

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Sepultaria sumneriana*'nın ETANOLİK EKSTRESİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTESİ**

Serkan KALKIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Sepultaria sumneriana'nın ETANOLİK EKSTRESİNİN ANTIÖKSİDAN AKTİVİTESİ

Serkan KALKIN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ilgaz AKATA

Mantarlar besinsel değerleri, düşük oranda şeker ve yağ içermeleri nedeniyle özellikle iyi birer diyet ürünü olarak nitelendirilmektedir. Bununla beraber mantarların doğal olarak ürettiği biyolojik olarak aktif bileşenlerin çok çeşitli etkileri gösterilmiştir. Antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivite, kolesterol düşürücü ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkilere sahip oldukları yapılan birçok çalışma sonucunda bilinmektedir. *Sepultaria sumneriana*'nın etanolik ekstreslerinin antioksidan kapasitesi, DPPH radikalini temizleme yeteneği kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla ayrıca fenolik ve flavonoid içeriği de araştırılmıştır. Antioksidan enzimler, oksidatif stresin kontrol edilmesi ve hücrel dengenin düzenlenmesi için oldukça önemlidir. Hücreleri reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden koruması birçok dejeneratif hastalıkların gelişimini engelleyebilmektedir. Bu nedenle *Sepultaria sumneriana*'nın SOD, GPx, GST ve KAT enzimleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. DPPH üzerine yapılan çalışmalarda Radikal Süpürücü Aktivite oranı 10 mg/ml en yüksek mantar özütü konsantrasyonunda %28.28 ±0.0088 olarak belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri ise Gallik Asit için 0.00148 mg/ml, *Sepultaria sumneriana* için ise 1.148 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 11.139 mgGAE/g, toplam flavonoid madde miktarı ise 1.872 mgQUE/g olarak hesaplanmıştır. GST ve Katalaz enzimleri üzerinde yapılan çalışmalarda mantar özütünün aktivasyona neden olduğu, SOD enzimi üzerinde ise inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir.

Ocak 2021, 37 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Sepultaria sumneriana*, *Geopora*, Antioksidan aktivite

ABSTRACT

Master Thesis

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AN ETHANOLIC EXTRACT OF *Sepultaria sumneriana*

Serkan KALKIN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Ilgaz AKATA

Mushrooms are considered particularly good dietary products due to their nutritional value, low sugar and fat content. However, many studies have shown that a wide variety of components naturally produced by mushrooms have important activities such as activation of antioxidant enzymes, anticancer and antidiabetic. The antioxidant capacity of the ethanolic extracts of *Sepultaria sumneriana* was determined using the ability to scavenge the DPPH radicals. Phenolic and flavonoid content was also investigated in order to determine its antioxidant activity. Antioxidant enzymes are very important for controlling oxidative stress and regulating cellular balance. Protecting cells from the harmful effects of reactive oxygen species can prevent the development of many degenerative diseases. Therefore, the effects of *Sepultaria sumneriana* on SOD, GPx, GST and CAT enzymes were also investigated. In studies on DPPH, the Radical Scavenging Activity ratio was determined as $28.28\% \pm 0.0088$ at the highest concentration of mushroom extract of 10 mg / ml. IC_{50} values were determined as 0.00148 mg / ml for Gallic Acid and 1.148 mg / ml for the *Sepultaria sumneriana*. The total amount of phenolic content was determined as 11.139 mgGAE / g, and the total amount of flavonoid content was determined as 1.872 mgQUE / g. In studies on GST and Catalase enzymes, it has been observed that the mushroom extract causes activation. Inhibition was observed on the SOD enzyme.

January 2021, 37 pages

Key Words: *Sepultaria sumneriana*, *Geopora*, Antioxidant activity

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca bana her zaman yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana akademik bilgi ve tecrübe katan Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), örneklerimin toplanması, teşhis edilmesi ve en önemlisi mikoloji hakkında bana kattıkları için değerli danışmanım ve hocam Doç. Dr. Ilgaz AKATA'ya (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), laboratuvar çalışmalarında bana her türlü desteğini veren, yol gösteren, yardımcı olup tecrübelerini benimle paylaştığı için Öğr. Gör. Okan ONAR'a, hayatım boyunca maddi, manevi her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Serkan KALKIN
Ankara, Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1 <i>Sepultaria sumneriana</i> (Cooke) M. Torre	2
2.1.2 Makroskobik ve mikroskobik özellikler	4
2.2 Aktif Mantar Bileşenleri.....	4
2.2.1 Fenolik bileşikler	5
2.2.2 Flavonoidler	5
2.3 Serbest Radikaller	6
2.4 Antioksidan Savunma Sistemi	8
2.5 Antioksidan Enzimler	9
2.5.1 Süperoksit dismutaz (SOD).....	9
2.5.2 Glutatyon peroksidaz (GPx)	10
2.5.3 Katalaz (KAT)	11
2.5.4 Glutatyon S-Transferaz (GST)	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1 Materyal	14
3.2 Yöntem	15
3.2.1 Mantar örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması	15
3.2.2 Mantar özütünün fenolik miktar tayini	15
3.2.3 Mantar özütlerinin flavonoid miktar tayini	16
3.2.4 Mantar özütlerinin antioksidan aktivite analizi.....	16
3.2.5 Mantar özütünün süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	17

3.2.6 Mantar Özütlelerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi	18
3.2.7 Mantar özütünün katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi.....	19
3.2.8 Mantar özütlerinin Glutatyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi	20
4. BULGULAR	21
4.1 Mantar Özütlelerinin Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini	21
4.2 Mantar Özütlelerinin Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini	21
4.3 Mantar Özütlelerinin Antioksidan Aktivite Analizi	22
4.4 Mantar Özütlelerinin Süperoksit Dismütaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi	24
4.5 Mantar özütlerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi.....	25
4.6 Mantar Özütlelerinin Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.	26
4.7 Mantar Özütlelerinin Glutatyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesine Olan Etkileri	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
AlCl ₃	Alüminyum klorür
BSA	Sığır serum albümin
oC	Celsius derece
Cu	Bakır
dH ₂ O	Distile su
EtOH	Etanol
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IC ₅₀	İnhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
μ m	Mikrometre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
Mn	Manganez
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaN ₃	Sodyum azid
NaOH	Sodyum hidroksit
Nm	Nanometre
NO-	Nitrik oksit
OH	Hidroksil
t-BOOH	Ter-butil hidroperoksit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Zn	Çinko

Kısaltmalar

DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC	Enzim komisyon numarası
GA	Gallik asit
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
NBT	Nitro blue tetrazolium
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotit fosfat
OD	Optik dansite
KAT	Katalaz
LD ₅₀	Test edilen popülasyonun yarısını öldürmek için gereken doz
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
XOD	Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Sepultaria sumneriana</i> (Akata 2019).....	3
Şekil 2.2 <i>Sepultaria sumneriana</i> (Akata 2019).....	3
Şekil 2.3 Flavonoidlerin genel yapısı (Ferreira vd. 2009)	6
Şekil 2.4 Mantarlarda bulunan flavonoid grupları (Ferreira vd. 2009).....	6
Şekil 2.5 Oksidatif stresin temel sebepleri ve sonuçları (Ferreira vd. 2009)	7
Şekil 2.6 Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve savunma mekanizmaları (Mates vd. 1999).....	9
Şekil 4.1 Toplam fenolik madde miktar tayini için oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	21
Şekil 4.2 Toplam flavonoid madde miktar tayini için gösterilen kuersetin kalibrasyon eğrisi.....	22
Şekil 4.3 Standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiği	23
Şekil 4.4 <i>Sepultaria sumneriana</i> etanolik ekstresinin antioksidan aktivite grafiği.....	23
Şekil 4.5 <i>Sepultaria sumneriana</i> özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	24
Şekil 4.6 <i>Sepultaria sumneriana</i> özütlerinin Glutasyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	25
Şekil 4.7 H ₂ O ₂ kalibrasyon eğrisi	26
Şekil 4.8 <i>Sepultaria sumneriana</i> özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	27
Şekil 4.9 <i>Sepultaria sumneriana</i> özütlerinin GST enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Mantarlarda bulunan fenolik asit grupları (Ferreira vd. 2009)	5
Çizelge 2.2 GST enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar (Hermier vd. 1999)	13
Çizelge 2.3 Gallik asit ve Mantar özütünün IC ₅₀ değerleri.....	23

1. GİRİŞ

Makrofunguslar, yüksek miktarlarda nitelikli protein, ham lif yapıları, çeşitli mineraller ve vitaminler içermektedir (Sivrikaya vd. 2002). Mantarlar son yıllarda terpenoidler, steroidler, polifenoller, alkaloidler ve polisakkaritler gibi çeşitli biyoaktif bileşiklerinin terapötik potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Bazı mantar türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, kolesterol düşürücü ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkilere sahip olduğu yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (Miuzino 1999, Barros vd. 2007, Kitzberger vd. 2007). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir ve aynı zamanda vücutta birçok metabolik yolun doğal ürünleridir. Bazıları temel işlevleri yerine getirirken kontrollü bir formda bulunurken bazıları ise serbest formda bulunur ve çeşitli doku, hücre bileşenleriyle etkileşime girerler. Bu tür etkileşimler, oksidatif stres olarak da adlandırılan önemli fonksiyonel bozukluklara neden olabilir.

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların hücrelere ve biyolojik moleküllere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da yavaşlatır. Günümüzde antioksidan özelliği keşfedilen birçok madde vardır. Bu maddelerin bir kısmı günlük diyetimizde yer alırken, bir kısmını da vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma amacıyla sentezlediği enzimler; katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon s-transferaz gibi enzimlerdir. Bunların bazıları antioksidan enzimler olarak da adlandırılmaktadır. Doku ve hücrelerde reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller sebebiyle meydana gelen oksidatif stres DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli biyomoleküllere zarar verebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda *Sepultaria sumneriana*'ın etanolik ekstresinin toplam fenolik-flavonoid madde içeriği ve önemli antioksidan enzimlerinin üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Sepultaria sumneriana* (Cooke) M. Torre

Sepultaria sumneriana (Cooke) M. Torre Sedir kupası olarak da bilinen, sedir ağaçlarıyla ilişkili ektomikorizal bir makrofungus türüdür. Türler genellikle kışın sonundan ilkbahara kadar büyür ve Ascomycota bölümü içindeki Pezizales takımına ait Pyronemataceae ailesinin bir üyesidir (Kirk vd 2008). Türkiye'deki yayılışı ise Konya, Mersin, Kayseri, Kahramanmaraş, Gaziantep, Denizli, Balıkesir, Tokat, Ankara'dır (Sesli ve Denchev 2008). İlk olarak Mordecai Cooke tarafından tanımlanan ve *Peziza sumneriana* olarak adlandırılan bu mantar, uzun yıllar *Sepultaria sumneriana* olarak biliniyordu. *Sepultaria sumneriana* ismi 1895'te İngiliz Mikoloji Derneği'nin kurucu ortağı ve ilk başkanı George Edward Masee (1850 - 1917) tarafından verilen bir isimdir.

