

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK, 2014

Yüksek Lisans - Biyoloji Bölümü

SERDAR BURAK BÜLBÜL

**GAZİANTEP İLİNDEKİ BAZI MİKORİZAL
MANTARLAR ÜZERİNE BİYOAKTİVİTE
ARAŞTIRMALARI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SERDAR BURAK BÜLBÜL
OCAK 2014**

**Gaziantep İlindeki Bazı Doğal Mikorizal Mantarlar Üzerine
Biyoaktivite Araştırmaları**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL

Serdar Burak BÜLBÜL

Ocak 2014

©2014 [SERDAR BURAK BÜLBÜL]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Gaziantep İlindeki Bazı Mikorizal Mantarlar Üzerine Biyoaktivite Araştırmaları

Öğrencinin, Adı Soyadı: Serdar Burak BÜLBÜL

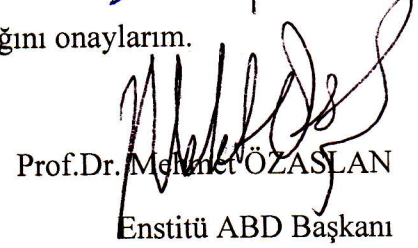
Tez Savunma Tarihi: 13.01.2014

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



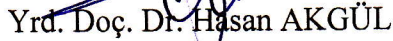
Doç.Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.



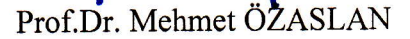
Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL

2. Tez Danışmanı



Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

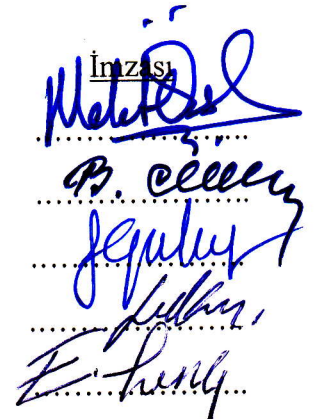
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Cengiz BAHADIROĞLU

Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Erdihan TUNÇ



İnzası
.....
.....
.....
.....
.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Serdar Burak BÜLBÜL

ABSTRACT

BIOACTIVITY RESEARCHES ON SOME OF THE NATURAL MYCORRHIZAL FUNGI IN GAZIANTEP PROVINCE

BULBUL, Serdar Burak

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

October 2014

49 Pages

In this study, we aimed that determine antioxidant, antimicrobial and DNA protective activity of *Helvella leucomelaena* and *Sarcosphaera crassa* fungus species with ethanol extract. To determine antioxidant activity Rel Assay Diagnostics kits were used (TAS, TOS) and DPPH method. For the test of antimicrobial activity 8 different bacteria species (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Escherichia coli* ATCC 35128, *Escherichia coli* ATCC 10799, *Escherichia coli* ATCC 8739) were used and studied with minimum inhibition method (MIC). DNA protect activity was determined with agarose gel electrophoresis. According to the results, not only DPPH but also Rel Assay Diagnostics kits didn't clean so much free radical in the extract of *Helvella leucomelaena* and *Sarcosphaera crassa*. When the antimicrobial test results were evaluated, it was determined that the extract of *S. crassa* more effective than the extract of *H. leucomelaena*. Also it was found that the applied concentrations have no protective activity against to pBR322 plasmid in the test of DNA protective activity. Consequently, it was determined that the extracts which obtained both fungi species have antioxidant and antimicrobial activity but no have protective effect on DNA.

Keywords: *Helvella leucomelaena*, *Sarcosphaera crassa*, Antioxidant, Antimicrobial, TAS, TOS, DPPH, DNA protective activity.

ÖZET

GAZİANTEP İLİNDEKİ BAZI DOĞAL MİKORİZAL MANTARLAR ÜZERİNE BİYOAKTİVİTE ARAŞTIRMALARI

BÜLBÜL, Serdar Burak
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Ocak 2014
49 Sayfa

Bu çalışmada, *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* mantar türlerine ait etanol özütlerinin antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antioksidan aktivitelerin belirlenmesin amacıyla Rel Assay Diagnostics kitleri (TAS, TOS) ve DPPH yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri için 8 farklı bakteri türü (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Escherichia coli* ATCC 35128, *Escherichia coli* ATCC 10799, *Escherichia coli* ATCC 8739) kullanılmış ve minimum inhibisyon metodu (MIC) ile çalışılmıştır. DNA koruyucu aktivite ise, agaroz jel elektroforezi metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mantar türlerinden elde edilen özütlerin, hem DPPH yöntemiyle hem de Rel Assay Diagnostics kitleriyle yapılan çalışmada önemli derecede serbest radikal temizleme aktivitesi göstermediği gözlenmiştir. Antimikrobiyal testler değerlendirildiğinde *S.crassa* özütünün test edilen bakteriler üzerine *H.leucomelaena* özütüne göre daha fazla bakteri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan DNA koruyucu aktivite testlerinde uygulanan konsantrasyonların pBR322 plazmid DNA üzerine etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Sonuç her iki mantar türünden elde edilen özütlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları ancak DNA üzerine koruyucu bir etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Helvella leucomelaena*, *Sarcosphaera crassa*, Antioksidan, Antimikrobiyal, TAS, TOS, DPPH, DNA koruyucu aktivitesi.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ve fikirleriyle beni yönlendiren değerli hocam Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'na teşekkürlerimi sunarım.

Bilgileriyle bana yardımcı olan ve her türlü desteği sağlayan, mantarların tür düzeyinde adlandırılmasını yapan Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL'e ve antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivite çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ hocama ve Biyolog Neşe ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans dönemi boyunca yardımlarını esirgemeyen Biyolog Mustafa SEVİNDİK'e, Biyolog Ali İmran KORKMAZ'a, Biyolog Ruşen AVŞAR'a ve Biyolog Esra ATACAN'a;

Bu çalışmada FEF.13.13 nolu proje ile maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine;

Maddi ve manevi alanda desteğini eksik etmeyen her zaman yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	i
ÖZET	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	viii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Reaktif Oksijen Türleri	4
1.2. Antioksidan Aktivite	8
1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	8
1.2.2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	14
1.3. Antimikrobiyal Aktivite	14
1.4. DNA Koruyucu Aktivite	15
1.5. <i>Helvella leucomelaena</i> ve <i>Sarcosphaera crassa</i> Mantarlarının Genel Özellikleri	16
1.5.1. <i>Sarcosphaera crassa</i> mantarının genel özellikleri	16
1.5.2. <i>Helvella leucomelaena</i> mantarının genel özellikleri	18
BÖLÜM 2	20
KAYNAK ÖZETLERİ	20
BÖLÜM 3	26
MATERYAL VE METOD	26
3.1. Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması	26
3.1.1. Materyal	26
3.1.2. Metod	26
3.2. Mantarların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod	26

3.2.1. DPPH Serbest Radikal Giderimi Yöntemiyle Antioksidan Özellik Kontrolü.....	26
3.2.2. Mantarların Total Antioksidan Aktivitelerinin (TAS) Belirlenmesi	27
3.2.3. Mantarların Total Oksidan Aktivitelerinin (TOS) Belirlenmesi.....	28
3.3. Mantarlar'ın Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod.....	30
3.3.1. Materyal	30
3.3.2. Test Mikroorganizmaları	30
3.3.3. Metod.....	30
3.4. Mantarların DNA Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod.....	31
3.4.1. Materyal.....	31
3.4.2. Metod.....	31
BÖLÜM 4	33
BULGULAR.....	33
4.1. <i>Helvella leucomelaena</i> ve <i>Sarcosphaera crassa</i> Mantar Özütlerinin DPPH, TAS ve TOS Aktivite Bulguları	33
4.1.1. <i>Helvella leucomelaena</i> Özütünün DPPH Serbest Radikallerini Süpürme Aktivite Bulguları	33
4.1.2. <i>Sarcosphaera crassa</i> özütünün DPPH Serbest Radikallerini Süpürme Aktivite Bulguları	34
4.1.3. <i>Helvella leucomelaena</i> ve <i>Sarcosphaera crassa</i> Mantarlarının TAS ve TOS Aktivite Bulguları	35
4.2. Mantarların Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	36
4.3. Mantarların DNA Koruyucu Aktivite Bulguları	38
BÖLÜM 5	39
TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41

TABLÖLAR LİSTESİ

SAYFA

Tablo 4. 1. Rell Assay Diagnostic Kit Referans Değerleri	35
Tablo 4. 2. <i>Helvella leucomelaena</i> ve <i>Sarcosphaera crassa</i> mantar özütlerrinin TAS ve TOS aktivitelerreri ($\mu\text{g/ml}$)	36
Tablo 4. 3. <i>Sarcosphaera crassa</i> ve <i>Helvella leucomelaena</i> mantar özütlerrinin antimikrobiyal aktivitesii	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1. 1 Tokoferollerin genel kimyasal görünümü.....	9
Şekil 1. 2. Flavonoidlerin genel kimyasal formülü	10
Şekil 1. 3. Genel bir fenolün kimyasal formülü	11
Şekil 1. 4. Askorbik asidin kimyasal formülü.....	12
Şekil 1. 5. β - karotenin kimyasal formülü.....	13
Şekil 1. 6. <i>Sarcosphaera crassa</i> (Jacq.) J. Schröt	17
Şekil 1. 7. <i>Sarcosphaera crassa</i> (Jacq.) J. Schröt spor görüntüsü	17
Şekil 1. 8 <i>Helvella leucomelaena</i> (Pers.) Nannf.	19
Şekil 1. 9 <i>Helvella leucomelaena</i> (Pers.) Nannf. spor görüntüsü	19
Şekil 4. 1. <i>Helvella leucomelaena</i> ekstraktının DPPH süperme aktivitesi	33
Şekil 4. 2. <i>Sarcosphaera crassa</i> ekstraktının DPPH süpürme aktivitesi	34
Şekil 4. 3. <i>Helvella leucomelaena</i> ve <i>Sarcosphaera crassa</i> mantar özütlerinin DNA koruyucu aktivitelerinin Jel elektroforezi.....	38

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

O₂⁻ : Süperoksit Radikali

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

BHA : Butillenmiş Hidroksi Anisol

BHT : Butillenmiş Hidroksi tolüen

DPPH : 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

TAS : Total Antioksidan Statüs

TOS : Total Oksidan Status

DNA : Deoksiribonükleik Asit

RNA : Ribonükleik Asit

ETS : Elektron Taşıma Sistemi

linDNA : Doğrusal DNA

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

MIC : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

CLSI: The Clinical Laboratory Standarts Institute

ocDNA : Open-circular DNA

UV : Ultraviyole

VIS : Görünür Işık

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Mantarlar ökaryotik canlılar olup klorofil içermeyen, spor oluşturan ve heterotrof yaşayan organizma grubudur. Saprofit, parazit veya mikorizal olarak yaşarlar. Dünyanın hangi iklim bölgesi ve neresi olursa olsun; dağlar, ovalar, denizler, sulak alanlar, orman alanları, tarım alanları, çayır ve meralar bilhassa toprakların üst tabakaları çeşitli canlı türleriyle iskân edilmiş durumdadır. Hali hazırda, biyosfer denilen dünyanın bu alanlarında yaklaşık 1.7 milyon canlı türü olduğu bilinmektedir (Wong, 2011). Bunlardan bitkiler ve mantarlar yaklaşık 500 milyon yıl önce okyanuslardan yeryüzündeki karalara ilk olarak dağılan canlılardır (Anonymous, 2011a). Bu zamandan beri mantarlar, bitkiler ve bunlarla diğer tüm canlılar arasında karşılıklı ilişkiler, insanın müdahalelerine rağmen, bugünün flora ve faunasının var olmasında önemli katkılar sağlamıştır. Özellikle floranın evriminde mantarlardan mikorizal türlerin dahil olduğu *Glomeromycota* mensubu türler ile *Basidiomycota* ve az da olsa *Ascomycota*' ya dahil türler önemli rol oynamışlardır. Bu bakımdan, mantarların birçok aktivitesi yanında özellikle çürükçül beslenme biçimleri ile yerkürede besin döngüsünün devamını sağlamakta olup, yaşamın devamı için oldukça önemlidir. Toprakta yaşayan mantar türleri, bitkilerin ve birlikte yaşayan hayvanların tiplerini belirlemiştir (Liang 2005). Mikorizal mantar çeşitliliği bitki çeşitliliğini, ekosistem varyabilitesini ve üretkenliğini belirler (Song vd., 2010). Kısaca, mantarların bitkilerle karşılıklı yarara dayanan bir beraberlik içinde yaşamaları yeryüzünde canlıların hayat bulmalarına büyük katkı sağlamıştır.

