

Tricholoma terreum ve Coprinus micaceus'un bazı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi

Determination of some biological activities of Tricholoma terreum and Coprinus micaceus

Hasan AKGÜL¹, Aylin Dilara NUR¹, Mustafa SEVİNDİK¹, Muhittin DOĞAN²

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye

²Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gaziantep, Türkiye

Eser Bilgisi

Araştırma makalesi

DOI: 10.17474/acuofd.63466

Sorumlu yazar: Hasan AKGÜL

e-mail: hakgul@akdeniz.edu.tr

Geliş tarihi: 02.04.2016

Düzeltilme tarihi: 24.06.2016

Kabul tarihi: 24.06.2016

Anahtar kelimeler:

Tricholoma terreum

Coprinus micaceus

Mineral Madde

Antioksidan

DNA koruyucu

Keywords:

Tricholoma terreum

Coprinus micaceus

Mineral

Antioxidant

DNA protective

Özet

Mantarların gıda olarak kullanımlarının yanı sıra tıbbi açıdan kullanımları gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada yenilebilir mantar türlerinden *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm. ve *Coprinus micaceus* (Bull.) Fr. materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada mantarların etanol özütlерinin antioksidan ve DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesi ve toplam antioksidan ve oksidan seviyeleriyle oksidatif stres indeksleri ve Fe, Mg, Zn, Cu, Na ve Ca içeriklerinin tespiti ve kıyaslanması amaçlanmıştır. Antioksidan aktiviteleri DPPH metodu ile toplam antioksidan ve oksidan seviyeleri ise Rel Assay Diagnostics kitleri kullanılarak belirlenmiştir. DNA koruyucu aktivitesi pBR322 süperkoil DNA kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca element içerikleri yaş yakma metodu ile atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak saptanmıştır. Çalışma sonucunda her iki mantar türünün etanol özütleri antioksidan ve DNA koruyucu aktivitelerinin dikkate değer bir etki göstermemiştir ve toplam oksidan değerlerinin çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

Abstract

The use of mushrooms as food also as medicine is increasing day by day. In this study, an edible mushrooms - *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm. and *Coprinus micaceus* (Bull.) Fr. – were used as materials. This study was aimed to determine the antioxidant and DNA protective activity of ethanol extract of mushrooms and determine and compare total antioxidant, oxidative stress index with oxidative levels and Fe, Mg, Zn, Cu, Na and Ca contents. The antioxidant activity of mushrooms were analyzed with using DPPH and total antioxidant and oxidative levels were analyzed with using Rel Assay Diagnostics kits. DNA protective activity was determined by using the supercoiled pBR322 DNA. Furthermore, element contents of the mushrooms were determined with wet decomposition method by using atomic absorption spectrophotometry. As a result of the study, antioxidant and DNA protective activities of ethanol extracts of both mushroom species were not showed any notable effect and total oxidant value was determined very high.

GİRİŞ

Mantarlar kozmopolit olarak yaşayan organizmalar olup bazıları eski tarihlerden beri gerek besin gerekse ilaç yapımında kullanılmıştır (Akata ve ark. 2012). Yüksek protein, vitamin ve mineral içeriklerinden dolayı mantarlar dünya genelinde popüler gıda olmaya adaydırlar (Şanda ve ark. 2012). Farmasötik açıdan araştırılan mantarların sayısı günümüzde hala çok düşük seviyelerdedir. Bununla birlikte şimdiye kadar üzerinde çalışılan türler antitümör ve bağışıklık sistemini güçlendirici özellikleri açısından önemli bir yere sahiptir (Wasser 2002). Mantarlar yüksek tansiyon hiperkolesterolemi ve kanser gibi hastalıkların önlenmesinde yararlı terapötik gıdalar olarak bildirilmiştir (Sarıkurkcu ve ark. 2011).

Fe, Cu, Zn, Cr, I, Co, Mo ve Se gibi elementler insan sağlığı için gerekli elementler olmasına karşılık (Doğan ve ark. 2012), As, Cd, Ni, ve Hg gibi farklı elementler, toksik etki yaratmaktadır (Stihi ve ark. 2009). Bu bakımdan mantarlar bünyelerinde Cd ve Pb gibi ağır metalleri ve Fe ve Zn besin elementlerini biriktirmelerinden dolayı kullanılmadan önce metal konsantrasyonlarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir (Stihi ve ark. 2009).