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Pezizomycetes

Order: Pezizales

Family: Pyronemataceae

Genus: *Sepultaria*

Species: *Sepultaria sumneriana*



Şekil 2.1 *Sepultaria sumneriana* (Akata 2019)



Şekil 2.2 *Sepultaria sumneriana* (Akata 2019)

2.1.2 Makroskobik ve mikroskobik özellikler

Pürüzsüz iç yüzeyi vardır ve soluk krem ile açık grimsi bej rengindedir. Toprağın yüzeyinden çıkmadan önce yer altında birkaç ay boyunca gelişir ve tipik olarak 5 ila 8 düzensiz ışın şeklinde bölünerek açılır. Boyu 5 cm'ye uzayabilir ve tamamen açıldığında ise 5 - 7 cm arasındadır.

Askusları silindirik olup 330-370 μ m x 16-22 μ m boyutundadır. Her askus ise 8 adet spor içerir. Spor yapısı Elipsoid-fusiform veya düz olup 27-37 μ m x 13-16 μ m boyutundadır. Her biri genellikle 2 büyük yağ damlası içermektedir.

2.2 Aktif Mantar Bileşenleri

Mantarlar, önemli besin ve tıbbi değerleri nedeniyle fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilebilir. Mantarların biyolojik aktivitesi, günümüzde yapılmış ve halen yapılmakta olan geniş çalışmalarla doğrulanmıştır. Yakın geçmişte mantarlardan izole edilen çeşitli bileşiklerin, farmasötik uygulamaları fazlaca görülmektedir. Polisakkaritler, lektinler, polisakkarit-protein kompleksleri ve çeşitli bir çok sekonder metabolitleri kapsayan bu mantar bileşenlerinin; immünomodülatör, antikanser ve antioksidan etkiler gibi önemli fonksiyonlara sahip oldukları kanıtlanmıştır (Ren vd. 2012).

Mantarların biyolojik olarak aktif bileşenleri çoğunlukla fruktifikasyon organı olarak adlandırılan meyve organlarından elde edilmektedir. Antioksidan ve anti-tümör maddelerde dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif bir çok molekül mantar türlerinde yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Mizuno 1996, Borchers vd. 1999).

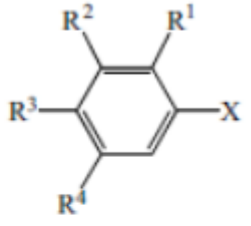
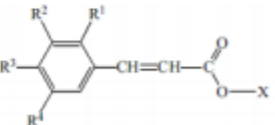
Ayrıca mantarlar fenolik bileşenler, poliketidler, terpenler ve steroidler de dahil olmak üzere bir çok ikincil metabolitleri de içermektedir (Buswell ve Chang 1993, Kim vd. 2006, Lee vd. 2006). Mantarlardan izole edilen bu sekonder bileşikler, başta antioksidan aktivite olmak üzere; anti-kanser, anti-enflamatuar ve immünomodülatör aktivite gibi çok çeşitli farmakolojik etkilerle ilişkilendirilmiştir (Chang vd. 2001).

Antioksidanlar vücudumuzda serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltan veya ortadan kaldıran bileşiklerdir. Hücrelerimizdeki serbest radikal olarak adlandırılan hasar yapıcı molekülleri “temizleyerek” hücre hasarını önlemeye yardımcı olmaktadır.

2.2.1 Fenolik bileşikler

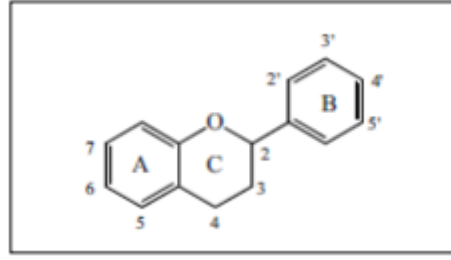
Fenolik bileşikler bir yada daha fazla aromatik halka bulunduran ve bir veya daha fazla hidroksil grubu bulunduran biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Günümüzde bir çok fenolik bileşik ve türevleri tanımlanmıştır. Fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler ve kurkuminoidler olarak sınıflandırılmaktadır (Fresco vd. 2006).

Çizelge 2.1 Mantarlarda bulunan fenolik asit grupları (Ferreira vd. 2009)

Benzoik Asit Türevleri	X	R¹	R²	R³	R⁴	
Gallik asit	COOH	H	OH	OH	OH	
Protokateşik asit	COOH	H	H	OH	OH	
Vanilik Asit	COOH	H	OCH ₃	OH	H	
Sinnamik Asit Türevleri	X	R¹	R²	R³	R⁴	
Kaffeik asit	H	H	OH	OH	H	
<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H	
<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H	

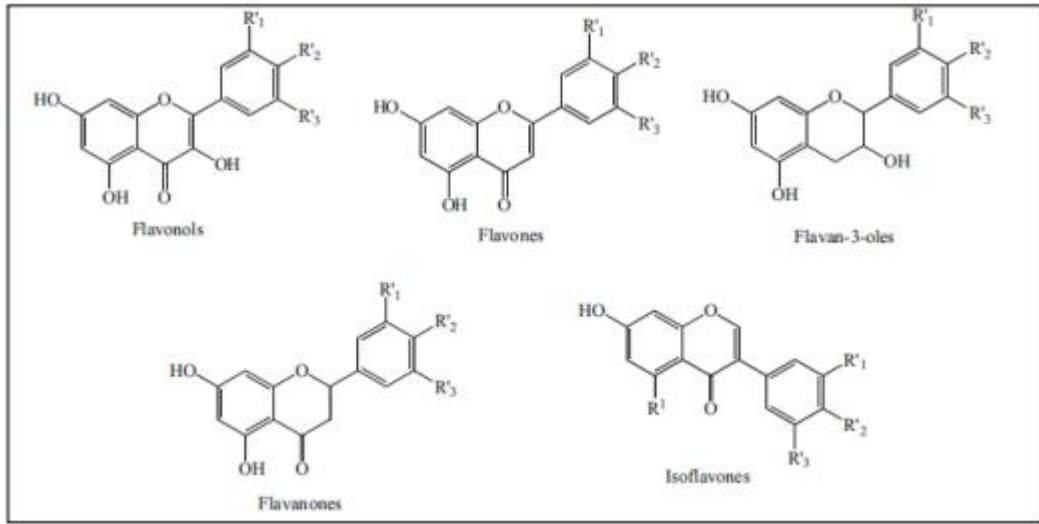
2.2.2 Flavonoidler

Flavonoidler antioksidan etkinlikleriyle, fenolik bileşiklerin geniş bir grubunu temsil etmektedir. Flavonoidlerin temel yapısı iki tane aromatik fenil benzo piren halkasından oluşmaktadır. Bu aromatik halkalar birbirlerine 3 karbon içeren bir zincir ile bağlanmaktadır (Cai vd. 2004).



Şekil 2.3 Flavonoidlerin genel yapısı (Ferreira vd. 2009)

Flavonoidler, serbest radikallerin temizlenmesi ve bununla beraber, önemli kronik hastalıkların risklerini azaltmakla da ilişkilendirilmiştir (Liu 2004).



Şekil 2.4 Mantarlarda bulunan flavonoid grupları (Ferreira vd. 2009)

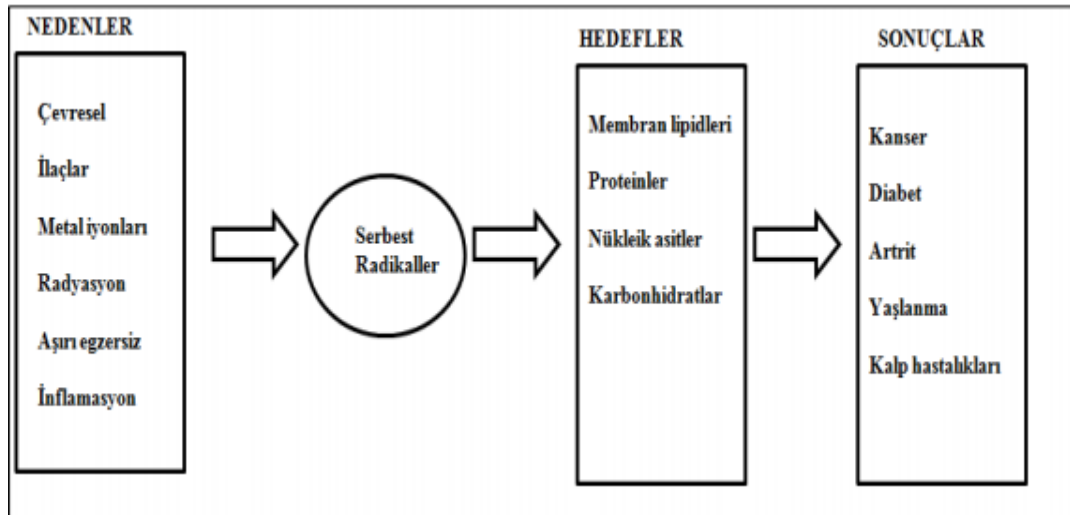
2.3 Serbest Radikaller

Serbest radikal, kararlı olmayan ve atomik ya da moleküler yörüngesinde çiftleşmemiş bir veya birden fazla elektron bulunduran bir kimyasal ürün olarak tanınmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1999). Bu çiftleşmemiş elektron(lar) serbest radikale oldukça büyük bir reaktivite verir. Bu kararsız bileşikler, genellikle oksijenli serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türleri (ROT) adıyla bilinmektedir (Dröge 2002). Reaktif oksijen türleri; hidroksil radikalleri (OH), süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit

(H₂O₂) ve nitrik oksidi (NO) içermektedir. Oksijenden türetilen radikaller, canlı sistemlerde üretilen radikal türlerinin en önemli sınıfını temsil etmektedir.

