

***Calvatia gigantea* (Dev kurtmantarı) protein
hidrolizatlarında biyoaktif peptidlerin araştırılması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 115Z774

Proje Yürütücüsü:

Yard. Doç. Dr. Ali ZEYTÜNLÜOĞLU

ÖZSÖZ

Son yıllarda enzimatik hidroliz, gıda işleme veya mikrobiyal fermantasyon gibi yöntemler kullanılarak çeşitli doğal protein kaynaklarından elde edilen peptidlerin farklı biyolojik aktiviteler sergilemeleri, bu peptidlerin medikal, zirai ve endüstriyel alanda kullanım potansiyellerini de arttırmıştır.

Biyoaktif peptidlerin eldesinde çoğunlukla bitkisel ve hayvansal gıdalar tercih edilmesine rağmen bunlar dışında proteince zengin makromantarların da alternatif doğal peptid kaynakları olarak kullanılabileceklerini gösteren birkaç çalışma literatürde yer almaktadır.

Ülkemiz coğrafi konumu itibarı ile birçok mantar türünün yetişebileceği eşsiz bir iklime sahiptir. Ülkemizde mantarlar ile yapılan çalışmalar özellikle son yirmi yılda büyük artış göstermiştir. Yapılan çalışmaların çoğunluğunun sistematik özellikte olmasına karşın, biyolojik aktivite potansiyellerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar da bu süreçte artmıştır. Biyolojik zenginliklerimizden olan mantarlardan yeterince yararlanabilmek ve olası zararlarından korunabilmek için bu tür araştırmalara ivme kazandırılması büyük önem arz etmektedir.

Dolayısıyla bu araştırma projesi ile ülkemizde yetişen yabani bir mantar türü *Calvatia gigantea*'dan medikal, zirai ve endüstriyel alanda değerlendirilebilecek biyoaktif doğal peptid/lerin elde edilmesi planlanmıştır.

Bu proje kapsamında *Calvatia gigantea* protein ekstraktından enzimatik hidroliz ile elde edilen peptid hidrolizatından kromatografik teknikler kullanılarak biyoaktif peptidin saflaştırılması ve saflaştırılan biyoaktif peptidin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu projenin gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu(TÜBİTAK)'na teşekkürlerimi sunarım.

Proje Yürütücüsü

Ali ZEYTÜNLÜOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖZSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE METOD.....	7
2.1. <i>Calvatia gigantea</i> mantarının temini.....	7
2.2. <i>Calvatia gigantea</i> mantarından biyoaktif peptidin/peptidlerin saflaştırılması	7
2.2.1 <i>Calvati gigantea'nın</i> protein ekstraktının hazırlanması.....	7
2.2.2 Proteinlerin enzimatik hidroliz.....	7
2.2.3 Hidroliz derecesinin ölçülmesi.....	7
2.2.4 Peptid ekstraktındaki peptidlerin kromatografik ayrımı.....	8
2.2.4.1 DEAE Kromatografisi ile peptidlerin ayrımı.....	8
2.2.4.2 Boya-ligand kromatografisi ile peptidlerin ayrımı.....	8
2.2.4.3 Jel Filtrasyon kromatografisi ile peptidlerin ayrımı.....	9
2.2.4.4 HPLC ile peptidlerin ayrımı.....	9
2.3 Protein Tayini.....	10
2.4 SDS-PAGE analizi.....	10
2.5 Saflaştırılan peptidin biyolojik aktivitesinin araştırılması.....	10
2.5.1 Antifungal aktivitenin araştırılması.....	10
2.5.2 Proteaz aktivitesinin araştırılması.....	11
2.6 Saflaştırılan peptidin karakterizasyonu.....	11
2.6.1 pH stabilitesinin belirlenmesi.....	11
2.6.2 Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	11
2.6.3 Kütle spektrometresi ile saflaştırılan peptidin yapısının aydınlatılması	12
3. BULGULAR.....	13

3.1. <i>Calvatia gigantea</i> mantarından biyoaktif peptidin saflaştırılması.....	13
3.2 SDS-PAGE Analizi.....	15
3.3 Antifungal aktivitenin araştırılması.....	16
3.4 Saflaştırılan peptidin karakterizasyonu.....	16
3.4.1 pH stabilitesinin belirlenmesi.....	16
3.4.2 Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	17
3.4.3 Kütle spektrometresi ile saflaştırılan peptidin yapısının aydınlatılması	17
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	18
5. KAYNAKLAR.....	21

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı mantar türlerinde tespit edilen biyolojik aktiviteler.....	2
Tablo 2. Bazı mantar türlerinden elde edilen biyoaktif peptid ve proteinler.....	3
Tablo 3. <i>C.gigantea</i> mantarı ekstraktından alkalaz hidroliziyle HLPC sonrası elde edilen yüksek proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonun NanoLC-ESI-MSMS analizi.....	17

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Calvatia gigantea'nın morfolojik görünümü.....	5
Şekil 2. Lösin ile TNBS standart grafiği.....	13
Şekil 3. İyon değişim kromatografisi ile biyoaktif peptidin ayrımı.....	14
Şekil 4. Boya-ligand kromatografisi ile biyoaktif peptidin ayrımı.....	14
Şekil 5. Jel filtrayon kromatografisi ile peptidin ayrımı.....	15
Şekil 6. HPLC ile biyoaktif peptidin ayrımı.....	15
Şekil 7. HPLC ile ayrımı yapılan ve yüksek proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonun SDS-PAGE sonrası gümüş boyama görüntüsü.....	16

ÖZET

Son yıllarda enzimatik hidroliz, gıda işleme veya mikrobiyal fermantasyon gibi yöntemler kullanılarak çeşitli doğal protein kaynaklarından elde edilen biyoaktif peptidlerin; antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, antioksidatif, antifungal ve antikanser gibi farklı birçok biyolojik aktivite sergilemeleri, dolayısıyla insan sağlığı ile ilişkili birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli rol oynamaları, bu peptidlerin yeni ilaçların geliştirilmesinde terapötik amaçlı kullanım potansiyellerini de arttırmıştır.

Ekosistemin en önemli parçalarından biri olan makromantarlar ise; kendilerine has spesifik aroma ve tatlarının yanında, zengin besin içeriklerinden (protein, karbohidrat, yağ asidi, vitamin ve minerallerce) dolayı hızlı artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Makromantarlardan enzimatik hidroliz sonucu elde edilen spesifik peptid fragmanlarında farklı biyolojik aktivitelerin gözlenmesi makromantarların çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilirliklerini gündeme getirmiştir.

Bu çalışmada Denizli ilinde doğal olarak yetişen, yenilebilen yabani bir mantar türü olan *Calvatia gigantea* mantarı protein ekstraktından enzimatik hidroliz ile elde edilen peptid hidrolizatından sıralı olarak farklı kromatografik teknikler (iyon değişim(DEAE-Cellulose), boya-ligand(Affi-gel □ Blue gel) ve gel filtrasyon (Sephadex G75) kullanılarak biyoaktif peptidin saflaştırılması ve saflaştırılan biyoaktif peptidin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Peptidin sıcaklık ve pH kararlılığı; 37°C ve pH 4.0 - 7.0 olarak belirlendi. Saflaştırılan peptidin *Physalospora tucumanensis*, *Fusarium oxysporum* ve *Mycosphaerella fijiensis* karşı antifungal aktivitesi gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *Calvatia gigantea*, mantar, biyoaktif peptid, antifungal aktivite, proteaz aktivite, saflaştırma

ABSTRACT

Currently, it has been reported that natural peptides obtained by microbial fermentation, food processing and enzymatic hydrolyzation showed many biological activity such as antimicrobial, antitrombotic, antihypertensive, antioxidant and anticancer and then they have significant therapeutic potential.

Fungi is one of the most important parts of ecosystem and they have both specific aroma and sweet and also rich nutrition ingredients such as protein carbohydrates, fatty acids, minerals in the world.

In this project; we performed purification and characterization of bioactive peptides from the natural edible fungi species *Calvatia gigantea* found in Denizli naturally. For this purpose, The different chromatographic techniques such as ion exchange (DEAE-Cellulose), dye-ligand(Affi-gel \square Blue gel) and gel filtration (Sephadex G75) were used for purification. Temperature and pH stability of the purified peptide were defined as 37°C and pH 4.0 - 7.0. The purified peptide did not show any significant antifungal activity against *Physalospora tucumanensis*, *Fusarium oxysporum* ve *Mycosphaerella fijiensis*.

