



## Kültüre Alınmış *Lentinula edodes*'in Metanol Ekstraktının Antioksidan ve *In Vitro* Bazı Enzim İnhibitör Aktiviteleri

Sinan ALKAN<sup>1</sup>, Haluk ÖZPARLAK<sup>2\*</sup>,  
Gökhan ZENGİN<sup>2</sup>, Gıyasettin KAŞIK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müd., Konya, Türkiye.

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Türkiye.

**Öz:** Shiitake mantarı adıyla da bilinen *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler Doğu Asya'ya özgü yenilebilir bir mantar olup antioksidan ve antimikrobiyal özellikleriyle tedavi edici etkiler içermektedir. Bu çalışmanın ilk kısmı Türkiye'deki kültür *L. edodes*'in metanolik ekstraktının antioksidan aktivitesini ayrıca total fenolik ve flavonoid içeriğini ilk kez tespit etmeyi amaçladı. Çalışmanın ikinci kısmında, bu mantar ekstraktının kolinesteraz, tirozinaz, amilaz ve glukozidaza karşı enzim inhibitör potansiyelleri araştırıldı. Bu çalışmada rutin çalışmalardan farklı olarak ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Ekstrakttaki total fenolik ve flavonoid içerikleri de Folin-Ciocalteu ve AlCl<sub>3</sub> yöntemleriyle tespit edildi. Antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS), indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC), fosfomolibdat ve metal şelatlama testleri gibi farklı yöntemlerle araştırıldı. *In vitro* enzim inhibitör potansiyelleri bir mikroplate okuyucuyla ölçüldü. Bu çalışmada flavonoid içerik ve tirozinaz enzim inhibisyonu tespit edilemedi. Ayrıca *L. edodes* ekstraktının antioksidan aktivitesi ve enzim inhibisyonu verilerinin özellikle, popüler ve etkili bir başka tıbbi mantar olan *Ganoderma lucidum*'un ekstraktından elde edilen verilerden daha düşük olduğu dikkat çekti.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, kültür *Lentinula edodes*, enzim inhibisyonu.

### Antioxidant and *In Vitro* Some Enzyme Inhibitory Activities of Methanolic Extract of Cultivated *Lentinula edodes*

**Abstract:** *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, as called Shiitake mushroom, is an edible fungus native to East Asia and contains several therapeutic actions such as antioxidant and antimicrobial properties. The first part of this work aimed to evaluate the antioxidant activity of methanolic extract of cultivated *L. edodes* in Turkey for the first time, as well as to measure the content of total phenolic and flavonoid compounds of mushroom extract. In the second part of this work, the enzyme inhibitory potentials of this mushroom extract were investigated against cholinesterase, tyrosinase, amylase and glucosidase. In this study, ultrasonication assisted extraction method was used in contrast to routine methods. Total phenolics and flavonoids contents in the extract were determined by Folin-Ciocalteu and AlCl<sub>3</sub> assays. Antioxidant activities were investigated by using different assays, including free radical scavenging assays (DPPH and ABTS) reducing power (FRAP and CUPRAC), phosphomolybdenum and metal chelating assays. The *in vitro* enzyme inhibitory potentials were measured with a microplate reader. Flavonoid content and tyrosinase enzyme inhibition could not be detected in the present study. It has been noted especially that the antioxidant activity and enzyme inhibition data of the *L. edodes* extract were lower than those of the *Ganoderma lucidum*, another popular and effective medical mushroom.

**Key words:** Antioxidant, cultivated *Lentinula edodes*, enzyme inhibition.



## Giriş

Doğal ve kültürü yapılan makrofunguslar tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de başta gıda olmak üzere yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Besin değerlerinin yanı sıra makrofunguslar antimikrobiyal, antioksidan, antikanserijen ve immünostimülan gibi biyolojik etkilere sahiptirler. Makrofungusların geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olmaları özellikle ilaçlara alternatif olma yolunda önemlerini her geçen gün daha da artırmaktadır. *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Lactarius*, *Auricularia*, *Hericium* ve *Lentinula* gibi cinslere ait bazı mantar türleri sahip oldukları biyolojik aktiviteleriyle tıbbi açıdan dikkat çekmektedirler (Üstün, 2011). Shiitake mantarı olarak da adlandırılan *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, dünyada kültürü yapılan mantar üretiminin %10'unu oluşturmaktadır. Başta Uzakdoğu ülkeleri olmak üzere Asya, Avrupa ve Amerika'da üretimi artmakta olan Shiitake mantarı taze ve kurutulmuş olarak tüketilmektedir. Protein, vitamin ve mineral maddeler bakımından oldukça zengin olması yanı sıra bünyesinde bulunan Lentinan maddesinin bir kanser tedavisinde olumlu sonuç vermiş olması sebebiyle tıp alanında kullanılması *L. edodes*'e olan ilgiyi artırmaktadır (Özçelik ve Pekşen, 2006).