Mantarlar ve benzeri organizmalar kök, gövde, yaprak ve çiçek gibi bir organ özelleşmesi göstermezler. Vücutları mikroskobik düzeyde çok ince, ekseri enine bölmeli veya bölmesiz, bol miktarda dallara ayrılan, ipliksi hif yığınlarından oluşan misel olarak bilinen yapılardan ibarettir. Hifler ve bol miktarda oluşturulan hifsel dallar yaşanılan habitatın içerdiği besin maddeleri ile temas kurabilmek için uç kısımlarından büyürler. Mayalar ise hücresel büyüyen ve vücutları tek hücreden

ibaret olan mantarlardır. Ekseri Mantarlar hareketli olmasa da, *Chytridiomycota*'da, su küflerini içeren *Oomycota* ve akışkan küflerde hareketli dönemler mevcuttur.

Mantarlar ışığa bağımlı olmayıp, karanlık çevrelerde de büyüyebilirler. Eukaryotik yani gerçek çekirdekleri olan hücelere sahiptirler. Klorofilden yoksun oldukları için karbonlu besinler sentezleyemez ve bu yüzden karbonlu besinleri diğer canlılardan temin ederler. Çoğunlukla sulu, yüksek nemli, aerobik ve 4-7 arası pH'ya sahip çevrelerde saprotrof, nekrotrof ve biyotrof olarak beslenip yaşarlar. Besinlerini yiyerek değil de salgıladıkları enzimlerle suda eriyebilir hale getirdikten sonra emerek alırlar. Mantarlarda hücre duvarı kitin ve glukan'dan yapılmış olmasına karşın, *Oomycota*'da β -1,3- ve β -1,6-glukan ve selülozdan ibarettir. Mantarlar genellikle en uygun olarak oda sıcaklığında (22-24 °C) yaşasalar da, soğuk ve sıcak koşullara uyum sağlamış olanları mevcuttur. Sporlarla eşeyli ve eşeysiz olarak ürerler. Bitkiler ve hayvanlarda hastalıklara neden olurlar. Salgıladıkları zehirlerle bulaşık gıda ve yemler insan ve hayvanlar tarafından tüketildiğinde, bazen ölüme varan çeşitli ciddi rahatsızlıklara neden olurlar. Bunun yanında, fermentasyon olayındaki işlevleri ile insanların bira gibi içecekler hazırlamasında ve şarap yapımında yararlanırlar. Ekmek ve pasta pişirmede kullanılır, ayrıca besin olarak tüketilirler. Bazı türler tarafından üretilen antibiyotikleri içeren ilaçlar bakteriyel hastalıkların tedavisinde çığır açmıştır. Organik asit ve çeşitli enzim üretiminde yararlanırlar. Bilimsel çalışmalarda model organizmalar olarak kullanılmak suretiyle bilimsel keşiflere yol açmışlardır. Bitkiler ve alglerle ortak bir yaşam kurarak sırasıyla mikoriza ve liken oluştururlar. Böcek patojeni mantarların yanında mikoriza oluşumu ile bitkileri bazı kök patojenlerinden korumaları nedeniyle, bitki korumada biyolojik mücadele açısından önem kazanmışlardır. Bazı mantar türleri endofit olarak bitkileri kurağa toleranslı yapar, böcekler ve çayır-mera alanlarında otlayan hayvanlardan onları koruyabilirler. Mantarlar bu güne kadar saptanmış yaklaşık 72.000 tür ile yerkürenin sular dahil her tarafına dağılmış büyük bir çeşitliliğe sahip canlı grubudur (Alexopoulos et al. 1996; Anonymous 2009).

Mikoriza terimi ilk olarak 1885'te orman patoloğu A.B. Frank tarafından ağaç kökleri ve mantarlar arasında bir birlik olarak tanımlanmıştır. Yunanca kökenli *myco* ve *rhiza* kelimelerinin birleştirilmesiyle kök mantarı anlamında mikoriza terimi

oluşturulmuştur. Bitki türlerinin yaklaşık % 95'inin mikoriza ile birlik oluşturduğu düşünülürse mikorizanın birçok bitki için önemi anlaşılabilir (Mehrotra, 2005)

Mikorizal birlik, mantar-ağaç ortaklığı olarak bilinse de daha sonra mantarların otsu ve çalı formundaki bitkilerle de birlik oluşturduğu belirlenmiştir. 1887'de Ericaceae ve Orchidaceae familyalarının üyelerinde de mikorizal birliğin olduğu tespit edilmiştir. 1897'de günümüzde en yaygın mikoriza olarak bilinen arbusküler vesiküler mikoriza tanımlanmıştır. (Strack vd., 2003, Koide vd., 2004). Mantar ve bitki kökleri arasındaki mikorizal birlik doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu birliği oluşturan çok sayıda mantar türü belirlenmiştir. (Gosling vd., 2006)

Mikorizal mantarların bitki kılcal kökleriyle birlikteliğinde esas olarak endomikoriza ve ektomikoriza gibi iki ayrı tip mevcuttur. Endomikoriza durumunda mantar hifi, bitki kılcal kökünün kabuk hücreleri içine girerek orada ağaç benzeri bir dallanma gösterirken, hifin geri kalan kısmı kabuk dokusuna bitişik toprak içinde bir hifsel ağ oluşturur. Bitki kök hücresi içinde dallara ayrılarak ağaç benzeri "arbüskül" denen bir yapı oluşturdukları için endomikoriza'ya ayrıca "arbüsküler mikoriza" denir. Oysa ektomikoriza'da mantar hifleri bitki kılcal köklerinin kabuk dokusunu oluşturan hücreler arasına yerleşerek uzantıları ile kök yüzeyini manto gibi bir misel tabakası ile sarar. Kök yüzeyini kuşatan misel tabakasından bir kısım hifler ise endomikoriza da olduğu üzere köklere bitişik toprağın her tarafına yayılan bir ağ yapısı kurar. Ekseri ektomikorizal mantar türleri belli konukçu bitki türleriyle birlikler oluşturmaya meylederken, endomikorizal mantar türleri farklı konukçu bitki türlerinin yüzlercesi ile beraber olabilirler. Bu karakteristik nedeniyle binlerce ektomikorizal ve ancak 200 kadar endomikorizal mantar türü belirlenmiştir (Bonello 2001).

Mikorizal mantarın konak bitkiye en önemli faydası, bitkiye besin elementi temin etmesidir. (Strack vd., 2003). Mikorizal mantar özellikle P (fosfor) iletiminde oldukça etkilidir. P, bütün organizmalar için önemli bir makro besindir ve nükleik asit, fosfolipid, çok sayıda enzim ve koenzim için gerekli yapısal bir elementtir. Bu nedenle yeterli miktarlarda P'nin sağlanması, hücrel P dengesini sağlamak için oldukça önemlidir (Karandashov vd., 2005).

Makrofungusların antimikrobiyal etkilerine, fungal yapıda sentezlenen ve ekseriyetle organizmaya özgü fenolik bileşikler, purinler, pirimidinler, kuinonlar, terpenoidler ve fenil propanoid türevi antagonistik maddeler neden olmaktadır. Antitümoral etki gösteren en önemli maddeler ise kalvasin, volvotoksin, flammotoksin, lentinan ve porisin denilen yalnızca makrofunguslardan izole edilmiş maddeler olup aynı zamanda antiviral bileşiklerdir. (Alsheik vd.,1983)

Mantarların hipertansiyon, hiperkolesterol ve kanser gibi hastalıklara karşı koruyucu bir besin olarak kullanıldıkları bildirilmiştir. Bu karakteristik fonksiyonların temel nedeni kimyasal kompozisyonlarıdır (Manzi vd., 2001).

Günümüze kadar yapılan birçok bilimsel çalışma sonucunda farklı makrofungus türlerinin antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu ortaya konulmuştur (Boh vd., 2007; White vd., 2002; Solak vd., 2006).

1.1. Reaktif Oksijen Türleri

İnsan yaşamının vazgeçilmezlerinden olan oksijen metabolizma sırasında meydana gelen bazı bileşiklerden dolayı zararlı olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan bu bileşikler; O_2^- . (Süperoksit) radikali, H_2O_2 (Hidrojen peroksit), HO . (Hidroksil) radikali, $HOCl$ (Hipokloröz asit), tekli O_2 ($O_2^{\uparrow\downarrow}$), R . (Alkil radikali), ROO . (Peroksil radikali), $RCOO$. (Organik peroksit radikali), HO_2 . (Perhidroksil radikali), RO . (Alkoksil radikali) olarak sıralanabilir (Halliwell vd., 1998). Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali OH^-) hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksitlerdir (Kaur vd., 2001). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur.

Reaktif oksijen türleri:

1 - Radikaller:

Süperoksit radikal (O_2^-)

Alkoksil radikal (LO^-)

Peroksil radikal (LOO^{\cdot})

2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Lipid hidroperoksit ($LOOH$)

Hipoklorik asit ($HOCl$)

3 - Singlet oksijen şeklinde sınıflandırılır (Çavdar vd., 1997).

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir. (Sohol vd., 1993, Southarn vd., 1993) Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen vd., 1999). Bu patolojik olaylar oksidatif stres olarak da adlandırılmaktadır. Oksidatif stresin; lipid peroksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonu ve aktivasyonu, kanser, arterosklerozis, kardiyovasküler hastalıklar, sıtma, nörodejeneratif hastalıklar, böbrek bozuklukları, immun sistem bozukluğu, katarakt, DNA hasarını ve yaşlanmaya neden olan birçok etkileri olduğu saptanmıştır (Halliwell vd., 1997).

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkenlerin etkisiyle de oluşabilir. Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stress, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir (Schoneich vd., 1999, Bolzan vd., 1997).

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar gıdalarda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu okside olabilir diğer substratlara

oranla, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Aruoma, 1998).

McCord (1993), hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "reaktif oksijen türleri", süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir (Çavdar vd. 1997). Halliwell (1991), oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidlerin oluşumuna yol açar (Çavdar vd., 1997).

Çavdar vd. (1997), reaktif oksijen partiküllerinin kaynaklarını şu şekilde vermişlerdir;

I - Normal biyolojik işlemler

1 - Oksijenli solunum

2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon

2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi

a-) İnhale edilenler

b-) Alışkanlık yapan maddeler

c-) İlaçlar

3 - Oksidan enzimler

a-) Ksantin oksidaz

b-) İndolamin dioksijenaz

c-) Triptofan dioksijenaz

d-) Galaktoz oksidaz

e-) Siklooksijenaz

f-) Lipooksijenaz

g-) Monoamino oksidaz

4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Serbest radikallerdeki elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder (Gökpınar vd., 2006).