Reaktif Oksijen Türleri (a) UV radyasyon, X- ışınları ve gama ışınlarından, (b) metal katalizlenen tepkimeler sırasında, (c) kirlenmeler olarak atmosferden, (d) enflamasyon sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından ve (e) mitokondriyel elektron transfer reaksiyonlarının ve diğer çeşitli mekanizmaların yan ürünleri olarak oluşmaktadır. ROT, hem endojen hem ekzojen olarak üretilip, üretim miktarı birçok faktör aracılığıyla belirlenmektedir. ROT'un endojen kaynakları arasında, mitokondriyel sistem, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve iltihaplı hücre aktivasyonu yer almaktadır (Inoue vd. 2003).

Serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma arasındaki dengenin önemi organizmanın normal işleyişi için vazgeçilmez bir koşuldur (Valko vd. 2007). Bu denge serbest radikal üretimine doğru eğilim gösterirse, organizma oksidatif strese girer. Bu durumda, serbest radikallerin fazlalığı; hücresel lipidler, proteinler ve DNA'nın normal fonksiyonlarını etkileyebilir ve çeşitli hastalıklara yol açarak zararlar verebilir (Fu vd. 1998, Ridnour vd. 2005, Valko vd. 2007).

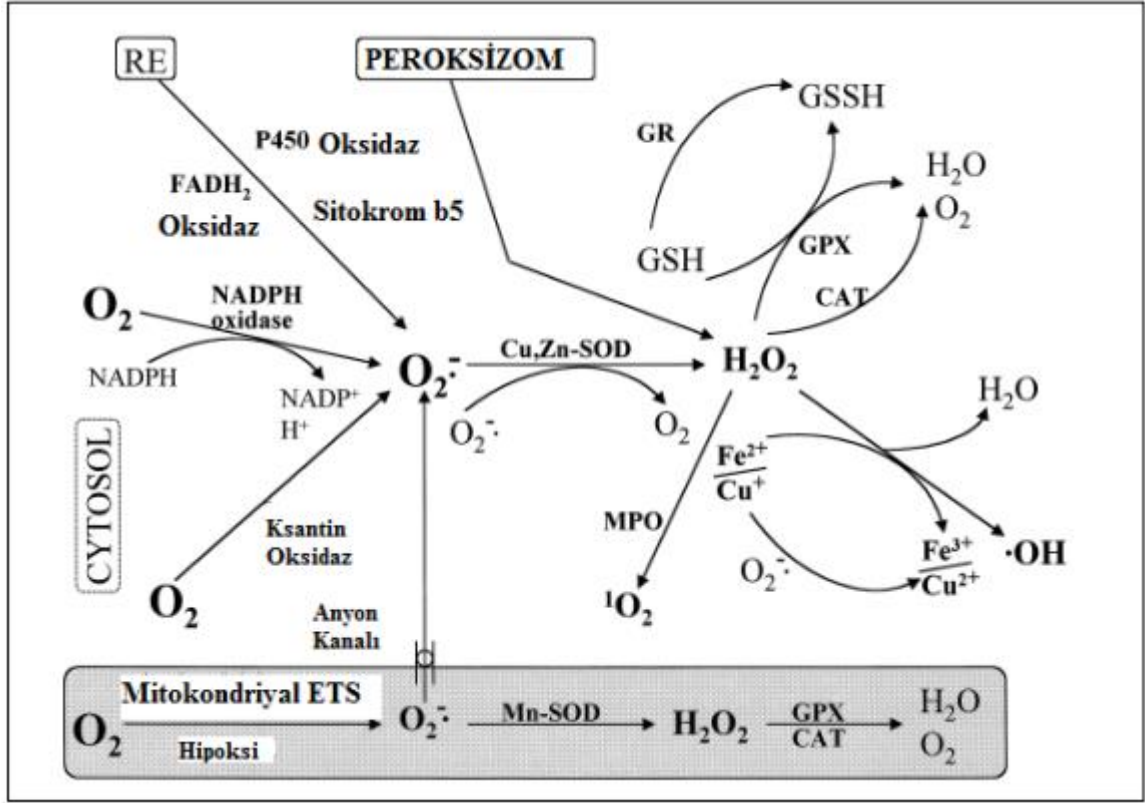


Şekil 2.5 Oksidatif stresin temel sebepleri ve sonuçları (Ferreira vd. 2009)

2.4 Antioksidan Savunma Sistemi

Çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalınması, organizmaların bir dizi savunma mekanizmaları geliştirmelerine yol açmıştır (Cadenas 1997). Bu mekanizmalar, aerobik yaşam koşullarında oksijen radikallerinin varlığının kaçınılmaz olması sonucunda evrimleşmiştir ve temel olarak enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar, oksidan moleküllerin oluşturduğu hasarı etkisiz hale getirmektedir. Organizmalarda, bir çok farklı endojen enzimatik antioksidan, hem hücre içi hem de hücre dışı ortamda bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), glutasyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon-S-transferaz (GST) bunlara örnek olarak verilebilir.

Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; glutasyon (GSH), alfa-tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), lipoik asit, melatonin, karatenoid, flavonoid bileşikleri ve diğer antioksidanlardan oluşmaktadır (Fang vd.2002, Lee vd. 2004, Valko vd. 2007). Ayrıca başta bakır, çinko ve selenyum olmak üzere bir çok element enzimatik antioksidanların fonksiyonları ve biyosentezi için gereklidir. Serbest radikal kaynaklı oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları; (i) önleyici mekanizmalar, (ii) onarım mekanizmaları, (iii) fiziksel savunma ve (iv) antioksidan savunma şeklinde özetlenebilir. Normal koşullar altında, bu mekanizmalar hücre içinde dengeyi sağlamaktadır. Bu denge organizmaların hayatta kalma ve kendi sağlığı için önemlidir (Valko vd. 2007). Antioksidanlar, doğrudan ya da dolaylı olarak serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin oluşturduğu olumsuz etkilere karşı hücreleri korurlar.

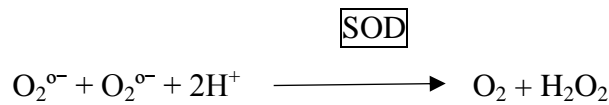


Şekil 2.6 Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve savunma mekanizmaları (Mates vd. 1999)

2.5 Antioksidan Enzimler

2.5.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalinin sıradan moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. Süperoksit, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir ve düzenlenmezse birçok hücre hasarına neden olur. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin üretimi süperoksidin ($O_2^{\bullet-}$) dismutasyonu ile gerçekleşir. Bu reaksiyonda iki tane süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Süperoksit dismutaz enzimi bu reaksiyonu katalizler.



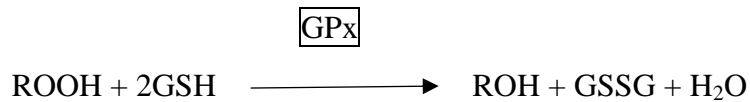
Memeli hücrelerinde; sitozolik Cu/Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD olmak üzere süperoksit dismutaz enziminin üç formu bulunmaktadır. Cu/Zn-SOD, 32 kDa'luk homodimer bir yapıya sahiptir. Cu/Zn-SOD veya bir diğer adıyla SOD-1, memeli hücrelerinin sitozol ve çekirdeğinde yer almaktadır (Perry vd. 2010). Bu izozimin alt üniteleri aktif bölgelerinde bakır ve çinko atomlarını bulundurmaktadır.

Bir diğer intrasellüler izozim olan Mn-SOD, 96 kDa'luk homotetramer bir yapıya sahiptir. SOD-2 olarak da adlandırılan bu izozim; her alt ünitesinde bir manganez atomu içermektedir. Mitokondriyal solunum zinciri, memeli hücrelerinde oksijen radikallerinin önemli bir kaynağıdır. Bunun sonucu olarak da Mn-SOD, genellikle hücrelerin mitokondri matriksinde yer almaktadır (Perry vd. 2010).

Ekstrasellüler SOD (EC-SOD) ise tetramerik yapıda, bakır ve çinko içeren sekretör bir glikoproteindir, heparin ve heperan sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlar ile yüksek afinite gösterir (Mates vd. 1999). EC-SOD ise diğer iki izozimden farklı olarak, dokular arasında ve hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır.

2.5.2 Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.19) 80 kDa ağırlığında, selenyum içeren tetramerik yapıda bir peroksidaz enzimidir. GPx genel olarak sitozolde yer almaktadır (Mates vd. 1999). GPx enzimi, redüklenmiş glutasyon tripeptidi (GSH) ile çeşitli hidro peroksit (ROOH ve H₂O₂) moleküllerinin reaksiyonunu katalize ederek, peroksit moleküllerinin suya dönüştürülmesini sağlamaktadır. Böylece glutasyon peroksidaz enzimi, oksidatif hasara karşı memeli hücre membranını ve hücre organellerini korur (Drevet 2006).



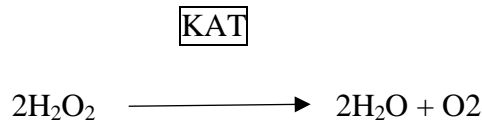
Glutasyon peroksidaz enzimi iki adet substrata sahiptir; bunlardan biri peroksitler, diğeri ise redüklenmiş glutatyondur. Peroksit molekülleri alkollü bileşikleri indirgenirken, GSH bileşiği yükseltgenir. Glutasyonun (GSH) yükseltgenmiş formu glutasyon disülfiddir (GSSG). Glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşmektedir (Drevet 2006). Glutasyon (GSH); glutamat, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Sitozol, çekirdek ve mitokondride bol bulunan, son derece önemli bir antioksidandır. Glutasyon etkili bir biçimde doğrudan veya detoksifikasyonda rol alan enzimlerin kofaktörü olarak dolaylı yoldan oksidatif strese karşı rol alır.

GPx seloenzim grubunda bir enzimdir, biyosentezinde selenyuma ihtiyaç duyar. Enzimin her alt ünitesi bir selenosistein bileşiğini içermektedir. Bu nedenle, selenyumun beslenme ile alınması antioksidan enzim savunması için önemlidir. Yenilebilen mantarların iyi miktarda selenyum içerdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Falandysz 2008).

Memeli hücrelerinde, glutasyon peroksidaz enziminin 5 izozimi tanımlanmıştır. Bunlar; GPx-1 (cGPx), GPx-2 (GPx-G1), GPx-3 (GPx-P), GPx-4 (PHGPx) ve GPx-5 olarak adlandırılmaktadır (Mates vd. 1999).