Günümüzde serbest radikallerin nükleik asit, lipid, protein ve karbohidratlarla etkileşerek doku ve hücre hasarının ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı, ayrıca pek çok kanser türüne, kardiyovasküler hastalıklara, dejeneratif ve kronik hastalıkların gelişmesine sebep olduğu bilinmektedir (Aruoma, 1996; Hou ve ark., 2003). Organizmada serbest radikalleri veya bunların zararlı etkilerini gideren enzimatik savunma sistemleri vardır. Ancak insanlar günlük hayatta dengesiz beslenme, ilaç kullanımı, stres, sigara kullanımı, UV ışınları ve çevre kirliliği gibi çeşitli faktörlere maruz kaldıkları için bu savuma sisteminin çalışması bozulmakta, bunun sonucunda organizmada serbest radikallerin birikimi ve zararlı etkilerinin ortaya çıkması söz konusu olmaktadır. Bundan dolayı antioksidan olarak nitelendirilen bileşiklerin insanlar tarafından diyetle alınmaları

oldukça önem kazanmaktadır. Çünkü antioksidanlar serbest radikalleri çeşitli mekanizmalarla (toplayıcı, bastırıcı ve zincir kırıcı etkilerle) etkisiz hale getirirler veya serbest radikallerin oluşturdukları hasarları onarırlar (Halliwell, 1994; Shahidi, 1996).

Enzim inhibisyonu teorisi günümüzde pek çok sağlık probleminin tedavisinde en çok kabul gören stratejilerden birisidir. Bu teori hastalık belirtilerinin hafifletilmesi için anahtar enzimleri inhibe etme temeline dayandığından çok sayıda enzim inhibitörü olan sentetik ilaç üretilmektedir. Ancak bu ilaçların etkinliklerinin sınırlı olması ve yan etkileri olması gibi olumsuz yönleri doğal enzim inhibitörlerinin önemini artırmaktadır. Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) Alzheimer hastalığıyla,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz diyabetle ve tirozinaz ise deri hastalıklarıyla ilişkili enzimlerdir ve bu hastalıkların tedavisinde bu enzimleri inhibe eden sentetik inhibitörler kullanılmaktadır. Bununla birlikte sentetik olanların yerine kullanılacak doğal inhibitörlerin tespit edilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün daha çok popüler olmaktadır (Melzer, 1998; Tocco ve ark., 2009; Tundis ve ark. 2010).

Bu çalışmada Türkiye'de doğal yayılış göstermeyen bununla birlikte son yıllarda ülkemizde kültür yetiştiriciliğiyle gündeme gelen *L. edodes*'in kültür formundan ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan metanolik ekstraktının antioksidan özelliklerinin ortaya konması yanı sıra bazı enzim (AChE, BChE, tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz) inhibitör özelliklerinin ilk kez belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Mantar materyali ve ekstraktların

#### hazırlanması

Kültür *L. edodes* örnekleri (Şekil 1) Selçuk Üniversitesi Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'ndeki kültür ortamından elde edildi ve laboratuarda özel kurutma dolaplarında 40-45°C'de kurutularak değirmende toz haline getirildi. Bu çalışmada rutin yöntemlerin aksine ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.



):



**Şekil 1.** *Lentinula edodes*'in kültür ortamındaki görünümü

Metanolik ekstraktın hazırlanması için 20 mL metanol içerisindeki kurutulmuş 10 g mantar örneği 60 dk süreyle 30°C'lik bir sonikatör banyoda (WiseClean, WUC-D06H) bekletildi. Daha sonra 40°C'de rotary evaporatörde metanol uzaklaştırıldı ve elde edilen ekstrakt analize kadar +4°C'de saklandı.