Halliwell ve Guttridge (1991), oksidasyon yaşayan çoğu organizmanın biyolojik sürecinde enerji üretimi için şarttır. Bununla birlikte kontrolsüz oksijen türevli radikallerin üretimi, kanser, eklem romatizması, siroz, damar tıkanıklığının yanı sıra yaşlanmayla süreciyle ilgili bozulmaları da içeren birçok hastalığın başlangıcını tetikler. İnsan vücudunda dış kaynaklı kimyasallar ve iç kaynaklı metabolizmik süreç ya da yiyecekler belki de serbest radikalleri özellikle biyomolekülleri okside etme yeteneğine sahip olan ve sonuçta hücreleri öldüren ve böylece dokulara zarar veren ROS'' ları yüksek derecede üretmektedir (Elmastaş vd., 2006). Serbest radikallerin

birikimiyle DNA'da meydana gelen oksidatif bozulmanın ve proteinler ile diğer makromoleküllerin zamanla birikimi, yaşlanmaya neden olan önemli iç faktörler olarak varsayılmaktadır (Harman, 1981). Halliwell ve Gutteridge (1999), lipid epoksidaz, hidroksiperoksidaz, alkoksil ve peroksil radikalleri ve lipid peroksidasyonu gibi etmenler mutajenikliği arttırmalarının yanı sıra yiyeceklerin renginin, tadının, yapısının ve besin değerinin bozulmasında da büyük bir rol oynarlar (Gezer vd., 2006).

Yaşlanmayla beraber antioksidan koruma mekanizmasında dengesizlikler meydana geldiği zaman, belki de fizyolojik fonksiyonlarda bozulmalar meydana gelerek sonuçta hastalıkları ve hızlı yaşlanmayı tetiklemektedir (Elmastaş vd., 2007). Bununla birlikte, antioksidan ilaveleri yada antioksidan içeren besinler belki de insan vücudundaki oksidatif zararı azaltmaya yardımcı olmaktadır (Yang vd., 2002). Ayrıca ROS'un neden olduğu hastalıklardan korunmada önemli roller oynarlar (Willcox vd., 2004).

1.2. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerini önemli ölçüde azaltabilen bileşiklerdir (Halliwell ve Aruoma, 1998).

Halliwell (1991), düzgün çalışan bir metabolizmada mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldaki organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korur. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda doğal enzimler devreye girer. Enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar ilk olarak hücre membranındaki lipidleri etkileyerek "lipid peroksidasyonu"nu başlatır. Lipid peroksidasyonunda, membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitlenir ki bu olay; PUFA'nın alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehitler hücre hasarına neden olur (Benzer ve Ozan 2003). Lipid peroksidasyonu sırasında yeterli düzeyde E vitamini (tokoferol) ve C vitamini (askorbik asit) gibi antioksidan vitaminlerin bulunması halinde bu tip hücresel hasarların önüne geçilebilir (Gökpınar vd., 2006).

1.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

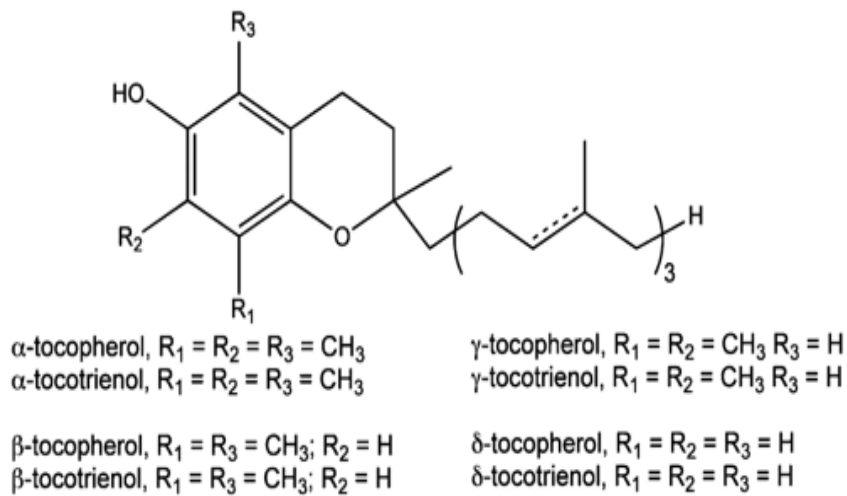
Doğal ve yapay antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

1.2.1.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanların başında tokoferoller, flavonoidleri fenolik asitler, askorbik asit ve karotenoidler gelir.

1.2.1.1.1. Tokoferoller

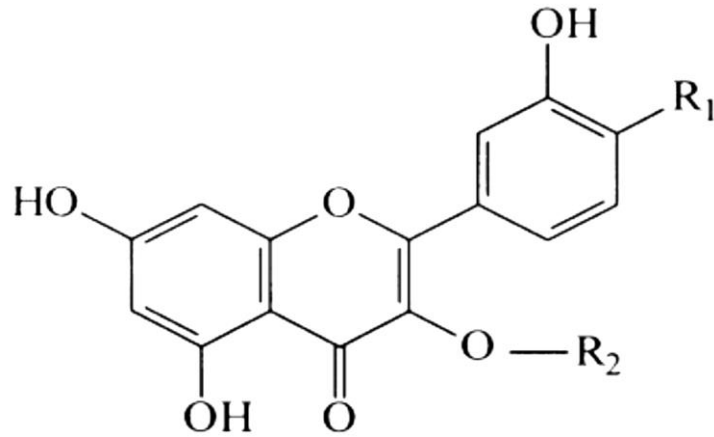
Lipid radikallerinin ve ROS'ların temizlenmesinde rol oynadığı bilinen tokoferoller biyolojik membranlarda özellikle kloroplastların tilakoid membranlarında yoğun olarak bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan dört izomeri arasında (α -, β -, γ - ve δ -) yer alan α tokoferoller; moleküler yapılarında üç metil grubu içermelerine sebebiyle en yüksek antioksidatif aktiviteye sahip olanıdır (Kamal-Eldin ve ark 1996, Wu ve ark 2007). Bu gruptaki en önemli antioksidan E vitamininin en aktif formu olan α -tokoferoldür (Can vd., 2005). α tokoferoller kloroplastlarda γ -tokoferolmetiltransferaz enzimi aracılığıyla γ -tokoferol'den sentezlenmektedirler. O_2^- gibi ROS çeşitlerine karşı membran kararlılığının korunmasında kritik öneme sahiptirler. Maslarova (2001), tokoferoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidatif aktivite göstermektedirler. α -Tokoferolün aynı zamanda hidroperoksitlerin dekompozisyonunu yavaşlattıkları da bilinmektedir. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dayanıklıdırlar. α -Tokoferolün oksidatif stabiliteyi artırmada ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (Can vd., 2005). Bir molekül tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir (Akkuş 1995).



Şekil 1. 1 Tokoferollerin genel kimyasal görünümü

1.2.1.1.2. Flavonoidler

Shi vd. (2001), flavonoidler, genellikle bitkilerde bulunan ve günlük diyetle sıklıkla tüketilen difenilpropanlardır. En önemli flavanoid kaynakları sebzeler, meyveler ve bunlara ait içeceklerdir (Can vd., 2005). Maslarova (2001), flavonoidler, C6–C3– C6 karbon iskeleti ile karakterize edilmektedirler. İki aromatik halka, üç karbonlu bir alifatik zincir ile birbirine bağlanmaktadır. Flavon, flavonol, izoflavon, flavonon ve çalkonları içeren flavonoidler tüm bitki dokularında bulunmaktadır. (Can vd., 2005). Shi vd. (2001), flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin, oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi oksidatif enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek ve süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri, hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler (Can vd., 2005).

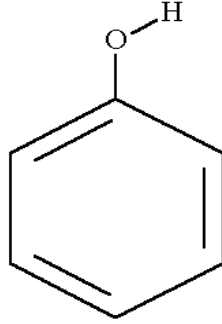


Şekil 1. 2. Flavonoidlerin genel kimyasal formülü

1.2.1.1.3. Fenolik Asitler

Fenoller basit fenol iskeletinin yapısıyla ilişkili olan karbon atomu sayılarına göre farklı gruplara (fenolik asitler ve flavonoidler) ayrılmaktadırlar. Bitkilerdeki en önemli ikincil metabolit gruplarından biri olan fenolik bileşikler antioksidan

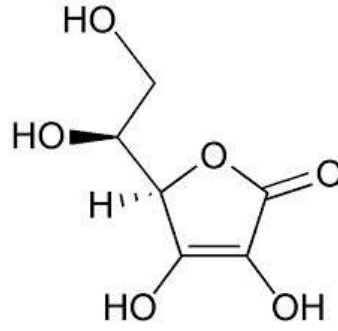
fonksiyona sahiptirler. Yapılan çalışmalarda; farklı çevresel faktörler ve stres koşulları altında fenilproponoid metabolizmasında ve fenolik bileşik miktarlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir (Temple vd., 2005, Quan vd., 2008). Flavonoidlerden biri olan izoflavonların ve diğer bazı flavonoidlerin sentezinin bitki enfekte olduğunda, yaralandığında, dşuk sıcaklıklar altında ve dşuk besin koşullarında artış gösterdiği belirlenmiştir (Peng vd., 2005). Aynı zamanda UV-B etkisinden korunmak amacıyla bitkilerin UV-absorbe eden flavonoidleri epidermal hücrelerin vakuollerinde biriktirdikleri de bilinmektedir. (Noctor vd., 1998, Beauchamp vd., 1971)



şekil 1. 3. Genel bir fenolün kimyasal formülü

1.2.1.1.4. Askorbik Asit

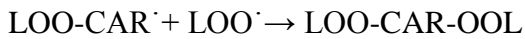
Askorbik asit bitkilerde ROS'a bağlı olarak meydana gelen hasarın etkilerini en aza indirmede ve önlemede rol oynayan hücrelerdeki en güçlü ve en bol antioksidandır (Athar vd., 2008, Foyer vd., 1995). C vitamininin meyvelerde bulunan en baskın formu askorbik asittir. Primer oksidasyon ürünü olan L-Dehidroksiaskorbik asit (DHA) de biyolojik aktiviteye sahip olduğu için önemlidir. Meyvelerdeki ortalama DHA miktarı, toplam C vitamini içeriğinin %10'undan azdır. Okside olmuş olan form dekompozisyona daha dayanıksız olduğu ve biyolojik aktivite kaybına yol açtığı için, askorbik asit formlarındaki değişiklikler hem teknolojik hem de besinsel açıdan önemlidir (Cordenunsi vd., 2004). Askorbik asit bitkilerde ROS'a bağlı olarak meydana gelen hasarın etkilerini en aza indirmede ve önlemede rol oynayan hücrelerdeki en güçlü ve en bol antioksidandır (Athar vd., 2008, Foyer vd., 1995).

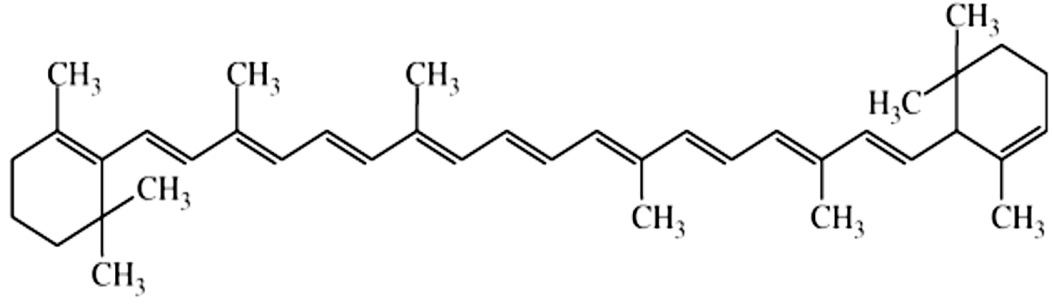


Şekil 1. 4. Askorbik asidin kimyasal formülü

1.2.1.1.5. Karotenoidler

Karotenoidler, sebze ve meyveler renk veren maddelerdir ve vitamin A öncülleri olarak antioksidan etkileri vardır. En önemlileri α - karoten, β -karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantindir. Bunlardan β - karoten, iki molekül vitamin A'nın (retinol) birleşmesinden oluşmuştur. Diyetteki β -karoten ince barsak mukozası tarafından emilirken retinole çevrilmektedir. β -karotenin antioksidan etkisi singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumasıdır. Singlet oksijenden enerji karotenoide aktarılmakta ve geçici bir ara molekül oluşmaktadır. Fotosensitif bir rahatsızlık olan eritropoietik porfiri de β - karotenin singlet oksijeni temizlemesi özelliğinden yararlanılmaktadır. β -karoten yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan olarak davranmakta ve proteazları aktive etmektedir. Ayrıca β -karoten diğer ROS'ları da etkisiz hale getirmektedir. Düşük oksijen basıncında β - karoten peroksil radikali ile direk reaksiyona girmekte ve bu durum yüksek oksijen basıncında vitamin E'nin aynı etkisi ile sinerji oluşturmaktadır (Baskin vd., 1997).