Keywords: *Calvatia gigantea*, mushroom, bioactive peptide, antifungal activity, protease activity, purification

1.GİRİŞ

Ekosistemin en önemli parçalarından biri olan makromantarlar zengin besin içerikleri (protein,karbonhidrat,yağ asidi vitamin ve minerallerce) ve kendilerine has spesifik aroma ve tatları sayesinde hızlı artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Makromantarların besin olarak tüketilmelerinin dışında sahip oldukları farmakolojik karakterler sayesinde Çin ve Japonya başta olmak üzere bir çok uzak Asya ülkesinde çeşitli hastalıklara karşı geleneksel tıpta ilaç olarak kullanıldığı da bilinmektedir (Barros et al.,2008; Üstün,2011).

Makromantarlardan saflaştırılan çok sayıda doğal bileşenin (küçük metabolitler, proteinler, polisakkaritler, protein-polisakkarit kompleksleri vb.) antioksidant, antifungal, antitümör, antiviral, antibakteriyal ve immunomodülatör ajan olarak iş görmeleri, özellikle saflaştırılan birkaç mantar bileşeni ile kanser ve diğer hastalıkların tedavisine yönelik klinik faz (I-II-III) denemelerine geçilmesi (Xu et al, 2011) birçok araştırmacının makromantarlara olan ilgisini arttırmıştır (Tablo 1).

Makromantarların gıda ve medikal uygulamalar dışında biyoteknolojik uygulamalarda da biyokütle,organik asit (Pandey ve ark.,2000), enzim (Zheng ve Shetty, 2000) ve inhibitor (Lau et al., 2013) gibi metabolik ürünlerin elde edilmesinde kullanıldığı, yüksek protein içerikleri sebebiyle de beslenme yetersizliği görülen kişilerde gıda takviyesi ve bağıışıklığı arttırıcı bir ticari ürün olarak tablet formları satıldığı bilinmektedir. Ayrıca makromantarlar zengin protein içerikleri ve bütün esansiyel aminoasitleri içermelerinden dolayı da vejeteryanlar tarafından ençok tercih edilen gıdaların başında yer almaktadır. Makromantarlarda bulunan protein miktarı mantar tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g olduğu belirtilmektedir (Erkel, 1992).

Table 1. Bazı mantar türlerinde tespit edilen biyolojik aktiviteler

Biyolojik Etki	Mantar türü	Kaynaklar
ACE inhibitörü	<i>Pholiota adiposa</i>	Kim et al.,2006
Antianjiogenik	<i>Antrodiella liebmannii</i> , <i>Agaricus murrill</i> , <i>Rigidoporus ulmarius</i>	Chen et al.,2005
Antifungal	<i>Fomes lignosus</i> , <i>Marasmius jodocodo</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	Gbolagade et al.,2007 Wang et al.,2006
Hipoglisemik	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Phellinus baumii</i>	Jeong et al.,2010 Hwang et al.,2005
Antienflamatuar	<i>Agrocybe aegerita</i> , <i>Termitomyces albuminosus</i>	Diyabalanage et al.,2008 Lu et al.,2008
Antioksidan	<i>Russula cyanoxantha</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>Amanita caesarea</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>P.cystidiosus</i> , <i>P.ostreatus</i> <i>P.sajor-caju</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus sp</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Lentinula edodes</i> ,	Ribeiro et al.,2008 Lakshmi et al.,2004 Anguiano et al.,2007 Yang et al.,2002
Antikanseröjen (Antitümör)	<i>Agrocybe aegerita</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> <i>Phellinus gilvus</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Phellinus rimosus</i>	Diyabalanage et al.,2008 Stanley at al.,2005 Bae et al.,2005 Kaneno et al.,2004 Ajith et al.,2003

Mantarlarda yeralan proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen spesifik peptid fragmanlarında farklı biyolojik aktivitelerin gözlenmesi mantarların biyoaktif peptidlerce zengin olduklarını ortaya koymaktadır (**Tablo 2**).

Table 2. Bazı mantar türlerinden elde edilen biyoaktif peptid ve proteinler

Mantar Tür adı	Biyolojik aktivitesi	Biyolojik yapı (Peptid/protein)	Peptid/protein adı	Dizisi	Molekül kütlesi (kDa)	Referans
<i>Cordyceps militaris</i>	Antifungal HIV-1 reverse transcriptase, antiproliferatif aktivite	Peptid	Cordymin	AMAPPYGYRTPDAAQ	11	Wong et al., 2011 Park et al., 2009
<i>Ganoderma lucidum</i>	Antifungal	Protein	Ganodermin	AGETHVTVMINHAGRGAPKLV VGGKKLS	15	Wang and Ng, 2006
<i>Pleurotus eryngii</i>	Antifungal	Peptid	Eryngin	ATRVVYCNRRSGSVVGGDD TVYYEG	10	Wang and Ng, 2004a
<i>Polyporus alveolaris</i>	Antifungal	Polipeptid	Alveolarin	GVCDMADLA	28	Wang and Ng, 2004b
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Antifungal	Peptid	Agrocybin	ANDPQCLYGNVAAKF	9	Ngai et al., 2005
<i>Lentinus edodes</i>	Antifungal HIV-1 reverse transcriptase, antiproliferatif aktivite	Protein	Lentin	CQRAFNNPRDDAIRW	28	Ngai and Ng, 2003
<i>Lyophyllum shimeji</i>	Antifungal	Protein	LAP	AGTEIVTCYNAGTKVPRGPS AXGGAIFFN	14	Lam and Ng, 2001a
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	Antifungal	Protein	Hypsin	ITFQGDLDRQQVITNADTR RKRDVRAA	20	Lam and Ng, 2001b
<i>Tricholoma giganteum</i>	Antifungal HIV-1 reverse transcriptase	Protein	Trichogin	QVHWPMF	27	Guo et al, 2005
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Antifungal	Peptid	Pleurostrin	VRPYLVAF	7	Chu et al., 2005

Biyoaktif peptidler; kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilere sahip olan spesifik protein fragmanları olarak tanımlanmaktadır (Korhonen ve Pihlanto,2006). Biyoaktif peptidler diyabetin kontrolünde (Holst et al.,2008), obezite tedavisinde (Yada et al.,2008),kanser tedavisinde (Liu et al.,2007) ,antimikrobiyal ajan (Tanabe et al.,2007) olarak kullanılmaktadırlar. Biyoaktif peptidlerin biyolojik fonksiyonları dışında köpük oluşumu, jelleşme, emülsiyon oluşturma gibi özellikleri endüstriyel uygulamalar açısından ekonomik değerlerini arttırmaktadır (Gauthier and Pouliot, 2003). Biyoaktif peptidler üstlendikleri fizyolojik rollerden dolayı terapötik ajan geliştirilmesi için uygun adaylar olarak da kabul edilmektedirler (Danguah and Agyei, 2012).

Ülkemiz coğrafi konumundan dolayı birçok mantar türünün yetişebileceği eşsiz bir iklime sahiptir. Ülkemiz mantarları ile yapılan çalışmalar özellikle son yirmi yılda büyük artış göstermiştir. Yapılan çalışmaların çoğunluğunun sistematik özellikte olmasına karşın, biyolojik aktivite potansiyellerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar da bu süreçte artmıştır.

Biyolojik zenginliklerimizden olan mantarlardan yeterince yararlanabilmek ve olası zararlarından korunabilmek için bu tür araştırmalara ivme kazandırılması büyük önem arz etmektedir (Kalyoncu et al.2010).Dolayısıyla bu araştırma projesi ile ülkemize yetişen yabancı bir mantar türünden (*C. gigantea*) medikal, zirai ve endüstriyel alanda değerlendirilebilecek yeni biyoaktif doğal peptidlerin elde edilmesi planlanmaktadır.

C. gigantea (Dev Kurtmantarı, Kabak mantarı, Patates Mantarı); mantarı; Agaricomycetes sınıfındaki Lycoperdaceae familyasında yer alan kozmopolit bir mantar türüdür. *C.gigantea* mantarı; genellikle çayır kenarlarında, tarla ve, ormanlarda yaz sonu ve sonbahar başlarında görülmektedir. Yenilebilir bir mantar türü olan *C.gigantea* mantarı büyük şişkin, futbol topunu andıran şekliyle dikkat çekmektedir (**Şekil 1.**). Etli kısmı; genç dönemde beyaza yakın renkte olup, sünger gibi yumuşak ve içi dolgundur. Gelişmesi ilerleyince rengi sülfür sarısından zeytin yeşiline dönmekte ve tatlımsı, ağır bir koku oluşturmaktadır.