#### **Toplam Fenolik Madde Tayini**

Mantar ekstraktından (2 mg/mL) 250 µL bir deney tüpüne alındı ve ardından 1mL Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilerek) eklendi. Daha sonra 750 µL %1'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden ilave edildi. Bu karışım karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbanı ölçüldü (Shimadzu UV-1800). Tüm işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de gerçekleştirildi. Mantar örneğinin fenolik madde içeriği g ekstraktta gallik asit eş değeri (mgGAE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

#### **Toplam flavonoid madde tayini**

Mantar ekstraktından (1 mg/mL) 1 mL deney tüpüne konuldu ve ardından 1mL metanolik AlCl<sub>3</sub> çözeltisi eklendi. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbanı belirlendi. Tüm işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Mantar örneğinin toplam flavonoid madde içeriği g

ekstraktta rutin eş değeri (mgRE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

#### **DPPH radikal giderme (süpürme) aktivitesinin belirlenmesi**

Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı, ardından mantar ekstraktının 1 mL'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 mL'siyle karıştırıldı. Tüpün ağzı kapatılıp iyice karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından absorbanı 517 nm'de okundu. Aynı işlemler troloks için de gerçekleştirildi ve mantar örneğinin DPPH radikalini giderme (süpürme) aktiviteleri g ekstraktta troloks eş değeri (mgTE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

#### **ABTS radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi**

Bu metotta ABTS<sup>+</sup> radikal katyonu, 7.4 mM ABTS solüsyonu ile 2.45 mM potasyum persülfatın reaksiyona girmesiyle direk olarak üretildi. Bu karışım 12-16 saat karanlıkta bekletilerek aktif radikal oluşması sağlandı. Analizden önce ABTS solüsyonunun 734 nm'de absorbanı 0.700±0.02 olacak şekilde metanolla seyreltilti. Mantar ekstraktından 1 mL alınarak 2 mL ABTS solüsyonuyla karıştırıldı. Kapalı tüp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ardından absorbanı 734 nm'de okundu. Aynı işlemler troloks içinde gerçekleştirildi ve ekstraktın ABTS katyon radikalini süpürme aktivitesi troloks eş değeri (mgTE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

#### **FRAP testi**

Bu test için öncelikle 0.3 M pH'sı 3.6 olan asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl<sub>3</sub>'ün 10:1:1 oranında karıştırılmasıyla FRAP reaktifi hazırlandı. Mantar ekstraktının 0.1 mL'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 mL'siyle karıştırılarak, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu karışımın absorbanı 593 nm'de okundu ve sonuçlar g ekstraktta troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).



):

### CUPRAC testi

Mantar ekstraktından 0.5 mL alınarak üzerine 1 mL  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 mM), 1 mL amonyum asetat (1 M; pH:7) ve 1 mL neokuproin (7.5 mM) çözeltileri konuldu. Ağzı kapalı bir biçimde karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek ardından absorbansları 450 nm'de okundu. Sonuçlar g ekstraktta troloks eşdeğer (mgTE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

### Fosfomolibdat testi

2 mg/mL konsantrasyonunda mantar ekstraktından 0.3 mL bir tüpe alınarak, bunun üzerine reaktif çözeltilisinden (0.6 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 28 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ve 4 mM amonyum molibdat) 3 mL eklendi. İyice karıştırılan tüp  $95^\circ\text{C}$ 'de 90 dakika inkübe edildi ve ardından çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Tüm işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de uygulandı. Antioksidan aktivite g ekstraktta troloks eşdeğeri (mmolTE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

### Metal şelatlama aktivitesi

Mantar ekstraktının  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarını şelatlama kapasitelerini belirlemek için önce içerisinde 2 mL ekstrakt (1 mg/mL) bulunan deney tüpüne 2 mM 0.05 mL  $\text{FeCl}_2$  çözeltilisi ilave edildi. Reaksiyon 0.2 mL 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı, tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından 562 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Tüm işlemler şelatlayıcı ajan olan EDTA içinde uygulandı. Sonuçlar g ekstraktta EDTA eş değeri (mgEDTA/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016a).