Şekil 1. 5. β - karotenin kimyasal formülü.

Niki vd. (1994), organizmaların hemen hemen tamamı serbest radikallerin zararlarına karşı süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi oksidatif enzimlerle yada α - tokoferol, askorbik asid, karotenoidler, polifenoller ve glutatyon ile iyi korunmaktadırlar (Mau vd., 2002). Simic (1988), hemen hemen tüm organizmalar antioksidan kökenli savunma ve tamir sistemine sahip olmasına rağmen bunların oksidatif zarara karşı koruyuculukları yaşlanmayla etkisini yitirerek zarara karşı koruyuculuğu etkisiz hale gelir (Türkoğlu vd., 2006). Sonuçta kanser, kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sistemi zayıflıkları, beyin fonksiyonları bozuklukları ve katarakt gibi vücudu dejenere eden hastalıklar baş gösterir (Ames vd., 1993).

Enstrom vd. (1992), Rimm vd. (1993), Stampfer vd. (1993), sebze ve meyvelerin C, E vitamini ve β -karoten gibi antioksidanlar bakımından zengin kaynaklar olduğu antiepidemiojik çalışmalarda antiaterojenik olduğu ileri sürülmüştür (Gezer vd., 2006). Liu vd. (2002), mantarlar genellikle serbest radikalleri süpürme etkisine sahip, polisakkaridler ve polifenoller gibi çok çeşitli moleküller barındırırlar (Cui vd., 2005).

1.2.1.2. Sentetik Antioksidanlar

En yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar butillenmiş hidroksidi anisol (BHA), butillenmiş hidroksidi toluen (BHT) ve üçüncü dereceden butillenmiş hidroksikinon (TBHQ)“ dur (Türkoğlu vd., 2006). Bütülenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütülenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde

kullanılmalarına ciddi sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir. (Yağcı vd., 2008, Köksal ve akr., 2007, Öztürk vd., 2002., Koşar vd., 2002).Hayvansal ürünlerde ve yağlarda lipid oksidasyonu raf ömrünü sınırlandıran temel faktördür. Bu sınırlandırmayı ortadan kaldırmak için BHA, BHT, TBHQ ve diğer sentetik antioksidanlar günümüze kadar geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Anılan maddelerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkiler göstermesi nedeniyle tüketici tercihleri doğal ürünlere kaymış ve aromatik bitkilerin antioksidan olarak kullanımı gündeme gelmiştir.

1.2.2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Gökpınar vd. (2006), antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanalara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

1.3. Antimikrobiyal Aktivite

Dünya nüfusunun giderek artması, beslenme ve sağlıkla ilgili sorunları da artırmıştır. Günümüzde bilim ve teknolojiye büyük ilerlemelere rağmen, doğal kaynakların bilinçsizce tüketimi ve karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların çok amaçlı kullanılmalarını zorunlu kılmıştır. Diğer taraftan enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede bugüne kadar geliştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin, mikropların direnç kazanmaları sonucu etkisiz kalmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunması, tıp ilmini yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yöneltmiştir. Doğal kaynaklar bakımından oldukça zengin olan ülkemizde sahip

olduğumuz en önemli değerlerden birisi de halkımızın tükettiği doğal bir besin durumunda olan makrofunguslardır (Duman ve ark., 2003)

Makrofungusların antimikrobiyal etkileri; fungal yapıda sentezlenen ve çoğunlukla organizmaya özđü bazı fenolik bileşikler, pürinler, primidinler, kinonlar, terpenoidler ve fenil proponoid türevi gibi antagonistik maddelerden kaynaklanmaktadır. Antitümorale etki gösteren en önemli maddeler ise; kalvasin, volvotoksin, flammütoksin, lentinan ve porisin denilen ve yalnızca makrofunguslardan izole edilmiş maddelerdir(Alsheik vd., 1983, Benedict vd., 1972).

1.4. DNA Koruyucu Aktivite

Stratosfer tabakasının tahrip olmasıyla dünyaya ulaşan UV ışınların canlılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Antioksidanlar ayrıca UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı koruma sağlamaktadırlar. UV ışınları cilt kanser ve cilt yaşlanmalarıyla sonuçlanan ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların topikal olarak (cilt üzerine) uygulanması cildi UV ışınların zararlı etkilerine karşı korumada etkili bir yaklaşımdır (Tepe v ark., 2011). Aslında insan derisi VIS (görünür ışınlar) ve UV ışınların zararlı etkisini azaltacak bir dizi mekanizmaya sahiptir. Ancak UV ışınlarla yüksek seviyede maruz kalma hücresele antioksidanların miktarında azalmaya ve sonuçta reaktif oksijen türlerinin neden olduğu UV-kaynaklı oksidatif DNA hasarına yol açabilmektedir. UV ışınların yanı sıra serbest radikaller de DNA hasarına yol açabilmektedir. Bir serbest radikal türü olan hidrojen peroksit, guanini, 8 hidroksi guanine dönüştürerek DNA hasarına neden olmaktadır (Gutteridge 1984). Kansere neden olan oksidatif DNA hasarını kontrol eden yeni bileşikler araştırmak için tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen özütler üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmaktadır (Feig vd., 1994).

1.5. *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* Mantarlarının Genel Özellikleri

1.5.1. *Sarcosphaera crassa* mantarının genel özellikleri

Divisio: Ascomycota

Classis: Pezizomycetes

Ordo: Pezizales

Familya: Pezizaceae

Genus : *Sarcosphaera*

Species: *Sarcosphaera crassa* (Jacq.) J. Schröt

Genellikle 15cm çapında, nadiren 5-10 cm çapında genç mantarın frükifikasyon organı oldukça düzensiz, gelişmiş bir dolmalık biber şekline benzer. Başlangıçta tamamen kapalı olan mantarın gelişmesiyle, tepe kısmında düzensiz bir açıklık meydana gelir. Bu açıklık giderek büyür ve mantar, bir çömlek şeklini alır ve toprakta çukurlar meydana getirir. Sapsız ve toprağa doğrudan bağlanır.

Renk: İç ve dış tarafı aynı renkte olup, kirli beyaz veya sarımsı kahverengidir.

Etli Kısım: Beyaz, ince, muma benzer ve kırılındır.

Tat ve Koku: Tatlı olup, toprak kokusuna benzer kokudadır.

Habitat: Çam ormanları içinde, özellikle güneş alan yerlerde, kalkerli topraklar üzerinde 2'li-3'lü bazen de 15-20'li gruplar halinde yetişir.

Besin Durumu: Zehirli.



Şekil 1. 6. *Sarcosphaera crassa* (Jacq.) J. Schröt



Şekil 1. 7. *Sarcosphaera crassa* (Jacq.) J. Schröt spor görüntüsü

1.5.2. *Helvella leucomelaena* mantarının genel özellikleri

Divisio: Ascomycota

Classis: Pezizomycetes

Ordo: Pezizales

Familya: Helvellaceae

Genus: *Helvella*

Species: *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.

Genellikle 2,5-3 cm çapında, subgluboz, kadeh veya fincan şeklinde uç kısımları tırtıklı, kısmen toprağa gömülü, ağzı dar veya oldukça yayvan ve yarılmış olabilir. Bu halde iki veya üç loblu hal alır ve aşağıya doğru kıvrımlı bir yapısı vardır. Yüzeyde genellikle ince granüllü yapı vardır. Mantar tabanda daha ince ve yukarı doğru ağız kısmı genişlemektedir.

Renk: İç kısım kahverengi, gri-siyahımsı kahverengi, dış kısım kurşuni kahve-krem rengindedir.

Etli kısım: Oldukça az (1-2 mm), beyaz, gevrek yapıda.

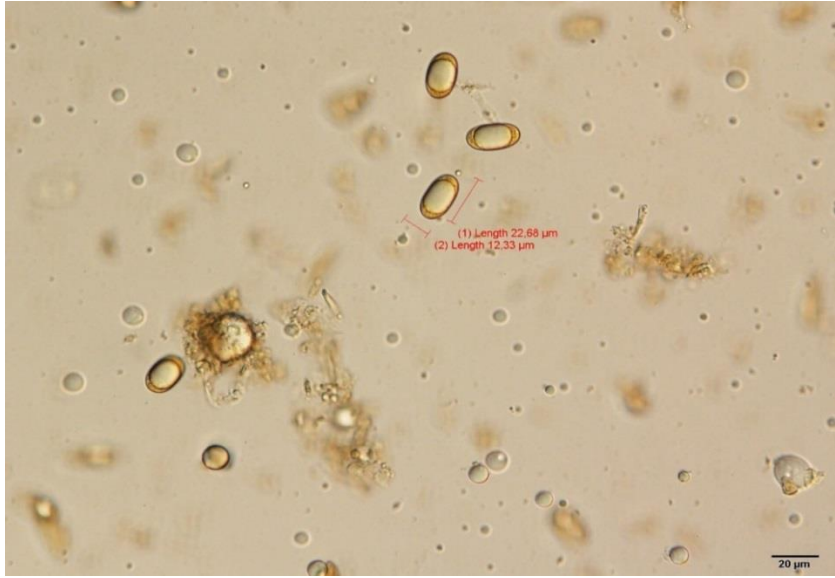
Tat ve koku: Kokusu yok denecek kadar azdır.

Habitat: İlkbahar aylarında çoğunlukla kalkerli topraklarda, Çam(*Pinus brutia*) ormanlarında toprak yüzeyinin biraz altında bol miktarda ve toplu halde yetişmektedir.

Besin durumu: Zehirsiz



Şekil 1. 8 *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.



Şekil 1. 9 *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf. spor görüntüsü

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Kılçık vd. (2013), yapmış olduğu bir çalışmada oksidatif stresten kaynaklanan DNA hasarına karşı *Silybum marianum*'un etken maddelerinden Silibinin'in (S) ve *Viscum album*'un ticari şekli olan Helixor'un (H) koruyucu ve tamir edici etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oluşturulan DNA hasarına karşı *Silibinin* ve *Helixor*'un maya hücrelerini koruduğunu göstermiştir. Uygulama sonucunda, her iki etken maddenin de 10 µg/mL'lık konsantrasyonda, hücrede koruyucu etki gösterdiği belirlenmiş ve Silibinin 10 µg/mL'lık konsantrasyonunun DNA tamir indüksiyonunu artırdığı bulunmuştur.

Berk vd., (2012) yapmış oldukları çalışmada *Myrtus communis*, *Pistacia vera*, *Ceterach officinarum*, *Arum maculatum*, *Inula oculus-christi* bitkilerinin DNA koruyucu aktivitelerini araştırmışlardır. *A. maculatum* haricinde diğer 4 bitki türünün UV ve H₂O₂ varlığında scDNA'yı koruyucu etkisinin olduğu belirlenmiş. Sonuç olarak çalışma kapsamında değerlendirilen söz konusu 4 bitki türünün yüksek DNA koruyucu aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Karaman vd. (2011), *Stachys iberica*, *Allium sivasicum*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum laevigatum*, *Teucrium polium* ve *Salvia hypargeia* bitkilerinden elde edilen su özütlerinin in vitro antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın ilk kısmında özütlerin antioksidan aktivitelerinin tespiti için, β-karoten-linoleik asit, fosfomolibdenyum, DPPH serbest radikal giderimi, indirgenme gücü ve şelatlama kapasitesi yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca özütlerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarları da belirlenmiştir. *O. laevigatum* özütü, DPPH ve fosfomolibdenyum metodlarına göre en yüksek aktiviteyi sergilemiştir. β-karoten-linoleik asit renk açılım testinde ise tüm bitki özütlerinin antioksidan aktivite değerlerinin sentetik antioksidanlar BHT ve BHA ile

karşılaştırılabilecek kadar yüksek olduğu görülmüştür. Metal şelatlama yönteminde *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* özütleri kayda değer bir aktivite göstermezken, en yüksek aktiviteyi *F. vulgare* su özütü sergilemiştir. İndirgeme gücü testinde ise en yüksek aktivite *A. sivasicum* su özütünden elde edilmiştir. *O. laevigatum*'un toplam fenolik bileşik miktarı yüksek bulunmuştur. Diğer yandan, *A. sivasicum*, flavonoidler açısından en zengin bitki olarak tespit edilmiştir. Özütlerin antimikrobiyal aktivite testlerinin sonucunda test mikroorganizmalarına karşı orta derecede aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bitki özütleri DNA koruyucu aktiviteleri açısından etkili bulunmuştur.