2.5.3 Katalaz (KAT)

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) tetramerik yapıda, 240 kDa ağırlığa sahip olan bir enzimdir. Enzimin her bir alt ünitesi 60kDa ağırlığında olup, bir ferriprotoporfirin grubu içermektedir (Mates vd. 1999). Katalaz, hidrojen peroksitin (H₂O₂) su ve oksijen molekülüne dönüştürülmesi işlemini katalizler. Ayrıca hidrojen kaynağı olarak metanol, etanol, formik asit ya da fenoller de kullanarak peroksidaz aktivitesi gösterir.



KAT



Memeli hücrelerinde katalaz, hücreleri oluşturulan hidrojen peroksitin etkilerinden korur. Hücrelerin oksidatif strese karşı adaptasyonunda önemli rol oynar. Bugüne kadar katalaz enziminin 3 izozimi tanımlanmıştır. Katalaz enziminin izozimleri, aktif bölgelerindeki değişikliklere göre; monofonksiyonel hem içeren katalaz, bifonksiyonel hem içeren katalaz ve manganez içeren katalazlar olarak sınıflandırılabilir (Chelikani vd. 2004).

Monofonksiyonel katalaz ve bifonksiyonel katalaz enzimleri, aktif bölgelerinde hem grubu bulundururken, manganez katalaz ise hem grubu içermeyip bunun yerine aktif bölgesinde manganez atomu bulundurmaktadır. Bu izozime doğada sadece bakterilerde rastlanmaktadır (Klotz ve Loewen 2003).

Monofonksiyonel hem içeren form, katalazın doğada ki en yaygın izozimidir. Buna karşılık, bifonksiyonel katalaz en az rastlanan izozimdir. Her üç izozimde, hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürmektedir.

2.5.4 Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-transferazlar, elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutatyon ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı koruyan Faz-II detoksifikasyon enzim ailesi üyesidir. Molekül ağırlıkları 20.000-25.000 daltondur ve her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. İlk kez sıçan karaciğerinde Boyland ve ark tarafından tanımlanmıştır (Hayes vd. 2005).

GST enzimleri kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine glutatyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. Bunun yanında oksidasyonla oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden

atılmasını sağlarlar. Bu yüzden GST enzimleri, çok önemli koruyuculuk görevi gören enzim gruplarından biridir (Armstrong 1997).

Glutatyon S-transferazların katalizlediği temel reaksiyonlar oksiran halkasının nükleofilik açılımı, nükleofilik yer değiştirme, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonları yer almaktadır (Hermier vd. 1999).

Çizelge 2.2 GST enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar (Hermier vd. 1999)

Reaksiyon tipi	Substrat
1. Michael katımı	N-asetil benzokinonamin, 4-hidroksinon-enol
2. Oksiran halkasına atak	1-nitropiren – 4,5 oksit
3. Nükleofilik yer değiştirme	Brom, izovalerilüre iyodometan, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
4. Organik hidroperoksitin indirgenmesi	Linoleik asit, hidroperoksit, 5-hidroperoksimetil-urasil
5. Organik nitratin indirgenmesi	Nitrogliserin ve türevleri

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan; nikotinamidadenin dinükleotit fosfat (NADPH), katalaz (KAT), sodyum 3,5 dikloro-2- hidroksi benzen sülfonat (DHBS), 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH), ksantin, ksantin oksidaz (XOD), kuersetin dihidrat, sığır serum albumin (BSA), etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), Folin-Ciocalteu reaktifi, ve glutatyon (GSH) Sigma firmasından, 4-aminoantipirin (4-AP), hidrojen peroksit (H_2O_2), tert-butil hidroperoksit (t-BOOH) ve sodyum azit (NaN_3) Acros firmasından, sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), sodyum nitrat ($NaNO_2$) Carlo Erba firmasından, etil alkol (EtOH), sodyum karbonat (Na_2CO_3) , potasyum mono fosfat (K_2HPO_4) ve potasyum di fosfat (KH_2PO_4), tris hidroklorid, tris baz, sodyum asetat ve glutatyon redüktaz (GR) Fisher Scientific firmasından, nitro blue tetrazolyum (NBT) ve horseraddish peroksidad (HRP) Thermo Scientific firmasından, sodyum hidroksit (NaOH) alüminyum klorür ($AlCl_3$), gallik asit (GA) ve sodyum klorür (NaCl) Merck firmasından analitik kalitede temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar; mantar ekstralarının hazırlanması için rotari evaporator (Büchi, R-3), ekstraların toplam fenolik-flavonoid miktar tayininde, antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde ve enzim aktivitelerinin hesaplanması amacıyla yapılan spektrofotometrik ölçümler için spektrofotometre (Biochrom Libra) kullanılmıştır. Bunların dışında çalışmamızda kullanılan cihazlar; otomatik pipetler (Eppendorf), buz dolabı (Profilo), Vorteks (Labnet), yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Sigma), hassas terazi (Mettler Toledo), pH metre (Hanna), saf su cihazı (Human RO 180) ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Termal) dır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mantar örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması

Bu tez çalışması kapsamında *Sepultaria sumneriana*, 10.05.2018 tarihinde Ankara üniversitesi Onuncu yıl kampüsünde (Tandoğan kampüsü) Doç. Dr. Ilgaz AKATA tarafından toplanmıştır ve ANK Akata & Altuntaş 92 kodu ile Ankara Üniversitesi fungaryumunda (ANK) saklanmaktadır. *Sepultaria sumneriana* (Cooke) Masee kurutulmuş mantar örneği, ekstraksiyon aşaması için ezilerek toz haline getirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi toz mantar örneğine sıvı çözügen (ağırlık-çözgen hacim oranı 1:10 olacak şekilde) eklenmesiyle başlamıştır. Deneyler sırasında sıvı çözügen olarak etanol kullanılmıştır. %99'luk etanol ile hazırlanan karışım 2.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 24 saat 4°C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışım Whatman filtre kağıdı ile filtre edildikten sonra, 54°C, 337 mBar basınç altında rotary evaporatör yardımıyla evapore edilmiştir. Evaporasyon sonrasında elde edilen özüt, liyofilizatör yardımıyla kurutulup, deneylerde kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Onar 2016).

3.2.2 Mantar özütünün fenolik miktar tayini

Mantar özütlerinin toplam fenolik madde miktar tayini spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotta % 50 Folin-Ciocalteu reaktifine ek olarak %2'lik sodyum karbonat çözeltisi ve fenolik madde standardı olarak gallik asit (GA) kullanılmıştır. Oluşan reaksiyona bağlı renk değişimleri ise 750 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Gallik asit (1 mg/mL) çözeltisinden 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.3 mg/mL aralığında hazırlanan çözeltiler fenolik madde standartları olarak kullanılmıştır. Fenolik madde miktarı tayini için, 100 µL mantar özütü, 100 µL % 50 Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılıp 3 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonunda, test tüplerine 2 mL % 2 Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, örneklerin köre karşı absorbans ölçümü 750 nm'de gerçekleştirilmiştir. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD₇₅₀ değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam fenolik madde

miktarları hesaplanmıştır ve sonuçlar 1 mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir (Singleton ve Rossi 1965).

3.2.3 Mantar özütlerinin flavonoid miktar tayini

Mantar özütlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesinde, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır (Zhishen vd. 1999). Çalışmada % 95'lik etil alkol, % 10'luk alüminyum klorür ve 1 M sodyum asetat çözeltileri kullanılmıştır. Bu yöntemde kuersetin, kalibrasyon eğrisini hazırlamak için flavonoid madde standartı olarak kullanılmıştır. 10 mg kuersetin 10 ml % 80'lik etil alkol içerisinde çözülerek, 100, 200, 300, 400 ve 500 µg/mL'ye seyreltilmiştir. Flavonoid madde miktarı tayini için tüpler içine 0.5 ml kör (%95'lik etil alkol), standart kuersetin çözeltileri ve mantar özütleri konularak, üzerine 1.5 ml % 95'lik etil alkol, 0.1 ml % 10'luk alüminyum klorür, 0.1 ml sodyum asetat (1M) ve 2.8 ml DMSO ilave edildikten sonra 30 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, örneklerin 415 nm'de köre karşı absorbans ölçümleri (OD₄₁₅) yapılmıştır. Kuersetin'in farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD₄₁₅ değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır ve mgQUE/g olarak ifade edilmiştir.

3.2.4 Mantar özütlerinin antioksidan aktivite analizi

Mantar özütlerinin total antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde, 2,2-difenil-1-pikirilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır (Burits vd. 2001). DPPH yöntemi, kararsız serbest radikallerin, antioksidan moleküller varlığında giderilmesi ile karakteristik mor renginin değişmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, farklı özüt konsantrasyonlarıyla muamele edilen 2,2-difenil-1-pikirilhidrazil (DPPH)'in absorbansındaki değişim ölçülmüştür. Absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar ile grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı mg/mL cinsinden belirlenip ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir.

Çeşitli konsantrasyonlarda (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL) hazırlanmış mantar özütünün 100 µL'lik çözeltileri, 100 µL etanol ve 1400 µL'lik DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Sonrasında 20 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 517 nm'de (OD₅₁₇) özütlerin absorbansları spektrofotometre aracılığıyla okunmuştur.

Mantar özütünün farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikallerini giderme kapasitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{RSA (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Sitozol izolasyonu: Glutasyon-S-transferaz, glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin tayininde, sığır karaciğerinden izole edilmiş sitozol enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan taze sığır karaciğeri, Ankara ilinin Kahramankazan (eski adı ile Kazan) ilçesinde bir mezbahadan temin edilmiştir .

Karaciğer dokusunun ağırlığının iki katı kadar, 0.15 M potasyum klorür, 1 mM EDTA ve 1 mM ditiyotritol içeren 10 mM'lik potasyum fosfat tamponu (pH=7.0) eklenmiştir. Sonrasında, doku homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir ve elde edilen homojenat +4°C, 10,000 × g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerde oluşan süpernatant alınıp temiz tüplere aktararak elde edilen süpernatant ikinci kez +4 °C, 30,000 × g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant, enzim aktivite tayinlerinde kullanılmak amacıyla ependorflar içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Shomali Moghaddam vd. 2015).

3.2.5 Mantar özütünün süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Özütlerin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Geller ve Winge tarafından geliştirilmiş metod kullanılmıştır (Geller and Winge 1984). SOD enzim aktivitesinin tayini amacıyla 0.3 mM ksantin, 12.5 mM nitro blue tetrazolyum (NBT) ve ksantin oksidaz içeren ksantin-ksantin

oksidaz sistemiyle oluşmuş süperoksit radikalleri, SOD enzim sisteminde kullanılmadığında ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve ortamda renk değişimine neden olmaktadır.