### Antikolinesteraz aktivitesi

Kolinesteraz inhibitör aktivite 96 kuyucuklu mikropate kullanılarak ölçüldü. Mikropate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 50  $\mu\text{L}$  mantar ekstraktı, 125  $\mu\text{L}$  DTNB [5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoik) asit], 25  $\mu\text{L}$  Tris-HCl tamponunda (pH=8.0) hazırlanan AChE veya BChE enzim çözeltilisi ilave edildi. Ardından karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek 25  $\mu\text{L}$  asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya

butiriltiyokolin iyodür (BTCl) eklendi. Aynı şekilde, AChE veya BChE enzim çözeltilisi olmadan hazırlanan reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltilisi ilave edilerek kör hazırlandı. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildikten sonra örneklerin ve körlerin absorbansları mikropate okuyucuda 405 nm'de kaydedildi. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslara ulaşıldı. Kolinesteraz inhibitör aktiviteleri g ekstraktta galantamine eşdeğer (mgGALAE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016b).

### Antitirozinaz aktivitesi

Bu çalışmada tirozinaz inhibitör aktivite L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı dopachrome yöntemiyle belirlenmeye çalışıldı. Mikropate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 25  $\mu\text{L}$  mantar ekstraktı, 40  $\mu\text{L}$  tirozinaz çözeltilisi ve 100  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu (pH=6.8) ilave edildi. Bu karışım 15 dakika süreyle  $25^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra 40  $\mu\text{L}$  L-DOPA eklendi. Aynı şekilde, tirozinaz enzim çözeltilisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltilisi eklenerek kör hazırlandı. Örneklerin ve körlerin absorbansları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra mikropate okuyucuda 492 nm'de kaydedildi. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslara ulaşıldı. Tirozinaz inhibitör aktiviteleri g ekstraktta kojik asite eşdeğer (mgKAE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016b).

### Antiglukozidaz aktivitesi

$\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktivitenin belirlenmesi için mikropate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 50  $\mu\text{L}$  mantar ekstraktı, 50  $\mu\text{L}$  glutasyon, fosfat tamponunda çözülmüş 50  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -glukozidaz çözeltilisi ile 50  $\mu\text{L}$  PNPG (4-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid) ilave edilerek 10 dakika süreyle  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Aynı şekilde,  $\alpha$ -glukozidaz enzim çözeltilisi konmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltilisi eklenerek kör hazırlandı. Reaksiyon 0.2 M 50  $\mu\text{L}$  sodyum karbonat ilavesiyle tamamlandı.



Örneklerin ve körlerin absorbanları mikrolate okuyucuda 400 nm'de kaydedildi ve körlerin absorbanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanlara ulaşıldı.  $\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktiviteleri g ekstrakta akarboza eşdeğer (mmolAKAE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016b).

#### Antiamilaz aktivitesi

Bu çalışmada  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivite Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemiyle belirlendi. Mikrolate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 25  $\mu$ L mantar ekstraktı ve fosfat tamponunda (pH=6.9 ve 6 mM sodyum klorür) hazırlanmış 50  $\mu$ L  $\alpha$ -amilaz çözeltisi eklenerek, 10 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildi. Ardından bu örnekler %0.05'lik 50  $\mu$ L nişasta çözeltisi eklendi. Aynı şekilde,  $\alpha$ -amilaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi ilave edilerek kör hazırlandı ve karışım 10 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildi. 1 M 25  $\mu$ L HCl eklenerek reaksiyon durduruldu ve ardından 100  $\mu$ L iyot-potasyum iyodür çözeltisi ilave edildi. Örneklerin ve körlerin absorbanları mikrolate okuyucuda 630 nm'de kaydedildi ve körlerin absorbanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanlara ulaşıldı.  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktiviteleri g ekstrakta akarboza eşdeğer (mmolAKAE/g) olarak sunuldu (Zengin ve ark., 2015; Özparlak ve ark., 2016b).

#### Bulgular ve Tartışma

Antioksidan kapasiteyi tamamıyla ortaya koyan tek bir metot henüz geliştirilememiş olmasından dolayı birden fazla metot kullanılarak antioksidan tablonun tümüyle yorumlanması daha doğru olacaktır. Bu sebeple bu çalışmada da *L. edodes*'in kültür formundan elde edilen metanolik ekstraktın antioksidan özellikleri farklı antioksidan test sistemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri de araştırılmıştır. Ancak bu çalışmada *L. edodes*'de flavonoid içerik tespit edilmemiştir. Benzer şekilde, Gil-Ramirez ve ark. (2016) mantarlarda flavonoidlerin bulunamayacağını rapor etmişlerdir. Fenolik bileşikler, antimikrobiyal, antikanser

ve antioksidan aktivite gibi oldukça geniş bir sahada biyolojik potansiyele sahip olmaları sebebiyle oldukça ilgi çeken bir bileşik grubudur. *L. edodes* ekstraktının toplam fenolik içeriği spektrofotometrik Folin metoduyla tespit edilmiştir (Tablo 1). Bununla birlikte *L. edodes*'in toplam fenolik içeriğini, günümüzde oldukça popüler ve etkili bir başka tıbbi mantar olan *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın Türkiye'deki yabani ve kültür formlarının sulu ekstraktından elde edilen fenolik içeriğiyle (Özparlak ve ark., 2016a) karşılaştırdığımızda *L. edodes*'in daha düşük içeriğe sahip olduğu görülmektedir (Tablo 1).

Genellikle antioksidan kapasite çalışmalarında en az bir radikal kullanılarak incelenen ekstraktın bu radikali hangi seviyede giderdiği tespit edilmeye çalışılmaktadır. En çok kullanılan radikaller DPPH ve ABTS radikalleridir. DPPH stabil bir radikaldır ve metanolik çözeltisi mor renklidir. Antioksidan maddelerin bu radikale elektron veya hidrojen aktarmalarıyla mor renk sarı renge dönüşmektedir. Bu renk değişimi 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. ABTS radikali ise potasyum persülfatla reaksiyona girerek 12-16 saat sonra aktif hale gelmekte ve radikalin koyu mavi rengi antioksidan maddelerin etkisiyle açılmaktadır. *L. edodes* ekstraktının bu iki metoda göre radikal giderme etkinliği Tablo 1'de verilmiştir ve görülebileceği gibi bu etkinlikler *G. lucidum*'dan elde edilen değerlerden (Özparlak ve ark., 2016a) oldukça düşüktür. Bu durum *L. edodes* ekstraktındaki fenolik bileşik miktarının düşük olması ile açıklanabilir ve çeşitli araştırmacılar da benzer şekilde fenolik bileşik düzeyi ile serbest radikal giderme arasında güçlü bir ilişkinin varlığını rapor etmişlerdir (Chen ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017).

İndirgeme gücü antioksidan kapasitenin ölçülmesinde önemli bir parametredir ve antioksidan bileşiklerin elektron verme yeteneğini gösterir. Bu çalışmada CUPRAC ve FRAP testleri uygulanmıştır. CUPRAC testi antioksidan bileşiklerin  $\text{Cu}^{2+}$ -neokuproin kompleksini  $\text{Cu}^{+}$ 'e indirgemesine ve 450 nm'de bu değişimin ölçülmesi prensibine dayanır.



Tablo 1. *Lentinula edodes*'in metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi ve *Ganoderma lucidum*'dan daha önce elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması

Parametreler	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Ganoderma lucidum</i> (Kültür) <sup>a</sup>	<i>Ganoderma lucidum</i> (Yabani) <sup>a</sup>
<b>Toplam fenolik içerik</b> (mgGAE/g ekstrakt)	5.25±0.35 *	21.22±0.17	25.58±0.15
<b>Toplam flavonoid içerik</b> (mgRE/g ekstrakt)	**	0.78±0.14	0.67±0.13
<b>DPPH radikal giderme aktivitesi</b> (mgTE/g ekstrakt)	7.43±0.29	16.10±0.84	17.67±0.06
<b>ABTS radikal giderme aktivitesi</b> (mgTE/g ekstrakt)	30.88±2.26	75.39±0.61	83.44±0.23
<b>FRAP aktivitesi</b> (mgTE/g ekstrakt)	6.47±0.11	38.15±0.59	46.55±0.45
<b>CUPRAC aktivitesi</b> (mgTE/g ekstrakt)	16.51±0.75	59.91±0.77	78.02±0.69
<b>Fosfomolibdat aktivitesi</b> (mmolTE/g ekstrakt)	0.43±0.03	0.41±0.06	0.46±0.10
<b>Metal şelatlama aktivitesi</b> (mgEDTA/g ekstrakt)	6.35±0.20	8.02±0.05	14.45±0.15

\*Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma.