Kalyoncu vd. (2010), Türkiye'nin özellikle Akdeniz bölgesinden toplanan 21 doğal makrofungus türünden (*Agaricus bresadolanus*, *Auricularia auricula-judae*, *Chroogomphus rutilus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Gymnopus dryophilus*, *Infundibulicybe geotropa*, *Inocybe flocculosa crocifolia*, *Inocybe catalaunica*, *Lentinula edodes*, *Lentinus sajor-caju*, *Lycoperdon excipuliforme*, *Macrolepiota excoriata*, *Morchella esculenta rigida*, *Morchella intermedia*, *Omphalotus olearius*, *Pleurotus djamor*, *Postia stiptica*, *Rhizopogon roseolus*, *Stropharia inuncta*) elde edilen misellerin antimikrobiyal aktivite potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma neticesinde, kullanılan makromantar türleri içinde *Ganoderma lucidum* en etkili tür olarak belirlenmiştir.

Mantar özütleri ile ilgili yapılan çalışmalardan Yalıtırak ve ark (2009), '*Russula delica* Fr Antimikrobiyal ve Antioksidan aktiviteleri' adlı çalışmalarında *Russula delicia* FR ekstraktının gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Demirhan vd. (2007) *Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex Fr.) Kum., *Pleurotus florida* Fovose, *Schizophyllum commune* Fr; *Helvella leucomelaena* (Pers) Nannf. ve *Amanita virosa* (Fr.) Bertillon'un etil asetat, kloroform, aseton ve etil alkol ekstraları hazırlanarak disk diffüzyon yöntemi ile *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27857' ye karşı bu ekstraların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. En yüksek antibakteriyal aktivite; *E. coli*' de *P. florida*' nın kloroform çözgeninde 13,33 mm; *S. aureus*' da *S. commune*' nin etil asetat çözgeninde 13, 33 mm ve *P. aeruginosa*' da ise *H. leucomelaena*' nın kloroform çözgeninde ise 14 mm çap olarak saptanmıştır.

Ufuk vd. (2007), *Tricholoma anatolicum* Doğan & İntını ve *Centharellus cibarius* FR.' un antioksidan, antimikrobiyal etkilerinin ve yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi adlı yüksek lisans tezinde *C. cibarius* ile *T. anatolicum* mantarlarının, DPPH radikallerini süpürme etkisi, β - karoten- linoleik asit sistemindeki etkisi, indirgeme gücü, toplam fenolik içeriği ve CUPRAC ile toplam antioksidan kapasitesi gibi deneylerle antioksidan aktivitelerinin belirlenmesini amaçlamıştır. Linoleik asit sisteminde mantarların ekstraktlarının ve standartların artan konsantrasyonu ile orantılı olarak inhibisyon değerlerinin arttığı gözlemlendi. Fenolik madde miktarı *C. cibarius*' da $0,5391 \pm 0.10$ mg ml⁻¹ ve *T. anatolicum*' da $0,265$ mg ml⁻¹ (Gallik asit eş değeri) olarak bulundu. DPPH radikallerini süpürme etkisi 250 μ g/ml' de *C. Cibarius*' da % 91 ve *T. anatolicum*' da % 90 olarak bulundu. *C. cibarius*' un indirgeme gücü 0,4 mg/ml' de 0,5' den daha yüksek bir absorban vererek mükemmel bir antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. *C. cibarius* ve *T. anatolicum*'un hekzan, aseton, kloroform ve metanolik ekstraktları 6 Gram pozitif, 4 Gram negatif bakteriye ve 1 mayaya karşı denendi. Mantarların yeterli antimikrobiyal etkisinin olmadığı görüldü.

Solak ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada ise *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. ve *Rhizopogon roseolus*'un çeşitli çözümlerle hazırlanan ekstraktlarının agar disk difüzyon metodu ile bazı mikroorganizmalar üzerine denendiği bu çalışmada her iki mantarın da metanolik ekstraktları *E. coli* (15-13mm), *Bacillus subtilis* (25-18mm) ve *Enterobacter aerogenes* (25-16mm)'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca *C. Alexandri*' nin etilasetat ekstraktı *Candida albicans* (14mm) ve *Saccharomyces cerevisiae* (12mm) mayalarına karşı etkili olduğu bulunmuştur.

Gao vd. (2005), tıbbi bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin çoğunun antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Harris vd., 2001) ve bu bitkilerdeki antimikrobiyal kimyasallar terpenler, steroidler, flavonlar, saponinler, komarinler ve alkaloidler gibi farklı sınıfları içerir (Srivastava vd., 2000).

Hur ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada *P. linteus*' un Bütanol fraksiyonu *Staphylococcus aureus*' un metisillin dirençli tüm suşlarına karşı (MIC, 63–125 μ g/ml) iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Son zamanlarda *Grifola frondosa* (Dicks. : Fr.) S.F. Gray" nın ve *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers.'un da içinde bulunduğu özel mantarların antitümör, immuno düzenleyici ve kronik bronşit gibi hastalıklar üzerine tedavi edici etkisi gibi tıbbi aktiviteleri bulunmuştur (Mau vd., 2002, Wasser ve Weis 1999).

Dülger vd. (1999) *Tricholoma terreum* (Fr.) Kummer'dan hazırlanan etil asetat, aseton, kloroform ve etanol ekstraktları disk difüzyon metoduna göre *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Listeria monocytogenes* ATCC 191 17, *Escheiichia coli* ATCC 11230, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Corynebacterium xerosis* CCM 2824, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13022, *Roteus vulgaris* ATCC 8427, *Serratia marcescens* NRRL 3284, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6538P, *Stapylococcus epidermidis* NRRL B4877, *Alcaligenes faecalis* CCM *Alcaligenes eutrophus*, *Salmonella parathyphi* B, *Salmonella thyphi* ATCC 19430, *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Klebsiella pneumoniae* UC57, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus flavus* ATCC 14452, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Bordatella bronclüseptica* ATCC 4617, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas extorquens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas campestris*, *Kluyveromyces fragilis* NRRL 2415, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida utilis* LA 991, *Hansenula sp.*, *Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.* ve *Torula sp.* üzerinde antagonistik etkileri denenmiştir. Çalışmanın sonucunda *Tricholoma terreum* (Fr.) Kummer ekstraktlarının araştırmada kullanılan Gram (+) ve (-) bakterilere karşı antagonistik etki içermesine rağmen, maya kültürleri üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Ichimura vd., (1998), aktif iki mantar bileşiği olan polisakkaridler ve peptidoglukan kimyasal yapısı ve izolasyonu gibi çalışmalarla en çok araştırılan konu olmaya devam eden farmakolojik olarak aktif iki mantar bileşiğidir. On yıl önceki araştırmalarda *L. edodes*'in lentinanının, *Schizophyllum commune*" nin Şizofilanının, *Grifola frondosa* (Dickson:Fr.) S.F.Gray' nın grifolanının ve *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary' un beta-1,3-glukanının önemli ölçüde antitümör aktiviteleri olduğu bulunmuştur (Fan vd., 2006). *G. pfeifferi* ve diğer *Ganoderma* türlerinden izole edilen ganodermediol, lusedadiol ve applanoksidik asid G, influenza

virüs tip A'ya karşı antiviral aktivite göstermişlerdir. Dahası, ganodermadiol uçuk ve diğer semptonlara neden olan herpes simpleks virüs tip 1" e karşı antiviral aktivite göstermiştir (Mothana vd., 2003). *Trametes versicolor* (L.) Lloyd'den izole edilen protein bağlı polisakkaridler olan PSK ve PSP'nin hücrede HIV'e ve sitomegalovirüse karşı antiviral etki göstermiştir

Dülger vd. (1998) *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. makrofungusundan elde edilen aseton, etil asetat, kloroform ve etanol ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon metoduna göre *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11230 *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Corynebacterium xerosis* CCM 2824, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13022, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Serratia marcescens* NRRL 3284, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus brevis* ATCC 9999, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Sarcina lutea*, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4877, *Alcaligenes faecalis* CCM 3763, *Alcaligenes eutrophus*, *Salmonella paratyphi* B, *Salmonella thyphi* ATCC 19430, *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Klebsiella pneumoniae* UC57, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus flavus* ATCC 14452, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas extorquens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida*, *Kluyveromyces fragilis* NRRL 2415, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida utilis* LA 991, *Hansenula sp.*, *Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.* ve *Torula sp.*, üzerinde denemışlerdir. Çalışma sonucuna göre, *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. ekstralarının bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antimikrobiyal bir aktivite içermesine rağmen çalışmada kullanılan maya kültürlerine karşı bir antagonistik aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır.

Dülger vd. (1997) *Russula delica* Fr. makrofungusundan Etil asetat, Aseton, Kloroform ve Etanol ekstraları hazırlanarak disk difüzyon metoduna göre *Escherichia coli* ATCC 11230, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4377, *Micrococcus*

luteus La 2971, *Micrococcus flavus* ATCC 14452, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus*, ATCC 7064, *Bacillus brevis* ATCC 9999, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Corynebacterium xerosis* CCM 2824, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Klebsiella pneumoniae* UC57, *Proteus vulgaris* ATTC 8427, *Xanthomonas campestris*, *Candida utilis* La 991, *Candida albicans* ATCC 10231, *Kluyveromyces fragilis* NRRL 2415, *Hansenula sp.*, *Debaryomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ve *Rhodotorula rubra* üzerinde antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre *Russula delica* Fr. Özellikle başta *Corynebacterium xerosis* CCM 2824 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 olmak üzere bazı Gram (+) ve (-) bakterilere ve bazı mayalara özellikle *Kluyveromyces fragilis* NRRL 2415 ‘e karşı bir antimikrobiyal aktivite içerdiği saptanmıştır.

Avrupada *G. pfeifferi* Bres.’ den üretilen Ganomisin olarak adlandırılan terpenoid methisillin antibiyotiği dirençli *Staphylococcus aureus* ve diğer bakterilerin gelişmelerini inhibe etmiştir (Mothana vd., 2000).

Breene (1990), tüm mantarlar arasında birkaç türün ya da ekstraktlarının antitümör aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Bu türler: *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., *Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underw, *Collybia confluens* (Pers: Fr.) Kummer, *Coriolus versicolor* (Linnaeus) Fries, *Flammulina velutipes* (Curtis : Fries) Singer., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst., *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai, *Pleutorus ostreatus* (Pers. ex. Fr.) Konr. et Maubl., *Schizophyllum commune* Fr., *Tremella fuciformis* Berk., *Tricholoma matsutake* (S.Ito. et Imai) Sing. ve *Volvariella volvacea* (Bulliard: Fries) Singer.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

Çalışma materyalini, Gaziantep ili içerisindeki bazı türlere ait mikorizal mantar örnekleri oluşturmuş olup yöre halkı tarafından pek rağbet görmeyen mantar türleridir. Mantarlardan *S.crassa* ve *H.leucomelaena* ilkbaharda Gaziantep Üniversitesi kampüsünden toplanıp Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün'de Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL tarafından teşhis edilmiştir.