Özütlerin SOD enzim aktivitesine olan etkilerini belirlemek için, her mantar örneğine karşılık kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. 20 µL kör, enzim kontrolü (sadece etil alkol) ve özüt içeren küvetlerin üzerine sırayla 20 µL sitozol, 600 µL 0.6 mM'lık EDTA içeren sodyum karbonat (Na₂CO₃) tampon çözeltisi (200 mM, pH=10.0), 300 µL ksantin (0.3 mM), 40 µL NBT (12,5 mM) ve XOD (0.28 U/mL) enziminden 20 µL eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra küvetlerde oluşan reaksiyonların 550 nm dalga boyunda 5 dakika süresince absorbanları kaydedilmiştir. Deneyler birden fazla olmak koşulu ile iki tekrarlı olarak çalışılmış olup mantar özütleri 0,625 mg/mL – 10 mg/mL aralığında etil alkol ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Deney sonunda, elde edilen veriler aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL)=(OD_{k\ddot{o}r}-OD_{numune})/OD_{k\ddot{o}r}\times(\text{seyreltme faktörü})$$

3.2.6 Mantar özütlerinin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Özütlerin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla GPx enzim aktivite tayini glutatyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksidin su ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) çevrimi sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR' ın NADPH molekülünü NADP'ye oksidasyonunun 340 nm'de spektrofotometrik olarak kinetik takibi gerçekleştirilmiştir (Paglia ve Valentine 1967).

Özütlerin GPx enzim aktivitesine olan etkilerini belirlemek için öncelikle NADPH (10 mM), t-BOOH (30 mM) ve GSH (20 mM) dH₂O ile seyreltilerek; sitozol ise Buffer (Tris HCl) ile seyreltilerek ependorflara konulmuştur. Sonrasında 340 nm'de kinetik

takip için küvete 25 µl GR, 100 µl Sitozol, 100 µl GSH, 25 µl NADPH, 25 µl t-BOOH, 10 µl mantar özütü ve 815 µl Tris HCl konularak spektrometrik takibi sağlanmıştır.

Enzim aktivitesi deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır;

$$EA(IU/mL)=(OD_{340}/dakika) \times (1/\epsilon_{340} \times (\text{seyreltme faktörü}))$$

NADPH için 340 nm'deki sönümleme (molar absorpsiyon) katsayısı (ϵ_{340}) 0,00622 $nM^{-1}.cm^{-1}$ olarak alınmıştır.

3.2.7 Mantar özütünün katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Özütlerin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla katalaz aktivite tayini bu enzimin hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyonu spektrofotometrik olarak 520 nm'de peroksit miktarındaki düşmeye bağlı olarak görülecek absorpsiyondaki azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir (Aebi 1984).

Deney iki aşamalı olup, aktivite tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada mantar özütünden (50 mg/ml) 0,625 mg/mL – 10 mg/mL aralığında etil alkol ile 1:2 oranında seri seyreltmeler ile farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Sonra, kör ve özüt içeren ependorflara sırasıyla 100.1 U/mL katalaz enziminin 20µL, 50 mM'lık fosfat tamponundan, 55 µL ve 10 mM'lık H₂O₂ çözeltisinden 100 µL eklenerek 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışıma 825 µL 15 mM'lık sodyum azit (NaN₃) ilave edilmiş ve 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra, her karışımdan 10'ar µL alınmış ve yeni ependorflara konulmuştur. Ardından 1000 µL kromojen karışımı eklenerek, toplam hacim 1010 µL'ye tamamlanmıştır. Örnek iyice karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, ortamda kalan H₂O₂ ile kromojen arasında oluşan reaksiyonda ortaya çıkan pembe renk 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur.

Enzim aktivitesi aşağıda sunulan formüle yerleştirilerek hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL) = (\Delta H_2O_2/dakika) \times (\text{seyreltme faktörü}) / \text{deney hacmi}$$

3.2.8 Mantar özütlerinin Glutatyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Mantar özütlerin glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Habig tarafından geliştirilmiş yöntem kullanılmıştır (Habig vd. 1974)..

Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, 50 µl 20 mM CDNB, 10 µl mantar özütü, 10 µl 1:3 oranında KP buffer ile seyreltilmiş sitozol, 930 µl buffer+kofaktör karışımı kullanılmıştır. Buffer+kofaktör karışımı; toplam 18 mL hacimde 1 mL 200 mM fosfat tamponu (pH:6.5) + 9 mL dH₂O eklenip üzerine 0.4 mL 50 mM'lık GSH ve 7.6 mL dH₂O eklenerek hazırlanmıştır. Mantar özütlerinin enzim aktivitesine olan etkisi ise özüt yerine çözügen kullanılan köre karşılık, 0,625 – 10 mg/ml 1:2 oranında seyreltilmiş konsantrasyonlardaki özütlerin GST aktivitesine olan etkilerinin oranlanmasıyla belirlenmiştir. Deneyler birden fazla olmak koşulu ile iki tekrarlı olarak çalışılmıştır.

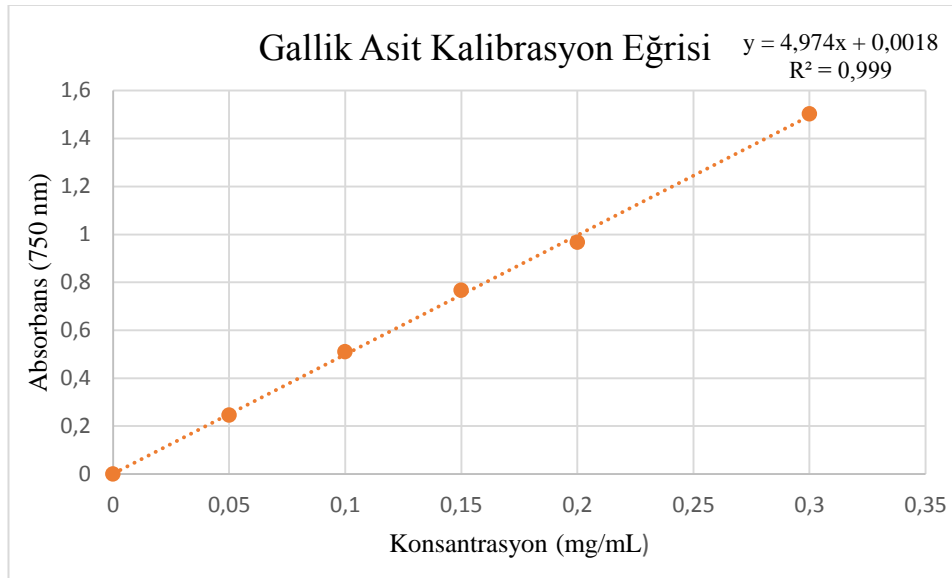
$$EA(IU/mL) = (OD_{340}/dakika) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

CDNB için 340 nm'deki sönmleme (molar absorpsiyon) katsayısı (ϵ_{340}) 0,00960 nM⁻¹.cm⁻¹ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Mantar Özütlerinin Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Mantar özütlerinin toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile mantar özütlerinin toplam fenolik madde içeriklerinin belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerinden elde edilen absorbanslar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.1). Mantar özütlerinin fenolik madde miktarı, mg GAE (gallik asit eşdeğeri) olarak ifade edilmiş olup toplam fenolik madde miktarı $11,139 \pm 0,328$ mgGAE/g olarak hesaplanmıştır.

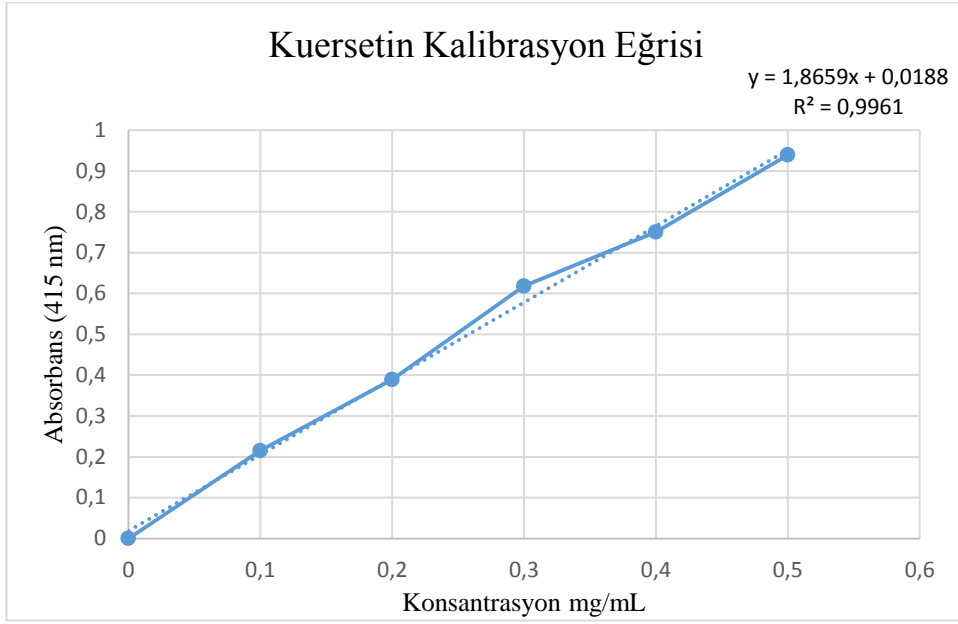


Şekil 4.1 Toplam fenolik madde miktar tayini için oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi

4.2 Mantar Özütlerin Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

Mantar özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı, alüminyum klorür klorometrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bu bağlamda, farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml, sırasıyla 0.00033, 0,00066, 0,00099, 0.013, 0.0016 mM) hazırlanan

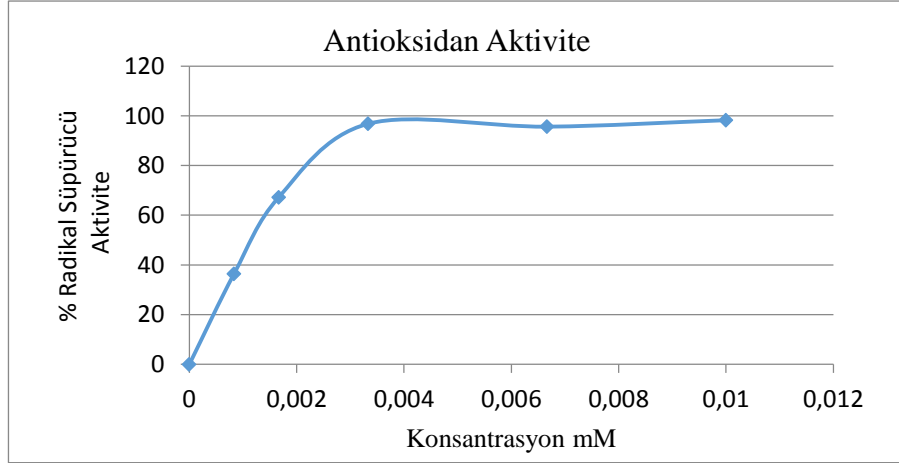
kuersetin çözeltilerinden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.2). Flavonoid madde miktarı, mg Kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilmiş olup $1,872 \pm 0,080$ mg QUE/g olarak hesaplanmıştır.