Şekil 1. *Calvatia gigantea*'nın morfolojik görünümü

C.gigantea mantarı besin kaynağı olarak tüketilmesinin yanında, biyoteknolojik öneme sahip enzimlerin (α -amilaz) üretiminde, kanamayı durdurucu (hemostatik ajan), yara iyileştirici ve arıcılıkta arıları sakinleştirici olarak kullanılmaktadır (Coetzee and Wyk, 2009). *C.gigantea* mantarında antibakteriyel, antienflamatuar, analjezik, antiproliferatif ve antikanser aktiviteleri tespit edilmiştir (Shen and Su, 1991; Wu et al., 2011, Yeh et al., 2011; Ng et al., 2003, Takaishi et al.,1997). Bu mantardan elde edilen calvacin bileşiğinin antitümör etkisinin yanında antiviral aktivitesiyle çocuk felci virüsüne karşı etkili olduğu da ifade edilmektedir (Coetzee and Wyk, 2009). *Calvatia* cinsinde yeralan diğer türlerde craniformin ve rubroflavin olarak tanımlanan iki maddenin antikarsinojenik özeliğe sahip olduğu, yine *Calvatia* türlerinden elde edilen ubiquitin–benzeri peptidin, göğüs kanserine karşı antiproliferatif ve dalak hücrelerine karşı antimitojenik aktivite gösterdiği görülmüştür (Lam et al., 2001)

C. gigantea'nın protein içeriği % 13,7 (Shannon and Stevenson, 1975) ve % 27,3 (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi, 2005) olarak ölçülmüştür. Yapısında linoleik asit'in fazla, palmitik ve oleik asit ise az miktarlarda bulunduğu, kısa zincirli yağ asitlerinden oktanoik, dekanoik ve laurik asitin *C.gigantea*'nın lipit içeriğinin önemli bileşenlerini oluşturduğu vurgulanmaktadır (Nedelcheva et al., 2007). Fosfotidilkolin ve fosfotidiletanolamin eser miktarlarda yapısında yeralmaktadır. 5'-GMP ve glutamik asit *C.gigantea*'da tespit edilen 2 önemli tatlandırıcı bileşenidir. *Calvatia* türleri kitinolitik enzimleri (kitinaz, kitobiaz) içermektedir. *Calvatia* türlerinde lipaz ve karboksi esteraz aktiviteleri gözlenmiştir (Coetzee and Wyk, 2009). *C. gigantea*'da uçucu bileşen olarak 3-Metilbutanol, 2-Metilbutanol 3-metilbütan-1-ol ve yüksek konsantrasyonda metoksibenzen tespit edilmiştir (Leffingwell and Alford ,2011; Overton.,1994).

Calvatia gigantea'nın sporlarının çok büyük miktarlarda solunmasıyla sporların Lycoperdonosis hastalığına sebep olduğu, Calvatia türlerinin diğer mantar türleri gibi allerjik durumları (asthma and rhinitis) tetiklediği belirtilmektedir. Calvatia türlerinin farklı metalleri (Hg, As, Pb, Cd ve Li) yüksek seviyelerde biyoakümüle edebilmesinden dolayı biyoindikatör olarak da kullanılabileceği belirtilmektedir (Coetzee and Wyk, 2009).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. *Calvatia gigantea* mantarının temini

C.gigantea mantarı Pamukkale Üniversitesi Mantar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi.

2.2. *Calvatia gigantea* mantarından biyoaktif peptidin/peptidlerin saflaştırılması

2.2.1 *Calvati gigantea'nın* protein ekstraktının hazırlanması

50 g *C.gigantea*(kurutulmuş); % 1,5 PVP, % 1 C vitamini ve 0,15 M NaCl içeren 50 mM Tris pH:7,4 tamponu ile blendırda parçalandı. Ardından homojenizörde homojenize edilerek 2,5 saat(+4°C'de) karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenat çift katlı tülbent bezinden süzöldükten sonra 4500 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatanta % 80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve gece boyu +4°C'de bekletildi. Çöken proteinler 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi sonrası ayrıldı. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen protein peleti 50 mM Tris pH:7,4 tamponu ile çözüldü. Protein örneğinden amonyum sülfat tuzlarının uzaklaştırılması amacıyla 50 mM Tris pH:7,4 tamponuna karşı diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz sonrası mantar ekstraktının protein içeriği Bradford yöntemine göre belirlendi(Bradford, 1976).

2.2.2 Proteinlerin enzimatik hidroliz

Enzimatik hidroliz öncesi *C.gigantea* protein ekstraktının (25 ml) pH'sı 8,0'e ayarlandı. Enzimatik hidrolizde kullanılacak alkalaz enzimi için enzim/substrat oranı (4/100) olacak şekilde uygulandı. Enzimatik parçalanma için karışım 4 saat 50 °C'deki bir su banyosu içerisinde inkübe edildi. Reaksiyon karışım pH'sının 4 saat boyunca sabit kalması 2 M NaOH ile sağlandı. Enzimatik reaksiyon; karışımın 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmesi ile sonlandırıldı. Enzimatik parçalamaya uğramayan proteinler 8000 g'de 60 dakika santrifüjlenerek çöktüröldü.

2.2.3 Hidroliz derecesinin ölçülmesi

100 µl protein hidrolizatına 100 µl 50 mM Na₂B₄O₇(pH:9,2) ve 50 µl 4mM TNBS(taze hazırlanmış) eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra karışıma 18 mM Na₂SO₃ içeren 2 M NaH₂PO₄'den 50 µl eklenerek mikropilaka

okuyucuda 420 nm'de absorbanları ölçüldü. Standart olarak L-Lösin kullanıldı. Elde edilebilecek maksimum α -amino miktarını belirleyebilmek için de protein ekstraktı (25 ml) 6N HCl ile 110°C'de 24 saat muamele edilerek asit hidrolizine maruz bırakıldı. Asit hidrolizi sonrası örnek 4500 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantın pH'sı 6N NaOH ile nötralize edildi. Hidroliz derecesi (DH) aşağıdaki formüle göre hesaplandı. (Li-Chan et al., 2012; [Tanzadehpanah et al., 2013](#)).

$$DH (\%) = (L_t / L_{max}) \times 100$$

L_t : Enzimatik hidroliz sonrası açığa çıkan α -amino miktarı

L_{max} : Protein ekstraktındaki maksimum α -amino miktarı

2.2.4 Peptid ekstraktındaki peptidlerin kromatografik ayrımı

2.2.4.1 DEAE Kromatografisi ile peptidlerin ayrımı

Enzimatik hidroliz sonrası elde edilen peptid ekstraktındaki peptidlerin DEAE ile kromatografik ayrımında kolon dolgu materyali olarak DEAE-Seluloz kullanıldı. 10 mM Tris HCl pH:7.4 tamponu ile dengelenen kolondan[2,5x 10 cm econo column(Biorad)] peptidlerin elüsyon 0,15-0,25-0,50 M NaCl içeren dengele tamponu ile adım adım şeklinde gerçekleştirildi. Kolon akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı ve fraksiyonlar 1 ml olarak toplandı. Yüksek proteaz aktivitesi ölçülen fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlar 10 mM 10 mM Tris-HCl pH: 7,4 tamponuna karşı diyalizlendi ve boya ligand kromatografisine uygulandı.

2.2.4.2 Boya-ligand kromatografisi ile peptidlerin ayrımı

Peptidlerin boya ligand kromatografisi ile ayrımında kolon dolgu materyali olarak Affi-gel \square Blue gel (Biorad) kullanıldı. 10 mM Tris-HCl pH: 7,4 ile dengelenen kolondan(1,5 x 10 cm) elüsyon 1,5 M NaCl ile gerçekleştirildi. Kolon akış hızı 0,2 ml/dk olarak ayarlandı ve fraksiyonlar 1 ml olarak toplandı. Yüksek proteaz aktivitesi ölçülen fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlar 10 mM 10 mM Tris-HCl pH: 7,4 tamponuna karşı diyalizlendi ve gel filtrasyon kromatografisine uygulandı.

2.2.4.3 Jel Filtrasyon kromatografisi ile peptidlerin ayrımı

Peptidlerin jel filtrasyon kromatografisi ile ayrımında kolon dolgu materyali olarak Sephadex G75 (Sigma) kullanıldı. Kolonun (1,5x 30 cm) dengelenmesi ve elusyon 0,15 M NaCl içeren 10 mM Tris-HCl pH: 7,4 ile gerçekleştirildi. Kolon akış hızı 0,2 ml/dk olarak ayarlandı ve fraksiyonlar 1 ml olarak toplandı.

2.2.4.4 HPLC ile peptidlerin ayrımı

Jel filtrasyon kromatografisi sonrası yüksek proteaz aktivitesi ölçülen fraksiyonlar birleştirildi ve HPLC'ye uygulandı. HPLC yürütme koşulları aşağıdaki gibi uygulandı:

HPLC Koşulları:

Sistem : Agilent 1260

Kolon : ACE RP-C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µM, 300 Å)

Mobil Faz A : % 0,1 (v/v) TFA

B : % 0,1 (v/v) TFA içeren asetoneitril

Akış hızı : 1 ml / dakika

Dedeksiyon : DAD 220 nm

Uygulama : Gradient elusyon

0-4 dakika % 100 B tamponu

4-25 dakika % 60 B tamponu

25-30 dakika % 50 B tamponu

30-35 dakika % 40 B tamponu

35-40 dakika % 0 B tamponu

40-45 dakika % 40 B tamponu

45-50 dakika % 50 B tamponu

50-55 dakika % 60 B tamponu

50-60 dakika % 100 B tamponu

HPLC sonrası elde edilen kromatogramda en yüksek proteaz aktivitesi gözlenen pikteki peptid fraksiyonu toplanarak saflık kontrolü ve moleküler kütle tayini için SDS-PAGE'e uygulandı.