\*\*Ölçülebilir flavonoid içerik tespit edilememiştir.

GAE: gallik asit eşdeğeri; RE: rutin eşdeğeri; TE: trolox eşdeğeri; EDTAE: EDTA eşdeğeri.

<sup>a</sup>Özparlak ve ark. (2016a)'na göre

FRAP testinde ise Fe<sup>+3</sup>-TPTZ kompleksinin Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenmesi ve bunun 595 nm'de spektrofotometrik ölçümü söz konusudur. *L. edodes* ekstraktının bu iki metoda göre indirgeme gücü Tablo 1'de sunulmuştur ve bu değerlerin *G. lucidum*'dan elde edilen indirgeme güçlerinden (Özparlak ve ark., 2016a) oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Fosfomolibdat testi asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo(VI)'yı Mo(V)'e indirgemesine ve oluşan yeşil renkli Mo(V)-fosfat kompleksinin 595 nm'de ölçülmesi temeline dayanır. Ekonomik ve kolay olmasından dolayı son yıllarda antioksidan kapasite çalışmalarında çok tercih edilmektedir. *L. edodes* ekstraktının bu testteki aktivitesi 0.43 mmolTE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Bu değer *G. lucidum* için rapor edilenlerle (Özparlak ve ark., 2016a)

benzerlik göstermektedir(Tablo 1). Bu durum *L. edodes* ekstraktında fenolikler dışında çeşitli bileşiklerin (askorbik asit, tokoferol vb.) fosfomolibdat testinde aktif rol aldığını göstermektedir.Geçiş metalleri Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikalının üretiminde bir katalizör gibi rol üstlenir. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonun bir başlatıcısıdır ve bu radikalin etkisiz hale getirilmesi büyük önem arz eder. Bu sebeple geçiş metallerinin şelatlama yeteneği antioksidan özelliklerin başında gelmektedir. Bu çalışmada ekstraktın şelatlama yeteneği ferrozin testi kullanılarak incelenmiştir ve testin sonucu EDTA eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu testin sonucuna göre de *L. edodes* ekstraktının aktivitesi *G. lucidum*'un (Özparlak ve ark., 2016a) gerisinde kalmıştır (Tablo 1).



*L. edodes*'in antioksidan özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar olmasına rağmen bu çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılmıştır (Kitzberger ve ark., 2007; Da Silva ve Jorge, 2011; Carneiro ve ark., 2013). Genel olarak bakıldığında *L. edodes*'in orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediği gözlenmiştir. Bu durum çalışmamızda da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte sentetik antioksidanların yan etkileri düşünüldüğünde *L. edodes* doğal antioksidan kaynağı olarak düşünülebilecek niteliktedir.

Deri ve saç renginin oluşmasında görev alan tirozinaz bakır içeren bir enzimdir. Tirozinaz enziminin inhibisyonu deri hastalıklarında hiperpigmentasyon tedavisinin temelidir. Hidrokinon, arbutin ve kojik asit bilinen tirozinaz inhibitörleridir. Bu inhibitörler beyazlatıcı ajanlar olarak kozmetik alanında kullanılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin yan etkileri göz ardı edilememektedir (Kim ve Uyama, 2005; Solano ve ark. 2006). Bu çalışmada gerçekleştirilen enzim inhibisyon testleri sonuçlarına baktığımızda *L. edodes* metanolik ekstraktının tirozinaz enzim inhibisyon özelliği tespit edilmemiştir.

Alzheimer hastalığında nöron ve akson kaybı ile asetilkolin seviyesinde azalma gerçekleşir. Bu sebeple asetilkolin seviyesini artırmak Alzheimer tedavisinde önemlidir. Asetilkolin düzeyi asetilkolini yıkan kolinesteraz enzimlerinin baskılanmasıyla artırılabilir. AChE ve BChE farklı genlerle kodlanan ancak özellikle substrat seçicilikleri ve bazı katalitik mekanizmalarındaki farklılıkları sebebiyle birbirinden ayrılan enzimlerdir (Howes ve ark., 2003). Çalışmalarda, kolinesteraz inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyindeki artışların, Alzheimer hastalığının erken dönemlerindeki bilinç kayıplarını iyileştirebileceği rapor edilmektedir ve bu sebeple Alzheimer tedavisinde galantamin, fizostigmin gibi sentetik kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte bu sentetik inhibitörlerin çeşitli toksik etkileri olması ve kısa ömürlü olmaları klinik açıdan kullanımlarının sınırlandırılmalarına sebep olmuştur (Melzer, 1998). Tablo 2'de görülebileceği gibi *L. edodes*