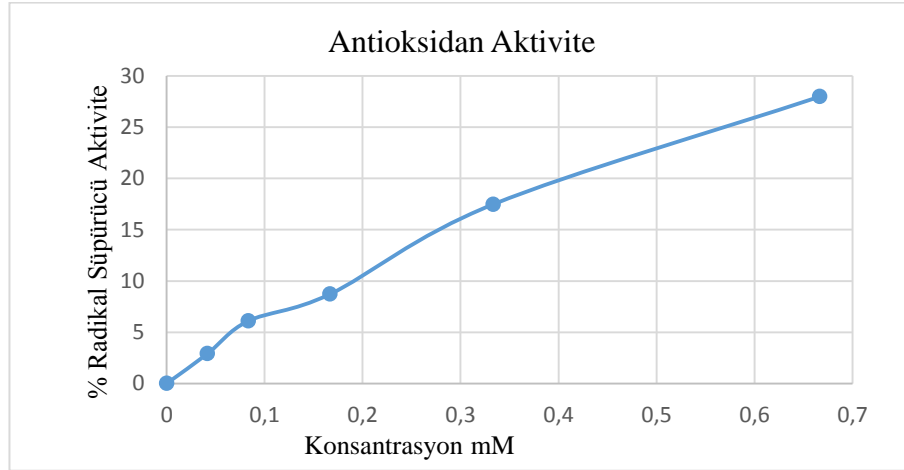
Şekil 4.2 Toplam flavonoid madde miktar tayini için gösterilen kuersetin kalibrasyon eğrisi

4.3 Mantar Özütlerinin Antioksidan Aktivite Analizi

Bu çalışma mantar özütlerinin DPPH radikalini giderici etkilerini saptamak amacıyla yapılmış olup farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltisi antioksidan standardı olarak kullanılmıştır. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan özütlerin % olarak antioksidan aktivitesi hesaplanarak (Şekil 4.3), DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren örnek miktarı mg/mL cinsinden belirlenerek IC_{50} değeri (Çizelge 4.5) hesaplanarak ifade edilmiştir ve en yüksek mantar özütü konsantrasyonunda (10 mg/ml, 0.666 mM) Radikal Süpürücü Aktivite oranı %28.28 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3 Standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiği



Şekil 4.4 *Sepultaria sumneriana* etanolik ekstresinin antioksidan aktivite grafiği

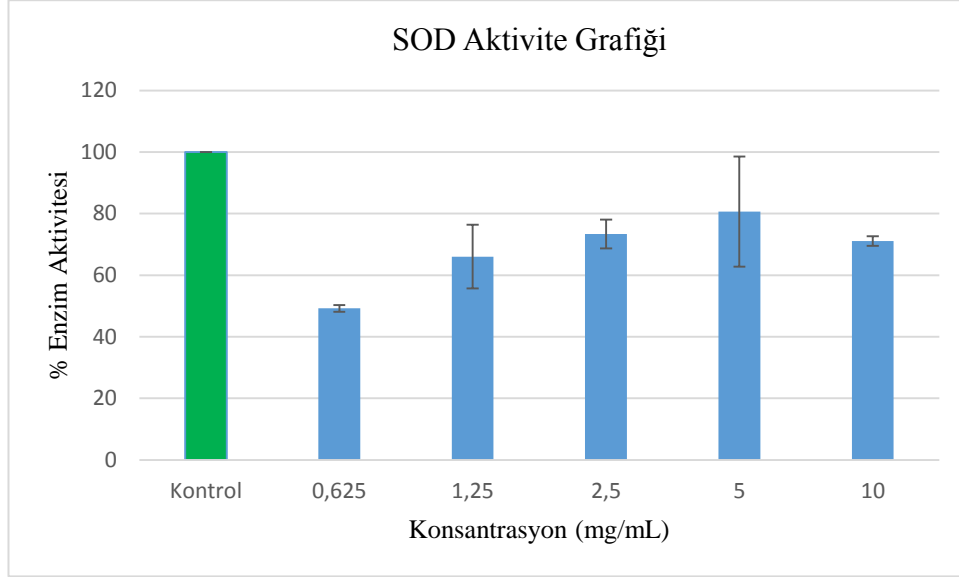
Çizelge 4.5 Gallik asit ve Mantar özütünün IC₅₀ değerleri

Gallik Asit	0.0015 ± 0.009
Mantar özütü	1.148 ± 0.08

4.4 Mantar Özütünün Süperoksit Dismütaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi

Mantar özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek için ksantin-ksantin oksidaz sistemine dayalı kinetik yöntem kullanılmıştır. Ksantin, NBT ve ksantin oksidaz içeren, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin ürettiği süperoksit radikallerinin SOD enzim sistemi içerisinde kullanılmadığı taktirde ortamda renk değişikliğine neden olmaktadır. Bu renk değişikliği, spektrofotometre yardımı ile kinetik olarak 550 nm’de takip edilmiştir.

Mantar özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonları kullanılmış olup minimum inhibisyon yüzdesi %19,3 olarak 5 mg/mL konsantrasyonunda görülmüştür. Maksimum inhibisyon oranı 0.625 mg/mL konsantrasyonunda %50,77 olarak gözlenmiştir. 1.25, 2.5 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında ise sırasıyla %33.95, %26.6 ve %29 oranlarında inhibisyon görülmüştür (Şekil 4.5).

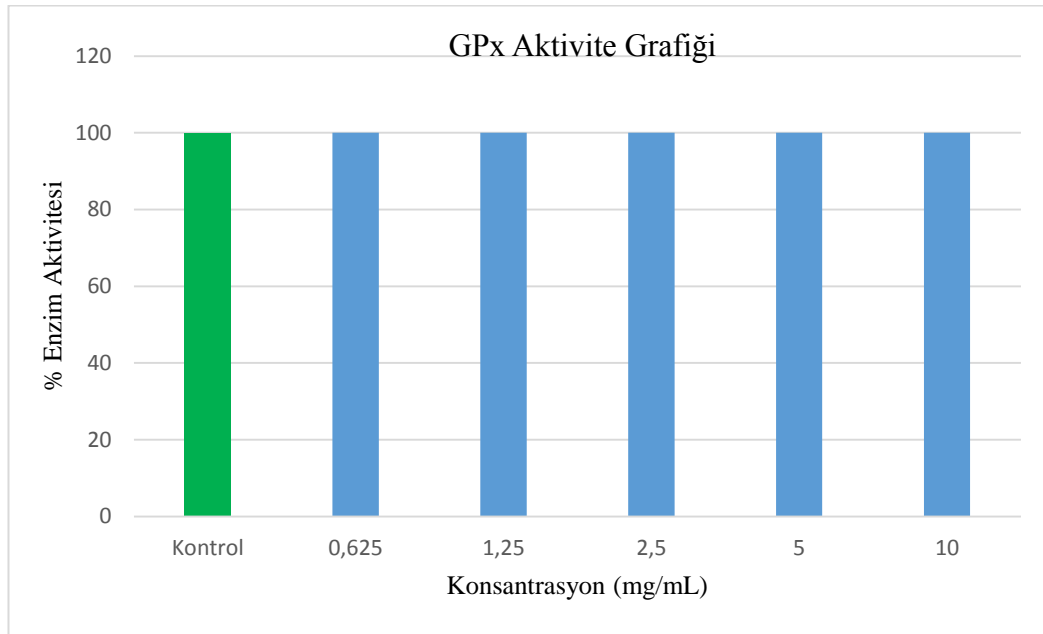


Şekil 4.5 *Sepultaria sumneriana* özütlerinin SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.5 Mantar özütlerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi

Özütlerin Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla GPx enzim aktivite tayini Glutatyon Redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksidin su ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) çevrimi sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR' ın NADPH molekülünü NADP'ye oksidasyonunun 340 nm'de spektrofotometrik olarak kinetik takibi gerçekleştirilmiştir (Paglia ve Valentine 1967).

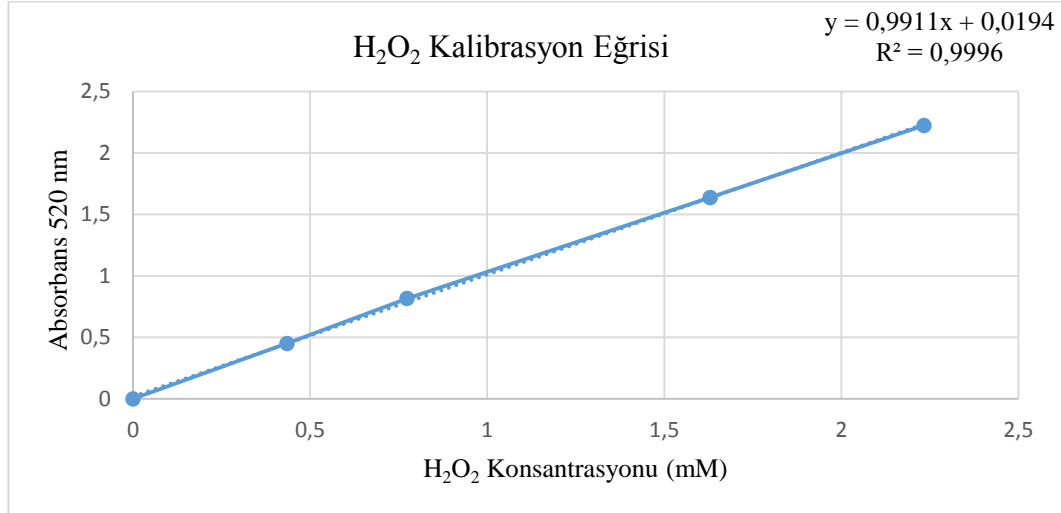
Mantar özütlerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda 0.625-10 mg/ml aralığında 5 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, saf enzime kıyasla enzim aktivitesinde 5 konsantrasyonda da aktivasyon veya inhibisyon olarak adlandırabileceğimiz anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.