2.3 Protein Tayini

Saflaştırma adımlarındaki protein tayinleri sığır serum albuminin standart (25-50-75-100-125-150 µg/ml) olarak kullanıldığı Bradford yöntemine göre belirlendi (Bradford, 1976). Yöntem mikrolaka okuyucu formatta uygulandı. 10 µl her bir standart, bilinmeyen örnek ve distile su (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi. Üzerlerine 200 µl Bradford reaktifi [40 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml 95 % (v/v) Etanol, 55 ml 85 % (v/v) Fosforik asit] ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekleme sonrası 595 nm'de absorbanlar okundu. Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak protein konsantrasyonları hesaplandı. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.4 SDS-PAGE analizi

Biyoaktif peptidin (peptidlerin) saflaştırma adımları sodyum dodesil sülfat poliakrilamid je elektroforezi (SDS-PAGE) ile izlendi. SDS-PAGE sistemi Laemmli metoduna göre uygulandı (Laemmli, 1970). Yürütme için %16'lik jel yüzdesi kullanıldı. SDS-PAGE sonrası jel Oackley ve arkadaşlarının gümüş boyama

yöntemi kullanılarak boyandı (Oackley et al., 1980).

2.5 Safılaştırılan peptidin biyolojik aktivitesinin araştırılması

2.5.1 Antifungal aktivitenin araştırılması

Safılaştırılan peptidin antifungal aktivitesi Chu ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemin minör modifikasyonlarıyla gerçekleştirildi (Chu et al, 2005). Antifungal aktivitenin değerlendirilmesinde de *Physalospora tucumanensis*, *Fusarium oxysporum* ve *Mycosphaerella fijiensis* mantar türleri kullanıldı. Nystatin (1 µg) pozitif, BSA (sığır serum albumin) (100µg) negatif kontrol olarak kullanıldı. Safılaştırılan peptid 40-200 µg olarak 10 µl (10 mM Tris HCl pH:7.4) içinde çözeltileri hazırlandı. Misel koloni gelişimi için hazırlanan patates dekstroz agardan (8,5 g/L) petri kaplarına (100 mm ×15 mm) 10 ml döküldü. Herbir petriye ayrı ayrı olarak mantar türleri inoküle edildi. Steril disklere (0,625 cm çapında) emdirilen kontrol (tampon: 10 mM Tris HCl pH:7,4),pozitif ve negatif kontrol ile safılaştırılan peptid örneği petri kaplarına 1 cm aralıklarla yerleştirildi. Misel gelişimi için petriler 23°C'de 72 saat inkübe edildi. Oluşan inhibisyon zonuna göre safılaştırılan peptidin antifungal etkinliği değerlendirildi.

2.5.2 Proteaz aktivitesinin araştırılması

Safılaştırılan peptidin proteaz aktivitesi Wong ve arkadaşları tarafından uygulanan yöntemine göre gerçekleştirildi (Wong et al., 2011). Kazein proteaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanıldı. 2 g kazein 10 ml distile su içerisinde çözümlenerek ,üzerine 10 ml 0,2 M NaOH eklendi. Daha sonra 60 ml distile su daha eklenerek karışım karıştırıcıda karıştırıldı. Karışımın pH'sı HCl ile 7,5'e ayarlanarak 15 dakika 90°C'de bekletildi. Daha sonra 100 ml 40 mM CaCl₂ içeren 100 mM Tris-HCl (pH:8,0) ile karışım seyreltilerek soğutuldu. Çöken pelet uzaklaştırılacak, sıvı kısım aktivite ölçümünde kullanıldı. Proteaz aktivitesinin ölçümünde pozitif kontrol olarak Tripsin kullanıldı. Safılaştırılan peptid ve pozitif kontrol olarak seçilen tripsinin 50 µl'sine yukarıda hazırlanan kazein çözeltilisinden 350 µl eklenerek 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 1 ml % 4 TCA (trikloroasetik asit) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika daha bekletildi. Daha sonra 15000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. 280 nm'de süpernatantın absorbansı suya karşı (kör olarak) ölçülerek kazeinin proteolitik parçalanması ile oluşan kazein fragmentlerinin miktarı belirlendi.

2.6 Saflaştırılan peptidin karakterizasyonu

2.6.1 pH stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan peptidin pH stabilitesinin belirlenmesi için pH'sı 3-11 arasında değişen farklı tamponlarda [50 mM glisin-HCl tamponu (pH 2.0-3.0), 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.0-5.5), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0-8.5) ve 50 mM glisin-NaOH tamponu (pH 9.0-11.0)] peptid 18 saat 4°C'de inkübe edildi. Daha sonra proteaz aktivitesi ölçüldü.

2.6.2 Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan peptidin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (40, 50, 55, 65, 80 ve 100 °C) inkübasyonları yapılacaktır. Daha sonra proteaz aktivitesi ölçüldü.

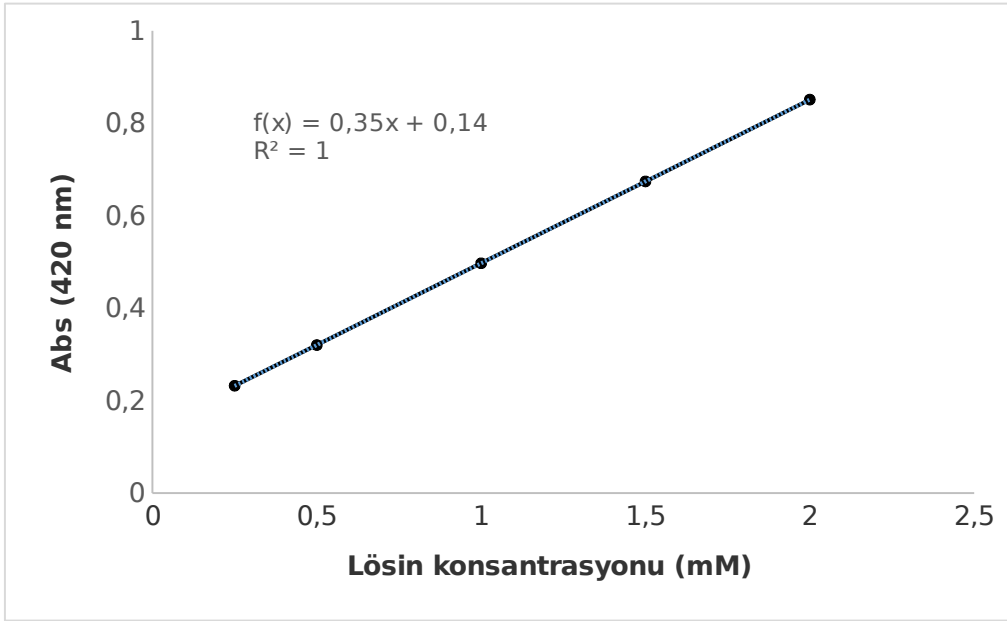
2.6.3 Kütle spektrometresi ile saflaştırılan peptidin yapısının aydınlatılması

SDS-PAGE jelden bir bistiiri yardımıyla uygun koşullarda kesilen peptid bandı ependorf tüpüne transfer edilerek kütle tayini ve tanımlanması için (Proteome Factory AG, Berlin, Almanya) analize gönderildi. Nano LC-ESI-MS/MS kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen veri Mascot Search yazılımı (Matrix Science Ltd., London, UK) kullanılarak NCBI veritabanında tarandı.