3.1. Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması

3.1.1. Materyal

Etanol (C₂H₆O), soxhlet, evaporatör.

3.1.2. Metod

Mantarlar laboratuvarında açık havada kurutulduktan sonra bir parçalayıcı ile toz haline getirildi. Daha sonra 40 g mantar materyali sokslet aparatında yaklaşık olarak 6 saat süreyle 75 C⁰'de etanol ile özütler çıkarıldı. Elde edilen özütler daha sonra basınç altında rotary evaporatörle yoğunlaştırılıp, +4 derecede deney yapılana kadar saklandı.

3.2. Mantarların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod

3.2.1. DPPH Serbest Radikal Giderimi Yöntemiyle Antioksidan Özellik Kontrolü

3.2.1.1. Materyal

DPPH, DMSO, Distile su, Thermo Scientific Multiskan Go(Vantaa, Finland)
Spektrofotometre, Elizaplate.

3.2.1.2. Metod

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil(DPPH), 517 nm’de maksimum optik absorbansa sahip, stabil bir serbest radikaldir. Serbest radikal süpürücüyle DPPH’ın reaksiyonu, 517 nm’deki absorbans değerinde düşüşe neden olur(A. Varada Reddy et al: J. Chem. Pharm. Res., 2010, 2(1): 292-299). 10mg/ml bileşik içeren stok çözeltiler, DMSO’da hazırlandı. Çözeltinin 50µl’si 160µl %0.039’luk DPPH’a eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 517nm’de absorbans okundu.

3.2.1.3. Hesaplamalar

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Abs kör} - \text{Abs örnek})}{\text{Abs kör}} \times 100$$

3.2.2. Mantarların Total Antioksidan Aktivitelerinin (TAS) Belirlenmesi

Reaktif oksijen türleri metabolik ve fizyolojik süreçler sonucunda oluşur ve zararlı oksidatif reaksiyonlar, enzimatik veya enzimatik olmayan süreçlerle organizmadan uzaklaştırılır. Belirli koşullar altında, oksidanlardaki artma veya antioksidanlardaki azalma, önlenemez. Bu durumda, 100’den fazla hastalık gelişebilir. Antioksidan moleküller bu zararlı reaksiyonları ya inhibe eder ya da engeller.

Burada kullanılan metodun amacı, tetkik edilmek istenen örneğin antioksidan kapasitesini belirlemektir. Örnekteki antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli ABTS’yi renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürür. 660 nm absorbanstaki değişim örneğin total antioksidan seviyesini belirtir. Bu test, ticari olarak trolox olarak adlandırılan E vitamini analoguyla kalibre edilir.

Örnek olarak, kan serumu, plazma, üre, hücre lizatı, doku homojenatı meyve suları, mantar özütleri ve yağlar kullanılabilir.

Bu çalışmada Rel Assay Diagnostics- TAS Assay Kit kullanıldı.

Kit içerisinde; Reagent 1 (Buffer)

Reagent 2 (Renkli ABTS Radikal Solüsyon)

Standart 1 (0,0 mmol troleks Equiv./L)

Standart 2 (1.00mmol troleks Equiv./L)

3.2.2.1. Materyal

TAS assay kit, Mantar özütleri, Spektrofotometre

3.2.2.2. Metod

Bir eliza plate alındı ve Reagent 1'den 200 µl alınır ve kuyucuğa eklendi. Üzerine 12 µl mantar örneği konuldu. 660nm'de absorbans ölçümü yapıldı(Örneğin birinci absorbansı) ve üzerine 30 µl Reagent 2 ilave edildi. 5 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 660nm'de ikinci absorbans alındı. (Örneğin ikinci absorbansı) İstenilen durumlarda referans olarak C vitamini de kullanıldı. Aynı işlemler C vitamini için de yapıldı. Kit içerisindeki standart 1 ve standart 2 için de aynı düzende ölçümler alındı.

3.2.2.3. Hesaplamalar

Δ Abs std 1: std1'in ikinci absorbansı- std1'in birinci absorbansı

Δ Abs std 2: std2'in ikinci absorbansı- std2'in birinci absorbansı

Δ Örnek abs: Örneğin ikinci absorbansı- örneğin birinci absorbansı

SONUÇ: $[\Delta$ abs std1- Δ abs örnek]/[Δ abs std1- Δ abs std2]

3.2.3. Mantarların Total Oksidan Aktivitelerinin (TOS) Belirlenmesi

Metabolik ve fizyolojik süreçlerde, reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretilir ve bunlar enzimatik veya enzimatik olmayan süreçlerle uzaklaştırılır. Belirli koşullar altında, oksidanlardaki artma veya antioksidanlardaki azalma, önlenemez. Bu durumda, 100'den fazla hastalık gelişebilir. Antioksidan moleküller bu zararlı reaksiyonları ya inhibe eder ya da engeller. Burada kullanılan metodun amacı tetkik edilmek istenen örneklerin oksidan potansiyelini tespit etmektir. Örnekte bulunan oksidanlar, demir iyonu şelat kompleksini demir iyonuna yükseltir. Yükseltgenme reaksiyonu, ortamda bulunan arttırıcı moleküllerle uzatılır. Demir iyonu, asidik bir ortamdaki kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Bu rengin şiddeti, spektrofotometrik olarak ölçülebilir ve örnekte bulunan oksidan molekül miktarıyla ilişkilidir. Bu test, hidrojen peroksit ile kalibre edilir. Örnek olarak, kan serumu,

plazma, üre, hücre lizati, doku homojenati meyve suları, bitki özütleri ve yağlar kullanılabilir.

Bu çalışmada Rel Assay Diagnostics- TOS Assay Kit kullanıldı.

Kit içerisinde; Reagent 1 (Assay buffer)

Reagent 2 (Prokromojen solüsyon)

Standart 1 (Blank solüsyon:distile su)

Standart 2 (stok stabilize standart solüsyon(SSSS): 800mM H₂O₂ Equiv./L)

3.2.3.1. Materyal

TOS assay kit, Mantar özütleri, Spektrofotometre.

3.2.3.2. Metod

Standart 2 distile su ile 40 kez seyreltildi. Bunun için std 2'den 5 µl ependorfa alındı ve üzerine 1ml distile su eklenip, vortekslendi. Bu çözeltilerden de 5 µl alındı ependorfa konuldu ve üzerine 1ml su eklendi. Sonuçta 20 µmolar H₂O₂ hazırlanmış oldu. Bu çözelti her seferinde yeniden hazırlandı. Eliza plate alındı ve kuyucuğa ilk olarak 200µl Reagent 1 konuldu. Üzerine 30µl örnek eklendi. 530nm'de ilk absorbans alındı(örneğin birinci absorbansı). Ölçümden sonra 10µl Reagent 2 eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk veya 37°C'de 5 dk bekletildi ve 530nm'de ikinci absorbans alındı. Aynı işlemler standart 2 için de tekrarlandı.

3.2.3.3. Hesaplamalar

Δ Abs std 2: std2'in ikinci absorbansı- std2'in birinci absorbansı

Δ Örnek abs: Örneğin ikinci absorbansı- örneğin birinci absorbansı

SONUÇ: (Δ abs örnek/ Δ abs std 2)x20

3.3. Mantarlar'ın Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod

3.3.1. Materyal

Eliza pleyt, mikropipet

3.3.2. Test Mikroorganizmaları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların tamamı Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Mantarların antimikrobiyal aktivitesi, 8 farklı bakteri; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Escherichia coli* ATCC 35128, *Escherichia coli* ATCC 10799, *Escherichia coli* ATCC 8739 üzerinde denendi.

3.3.3. Metod

Her bir örnekten 72 mg tartıldı ve üzerine 1 ml dH₂O konulur. Böylece 72 mg/ml'lik stok örnek hazırlanmış olur. Platelardaki her bir kuyucuğa 100 µl MHB sıvı besiyeri konuldu ve her sıranın ilk kuyucuğuna hazırlanan örneklerden 100 µl eklendi. Pipetaj yapıldı. İlk kuyucuktan 100 µl çekildi ve 2. kuyucuğa aktarıldı. Sırasıyla aynı işlemler 12. Kuyucuğa kadar uygulanarak dilüsyon yapıldı. 12. Kuyucukta pipetaj sonrası 100 ul örnek alındı ve atıldı. Son olarak tüm kuyucuklara çalışılan 100 µl 0.5 Mc farland bakteri örneği (ölçüleme yapıldıktan sonra) eklendi. Örnekler 24 saat 37 °C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası sonuçlar okunarak değerlendirildi. Bu değerler göz önüne alınarak bitkilerin antibakteriyel aktivite gösterdiği minimum madde konsantrasyonu (MIC) hesaplandı.

(Bakteri kalibrasyonu fizyolojik serumda seyreltilerek Makfarland (Biomerieux) cihazında ölçülerek yapıldı. 0.5)

3.4. Mantarların DNA Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesinde İzlenen Materyal ve Metod

3.4.1. Materyal

Pbr322 DNA(vivantis), H₂O₂, % 1.5'lik agoroz jel, distile H₂O, UV translüminatör (DNR-IS), jel dökümantasyon sistemi (DNR-IS, MiniBIS Pro)

3.4.2. Metod

Özütlerin, DNA'yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmid DNA'si (vivantis) kullanılmıştır. Plazmid DNA'sı, özütlerin varlığında H₂O₂ ve UV uygulanarak hasara uğratılmıştır. Russo vd. (2000) tarafından belirlenen metod uyarınca % 1.5'lik agoroz jel üzerinde görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Özütlerin % 5.0'lik ve % 7.0'lik stok derişimlerinin hazırlanması amacıyla özütlerden sırasıyla 50mg tartılarak üzerlerine 1000 µl distile su eklenmiştir. Özütün, tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.%5'lik mantar özütü solüsyonundan yapılan seyreltmeler yapılmıştır.

1/5 oranında seyreltme için 10 µl özüt üzerine 40 µl dH₂O eklenmiştir.

1/ 2,5 oranında seyreltme için 20 µl özüt üzerine 30 µl dH₂O eklenmiştir.

1/ 1,25 oranında seyreltme için 40 µl özüt üzerine 10 µl dH₂O eklenmiştir.

Kontrol ve özütlerin hazırlanması:

1. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)
2. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV
3. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl)
4. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ H₂O₂ (1 µl)
5. Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl)
6. Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl)

7. Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl)

5 nolu tüpe 1/1.25, 6 nolu tüpe 1/ 2.5, 7 nolu tüpe 1/5, oranında seyreltme yapılan mantar özütlerinden 5.0 µl konulmuştur. Tüplerin içerisine 3.0 µl pBR322 plazmid DNA'sı (172 ng.µl) ve 1.0 µl % 30'luk H₂O₂ konulmuştur. Mantar özütlerinin olduğu tüpler, 3. ve 4. tüpler ile birlikte 5 dk süresince UV ışınlarına maruz bıraktıktan sonra 2.0 µl yükleme tamponu eklenerek % 1.5'lik agaroz jele yüklenmiştir. Işık kaynağı olarak oda sıcaklığında 302 nm dalga boyunda ve 8000 µW/cm yoğunlukta ışık üreten UV translüminatör (DNR-IS) cihazı kullanılmıştır. % 1.5'lik agaroz jel eketroforezi uygulamasından sonra jel dökümantasyon sisteminde (DNR-IS, MiniBIS Pro) görüntülenerek fotoğrafları elde edilmiştir. Bu test sisteminde kontrol olarak, UV ve H₂O₂ uygulaması yapılmamış pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

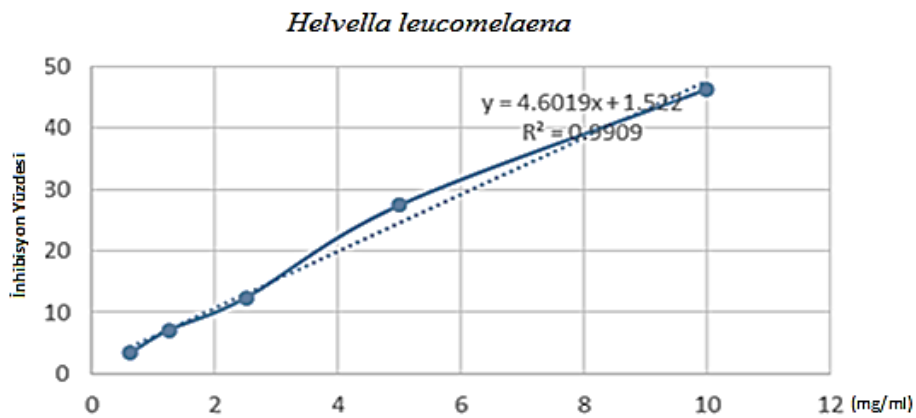
BULGULAR

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda açıklanmıştır. *Sarcosphaera crassa* ve *Helvella leucomelaena* mantar özütleri sokshlet cihazı ile elde edilmiş olup özüt verimleri sırasıyla %5.43 ve % 4.25 olarak belirlenmiştir.

4.1. *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* Mantar Özütlerinin DPPH, TAS ve TOS Aktivite Bulguları

4.1.1. *Helvella leucomelaena* Özütünün DPPH Serbest Radikallerini Süpürme Aktivite Bulguları

Helvella leucomelaena özütünün DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar şekil 4.1.'deki gibi şematize edilmiştir.

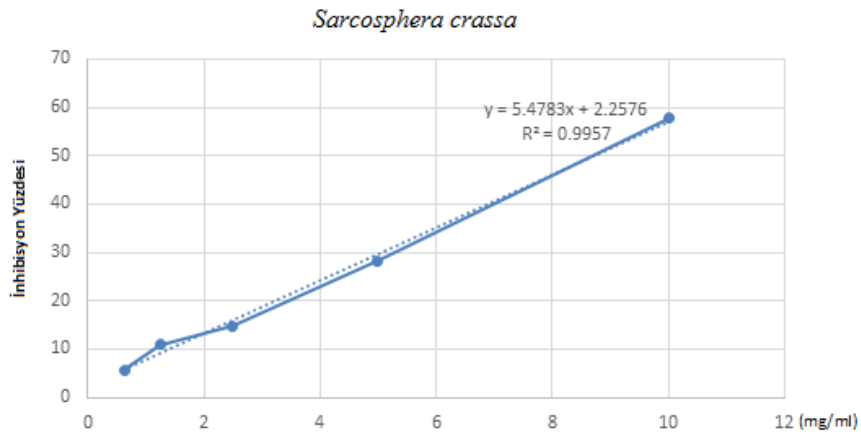


Şekil 4. 1. *Helvella leucomelaena* ekstraktının DPPH süpürme aktivitesi

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi *Helvella leucomelaena*’dan elde edilen özütlerin DPPH ortamdan ortamdan süpürme başarısı özüt konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılıdır. Belirlenen özüt konsantrasyonlarından en yüksek aktivite 10 mg/ml konsantrasyonda % 46.31, en düşük aktivite 0,625 mg/ml konsantrasyonunda %3,46 olarak tespit edilmiştir.

4.1.2. *Sarcosphaera crassa* özütünün DPPH Serbest Radikallerini Süpürme Aktivite Bulguları

Sarcosphaera crassa özütünün DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi belirlenmiş olup elde edilen veriler şekil 4.2.’ deki gibi şematize edilmiştir.



Şekil 4. 2. *Sarcosphaera crassa* ekstraktının DPPH süpürme aktivitesi

Şekil 4.2.’de görüldüğü gibi *Sarcosphaera crassa*’dan elde edilen özütlerin DPPH ortamdan süpürme başarısı özüt konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılıdır. Belirlenen özüt konsantrasyonlarından en yüksek aktivite 10 mg/ml konsantrasyonda % 57,8, en düşük aktivite 0,625 mg/ml konsantrasyonunda %5,68 olarak tespit edilmiştir.

4.1.3. *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* Mantarlarının TAS ve TOS Aktivite Bulguları

Çalışmamızdaki mantar özütlerinin TAS ve TOS aktivitelerinin belirlenmesi için Relassay kitleri kullanılmış olup bu kitlerin referans değerleri Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 4. 1. Rell Assay Diagnostic Kit Referans Değerleri

TAS REFERANS DEĞERLER		
(mmol Trolox Equiv./L)		
>2.0		Çok İyi
1.45	2	Normal
1.2	1.45	Normal Kabul Edilebilir
1	1.2	Düşük Antioksidan Seviyesi
<1.20		Çok Düşük Antioksidan Seviyesi
TOS REFERANS DEĞERLER		
($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)		
<5.00		Çok İyi
8	5	Normal Değer
12	8	Yüksek Oksidan Seviyesi
>12.00		Çok Yüksek Oksidan Seviyesi

	TAS (Total Antioksidan Status)	TOS (Total Oksidan Status)
<i>Helvella leucomelaena</i>	0.79	20.86
<i>Sarcosphaera crassa</i>	0.57	13.64

Tablo 4. 2.: *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* mantar özütlerinin TAS ve TOS aktiviteleri ($\mu\text{g/ml}$)

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi mantar özütlerinin TAS (Total antioksidan status) ve TOS (Total oksidan status) aktiviteleri “Rell Assay Diagnostic” kitleri ile belirlenmiştir. *Helvella leucomelaena* etanol özütünün TAS aktivitesi 10 mg/ml konsantrasyonunda 0,79, TOS aktivitesi 20.86 olarak belirlenmiştir. *Sarcosphaera crassa* etanol özütünün ise TAS aktivitesinin 10 mg/ml konsantrasyonunda değeri 0.57, TOS aktivitesi 13.64 olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda her iki mantar özütünde önemli derecede antioksidan ve oksidan aktivite göstermediği belirlenmiştir.

4.2. Mantarların Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Özütlerin MİK değerlerinin belirlenebilmesi için CLSI (The Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2013). Sonuçlar Tablo 3’ de verilmiştir.

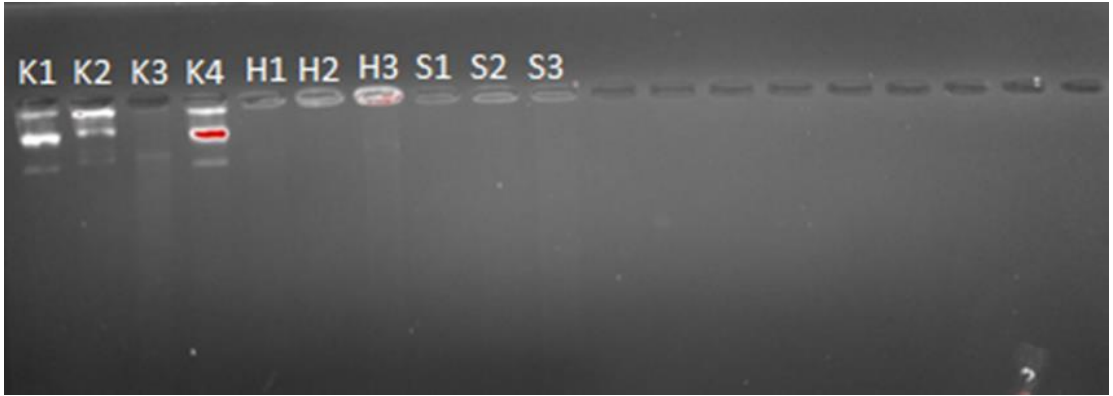
Tablo 4. 3. *Sarcosphaera crassa* ve *Helvella leucomelaena* mantar özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi. M.İ.K: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$).

Mikroorganizmalar	<i>Sarcosphaera crassa</i>	<i>Helvella leucomelaena</i>
	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.28	0.28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.14	0.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0.28	0.28
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.07	0.14
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25322	36	- (Etkisiz)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35128	72	- (Etkisiz)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10799	0.07	0.14
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.07	0.14

Tablo 4. 3’de görüldüğü gibi *Sarcosphaera crassa* mantar özütünün MİK değerleri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Escherichia coli* ATCC 35128, *Escherichia coli* ATCC 10799, *Escherichia coli* ATCC 8739 bakterileri için sırasıyla 0.28, 0.14, 0.28, 0.07, 36, 72, 0.07, 0.07 $\mu\text{g/ml}$ olarak, *Helvella leucomelaena* mantar özütünde ise 0.28, 0.56, 0.28, 0.14, -, -, 0.14, 0.14 değerleri tespit edildi. Sonuç olarak her iki mantar özütünün bakterilere karşı etkili bir antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu saptanmıştır. Ancak, *Helvella leucomelaena* mantarının *Escherichia coli* ATCC 25322 ve *Escherichia coli* ATCC 35128 bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.

4.3. Mantarların DNA Koruyucu Aktivite Bulguları

Helvella leucomelaena ve Sarcosphaera crassa mantarlarından elde edilen etanol özütünün DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmit DNA'sı kullanılarak test edilmiştir. Bu yöntemle göre, DNA üzerinde hasara yol açan UV ışınları ve H₂O₂ varlığında, özütün DNA hasarına engel olamadığı tespit edilmiştir. Bu mantarların özütleriyle gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen veriler Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 4. 3. *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* mantar özütlerinin DNA koruyucu aktivitelerinin Jel elektroforezi

K1: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl) K2: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV
K3. : Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl) K4: Plazmit DNA (3 µl)
+ dH₂O (6 µl)+ H₂O₂ (1 µl) H1: Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+
H₂O₂ (1 µl) H2: Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl) H3:
Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl) S1: Plazmit DNA (3
µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl) S2: Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü
(5 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl) S3: Plazmit DNA (3 µl) + Mantar özütü (5 µl)+ UV+
H₂O₂ (1 µl).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Helvella leucomelaena* ve *Sarcosphaera crassa* mantarlarının etanol özütlerinin antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri araştırılmıştır. Her iki mantar türünün özütlerinde antioksidan aktivitesi daha önce Rell Assay Diagnostic kitleri ile yapılmamış olup konu ile ilgili, literatürde herhangi bir bulguya raslanmamıştır. Aynı şekilde mantar özütlerinin antimikrobiyal aktivite çalışmaları MIC (Mikrodilüsyon) metodu ile daha önce çalışılmamış ve literatürde böyle bir bulguya raslanmamıştır. Diğer yandan bu çalışma kapsamında iki mantar türünde literatür de DNA korucu aktivite çalışmalarına rastlanmamıştır.

DPPH radikali, biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür (Wojdylo vd., 2007, Chen vd.,2007). Çalışmamızda; mantar özütlerinin serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmamızdaki mantar özütlerinin radikal giderme kapasitelerine ait IC50 grafiği şekil 4.1. ve 4.2.'de görülmektedir. Ekstraksiyon için kullanılan etanol'ün radikal giderme kapasitesinin yüksek derecede etkili olmadığı görülmektedir. Mantar özütlerinin TAS ve TOS aktiviteleri Rell Assay kitleri ile yapılmıştır ve test sonuçlarına göre her iki mantar özütünde 10mg/ml konsantrasyonlarında etkili olmadığı belirlenmiştir.