ekstraktının AChE inhibisyon değeri hem kültür hem de yabani *G. lucidum*'dan elde edilen değerlere (Özparlak ve ark., 2016b) oldukça yakın bulunmuştur. Ancak *L. edodes* ekstraktının BChE inhibisyon değeri *G. lucidum*'un değerlerinin (Özparlak ve ark., 2016b) oldukça altındadır.

$\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimleri karbohidrat sindiriminde görev alan anahtar enzimlerdir. Nişasta,  $\alpha$ -dekstrin ve maltoz  $\alpha$ -amilaz tarafından hidrolize edilirken,  $\alpha$ -glukozidaz ince barsakta disakkaritleri ve oligosakkaritleri glukoz monomerlerine hidroliz etmektedir. Bu sebeple  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu artan kan glukoz seviyesinin azaltılmasında önemli bir noktadır. Akarboz ve miglitol gibi glukoz seviyesini düşüren inhibitör ilaçların yerine doğal inhibitörlerin önemi dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yapılan öneriden sonra daha da fazla dikkat çekmektedir (Laube, 2002; Singh ve ark., 2010). Bu çalışmada elde edilen *L. edodes* ekstraktına ait  $\alpha$ -amilaz inhibisyon değerleri hem kültür hem de yabani *G. lucidum*'dan elde edilen değerlere (Özparlak ve ark., 2016b) oldukça benzerdir (Tablo 2). Bununla birlikte Tablo 2'de görülebileceği gibi  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon değerleri oldukça düşüktür.

Mantarların doğal enzim inhibitörlerinin bir kaynağı olabileceği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur (Afrin ve ark., 2016; Gheibi ve ark., 2016; Özparlak ve ark., 2016b). Bu çalışmada *L. edodes*'den elde edilen inhibisyon verilerinin çalışılan enzimlerle ilgili yeni inhibitörler geliştirilmesine ışık tutması umut edilmektedir. Bununla birlikte bu çalışmada tespit edilen *L. edodes*'e ait antioksidan kapasite ve enzim inhibisyon verilerine bakıldığında; Türkiye'deki kültür *L. edodes*'in genel olarak güncel ve önemli bir tıbbi mantar olan *G. lucidum*'un Türkiye'deki kültür ve yabani formları kadar potansiyele sahip olmadığı sonucu ortaya konmuştur.



Tablo 2. *Lentinula edodes*'in metanol ekstraktının enzim inhibitör özellikleri ve *Ganoderma lucidum*'dan daha önce elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması

Parametreler	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Ganoderma lucidum</i> (Kültür) <sup>b</sup>	<i>Ganoderma lucidum</i> (Yabani) <sup>b</sup>
<b>Asetilkolinesteraz inhibisyonu</b> (mgGALAE/g ekstrakt)	0.90±0.03 *	0.92±0.01	1.02±0.01
<b>Butirikolinesteraz inhibisyonu</b> (mgGALAE/g ekstrakt)	0.23±0.05	0.30±0.04	1.29±0.37
<b>Tirozinaz inhibisyonu</b> (mgKAE/g ekstrakt)	**	0.59±0.01	9.04±0.01
<b>α-amilaz inhibisyonu</b> (mmolAKAE/g ekstrakt)	0.16±0.01	0.14±0.01	0.18±0.01
<b>α-glukozidaz inhibisyonu</b> (mmolAKAE/g ekstrakt)	0.33±0.04	0.60±0.04	1.11±0.01

\*Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma.

\*\*Ölçülebilir tirozinaz inhibisyonu tespit edilememiştir.

GALAE: Galantamin eş değeri; KAE: Kojik asit eş değeri; AKAE: Akarboz eş değeri.