Oksidatif strese bağlı olarak kalp hastalıkları, nörolojik bozukluklar, diyabet ve lösemi de dahil olmak üzere bir çok ciddi sağlık sorunları oluşabilir (Shameem ve ark. 2015). Günümüzde oksidatif hasarı azaltmak için insan vücuduna yardımcı olarak alınan antioksidanlara kaynak olarak birçok bitki türü ve kısımları kullanılmıştır (Mujic ve ark. 2010). Bu bitkilere ek olarak mantarların da antioksidan aktivite ve oksidatif stres indeksi (OSİ) bakımından incelenmesi çok önemlidir.

Türkiye sahip olduğu zengin canlı çeşitliliği ile besin ve tıbbi açıdan birçok makromantar türünü bünyesinde barındırmaktadır. (Sevindik ve ark. 2016). Bu çalışmada Muğla ilinden toplanan *Tricholoma terreum* ve *Coprinus micaceus* makromantarları materyal olarak kullanılmış ve mantarların etanol özütlerinin antioksidan ve DNA koruyucu aktiviteleri ile toplam antioksidan ve oksidan seviyeleri ve Fe, Mg, Zn, Cu, Na ve Ca elementlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1. *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm.



Şekil 2. *Coprinus micaceus* (Bull.) Fr.

Mantar ekstraktlarının hazırlanması

Mantar örnekleri 40°C'de inkübatörde kurutma işleminden sonra mekanik öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiştir. Öğütülen mantarlar 30'ar g tartılarak kartuşlanıp etanol ile soxhlet ekstraktöründe yaklaşık olarak 6 saat süreyle 75 °C'de özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir (BUCHI Extraction System Model B-811). Elde edilen özütler daha sonra basınç altında rotary evaporatörle 40 °C'de yoğunlaştırılıp, +4 °C'de deney yapılacak hale getirilmiştir. (BUCHI Rotavapor Model R-144).

Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi

Mantarların DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri Shimada ve ark. (1992), kullanmış oldukları method ile belirlenmiştir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma, Aldrich), 517 nm'de maksimum optik absorbansa sahip, stabil bir serbest radikaldir. Serbest radikal süpürücüyle DPPH'in reaksiyonu, 517 nm'deki absorbans değerinde düşüşe neden olur. 1mg/mL bileşik içeren stok çözeltiler, DMSO'da hazırlanmıştır. Çözeltinin 50µL'si 160µL

MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırmada kullanılan doğal mantar örneklerinden *T. terreum* Muğla merkez, *Cedrus libani* A. RICH yakınından, *C. micaceus* Muğla, Ula *Pinus nigra* Arn. yakınından toplanmıştır.

%0.039'luk DPPH'a eklenmiştir. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 517 nm'de absorbans okunmuştur. Tüm konsantrasyonlar ve örnekler için ayrı ayrı işlemler tekrarlanmıştır. Ayrıca referans antioksidan olarak askorbik asit kullanılmıştır. Daha sonra DPPH serbest radikal süpürme yüzdeleri; Süpürme aktivitesi (%)= [(ADPPH-AÖrnek)/(ADPPH)]x100 formülüne göre hesaplanmıştır.

DNA Koruyucu Aktivitelerin Belirlenmesi

Mantarların etanol özütlerinin, DNA'yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmid DNA'sı (vivantis) kullanılmıştır. Plazmid DNA'sı, özütlerin varlığında H₂O₂ ve UV uygulanarak hasara uğratılmıştır. Russo ve ark. (2000), tarafından belirlenen metoda göre % 1.5'lik agaroz jel üzerinde görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Özütlerin % 5.0'lik ve % 7.0'lik stok derişimlerinin hazırlanması amacıyla özütlerden sırasıyla 50 mg tartılarak üzerlerine 1000 µL distile su eklenmiştir. Özütün, tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

%5'lik mantar özütü solüsyonundan seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltme işlemlerinden sonra mantar özütlerinin olduğu tüpler 5 dk süresince UV ışınlarına maruz bıraktıktan sonra 2.0 µL yükleme tamponu eklenerek % 1.5'lik agaroz jelle yüklenmiştir. Işık kaynağı olarak oda sıcaklığında 302 nm dalga boyunda ve 8000 µW.cm⁻¹ yoğunlukta ışık üreten UV translüminatör (DNR-IS) cihazı kullanılmıştır. % 1.5'lik agaroz jel eketroforezi uygulamasından sonra jel dökümantasyon sisteminde (DNR-IS, MiniBIS Pro) görüntüleme işlemi yapılmıştır. Bu test sisteminde kontrol olarak, UV ve H₂O₂ uygulaması yapılmamış pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