3. BULGULAR

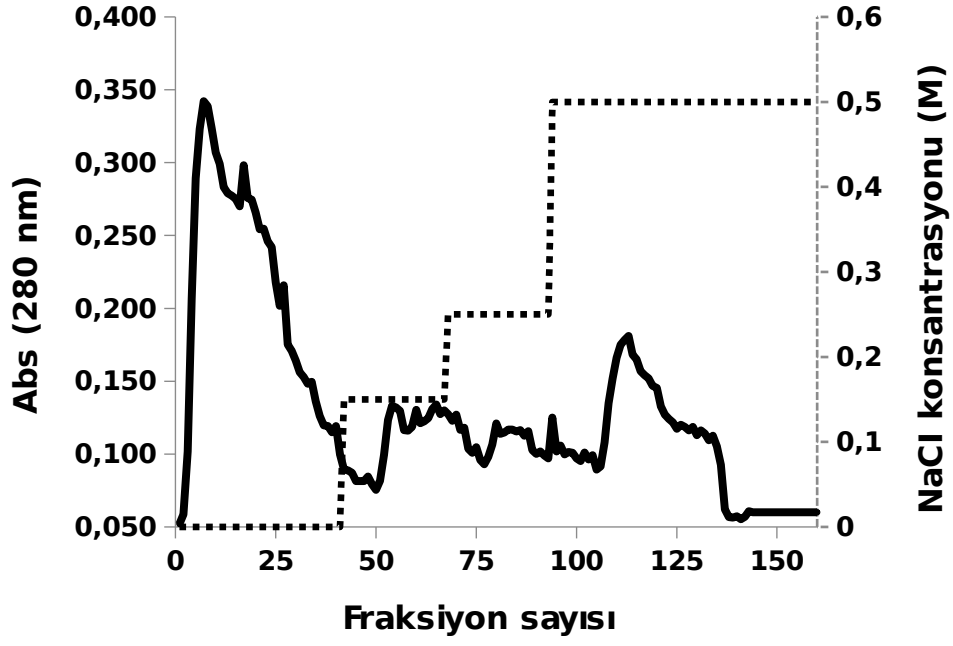
3.1. *Calvatia gigantea* mantarından biyoaktif peptidin saflaştırılması

Calvatia gigantea'dan enzimatik hidrolizle elde edilen peptid hidrolizatında hidroliz derecesi lösin standart grafiği (**Şekil 2**) kullanılarak % 87,3 olarak hesaplandı. Enzimatik hidroliz sonrası peptid hidrolizatından biyoaktif peptidin saflaştırılmasında sıralı olarak iyon değişim, boya-ligand, jel filtrasyon kromatografileri kullanıldı.

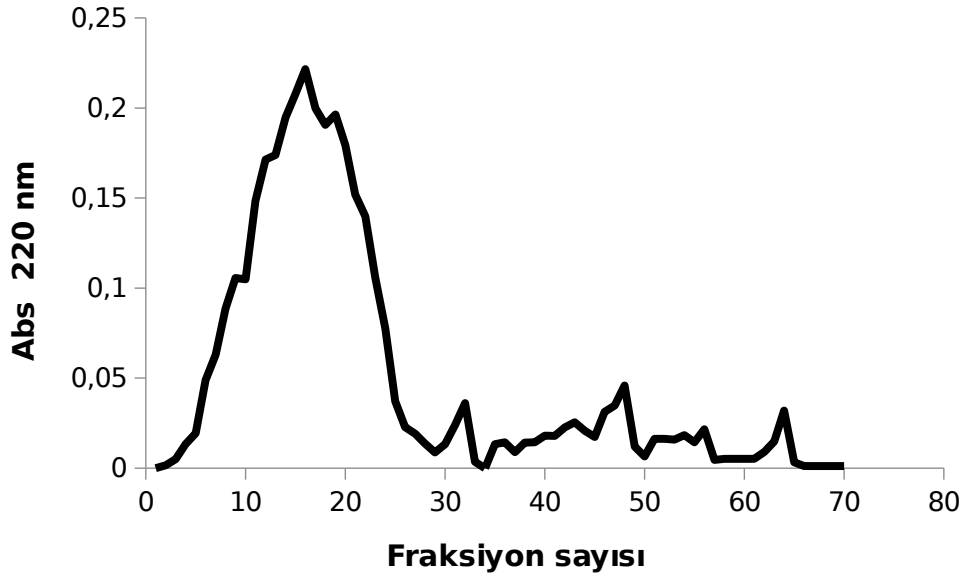


Şekil 2. Lösin ile TNBS standart grafiği

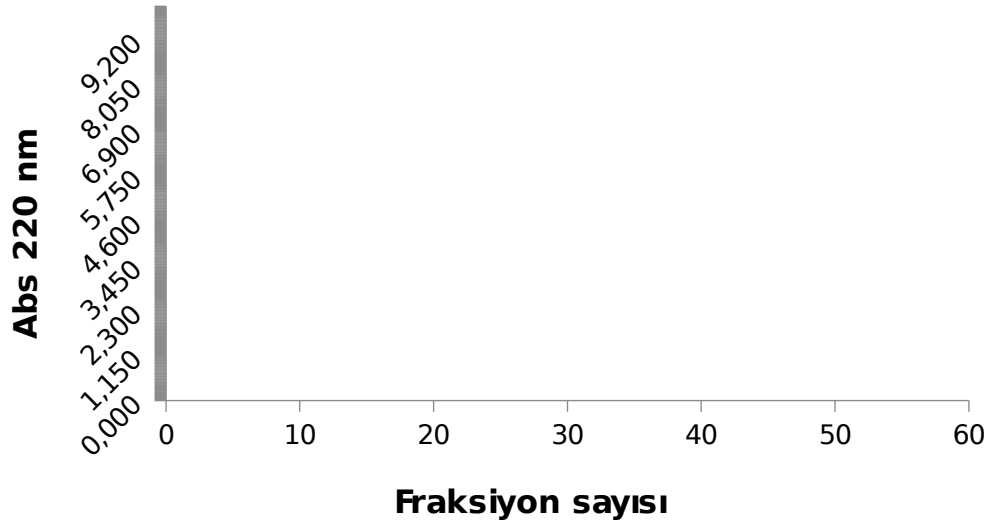
İyon değişim kromatografisinde yüksek proteaz aktivitesi görülen 53-57-58-61-63-68-71-72-74-100-107-110-115-120-122-126-130-133 no'lu fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki saflaştırma adımı olan boya ligand kolonuna uygulandı (**Şekil 3**). Boya-ligand kromatografisinde yine yüksek proteaz aktivitesi görülen 9-12-14 no'lu fraksiyonlar birleştirilerek jel filtrasyon kolonuna uygulandı (**Şekil 4**). Jel filtrasyon kromatografisinde de yüksek aktivite ölçülen 20'den 33'e kadar olan fraksiyonlar birleştirildi (**Şekil 5**). Birleştirilen fraksiyonlar son saflaştırma adımı olarak HPLC kolonuna uygulandı (**Şekil 6**).



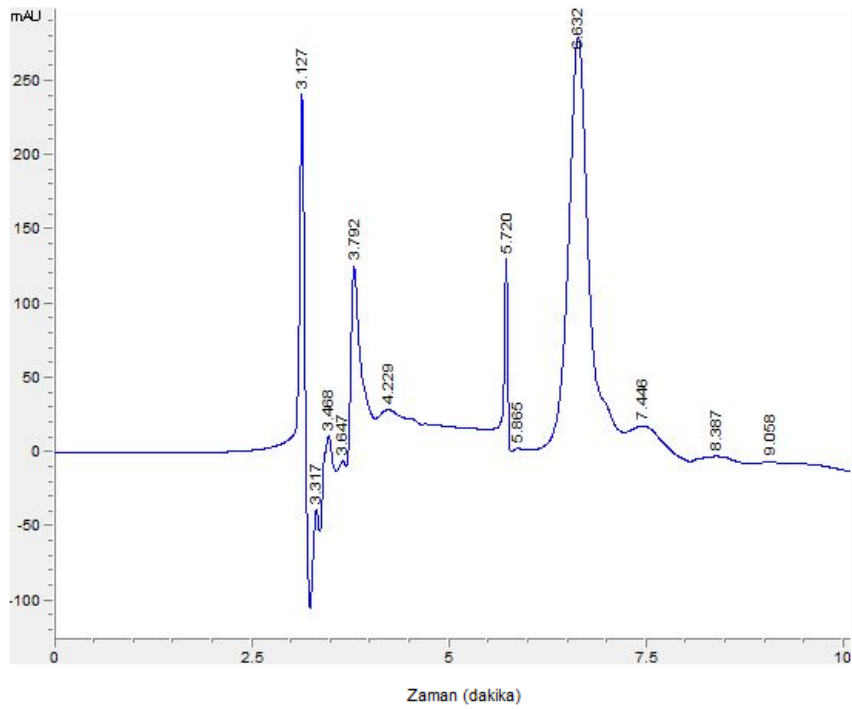
Şekil 3. İyon değişim kromatografisi ile biyoaktif peptidin ayrımı



Şekil 4. Boya-ligand kromatografisi ile biyoaktif peptidin ayrımı



Şekil 5. Jel filtrasyon kromatografisi ile peptidin ayrımı



Şekil 6. HPLC ile biyoaktif peptidin ayrımı

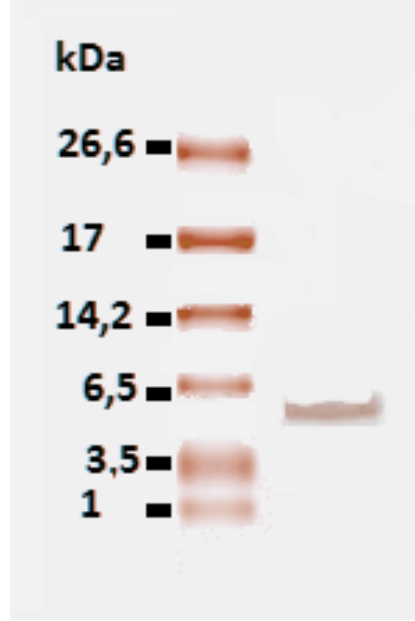
HPLC ile ayrımı yapılan fraksiyonlarda yüksek proteaz aktivitesi gösteren 6.632 dakika'da gelen fraksiyon MS analizi için ayrıldı ve SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı.