Şekil 4.6 *Sepultaria sumneriana* özütlerinin GPx enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

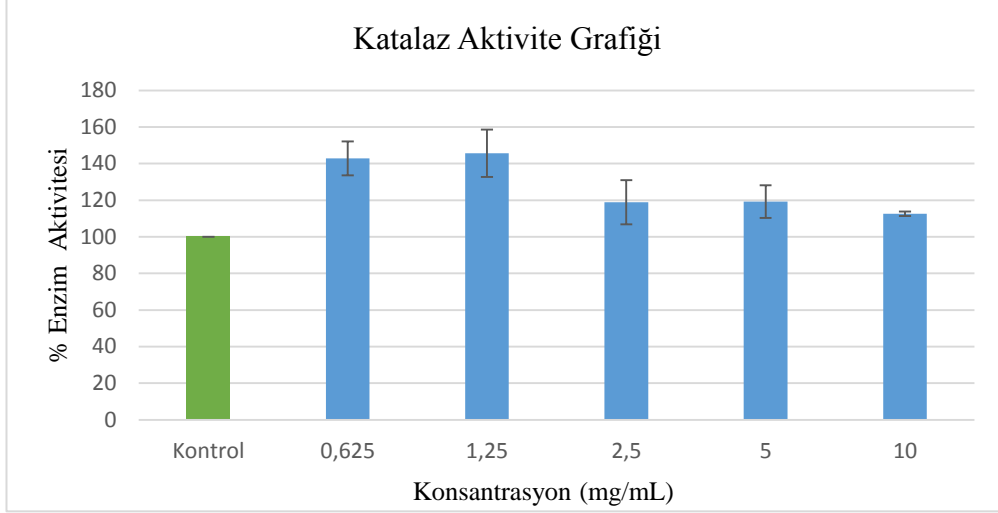
4.6 Mantar Özütlerinin Katalaz Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Mantar özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek için 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/ml aralığında 5 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Ortamdaki hidrojen peroksitin, kromojen reaktifi ile arasında oluşan reaksiyon spektrofotometrik olarak 520 nm dalga boyunda takip edilmiştir. KAT enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için 1 mL toplam hacimde 125 µL H₂O₂ + 875 µL dH₂O, 250 µL H₂O₂ + 750 µL dH₂O, 500 µL H₂O₂ + 500 µL dH₂O ve 750 µL H₂O₂ + 250 µL dH₂O konsantrasyonlarında hazırlanan H₂O₂'in absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.7 H₂O₂ kalibrasyon eğrisi

Sepultaria sumneriana özütlerinin katalaz enzimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonları kullanılmış olup sırasıyla %42.86, %45.6, %18.8, %19.2 ve %12.6 oranlarında enzim aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.8).

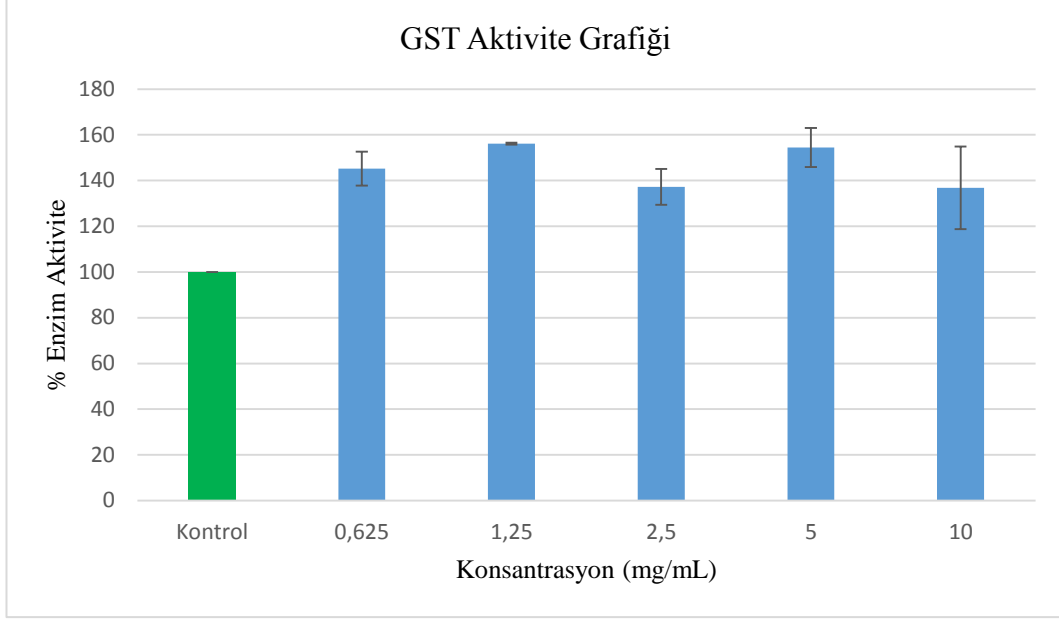


Şekil 4.8 *Sepultaria sumneriana* özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.7 Mantar Özütlerinin Glutatyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesine Etkilerinin Analizi

GST aktivitesi, Glutatyon ve 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanan metotla gerçekleştirilmiştir (Habig vd. 1974).

Protokol doğrultusunda, ilk olarak fosfat tamponu ve kofaktör karışımı için 1 mL fosfat tamponu üzerine 9 mL dH₂O eklenmiştir. Elde edilen karışıma 50 mM'lık 0.4 mL GSH ilave edilip 7.6 mL dH₂O ile son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Spektrometrik takip için 10 µl mantar özütü, 10 µl karaciğerden izole edilen sitozol 50 µl CDNB ve 930 µl fosfat tamponu + kofaktör karışımı küvete konulmuştur. Sonrasında 120 sn'de 340 nm dalga boyunda spektrometrik olarak kinetik takibi yapılmıştır. Mantar özütlerinin GST enzim aktivitesine olan etkisi ise özüt yerine çözen kullanılan köre karşılık 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki özütlerin %100 enzim aktivitesine göre oranlanmasıyla belirlenmiş olup sırasıyla %45.2, %56.2, %37.2, %54.45 ve %36.8 oranlarında aktivasyon gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *Sepultaria summeriana* özütlerinin GST enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mantarlar günümüzde bilimsel çalışmalarda oldukça popüler bir çalışma konusu haline gelmiştir. Doğal olarak içerdikleri çok çeşitli biyoaktif bileşenler nedeniyle birçok alanda çalışmalar yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarla mantarların antikanser, antienflamatuar , antitümör ve immünomodülatör aktivite gibi çok çeşitli farmakolojik etkileri gösterilmiş ve halen araştırılmaya devam edilmektedir.

Yapılan çalışmada *Sepultaria sumneriana*'ın etanolik ekstresinin *in vitro* olarak antioksidan madde içeriği ve de antioksidan enzimler olarak bilinen SOD, GPx, GST ve KAT enzimlerinin üzerindeki aktiviteleri araştırılmıştır.

Öncelikle özütlerin fenolik ve flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır. Fenolik ve flavonoid bileşikler, serbest radikalleri temizlemesi, detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin aktivasyonu ve önemli kronik hastalıkların risklerini azaltması sebebiyle önemli sekonder metabolitlerdir.

Fenolik bileşik miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmamız sonucunda, mantar özütünün fenolik madde miktarı 11.139 mgGAE/g olarak hesaplanmıştır. Sonrasında yapılan flavonoid miktar tayininde ise flavonoid madde miktarı 1.872 mgQUE/g olarak hesaplanmıştır.

Fenolik ve flavonoid madde miktarlarının belirlenmesinden sonra antioksidan aktivite çalışmalarının ilk basamağı olarak, özütlerin radikal süpürücü etkileri DPPH yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmalarımız sonucunda, özütlerin radikal süpürücü etkilerinin çok yüksek olmadığı gözlenmiştir. Kullanılan minimum konsantrasyon miktarı için (0,625 mg/ml, 0.041 mM) gözlenen etki % 4.23 olarak hesaplanmışken maksimum konsantrasyon miktarı için (10mg/ml, 0.666 mM) bu oran % 28.28 olarak gözlenmiştir. Mantar özütünün Antioksidan etkileri için hesaplanan IC₅₀ değeri 1,148 mg/mL olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullandığımız gallik asit için hesaplanan IC₅₀ değeri ise 0.0015 mg/mL'dir.

Fenolik madde miktarı tayini, flavonoid miktar tayini ve antioksidan aktivite çalışmalarının tamamlanmasından sonra, *Sepultaria sumneriana* etanolik ekstresinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Sepultaria sumneriana özütlerinin süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada mantar özütü için 0.625 - 10 mg/mL aralığında konsantrasyonlar kullanılmış olup sırasıyla %28,9, %19,3, %26,6, %33,95 ve %50,77 oranlarında inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Sepultaria sumneriana özütlerinin Glutasyon Peroksidaz (GPx) enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla 0.625-10 mg/ml aralığında 5 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, enzim kaynağı olarak kullanılan sitozol ile kıyasla *Sepultaria sumneriana* özütleri varlığında enzim aktivitesinde aktivasyon veya inhibisyon olarak adlandırabileceğimiz anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.6).

Sepultaria sumneriana özütlerinin katalaz (KAT) enziminin aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek için 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlar kullanılmış olup sırasıyla %42.86, %45.6, %18.8, %19.2 ve %12.6 oranlarında enzim aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.7). Enzim aktivitesinde gözlenen artış, katalazın H₂O₂ molekülünü birim zamanda daha fazla katalizleyerek su ve oksijen molekülüne dönüştürerek ve hücreleri hidrojen peroksidin oluşturabileceği oksidatif stresten korumasını destekleyebilecektir.

Sepultaria sumneriana özütlerinin Glutasyon S Transferaz (GST) enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada ise mantar özütü için 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlar kullanılmış olup sırasıyla %45.2, %56.2, %37.2, %54.45 ve %36.8 oranında enzim aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.9). Enzim aktivitesindeki bu artış, oksidasyon ile oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücuttan birim zamanda daha fazla atılmasını sağlayabilecektir. Ayrıca Glutasyon S-transferaz enzimi çok sayıda, farklı elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenziminin bulunmasıdır. Böylece GST

kansere neden olan bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. Mantar özütünün GST enzimi üzerindeki aktivasyonu , endojen ve eksojen kaynaklı bu zararlı bileşiklerin giderimini de aktive edebilecektir.