Sarcosphaera crassa ve *Helvella leucomelaena* mantar özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi etanol ekstraktı ile yapılan deneme sonucunda, çalışmada kullanılan bakterilere karşı yüksek derecede antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *S. crassa* etanol ekstraktının *Escherichiacoli* ATCC 10799 ve *Escherichia coli* ATCC 8739 bakterilerine karşı yüksek derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve MIC değerlerinin 0,07 mg olduğu belirlenmiştir. En düşük

antimikrobiyal aktiviteyi *Escherichia coli* ATCC 35128 bakterisine karşı gösterdiği ve MIC değerinin 72 mg olduğu gözlemlenmiştir. *H. leucomelaena* mantarının etanol ekstraktı ise *Escherichia coli* ATCC 10799, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterilerine karşı yüksek derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve MIC değerinin 0,14 mg olduğu belirlenmiştir. Ancak, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Escherichia coli* ATCC 35128 bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *S. crassa* mantarının etanol ekstraktının *H. leucomelaena* mantarına kıyasla test bakterilerine karşı daha etkili olduğu belirlenmiştir.

pBR322 plasmid DNA'sı agaroz jel elektroforezinde iki bant göstermektedir. Bunlar hızlı yürüyen ve plasmidin doğal formu olan süpercoiled DNA (scDNA; süper kıvrımlı DNA; kırık yok) ve yavaş yürüyen open-circular DNA (ocDNA; tek zincir kırığı içeren DNA)'dır. H₂O₂ varlığında DNA'nın UV ışınlarına maruz kalması süper kıvrımlı halkasal DNA'nın kırılmasına ve doğrusal DNA (linDNA; iki zincirde de bir veya daha fazla kırık mevcut) oluşmasına neden olmaktadır (Tepe vd., 2011). Bulgular kısmında verilen DNA koruyucu aktivite sonuçlarına bakıldığında *Sarcosphaera crassa* ve *Helvella leucomelaena* mantar özütlerinin UV ve H₂O₂ varlığında DNA'yı koruyucu aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla her iki mantar özütünde DNA koruyucu aktivite göstermediklerini söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

Akkuş, İ. (1995). “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri” Mimoza Yayınları, Konya

Alexopoulos C.J., C.W. Mims & M. Blackwell. (1996). Introductory Mycology (4th edition). John Wiley & Sons, New York.

Alsheik, A.M., Trappe, J.M. (1983). Desert Truffles: The Genus *Tirmania*, Trans. Br. Mycol. Soc., **81**: 83-90,

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**: 7915-7922.

Anonymous, (2009). <http://en.wikipedia.org/wiki/Fungus>.

Anonymous, (2011a). Life on Earth-Organism. <http://en.wikipedia.org>

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J. Am.Oil. Chem. Soc. **75(2)**:199–212.

Athar, HR., Khan A., Ashraf, M. (2008). Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Env Exp Bot; **63**: 224-31.

Baskin, SI., Salem, H. (1997). Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, pp 79-120.

Beauchamp, C., Fridovich., I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem; **44**: 276-87

Benedict, R.G., Brady, L.R. (1972). Antimicrobial Activity of Mushroom Metabolites, Journal of Pharmaceutical Sciences, **61 (11)**: 1820-1821.

Benzer, F., Ozan, S.T. (2003). *Fasciola hepaticae* Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, Turk J Vet Anim Sci, **27**: 657-661.

Berk, Ş., Tepe., B. (2012). “*Myrtus communis, Pistacia vera, Arum maculatum, Ceterach officinarum, Inula oculus-christi* türlerinin antioksidan, anti-mikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerinin araştırılması”. Cumhuriyet Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı.

Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidium* and its Pharmaceutically Active Compounds. Biotechnology Annual Review, **13**: 265–301.

Bolzan, D.A and Bianchi, N.O. 1997. Bianchi, Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking, Clin. Biochem. **30**: 6 449-454

Bonello, P. (2001). Mycorrhizas in the Urban Landscape. Ohio State University Extension <http://ohioline.osu.edu>

Breene, W. (1990). Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. Journal of Food Production, **53**: 883-894.

Can, A., Özçelik, B., Güneş, G. (2005). Meyve Sebzelelerin Antioksidan Kapasiteleri. GAP IV. Tarım Kongresi Bildirileri.

Chen, H.Y., Lin, Y.C., Hsieh, C.L. (2007): “Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs .” Food Chemistry, **104**: 1418-1424.

Cordenunsi, B.R., Genovese, M.I., Nascimento, J.R.O., Hassimotto, N.M.A., Santos, R.J., Lajolo, F.M. (2004). Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. Food Chemistry, **91**: 113-121.

Cui, Y., Kim, D., Park, K. (2005). Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. Journal of Ethnopharmacology, **96**: 79–85.

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi, **3-4**: 92-95.

Demirhan, A. (2007). 'Bazı Makrofungus Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma' . Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. J of Fırat Univ. **19 (4)**, 425-433,

Duman, H., Doğan, H.H., Ateş, A. (2003). *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S. F. Gray Makrofunguslarının Antimikrobiyal Aktiviteleri SÜ Fen Ed. Fak. Fen Derg, **22**: 19- 24

Dülger, B., Şen, F. (1997). *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi. Tr. J of Biology, **23**: 127-133.

Dülger, B., Arslan, Ü. (1998). *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi. Tr. J of Biology, **23**: 385–392.

Dülger, B., Yılmaz F., Gücin F.(1999). *Tricholoma terreum* (Fr.) Kummer "cincile" makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi. Çev. ve Kor. Der., **8(30)**:13-17.

Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y. (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of Bay leaf extracts. J. Iran Chem. Soc. **3(3)**: 1258-266

Elmastaş, M., Işıldak, Ö., Turkekul, Ş., Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms Journal of Food Composition and Analysis, **20**: 337-345.

Enstrom, E., Kanim, L.E., Klein, M.A. (1992). Vitamin C and mortality among a sample of the US population. Epidemiology, **3**: 194-198

Fan, L., Pan, H., Soccol, A.T., Pandey, A., Soccol, C.R. (2006). Advances in Mushroom Research in the Last Decade. Advances in Mushroom Research in the Last Decade Food Technol. Biotechnol, **44 (3)**: 303–311.

Feig, DI., Reid, TM., Loeb, LA. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Res **54**: S1890-4.

Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., et al. (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol*; **109**: 1047-57.

Gao, Y.H., Tang, W.B., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X.T., Zhou, SF. (2005). Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews Inter*, **21** (2): 211-229.

Gezer, K., Duru, M.E., Kivrak, İ., Türkoğlu, A., Mercan, N., Türkoğlu, H., Gülcan, S. (2006). Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **5**(20): 1924-1928.

Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **113** (1-4): 17-35,

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y. (2006). Algal Antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **23**: 85-89.

Gutteridge, JMX. (1984). Lipid peroxidation initiated by superoxide- dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **172**: 245-9.

Halliwell, B, Gutteridge, JMC. (1998). *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press: 188-96.

Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford.

Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*, **42**(4): 569 - 605.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr. Rev.* **55**(1):S44–S52

Harman, D. (1981). The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**: 7124-7128.

Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**: 282–286.

Hur, J.M., Yang, C.H., Han, S.H., Lee, S.H., You, Y.O., Park, J.C., Kim, K.J. (2004). Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, **75**:603– 605

Ichimura, T., Watanabe, O., Maruyama, S. (1998). Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom *Fuscoporia oblique*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**:575–577.

Karaman, P., Tepe, B. (2011).“Bazı aromatik bitki türlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesi”. Cumhuriyet Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı.

Kalyoncu, F. (2010). ‘Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi’. *Mantar Dergisi/The Journal of Fungus* Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996; **31**: 671-701.

Kaur, C. and Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium’s health, *International Journal of Food Science and Technology*, **36**: 703-725.

Kılçık, F., Ciğerci, İ.H. (2013). “Silibinin ve Helixor'un DNA koruyucu ve tamir potansiyellerinin belirlenmesi / Determination of DNA protection and repair potentials of Silibinin and Helixor, Afyon Kocatepe Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı

Koide, R.T., Mosse, B. (2004). A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, **14**: 145-163

Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F., Başer, K.H. (2002). Sumak (*Rhus Coriaria*)’in Fenolik Bileşikleri Ve Antioksidan Etkileri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı , Bildiriler, Eskişehir.

- Köksal, E., (2007). Karnabahar (*Brassica Oleracea* L.) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan Ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Liang, B. (2005). The Fungi Kingdom: Common Characteristics of Fungi. <http://www.wisc-online.com> (Erişim tarihi: 18 Aralık 2011).
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, **73**: 321–325.
- Maslarova, N.V.Y. (2001). Inhibiting Oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA.
- Mau, J.L., Lin, H.C., S.F. Song. (2002). Antioxidant properties of specialty mushrooms. *Food Chemistry*, **35**: 519-526.
- McCord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem*, **26**: 351 - 357.
- Mehrotra, V.S. (2005). *Mycorrhiza: Role and Applications*, Allied Publishers, Hindistan. 355 s.
- Mothana, R.A.A., Awadh, N.A.A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist U. (2003). Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES, *Fitoterapia*, **74**:177–180.
- Mothana, R.A.A., Jansen, R., Julich, W.D., Lindequist, U. (2000). Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*, *J. Nat.Prod*, **63**:416–418.
- Niki E., Shimaski, H., Mino, M. (1994). Antioxidantism-free radical and biological defense. Gakkai Syuppan Center.
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998) A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C₃ photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity. *J Exp Bot*; **49**: 1895-908.

Öztürk, N., Tunalıer, Z., Koşar, M., Başer, K.H. (2002). *Petroselinum crispum*, *Anethum graveolens* ve *Eruca sativa*'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı , Bildiriler, Eskişehir.

Peng, C.L., Ou, Z.Y., Liu, N., Lin, G.Z. (2005). Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci*; **12**: 179-86.

Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integrat Plant Biol*; **50**: 2-18.

Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A., Willett, W.C., (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *New England Journal of Medicine*, **328**: 1450-1456.

Schoneich, C. (1999). Reactive oxygen species and biological aging:a mechanistic approach. *Exp Geronto Jan*; **34**:19

Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Introducing Natural Antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA.

Simic, M.G. (1988). Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, **202**: 377–386.

Sohol, R.S., (1993). The free radical hypothesis of aging. An appraisal of the current status. *Aging* ; **5**:3-17.

Solak, M.H., Kalmis, E., Saglam, H., Kalyoncu, F. (2006). Antimicrobial Activity of Two Wild Mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. And *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries Collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, **20**:1085–1087.

Song, Y.Y., R.S. Zeng, J.F., Xu, J. Li, X. Shen & W. G. Yihdego. (2010). Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal Networks. *PLoS One*. 13; **5(10)**: 13324.

Southam, P.A. and Powi, G. (1993). Free radicals in medicine : chemical nature and biological reactions. Mayo Clin Proc **63**: 381-389.

Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B., Willett, W.C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. New England J. of Medicine, **328**: 1444-1449.

Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., Walter, M.H. (2003). Arbuscular Mycorrhiza: Biological, Chemical and Molecular Aspects, Journal of Chemical Ecology, **29 (9)**: 1955-1979

Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends Cell Biol; **15**: 319-26.

Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. Fitoterapia, **82 (2)**: 237–246.

Türkoğlu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kıvrak, İ., Gezer, K., (2006b). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, **101(1)**: 267-273

Ufuk, U. (2007). '*Tricholoma anatolicum doğan & Intını ve Cantharellus cibarius fr.*' un antioksidan, antimikrobiyal etkilerinin ve yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi'.

Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). International Journal of Medicinal Mushrooms, **1**: 31–62.

White, R.W., Hackman, R.M., Soares, S.E., Beckett, L.A., Sun, B. (2002). Effects of a Mushroom ycelium Extract on the Treatment of Prostate Cancer. Urology, **60**: 640–644.

Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit Rev Food Sci, **44**: 275–295.

Wojdylo, A., Oszm, Í., Anskı, J., Czemerys, R. (2007). "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs.", *Food Chemisrty*, **105(3)**: 940-949.

Wong, GJ. (2011). *Introduction to Botany 135: Magical Mushrooms and Mystical Molds*. University of Hawaii, Botany 135 Syllabus. <http://www.botany.hawaii.edu> (Erişim tarihi: 21 Aralık 2011).

Wu, G., Wei, Z.K., Shao, H.B. (2007). The mutual responses of higher plants to environment: Physiological and microbiological aspects. *Biointerfaces*, **59**:113-9.

www.relassay.com

Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G. (2008). Bitki Doku Kùltürü Yoluyla Üretilen Flavonoitler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* **1 (1)**: 47-58.

Yaltrak, T. (2009). 'Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr.' *Food and Chemical Toxicology* **47**: 2052–2056

Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, **77**: 229–235.

Yen, G.C. and J.Y. Wu, (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* **65**: 375-379.