3.2 SDS-PAGE Analizi

Saflaştırma adımlarından sonra elde edilen peptidin saflığı için SDS-PAGE uygulaması yapıldı. Laemmlı metoduna göre Biorad'ın mini protean tetra cell

sistemi kullanılarak %16'lık jelde yürütme işlemi yapıldı. Peptidin molekül kütlesinin belirlenmesinde Ultra-low Range Molecular Weight Marker (M.W. 1,060-26,600)(sigma M3546) kullanıldı. Jelde peptid varlığı Oakley ve arkadaşlarının uyguladığı gümüş boyama protokolüne göre gerçekleştirildi (Oakley et al., 1980).

Bu boyama sonrasında jelde 5,2 kDa büyüklüğünde bir peptidin varlığı belirlendi(Şekil 7).



Şekil 7. HPLC ile ayrımı yapılan ve yüksek proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonun SDS-PAGE sonrası gümüş boyama görüntüsü

3.3 Antifungal aktivitenin araştırılması

Bitki patojen funguslarına (*Physalospora tucumanensis*, *Fusarium oxysporum* ve *Mycosphaerella fijiensis*) karşı farklı konsantrasyonları uygulanarak antifungal aktivitesi değerlendirilen *C. gigantea*'dan saflaştırılan peptidin *hiçbir* antifungal aktivitesi görülmedi.

3.4 Saflaştırılan peptidin karakterizasyonu

3.4.1 pH stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan peptidin farklı pH'larda ölçülen proteaz aktivitelerinde pH 4.0-7.0 aralığında peptidin stabilitesini koruduğu gözlemlendi.

3.4 2 Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan peptidin farklı sıcaklıklarda ölçülen proteaz aktivitelerinde en yüksek proteaz aktivitesi 37 °C'de koruduğu gözlenirken, en düşük proteaz aktivitesi 95°C'de ölçüldü. Sıcaklık artışına paralel olarak proteaz aktivitesinde bir düşüş gözlemlendi.

3.4.3 Kütle spektrometresi ile saflaştırılan peptidin yapısının aydınlatılması

SDS-PAGE jelden kesilen ve molekül kütlesi SDSPAGE ile 5.2 kDa olarak tanımlanan bandın Nano LC–ESI-MS/MS sonrasında peptid uzunluğu 9 ila 14 arasında değişen 4 farklı dizisi tanımlanmıştır (Tablo 3). Tanımlanan bu diziler ile ilgili olarak NCBI veritabanlarında yapılan tarama sonrasında bu diziler ile çok düşük oranlarda(% 40'ın altında) eşleşme bulunmuştur.

Tablo 3. *C.gigantea* mantarı ekstraktından alkalaz hidroliziyle HLPC sonrası elde edilen yüksek proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonun NanoLC-ESI-MSMS analizi

Peptid dizisi	Peptid Uzunluğu (amino asit)	m/z	Alıkonma zamanı (dk)	Kütlesi (Da)
TSEDCYVLR	9	571,7607	22,7	1141,5073
SPTSEDCYLLR	11	670,8115	26,56	1339,6077
LLVEASGNVLFRR	12	659,3796	37,02	1316,7451
LVSEFDNSLCLWGK	14	834,4086	42,3	1666,8025

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya nüfusunun 2050 yılında 11,3 milyar, ülkemiz nüfusunun ise 93,5 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir. Artan nüfusa paralel olarak da insanlar için gerekli olan gıda kaynaklarındaki azalma, gıda kaynaklarını, enerji kaynaklarından daha stratejik bir konuma getirmiştir. Küresel ısınma, kullanılabilir su kaynaklarındaki azalma, tarım arazilerinin kuraklaşması, toprağın verimsizleşmesi ve tuzlanması, erozyon, tarım ürünlerinde hastalık ve zararlıların direnç kazanması, tarım arazi parsellerinin miras paylaşımı yoluyla küçülmesi, köyden kente göçün artması gibi faktörler gıda kaynaklarında önemli oranda azalmaya sebep olmuştur. Dolayısıyla tüm dünyada insanların sağlıklı ve aktif bir hayat sürdürebilmeleri için yeni alternatif gıda ürünlerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar başlatılmıştır.

Makromantarlar bu bağlamda bitkisel ve hayvansal gıdalardan sonra zengin besin içeriklerinden (protein, karbohidrat, yağ asidi, vitamin ve minerallerce) dolayı hızlı artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Makromantarlar üzerine yapılan ilk literatür çalışmalarını mantarların sistematik tanımlanması, ekolojik özellikleri ve ekonomik değerlerinin belirlenmesi oluştururken, daha sonraki çalışmalarda mantarlardan biyoaktif bileşenlerin taranması üzerine odaklanılmıştır. Son yıllardaki çalışmalar ise etken biyoaktif bileşenin mantarlardan saflaştırılması, tanımlanması medikal, zirai ve endüstriyel alanda kullanılabilirliklerinin araştırılması üzerinedir (**Tablo 1.**).

Ülkemiz coğrafi konumu itibarı ile birçok mantar türünün yetişebileceği eşsiz bir iklime sahiptir. Ülkemizde de mantarlar ile yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda büyük artış göstermiştir. Yapılan çalışmaların çoğunluğunun sistematik özellikte olmasına karşın, biyolojik aktivite potansiyellerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar da bu süreçte artmıştır. Biyolojik zenginliklerimizden olan mantarlardan yeterince yararlanabilmek ve olası zararlarından korunabilmek için bu tür araştırmalara ivme kazandırılması büyük önem arz etmektedir.

Makromantarlardan enzimatik hidroliz sonucu elde edilen spesifik peptid fragmanlarında farklı biyolojik aktivitelerin gözlenmesi (**Tablo 2.**) makromantarların çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilirliklerini gündeme getirmiştir.

Calvatia gigantea ülkemizde doğal olarak yetişen yaklaşık 45 tür ile temsil edilen Lycoperdaceae familyasında yeralan ve şişkin bir futbol topunu andıran bir mantardır. *C.gigantea* mantarı üzerinde antibakteriyel, antienflamatuar, analjezik, antiproliferatif ve antikanser gibi farklı biyoaktiviteler tespit edilmiştir (Badshah et al., 2012).

Bu çalışmada *Calvatia gigantea*'dan enzimatik hidroliz sonucu elde edilen peptid hidrolizatından farklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılan peptidin proteaz ve antifungal aktivitesi değerlendirildi. Peptid proteaz aktivitesi sergilerken, bitki patojen funguslarına (*Physoctenium tucumanensis*, *Fusarium oxysporum* ve *Mycosphaerella fijiensis*) karşı hiçbir antifungal aktivite göstermedi.

Badshah ve arkadaşları *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* üzerine *C.gigantea* metanolik ekstraktının antifungal aktivitesine baktıklarında *A. niger* üzerinde % 50, *A. fumigatus* üzerinde ise % 15 inhibisyon etkisini gözlemlemişler ve antifungal aktiviteyi kontrole göre oldukça düşük bulmuşlardır(Badshah et al., 2012). Dolayısıyla farklı funguslar ile yapılan denemeler ve farklı ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanan ekstraktlarda *C. gigantea* mantarının antifungal aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Biyoaktif peptidlerin sahip oldukları fiziksel ve kimyasal karakteristik özellikler (moleküler büyüklük, yük, polarite, çözünürlük, afinite, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler) onların kromatografik ayırlama ve saflaştırılmalarında etkin rol oynamaktadır. Yüke bağlı ayırlamalarda iyon değişim, moleküler büyüklüğe bağlı ayırlamada jel filtrasyon, afiniteye bağlı ayırlamada ise ligand (boya) kromatografisi kullanılmaktadır. Daha iyi bir ayırım için ise çoğunlukla birden fazla kromatografik adım kombine edilerek uygulanmaktadır(Kim et al, 2013).*C. gigantea* mantarından da da biyoaktif peptidlerin ayırlamasında kombine kromatografik adımlar kullanılmıştır (Şekil 3-4-5-6).Herbir adımdan sonra elde edilen aktif fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki kromatografi adımına uygulanmıştır.