Sahin ve Akata (2019) bu mantarla yaptıkları çalışmalarda *Sepultaria sumneriana* (Cooke) M. Torre' den izole edilen mitovirüsün tam genom dizilimini göstermişlerdir. *Sepultaria sumneriana* (Cooke) M. Torre ekstraktından elde edilen dsRNA ile 3146 nükleotid içeren tam uzunlukta cDNA dizisi belirlenmiştir. Guanin+ Sitozin (G+C) içeriği % 40,59 olarak belirlenmiştir. GsMV1 cDNA fragmentinin 5'-UTR bölgesi 514 nükleotid uzunluğunda olduğu belirlenmiştir, ki bu uzunluk ortalama bir mitovirüsten fazladır. 3'-UTR bölgesi ise 148 nükleotid uzunluğunda olduğu saptanmıştır. Bu uzunluk ise ortalama bir mitovirüsten azdır.

Nevcihan vd. (2009) *Morchella* türleri ile yaptıkları çalışmalarda 1, 1 difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki Radikal Süpürücü Etkisini göstermişlerdir. *M. rotunda* %61,20±1,52 , *M. crassipes* %65,56±2,0 , *M. esculenta* var. *umbriana* %62,57±1,83 , *M. deliciosa* %40,63±1,13 , *M. elata* %48,07±1,35 , *M. conica* %85,36±2,19 ve *M. angusticeps* türünün Radikal Süpürücü Etkisi %54,54±0,48'dir. Verilen değerler çalışılan en yüksek konsantrasyonda (4,5mg/ml) tespit edilen verilerdir. *Sepultaria sumneriana* özütünün Radikal Süpürücü Etkisi ise benzer konsantrasyonda (5 mg/ml) %17.28 olarak hesaplanmış ve *Morchella* türleriyle kıyasla düşük olduğu görülmektedir.

Macáková (2011) *Gyromitra esculenta* (Pers.), *Gyromitra infula* (Schaeff.) Qué. , *Helvella crispa*, *Morchella conica*, *Morchella esculenta*, *Peziza cerea* ve *Peziza vesiculosa* türleri için yaptıkları deneylerde Radikal Süpürücü Etki oranlarını % olarak ifade etmişlerdir ve 1 mg/ml mantar özütü konsantrasyonunda bulunan değerler sırasıyla 13.47, 33.80, 10.24, 26.03, 19., 52. ve 40.99'dur. *Sepultaria sumneriana* mantar özütünün benzer konsantrasyonda (1.25 mg/mL) Radikal süpürücü Etkisi ise % 8.21 olarak hesaplanmıştır.

Dundar vd. *Terfezia boudieri* etanolik ekstresi ile yaptıkları çalışmalarda 1, 2, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında DPPH Radikal Süpürücü Etkilerini incelemişlerdir. Bu

bağlamda Radikal Süpürücü Etkileri sırasıyla %36.62, %48.45, %67.71 ve %92.21 olarak gösterilmiştir. *Sepultaria sumneriana* özütünün Radikal Süpürücü Etkisi ise benzer konsantrasyonda (5 ve 10 mg/mL) sırasıyla %17.28 ve %28.28 olarak hesaplanmış ve *Terfezia boudieri* etanolik ekstresine kıyasla düşük olduğu görülmektedir.

Gouzi vd. (2013) yılında yaptıkları çalışmada yenilebilir olan *Terfezia leonis*, *Tirmania pinoyi*, ve *T. nivea* türlerinin metanolik ekstresi ile DPPH Radikal Süpürücü Etkilerini araştırmışlar ve 2.6 mg/mL mantar özütü konsantrasyonunda Radikal Süpürücü Etkilerini sırasıyla % 92.47, %53.06, ve %41.34 olarak göstermişlerdir. Sonrasında yaptıkları toplam fenolik madde miktarı tayininde ise standart olarak gallik asit kullanmışlardır. Bu bağlamda *Terfezia leonis*, *Tirmania pinoyi*, ve *T. nivea* türlerin sırasıyla 3.26, 2.10 ve 1.71 mgGAE/g fenolik madde miktarı tayin edilmiştir. *Sepultaria sumneriana* özütünün fenolik madde miktarı ile kıyaslanır ise *Terfezia leonis*, *Tirmania pinoyi*, ve *T. nivea* türlerinin fenolik madde miktarı oldukça düşük gözükmektedir.

Lalotra vd. (2016) yaptıkları çalışmada *Geopora arenicola* ve *Morchella deliciosa* mantarlarının metanolik ekstresinin toplam fenolik içeriği araştırmışlar ve sırasıyla 8216 ± 28.80 mgGAE/kg ve 11500 ± 866.0 mgGAE/kg olarak tespit etmişlerdir. Bulunan değerler *Sepultaria sumneriana*'da tespit edilen miktarlardan fazladır.

Sepultaria sumneriana, GST ve KAT enzimlerinde sırasıyla %56 ve %45'e kadar olumlu bir etki gösterip aktivasyon sağlarken SOD enziminde %50'ye kadar çıkabilen oranda inhibisyon etkisi görülmüştür. Radikal süpürücü aktivitesi üzerine olan etkisi ise maksimum konsantrasyonda %28'e kadar çıkabilmiştir. Bu oran, antioksidan etkisinin çok yüksek olmadığını göstermektedir.

Yapılan literatür taraması kapsamında, tez çalışmasında kullanılan *Sepultaria sumneriana* ile ilgili olarak yeterli bilgiye ve çalışmalara rastlanmamıştır. Fenolik ve flavonoid içeriği, GPx, SOD, GST ve KAT enzimleri üzerine olan etkileri ilk defa kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışma doğrultusunda kullandığımız mantarın

biyolojik aktivitesi hakkında elde edilen sonuçlar *Sepultaria sumneriana* türü için bir ilki teşkil etmektedir.

Sepultaria sumneriana, düşük flavonoid içeriği ve düşük Radikal Süpürücü Etkisi göstermesine rağmen, bazı antioksidan enzimleri üzerinde aktivasyona sebep olduğu görülmüştür. Bu bağlamda *Sepultaria sumneriana* mantar özütü, kanser ilaçları, kolesterol düşürücü ilaçlar ve immünomodülatör gibi bazı farmasötik çalışmalara ışık tutabilir. Ayrıca *Sepultaria sumneriana*'nın etanolik ekstresinin antimikrobiyal etkileri için de çalışmalar yapılarak bu mantarın biyolojik aktiviteleri hakkında daha fazla bilgi elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*;105: 121–6.
- Akata,. I, Altuntaş., D, Kabaktepe. Ş. 2019. Fungi Determined in Ankara University Tandoğan Campus Area (Ankara-Turkey). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 20(1): 47-55.
- Anonyomous. <https://www.first-nature.com/fungi/geopora-sumneriana.php> Erişim Tarihi: 15.12.2020
- Armstrong, RN. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 10(1), 2-18.
- Burak, M, ve Çimen, Y. 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19: 296-304
- Cadenas, E. ve Davies, K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med*, 29; 222-230.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. ve Corke, H. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78; 2872-2888.
- Chelikani, P., Carpena, X., Fita, I. ve Loewen, P.C. 2004. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J Biol Chem*, 278; 31290-31296.
- Dundar, A., Faruk, O. Yesil., Acay, H., Okumus, V., Ozdemir, S., Yildiz, S. 2012. Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L. ve Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem*, 16(12), 1543-1560
- Geller, BL. ve Winge DR. 1984. Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver. *Methods Enzymol.* ;105:105-14.
- Gouzi, H., Leboukh, M., Bouchouka, E. 2013. Antioxidant and Antiradical Properties of Methanolic Extracts from Algerian Wild Edible Desert Truffles (*Terfezia* and *Tirmania*, Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(5): 473–488
- Gursoy, N., Sarikurkcü, C. , Cengiz, M. ve Solak M H 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. ve Jakoby, W. B. 1974. Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22–25); 7130-7139.

- Halliwell, B, ve Gutteridge, JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press;. s. 936.
- Hayes., JD., Flanagan, JU. Ve Jowsey, IR. 2005. Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 51-88.
- Hermier., D, Salchon., MR., Guy, G. ve Peresson, R. 1999. Metabolism and nutrition differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. Poultry Science 78: 1398-1406
- Kirk.,PM., Cannon, PF., Minter, DW. ve Stalpers. JA. 2008. Dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford.
- Klotz, M.G. ve Loewen, P.C. 2003. The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. Mol. Biol. Evol, 20; 1098-1112.
- Lalotra, P., Bala, P., Kumar, S. ve Y. P. Sharma. Biochemical Characterization of Some Wild Edible Mushrooms from Jammu and Kashmir. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences volume 88, 539–545 (2018).
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. The Journal of nutrition, 134(12), 3479S-3485S.
- Macáková, K. (2011). Biological activity of selected taxons of mushrooms from divisions ascomycota and basidiomycota. Dokrora Tezi, Charles University, Faculty of Pharmacy, Prag.
- Miuzino, T. 1999. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, International Journal of Medicinal Mushrooms, 1, 9-30.
- Mizuno, T. 1996. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods Food Ingrid J Jpn, 167, 69–85.
- Onar O., Akata I., Sagdicoglu Celep G., Yildirim O. 2016. Antioxidant Activity of Extracts from the Red-Belt Conk Medicinal Mushroom, *Fomitopsis pinicola* (Agaricomycetes), and Its Modulatory Effects on Antioxidant Enzymes.
- Ren, L., Perera, C. ve Hemar, Y. 2012. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. Food & Function, 3, 1118-1130
- Sahin E. , Akata I. 2019. Complete genome sequence of a novel mitovirus from the ectomycorrhizal fungus *Geopora summeriana*.
- Sesli E, Denchev CM. 2008. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. Mycotaxon, 106: 65-67.

- Singleton, V.L. ve Rossi, J.A.Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic*, 16(3), 144- 158.
- Sivrikaya, H., Bacak, L., Saraçbaşı, A., Toroğlu, İ., Eroğlu, H. 2002. Trace elements in *Pleurotus sajorcaju* cultivated on chemithermomechanical pulp for bio-bleaching, *Food Chemistry*, 79(2), 173-6
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28; 49-55.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64(4), 555–9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serkan KALKIN

Doğum Yeri : Balıkesir

Doğum Tarihi : 28.04.1994

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Türk Maarif Koleji (2012)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Şubat 2021)