<sup>b</sup>Özparlak ve ark. (2016b)'na göre

### Kaynaklar

- Afrin S., Rakib M.A., Kim B.H., Kim, J.O., Ha Y.L., *Eritadenine from edible mushrooms inhibits activity of angiotensin converting enzyme in vitro*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64: 2263-2268 (2016).
- Aruoma O.I., *Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions*, Journal of the American Oil Chemists Society, 73(12): 1617-1625 (1996).
- Carneiro A.A., Ferreira I.C., Dueñas M., Barros L., Da Silva R., Gomes E., Santos-Buelga, C., *Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of Agaricus blazei and Lentinus edodes*, Food Chemistry, 138: 2168-2173 (2013).
- Chen G.L., Zhang X., Chen S.G., Han M.D., Gao Y.Q., *Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China*, Journal of Functional Foods, 30: 290-302 (2017).
- Da Silva A.C., Jorge N., *Antioxidant properties of Lentinus edodes and Agaricus blazei extracts*, Journal of Food Quality, 34: 386-394 (2011).
- Gheibi N., Zavareh S.H., Behbahani G.R., Haghbeen K., Sirati-sabet M., Ilghari D., Chegini K.G., *Comprehensive kinetic and structural studies of different flavonoids inhibiting diphenolase activity of mushroom tyrosinase*, Applied Biochemistry and Microbiology, 52: 304-310 (2016).
- Gil-Ramírez A., Pavo-Caballero C., Baeza E., Baenas N., Garcia-Viguera C., Marín FR., Soler-Rivas C., *Mushrooms do not contain flavonoids*, Journal of Functional Foods, 25: 1-13. (2016).
- Halliwell B., *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence*, Lancet, 344: 721-724 (1994).
- Hou W.C., Lin R.D., Cheng K.T., Hung Y.T., Cho C.H., Chen C.H., Hwang S.Y., Lee M.H., *Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants*, Phytomedicine, 10: 170-175 (2003).





- Howes M.J.R., Houghton P.J., Perry N.S.L., *Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders*, *Phytotherapy Research*, 17: 1-18 (2003).
- Kim Y.J., Uyama H., *Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15): 1707-23 (2005).
- Kitzberger C.S.G., Smânia A., Pedrosa R.C., Ferreira S.R.S., *Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids*, *Journal of Food Engineering*, 80: 631-638 (2007).
- Laube H., *Acarbose: An update of its therapeutic use in diabetes treatment*, *Clinical Drug Investigation*, 22: 141-156 (2002).
- Melzer D., *New drug treatment for alzheimer's diseases: lessons for healthcare policy*, *British Medical Journal*, 316: 762-764 (1998).
- Özçelik E., Pekşen A., *Lentinus edodes yetiştiriciliğinde fındık zurufundan hazırlanan farklı yetiştirme ortamlarının verim ve bazı mantar özelliklerine etkileri*, 21(1): 65-70 (2006).
- Özparlak H., Zengin G., Kaşık G., *Türkiye'den yabani ve kültüre alınmış *Ganoderma lucidum*'un sulu ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması*, *Mantar Dergisi*, 7(2): 102-109 (2016a).
- Özparlak H., Alkan S., Zengin G., Aktümsek A., *Türkiye'deki yabani ve kültüre alınmış *Ganoderma lucidum*'un sulu ekstraktlarının in vitro bazı enzim inhibitör özelliklerinin karşılaştırılması*, *Mantar Dergisi*, 7(2): 110-117 (2016b).
- Shahidi F., *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois (1996).
- Singh J., Dartois, A., Kaur, L., *Starch digestibility in food matrix: A review*, *Trends in Food Science & Technology*, 21: 168-180 (2010).
- Solano F., Briganti S., Picardo M., Ghanem G., *Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects*, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 19: 550-571 (2006).
- Tocco G., Fais A., Meli G., Begala M., Podda G., Fadda M.B., Corda M., Attanasi O.A., Filippone P., Berretta S., *Peg-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 36-39 (2009).
- Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F., *Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update*, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10: 315-331 (2010).
- Üstün O., *Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri*, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4): 223-240 (2011).
- Zengin G., Sarikurkcü C., Gunes E., Uysal A., Ceylan R., Uysal S., Güngör H., Aktümsek A., *Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders*, *Food Function*, 6: 2794-2802 (2015).
- Zhang XX., Shi QQ., Ji D., Niu LX., Zhang YL., *Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) species native to China*, *Food Research International* 97: 141-148 (2017).