Sıcaklık ve pH; bir peptidin çalışma ve depolama koşullarını belirleyen önemli iki faktördür. Bu iki faktördeki değişimler peptid stabilitesini etkilemektedir. Peptidin stabilitesini etkileyen diğer önemli faktör amino asit kompozisyonudur. Peptidin amino asit kompozisyonu hidroliz, oksidasyon, deamidasyon, diketopiperazin and piroglutamik asit oluşumu ile değişmektedir. Özellikle sistein ve metiyonin içeren peptidler oksidasyona meyillidir ve oksidasyon hızı da pH ile değişmektedir Yine asidik ve bazik koşullarda ile sıcaklıktaki değişim peptidin yan

zincirinde değişime sebep olmaktadır. Bu yüzden peptidin stabilitesinin devamlılığını sağlayabilmek için ilgili peptidin stabil olduğu pH ve sıcaklık aralığının bilinmesi önemlidir. *C. gigantea* mantarından saflaştırılan peptidin pH 4.0-7.0 aralığında ve 37 °C'de stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

Proteazlar; protein hidrolizini katalizleyen, bitkilerden mikroorganizmalara kadar geniş bir dağılım gösteren parçalayıcı enzimlerdir. Proteazlar hücrenel metabolik proseslerde önemli rol oynamalarının yanında deri işleme, deterjan sanayi, gıda işleme gibi endüstriyel proseslerde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma *et al.*, 2007). Birçok mantar türünde de [*Agaricus bisporus* (Burton *et al.*, 1994), *Pleurotus citrinopileatus* (Cui *et al.*, 2007), *Hypsizigus marmore* (Zhang *et al.*, 2010), *Tricholoma saponaceum* (Kim *et al.*, 2001)] çeşitli proteaz aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu proje çalışmasında kullanılan *C.gigantea* mantarından saflaştırılan peptidin de yüksek proteaz aktivitesi gözlemiştir.

Bu çalışma ülkemizde doğal olarak yetişen makromantarlardaki biyoaktif bileşenin saflaştırılması için öncü bir çalışmadır. Saflaştırması yapılan peptidin farklı uygulamalarda (medical, zirai ve endüstriyel) kullanılabilirliğinin araştırılması ileriye yönelik planlanan hedeflerdir. Ayrıca *Calvatia* veya farklı mantar türlerinden farklı enzimlerle yapılacak hidroliz işlemleri ile elde edilecek yeni peptidlerde biyolojik aktivitelerinin araştırılması yine bu konuda yapılacak yeni çalışma konularını oluşturacaktır. Ayrıca biyolojik aktivitesi tespit edilen mantar türlerinin kültüre alınma işlemleri de ayrı bir çalışma konusunu oluşturacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Agrahar-Murugkar, D., Subbulakshmi, G., 2005 ,Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya, Food Chemistry 89 :599–603.
- Ajith, T.A., Janardhanan, K.K.,2003, Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus,*Phellinus rimosus* (Berk) Pilat, J Ethnopharmacol.; 84: 157-62.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M., 2013, A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds, Current Topics in Medicinal Chemistry, 13, 2648-2659.
- Anguiano, A.C.R., Santoyo, S., Reglero, G., Rivas, C.S., 2007, Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe, J Sci Food Agric ; 87: 2272-8.
- Arikan S, Rex J.H., 2002, New agents for the treatment of systemic fungal infections - current status, Expert Opin Emerging Drugs;7:3-32.
- Bae, J.S., Jang, K.H., Yim, H., Jin, H.K., 2005,.Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. Cancer Lett ; 218: 43-52.
- Barros, L, Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C., 2008, Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals, Food Chem Toxicol.,46(8):2742-7.
- Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248–54.
- Blumberg, H.M., Jarvis, W.R., Soucie, J.M., Edwards, J.E., Patterson, J.E., Pfaller, M.A., Rangel-Frausto, M.S., Rinaldi, M.G., Saiman, L., Wiblin, R.T., Wenzel, R.P., 2001, “Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: The NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey” *Clin. Infect. Dis*, 33, 177-186.
- Burton, K.S., Hammond, J.B.W., Minamide, T. ,1994, Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) and sporophore development. *Curr Microbiol* 28: 275–278.

- Chen, S.C., Lu, M.K., Cheng, J.J., Wang, D.L., 2005, Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated from medicinal fungi, [FEMS Microbiol Lett.](#), 249(2):247-54.
- Chu, K.T.; Xia, L.; Ng, T.B., 2005, Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides*, 26, 2098–2103.
- Coetzee, J.C., Wyk, A.E., 2009, The genus *Calvatia* ('Gasteromycetes', Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential, *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (22), pp. 6007-6015.
- Cui, L., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B., 2007, An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 81–85.
- Dalgıç, N., İnce, E., 2005, Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar, *Klinik Pediatri*;4(3):90-98.
- Danquah, M.K., Agyei, D., 2012, Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, 1(2):5.
- Denning, D.W., 1998, "Invasive aspergillosis" *Clin. Infect. Dis*, 26, 781-805.
- Diyabalange, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D. L., Nair, M.G. 2008, Health-Beneficial Qualities of the Edible Mushroom, *Agrocybe aegerita*, *Food Chemistry*, 108, 97–102.
- Erkel, İ., 1992, Dünya'da ve Türkiye'de Kültür Mantarcılığının Durumu Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, Cilt I. Yalova.
- Gauthier, S.F. and Pouliot, Y., 2003, Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins, *Journal of Dairy Science*, 86: (E.Suppl.), E78-E87.
- Gbolagade, J., L. Kigigha, L., Ohimain, E., 2007, Antagonistic Effect of Extracts of Some Nigerian Higher Fungi Against Selected Pathogenic Microorganism, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2 (4): 364-368.
- Guo, Y.; Wang, H.; Ng, T.B. 2005, Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*, *Peptides*, 26, 575–580.
- Holst, J.J., Deacon, C.F., Vilsboll, T., Krarup, T., Madsbad, S., 2008, Glucagon like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. *Trends Mol Med* ; 14:161-8.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, H.O., Kim, H.M., Yun, J.W., 2005, Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats, [Life Sci.](#) 76(26):3069-80.

- Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B.K., Islam, R., Koyyalamudi, S.R., Pang, G., Cho, K.Y., Song, C.H., 2010, White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats., [Nutr Res.](#), 30(1):49-56.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., Kalmış, E., 2010, Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, *The Journal of Fungus*, Nisan 1(1):1-8.
- Kaneno, R., Fontanari, L.M., Santos, S.A., Di Stasi, L.C., Rodrigues Filho, E., Eira, A.F., 2004, Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice, *Food Chem Toxicol* ; 42: 909-6.
- Kim, J.H., Kim, Y.S. (2001) Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. *Biosci Biotechnol Bioch* 65:356–362.
- Kim, J.H., Lee, D.H., Choi, S.Y., Park, J.S., Lee, J.S., 2006, Effects of Lycii fructus and Edible Mushroom, *Pholiota adiposa*, on the Quality and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Korean Traditional Rice Wine, *Food Biotechnology*, 20:183–191.
- Kim E.K., Hwang J.W., Kim Y.S., Ahn C.B., Jeon Y.J., Kweon H.J., Bahk Y.Y., Moon S.H., Jeon B.T., Park P.J., 2013, A novel bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of *rudita pes philippinarum*: Purification and investigation of its free-radical quenching potential. *Process. Biochem.* 48:325–330.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A., 2006, Bioactive peptides: production and functionality, *International Dairy Journal*, 16(9):945-960.
- Küçüköğlü, K., 2008, Antifungal tedavide son gelişmeler, *J. Fac. Pharm, Ankara*, 37 (1) 63 – 90.
- Lam S.K., Ng T.B., 2001a, First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Arch Biochem Biophys*; 393(2): 271–80.
- Lam, S.K.; Ng, T.B., 2001b, Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 1071- 1075.
- Lau, C.C., Abdullah, N., Shuib, A.S., 2013, Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, *Pleurotus cystidio-*