TAS, TOS Seviyeleri ve OSİ Değerlerinin belirlenmesi

Mantarların toplam antioksidan seviyeleri (TAS), Erel (2004), tarafından geliştirilen Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılmıştır. Sonuçlar mmol Trolox equiv./L olarak ifade edilmiştir. Mantarların toplam oksidan seviyeleri (TOS), Erel (2005), tarafından geliştirilen Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör olarak hidrojen peroksid kullanılmıştır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv./L olarak ifade edilmiştir. TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi µmol birimine çevrilmiştir (Erel 2005). Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$OSİ = \frac{TOS, \mu mol H_2 O_2 equiv./L}{TAS, \mu mol Trolox equiv./L \times 10}$$

Element İçeriklerinin Belirlenmesi

Etüde 80 °C'de sabit tartıma kadar kurutulan mantar örnekleri sonra havanda öğütülmüştür. Öğütülen mantar örneklerinden 1'er gram tartılmış ve 50 mL'lik cam erlenlere konularak üzerine 10 mL konsantre HNO₃ eklenmiş ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Örnekler ısıtıcı tabla üzerinde tortu kalıncaya kadar ısıtılmıştır. Daha sonra bu erlenlerin üzerine 10 mL konsantre HCl eklenmiş yakma işlemi yenilenmiştir. Yakma işlemi takiben örnekler üzerine 20 ml seyreltik HCl eklenmiş ve örnekler süzümüştür (Doğan 2005).

Mantar örneklerinin element içerikleri Perkin Elmer (AAnalyst 400) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

BULGULAR

DPPH Aktiviteleri

T. terreum ve *C. micaceus* mantarlarının etanol özütlerinin DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi % inhibisyon değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Mantar Örneklerinin DPPH Serbest Radikal Süpürme Aktiviteleri (% inhibisyon)

| Konsantrasyon (mg/ml) | <i>T. terreum</i> (%) | <i>C. micaceus</i> (%) | Askorbik Asit (%) |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| 0.5 | 2.00 | 3.83 | 97.01 |
| 1 | 6.12 | 5.95 | 97.21 |

Mantarlardan elde edilen özütlerin DPPH serbest radikal süpürme başarısı özüt konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. *T. terreum* aktivitesinin *C. micaceus*'a göre daha fazla olduğu söylenebilir.

DNA Koruyucu Aktiviteleri

Yapılan DNA koruyucu aktivite testleri sonucunda her iki mantar örneğinin etanol özütlerinin DNA'yı koruyucu bir aktivite göstermediği belirlenmiştir.

TAS, TOS Seviyeleri ve OSİ Değerlerinin belirlenmesi

Mantarların TAS ve TOS seviyeleri ve OSİ değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Mantar Özütlerinin TAS, TOS Seviyeleri ve OSİ Değerleri

| | TAS (mmol Trolox equiv./L) | TOS (µmol H ₂ O ₂ equiv./L) | OSİ |
|--------------------|----------------------------|---|------|
| <i>T. terreum</i> | 0.38 | 16.76 | 4.41 |
| <i>C. micaceus</i> | 0.46 | 16.87 | 3.67 |

Mantarların etanol özütlerinin TAS değerlerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu mantarların TOS değerlerinin çok yüksek seviyeye sahip olduğu tespit edilmiştir. Her iki mantarın OSİ değeri çok yüksek olduğu görülmüştür.

Element Kompozisyonları

Mantarlar için literatürde yer alan değer aralıkları ve çalışmada yer alan örneklerin element içerikleri (ortalama±Std) Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Mantarların bünyelerinde yer alan elementlerin literatürde tespit edilen değer aralıkları ve deney sonuçları (Mallikarjuna vd. 2013)

| Element | Literatürde yer alan en düşük ve en yüksek değerler (mg.kg ⁻¹) | Çalışma verileri (mg.kg ⁻¹ Kuru ağırlık) | |
|---------|--|---|--------------------|
| | | <i>T. terreum</i> | <i>C. micaceus</i> |
| Fe | 14.6-835 | 341.98±2.58 | 84.51±5.73 |
| Mg | 600-2500 | 132.26±1.41 | 128.44±13.49 |
| Zn | 29.8-158 | 107.11±7.82 | 51.01±7.42 |
| Cu | 71-95 | 9.59±2.28 | 16.50±1.27 |
| Na | 60-920 | 219.44±0.62 | 485.83±5.42 |
| Ca | 18-590 | 115.93±3.58 | 125.94±0.86 |

Element içeriklerinin mantar türleri arasında farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Buna göre *T. terreum*'un element içeriklerinin Fe> Na> Mg> Ca> Zn> Cu olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık *C. micaceus*'un element içerikleri ise Na> Mg> Ca> Fe> Zn> Cu şeklinde olduğu bulunmuştur.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mantarların gerek gıda olarak gerekse tıbbi açıdan kullanımlarında biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda her iki mantar türünün de zayıf antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. DNA koruyucu aktivite testlerinde mantar özütlerinin herhangi bir aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanında farklı çözücüler kullanılarak yapılacak deneylerle sonuçların değişebileceği düşünülmektedir.

Mineral madde içeriklerinin belirlenmesi için yaptığımız çalışmada Mallikarjuna ve ark. (2013), yaptıkları araştırmaya kıyasla Mg ve Cu içeriği her iki mantar da literatür değerlerine göre daha az seviyelerde tespit edilmiştir. Bu durumun mantar örneklerinin toplandığı habitatlardan ve kullandıkları substratlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Oksidan maddelerin canlıda yoğunluğunun artması ile bu maddeler, nükleik asitler, lipidler, proteinler, enzimler ve karbonhidratlar ile etkileşime girerek hücre hasarı ve ölüm ile sonuçlanan etkilere neden olabilirler (Yerer ve Aydoğan 2000). Çalışmada kullanılan mantarların oksidan seviyelerinin çok yüksek bulunması nedeniyle bu bölgelerden toplanan mantarların tüketilmesi

durumunda insan vücudunda ciddi hasarlara neden olabileceği ve tüketiminin yapılmaması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akata I, Ergönül B, Kalyoncu F. 2012. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of 16 Wild Edible Mushroom Species Grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8 (2): 134-138.
- Doğan M (2005) *Ceratophyllum demersum* L.'de Kadmium Klorür, Sodyum Klorür ve Bunların Kombinasyonlarının Fizyolojik ve Morfolojik Etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Doğan HH, Şanda MA, Akata I. 2012. Mn, Fe, K, Na, and P contents in some *Tricholoma* (Fr.) Staude (*Tricholomataceae*) taxa from central Anatolia, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21: 3389- 3393.
- Erel O (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radicalcation. *Clin Biochem* 37: 277-85.
- Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuringtotal oxidant status. *Clin Biochem*. 38: 1103-11.
- Mujic I, Zekovic Z, Lepojevic Z, Vidovic S, Zivkovic J (2010) Antioxidant Properties Of Selected Edible Mushroom Species. *Journal Central European Agriculture* 11(4): 387-392.
- Mallikarjuna SE, Ranjini A, Haware DJ, Vijayalakshmi MR, Shashirekha MN, Rajarathnam S (2013) Mineral Composition of Four Edible Mushrooms. *Journal of Chemistry* 1:1-5.
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona M, Vanella A (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* 16(2): 91-98.
- Sarıkkürkçü C, Çopur M, Yıldız D, Akata I. 2011. Metal concentration of wild edible mushrooms in Soğuksu National Park in Turkey. *Food Chemistry*, 128:731-734.
- Sevindik M, Akgül H, Günel S, Doğan M (2016) *Pleurotus ostreatus*'un Doğal ve Kültür Formlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri ve

- Mineral Madde İçeriklerinin Belirlenmesi. Kastamonu Uni., Orman Fakültesi Dergisi, 2016, 16 (1): 153-156
- Shameem N, Kamili NA, Ahmad M, Masoodi FA, Parray PJ (2015) Radical scavenging potential and DNA damage protection of wild edible mushrooms of Kashmir Himalaya. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.10.005>
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 945–948
- Stihi C, Radulescu C, Busuioc G, Popescu VI, Gheboianu A, Ene A, (2009) Studies on Accumulation of Heavy Metals From Substrate To Edible Wild Mushrooms. Rom. Journ. Phys. 56 (1-2): 257–264.
- Şanda MA, Doğan HH, Akata I. 2012. Metal contents in some *Cortinarius* (Pers.) Gray (Cortinariaceae) taxa from Turkey. Fresenius Environmental Bulletin, 21: 3394- 3399.
- Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol. 60:258–274.
- Yerer BM, Aydoğan S, (2000) Oxidative Stress and Antioxidants. Erciyes University Journal of Health Sciences 9(1):49-53.