- sus* O.K. Miller identified by LC-MS/MS, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:313, 1-10.
- Lakshmi, B., Tilak, J.C., Adhikari, S., Devasagayam, T.P.A., Janardhanan, K.K., 2004, Evaluation of antioxidant activity of selected Indian mushrooms, *Pharm Biol* ; 42(3): 179-85.
- Leffingwell, J.C., Alford, E.D., 2011, Volatile Constituents of the Giant Puffball Mushroom (*Calvatia gigantea*), *Leffingwell Reports*, Vol. 4, 1-17.
- Li-Chan, E.C., Hunag, S.L., Jao, C.L., Ho, K.P., Hsu, K.C., 2012, Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors, *J Agric Food Chem.*, 60(4):973-8.
- Lin, S.J., Schranz, J., Teutsch, S.M., 2001, "Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature" *Clin. Infect. Dis*, 32, 358-366.
- Liu, X., Carlisle, D.L., Swick, M.C., Gaither-Davis, A., Grandis, J.R., Siegfried, J.M., 2007, Gastrin-releasing peptide activates AKT through the epidermal growth factor receptor pathway & abrogates the effect of gefitinib, *Exp Cell Res* ; 313:1361-72.
- Lu, Y.Y., Ao, Z.H., Lu, Z.M., Xu, H.Y., Zhang, X.M., Dou, W.F., Xu, Z.H., 2008, Analgesic and anti-inflammatory effects of the dry matter of culture broth of *Termitomyces albuminosus* and its extracts, [J Ethnopharmacol](#), 120(3):432-6.
- Ma, C., Ni, X., Chi, Z., Ma, L., Gao, L. 2007, Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. *Mar Biotechnol (NY)* 9: 343–351.
- Mikhailov, V.N. and Petrishchev, N.N., 1999, Thrombolytic Activity of Mushroom Proteinases: Thrombolytic Activity of Proteinases from *Coprinus domesticus*, *C. cinereus*, and *Cerrena unicolor*, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, Volume 1, Issue 2, 187-190.
- Nedelcheva, D., Antonova, D., Tsvetkova, S., Marekov, I., Momchilova, S., Nikolova-Damyanova, B., 2007, TLC and GC-MS Probes into the Fatty Acid Composition of some Lycoperdaceae Mushrooms, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30: 2717–2727.
- Ng, T.B., Lam, Y.W., Wang, H., 2003, Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*, *Planta Med.*, 69: 212-217.
- Ngai, P.H.K.; Ng, T.B., 2003, Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunode-

- iciency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci.*, 73, 3363–3374.
- Ngai, P.H.K.; Zhao, Z.; Ng, T.B., 2005, Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26, 191–196.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R. & Morris, N. R. (1980), A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 105, 36 1-363.
- Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Pelaez, F., Diez, M.T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, S., Harris, G., Tsipouras, A., Wilson, K., Kurtz, M.B., 2000, Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:368–377.
- Pandey, A. and C.R. Soccol, 1998. Bioconversion of biomass: A case study of lignocellulosic bioconversions in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 41: 379-390.
- Park, B.T., Na, K.H., Jung, E.C., Park, J.W., Kim, H.H. ,2009, Anti-fungal and -cancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean J Physiol Pharmacol*,13:49–54.
- Paterson, D.L., Singh, N., 1999, “Invasive aspergillosis in transplant recipients” *Medicine*, 78, 123-138.
- Rex, J.H., Walsh, T.J., Sobel, J.D., Filler, S.G., Pappas, P.G., Dismukes, W.E., Edwards, J.E., 2000, “Practise guidelines for the treatment of candidiasis” *Clin. Infect. Dis*, 30, 662-678.
- [Ribeiro, B.](#), [Valentão, P.](#), [Baptista, P.](#), [Seabra, R.M.](#), [Andrade, P.B.](#), 2007, Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*), [Food Chem Toxicol.](#), 45(10):1805-13.
- Shannon, L.J., Stevenson, K.E.,1975, Growth of *Calvatia gigantea* and *Candida steatolytica* in brewery wastes for microbial protein production and bod reduction, *Journal of Food Science*, 40(4):830–832.
- Shen, Y. S., and Su, Y., 1991, Isolation, purification and some bioeffectiveness of polysaccharides from *Calvatia gigantea*, *J. Anhui Univ.*, 2:89–92.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., Sliva, D., 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-b1 from prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* ; 330: 46-52.

- Takaishi, Y., Murakami, Y., Uda, M., Ohashi, T., Hamamura, N., Kido, M., Kadota, S., 1997, Hydroxyphenylazoforamide derivatives from *Calvatia craniformis* (sic), *Phytochem.*, 45: 997-1001 .
- Tanzadehpanah, H., A. Saberi, M.R., Jamshidkhan Chamani, J., 2013; Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 18: 212–219
- Tanabe, H., Avabe, T., Maemoto, A., Ishikawa, C., Inaba, Y., Sato, R. et al., 2007. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochem Biophys Res Commun* ;358:349-55.
- Üstün, O., 2011, Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri, *Türk Hij Den Biyol Derg.*, 68(4): 223 – 240.
- Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O., 2015, Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life, *International Journal of Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376387>, 1-14.
- Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms, *Food Chem* ; 77: 229-35.
- Yada, T., Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Damdindorj, B., Nakata, M., Kakei, M., 2008, Ghrelin regulates insulin release & glycemia: physiological role & therapeutic potential, *Curr Diabetes Rev* ; 4: 8-23.
- Yeh, C.H., Yang, S.T., Chen, C.H., 2011, *Calvatia lilacina* protein extract induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human colon carcinoma cells, *Process Biochemistry* 46:1599–1606.
- Wang H, Ng TB, Liu Q., 2004b, Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*. *Peptides* 25: 693–6.
- Wang, H.; Ng, T.B. 2006, Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27, 27-30.
- Wang, H.; Ng, T.B., 2004, Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25,1-5.
- Wingard, J.R., Leather, H., 2004, “A new era of antifungal therapy” *Biol. Blood Marrow Transplant*, 10, 73-90.
- Wong, J.H.; Ng, T.B.; Wang, H.; Sze, S.C.W.; Zhang, K.Y.; Li, Q.; Lu, X., 2011, Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*, *Phytomedicine*, 18, 387–392.

- Wu, J.Y.,Chen, C.H.,Chang, W.H.,Chung, K.T.,Liu, Y.W.,Lu, F.J.,Chen, C.H., 2011, Anti-Cancer Effects of Protein Extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*, Evid Based Complement Alternat Med., doi:10.1093/ecam/neaq057, 1-10.
- Xu, X., Yan,H., Chen, J., Zhang, X., 2011, Bioactive proteins from mushrooms, Biotechnology Advances, 29: 667–674.
- Zhang, X.Q., Liu, Q.H., Zhang, G.Q., Wang, H.X., Ng, T.B. ,2010,Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizigus marmore*. Process Biochem 45: 724–30.
- Zheng, Z., Shetty,K, 2000, Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes, Process Biochem., 35: 825-830.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ALİ ZEYTÜNLÜOĞLU
Proje No:	115Z774
Proje Başlığı:	Calvatia Gigantea (Dev Kurtmantarı) Protein Hidrolizatlarında Biyoaktif Peptidlerin Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. ELEKTRON MİKROSKOBU BİRİMİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/09/2015 - 15/09/2016
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	23500.0
Öz:	<p>Son yıllarda enzimatik hidroliz, gıda işleme veya mikrobiyal fermantasyon gibi yöntemler kullanılarak çeşitli doğal protein kaynaklarından elde edilen biyoaktif peptidlerin; antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, antioksidatif, antifungal ve antikanser gibi farklı birçok biyolojik aktivite sergilemeleri, dolayısıyla insan sağlığı ile ilişkili birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli rol oynamaları, bu peptidlerin yeni ilaçların geliştirilmesinde terapötik amaçlı kullanım potansiyellerini de arttırmıştır.</p> <p>Ekosistemin en önemli parçalarından biri olan makromantarlar ise; kendilerine has spesifik aroma ve tatlarının yanında, zengin besin içeriklerinden (protein, karbohidrat, yağ asidi, vitamin ve minerallerce) dolayı hızlı artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Makromantarlardan enzimatik hidroliz sonucu elde edilen spesifik peptid fragmanlarında farklı biyolojik aktivitelerin gözlenmesi makromantarların çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilirliklerini gündeme getirmiştir.</p> <p>Bu çalışmada Denizli ilinde doğal olarak yetişen, yenilebilen yabani bir mantar türü olan Calvatia gigantea mantarı protein ekstraktından enzimatik hidroliz ile elde edilen peptid hidrolizatından sıralı olarak farklı kromatografik teknikler (iyon değişim(DEAE-Cellulose), boya-ligand(Affi-gel ? Blue gel) ve gel filtrasyon (Sephadex G75) kullanılarak biyoaktif peptidin saflaştırılması ve saflaştırılan biyoaktif peptidin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Peptidin sıcaklık ve pH kararlılığı; 37°C ve pH 4.0 - 7.0 olarak belirlendi. Saflaştırılan peptidin Physalospora tucumanensis, Fusarium oxysporum ve Mycosphaerella fijiensis karşı antifungal aktivitesi gözlenmedi.</p>
Anahtar Kelimeler:	Calvatia gigantea, mantar, biyoaktif peptid, antifungal aktivite, proteaz aktivite, saflaştırma
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır