



**FUNGAL SEKONDER METABOLİTLERİNİN
A549 HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Melis HACIOĞLU

Eskişehir 2023

**FUNGAL SEKONDER METABOLİTLERİNİN A549 HÜCRE HATTINDA
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melis HACIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2023

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Melis HACIOĞLU'nun "Fungal Sekonder Metabolitlerinin A549 Hücre Hattında Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 20/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK	
Üye	: .Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ferhan KORKMAZ	

Enstitü Müdürü

ÖZET

FUNGAL SEKONDER METABOLİTLERİNİN A549 HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melis HACIOĞLU

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Kanser, 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Akciğer kanseri dünya çapında en sık görülen kanser türlerinden biri olup, 2022 yılında 1.9 milyondan fazla yeni vaka görülmüştür. Doğada hemen her yerde bulunabilen, ekstrem koşullara uyum sağlamış mikrofunguslardan elde edilen sekonder metabolitler antimikrobiyal, antikanser, immünoşüpresan gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Tez kapsamında, antioksidan aktivitelerine göre seçilen 9 fungus izolatu klasik yöntemle identifikasyonu yapılarak *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi olarak belirlenmiştir. Fungus izolatları 30 gün sıvı antioksidan besiyerinde fermente edildikten sonra etil asetat ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fungal özütler, DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi, antimikrobiyal aktivitesi, MTT yöntemi ile sitotoksik etkisi, Annexin V-PI ve Kaspaz 3 yöntemleri ile apoptotik etkileri araştırılmıştır. Fungus izolatlarından bir tanesi *Talaromyces flavus* olarak tanımlanmıştır. Üç fungus izolatu %70'in üzerinde antioksidan aktivite göstermiştir. IC₅₀ değerlerine göre *Talaromyces flavus* özütü ve fermentasyon sıvısının liyofilize edilmiş örneği, A549 hücre hattı üzerinde yüksek sitotoksik etki gösterirken, sağlıklı hücre hattı olan BJ hücrelerinde ise düşük sitotoksikite göstermiştir. Akış sitometride yapılan çalışmalarda fungal özütlerin erken apoptoza neden olduğu görülmüştür. Tez kapsamında yapılan çalışmalar *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait sekonder metabolitlerin antioksidan, antikanserojenik ve antimikrobiyal olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, Antikanser, *Penicillium*, Sekonder metabolit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF FUNGAL SECONDARY METABOLITES IN A549 CELL LINE

Melis HACIOĞLU

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Cancer is one of the most important public health problems of the 21st century. Lung cancer is one of the most common types of cancer worldwide, with more than 1.9 million new cases in 2022. Secondary metabolites obtained from microfungi, which can be found almost everywhere in nature and provide extreme safety compliance, have many biological activities such as antimicrobial, anticancer, immunosuppressant. Within the scope of the thesis, 9 fungal isolates selected according to antioxidant diseases were determined as *Aspergillus* and *Penicillium* species with classical spread identification. Fungal isolates were fermented in liquid antioxidant medium for 30 days and then extracted with ethyl acetate. Fungal extracts, antioxidant preservatives, antimicrobial shields by DPPH method, cytotoxic effect by MTT method, apoptotic effects by Annexin V-PI and Caspase 3 methods were investigated. One of the fungal isolates is used as *Talaromyces flavus*. Three fungal isolates maintained over 70% antioxidant activity. According to IC₅₀ values, the lyophilized sample of *Talaromyces flavus* extract and fermentation broth showed a high cytotoxic effect on the A549 cell line, while the healthy cell line, BJ cells, had a low cyto capacity. Measurements by flow cytometry have properties that fungal extracts cause early apoptosis. The application within the scope of the thesis shows that secondary metabolites belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera have many active activities such as antioxidant, anticarcinogenic and antimicrobial.

Keywords: *Aspergillus*, Anticancer, *Penicillium*, Secondary metabolite

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	ii
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Filamentöz Mikrofunguslar Ve Genel Özellikleri	3
2.2. <i>Aspergillus</i> Ve <i>Penicillium</i>	4
2.3. Sekonder Metabolitler	7
2.3.1. Fungal sekonder metabolitler.....	8
2.3.1.1. Sekonder metabolit biyosentezi.....	10
2.3.1.2. Fungal sekonder metabolitlerin kimyasal yapısı.....	11
2.3.2. Fungal sekonder metabolitlerin antikanser özellikleri-----	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. MATERYAL	16
3.1.1. Fungus izolatları.....	16
3.1.2. Standart bakteri ve maya suşları.....	16
3.1.3. A549 ve BJ Hücre hatları.....	17
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri.....	17
3.1.4.1. Malt Ekstrakt Agar (MEA)	17
3.1.4.2. %17 NaCl Malt Ekstrakt Agar	18
3.1.4.3. Czapek Maya Ekstrakt agar (CYA)	18
3.1.4.4. Czapek Maya Ekstrakt Agar %20 sukroz (CY20S)	19
3.1.4.5. Czapek Dox Agar (CZ)	19

3.1.4.6. %25 Gliserol Nitrat Agar (G25N).....	20
3.1.4.7. Antioksidan aktivite için kullanılan sıvı besiyeri.....	20
3.1.4.8. Mueller Hinton Broth (MHB)	21
3.1.4.9. Nutrient Broth (NB)	21
3.1.4.10. Saboroud Dekstrozu Broth (SDB).....	21
3.1.4.11. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan besiyerleri	22
3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve boyalar.....	23
3.1.5.1. %20 gliserol içeren stok çözeltisi.....	23
3.1.5.2. %0.9' luk fizyolojik tuzlu su çözeltisi	23
3.1.5.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi	23
3.1.5.4. BHT (butilhidroksitoluen) çözeltisi.....	23
3.1.5.5. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) çözeltisi.....	24
3.1.5.6. Spor süspansiyonunun hazırlanması	24
3.1.5.7. Czapek konsantresi	24
3.1.5.8. Laktofenol pamuk mavisi çözeltisi.....	25
3.1.6. Kullanılan cihazlar.....	25
3.1.7. Kullanılan kimyasallar ve malzemeler.....	25
3.2. YÖNTEM.....	26
3.2.1. Mikrofungusların izolasyonu.....	26
3.2.2. Mikrofungusların klasik yöntemle tanımlanması.....	26
3.2.2.1. Laktofenol pamuk mavisi ile boyama.....	27
3.2.3. Mikrofunguslardan sekonder metabolit Ekstraksiyonu.....	27
3.2.4. Antimikrobiyal aktivite testi.....	27
3.2.5. Mikrobrotu dilüsyon yöntemi.....	28
3.2.6. Fungal sekonder metabolitlerin antioksidan aktivite tarama testi.....	29
3.2.7. Hücre kültürü çalışmaları.....	29
3.2.7.1. A549 hücre hattının hazırlanması.....	29
3.2.7.2. BJ hücre hattının hazırlanması.....	30
3.2.8. Hücrelerden stok yapılması.....	31

3.2.9. Hücre sayımı.....	31
3.2.10. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi.....	31
3.2.11. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	34
3.2.12. Akış sitometride kaspaz-3 yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi...	35
3.2.13. Sitotoksisite yöntemlerinin istatistiksel analizi.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Mikrofungusların Klasik Yöntemle Tanımlanması.....	37
4.1.1. Koloni ve mikroskobik özellikleri.....	38
4.2. 16S rRNA Dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi.....	47
4.3. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tarama testi.....	48
4.4. Fungus izolatlarının ekstraksiyonu.....	51
4.5. Mikrobrot Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	52
4.6. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi.....	57
4.7. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi.....	72
4.8. Akış Sitometride Kaspaz 3 Aktivasyonu ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi.....	77
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKÇA.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan standart bakteri ve maya suşları	16
Çizelge 3.2. MEA içeriği.....	17
Çizelge 3.3. %17 NaCl MEA içeriği.....	18
Çizelge 3.4. CYA içeriği	18
Çizelge 3.5. CY20S içeriği	19
Çizelge 3.6. CZ içeriği.....	19
Çizelge 3.7. G25N içeriği	20
Çizelge 3.8. Antioksidan besiyeri içeriği.....	20
Çizelge 3.9. MHB içeriği.....	21
Çizelge 3.10. NB içeriği	21
Çizelge 3.11. SDB içeriği	21
Çizelge 3.12. A549 hücre hattı besiyeri	22
Çizelge 3.13. BJ hücre hattı besiyeri	22
Çizelge 3.14. Spor solüsyonu içeriği	24
Çizelge 3.15. Czapek içeriği	24
Çizelge 3.16. Laktofenol pamuk mavisi içeriği.....	25
Çizelge 3.17. Kullanılan cihazlar ve markaları	25
Çizelge 3.18. Kimyasallar, malzemeler ve markaları.....	25
Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının antioksidan aktivitesi % değerleri.....	50
Çizelge 4.2. Fungal öütler ve tartım sonuçları.....	51
Çizelge 4.3. Bakterilerde antimikrobiyal aktivite mikrobrot dilüsyon yöntemi MİK değerleri (µg/mL).....	56
Çizelge 4.4. Mayalarda antimikrobiyal aktivite mikrobrot dilüsyon yöntemi MİK değerleri (µg/mL).....	57
Çizelge 4.5. Fungal özüt ve liyofilize örneklerin A459 hücre hattı için IC ₅₀ değerleri.....	59

Çizelge 4. 6. Fungal özüt ve liyofilize örneklerin BJ hücre hattı için IC ₅₀ değerleri	60
Çizelge 4.7. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri	61
Çizelge 4.8. Fungal liyofilize örneklerin A549 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri.....	61
Çizelge 4.9. Fungal özütlerin BJ hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri.....	62
Çizelge 4.10. Fungal liyofilize örneklerin BJ hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri.....	63
Çizelge 4.11. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde apoptotik etkilerinin belirlenmesi.....	74
Çizelge 4.12. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde kaspaz 3 aktiviteleri (%).....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Aspergillus</i> ve <i>Penicillium</i> cinslerinin mikroskopik yapıları.	5
Şekil 2.2. <i>Aspergillus</i> türlerinin konidiyal baş yapıları	6
Şekil 2.3. <i>Penicillium</i> konidiofor dallanma şekilleri	7
Şekil 2.4. Sekonder metabolit üretimi	8
Şekil 2.5. (A): Petride <i>Penicillium</i> görüntüsü.....	9
Şekil 2.6. Sekonder metabolit biyosentezinin yolları	11
Şekil 2.7. Lovastatinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.8. Griseofulvinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.9. Fumagillinin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3.1. A549 hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü.....	30
Şekil 3.2. BJ hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü.....	30
Şekil 3.3. MTT'nin formazana dönüşümü.....	32
Şekil 3.4. MTT aşamaları.....	33
Şekil 4.1. <i>Penicillium</i> sp. 1 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüleri.....	39
Şekil 4.2. <i>Penicillium</i> sp. 2 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüleri	40
Şekil 4.3. <i>Penicillium</i> sp. 3 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	43
Şekil 4.4. <i>Penicillium</i> sp. 4 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. <i>Penicillium</i> sp. 5 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. <i>Talaromyces flavus</i> 'un 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	46

Şekil 4.7. <i>Aspergillus sp.</i> 1 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	47
Şekil 4.8. <i>Aspergillus sp.</i> 2 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	48
Şekil 4.9. <i>Aspergillus sp.</i> 3 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü.....	49
Şekil 4.10. Fungus izolatlarının antioksidan sıvı besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonrası görüntüsü.....	51
Şekil 4.11. Fungus izolatlarının DPPH çözeltisi ile inkübasyonu sonrası spektrofotometre küvetindeki görünümü.....	52
Şekil 4. 12 (A) Antioksidan sıvı besiyerinde 7 gün bekletilen fungus izolatları (B) Fermentasyon sıvısının 1:1 oranda etil asetat ile ekstraksiyonu (C) Rotavaporda organik fazın uçurulması.....	53
Şekil 4.13. Fungal özütlerin <i>E.faecalis</i> 'te antimikrobiyal aktivite testi.	53
Şekil 4.14. Fungal özütlerin <i>B.subtilis</i> 'te antimikrobiyal aktivite testi.	53
Şekil 4.15. Fungal özütlerin <i>K.pneumoniae</i> antimikrobiyal aktivite testi.	54
Şekil 4.16. Fungal özütlerin <i>S.aureus</i> 'un antimikrobiyal aktivite testi.	54
Şekil 4.17. Fungal özütlerin <i>B.subtilis</i> 'in antimikrobiyal aktivite testi	54
Şekil 4.18. Fungal özütlerin <i>K.pneumoniae</i> 'in antimikrobiyal aktivite testi.....	54
Şekil 4.19. Fungal özütlerin <i>S.aureus</i> 'un antimikrobiyal aktivite testi gösterilmiştir. ..	55
Şekil 4.20. Fungal özütlerin <i>E.faecalis</i> 'in antimikrobiyal aktivite testi	55
Şekil 4.21. Fungal özüt ve liyofilize örneklerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemine göre değerlendirilmesi.....	69
Şekil 4.22. Fungal özüt ve liyofilize örneklerin BJ hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemine göre değerlendirilmesi.....	74
Şekil 4.23. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde kaspaz 3 aktivitelerinin akış sitometri cihazında belirlenmesi.....	82

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA :	Varyans Analizi
ATCC :	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BHT :	Butilhidroksitoluen
cm :	Santimetre
CYA :	Czapek Yeast Autolysate Agar
CY20S :	%20 Sukroz Czapek Maya Ekstrakt Agar
CZ :	Czapek Dox Agar
dk :	Dakika
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO :	Dimetilsülfoksit
DNA :	Deoksiribo nükleik asit
DPPH :	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA :	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA :	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FBS :	Fötal Sığır Serum
g/L :	Gram/ Litre
G25N :	%25 Gliserol Nitrat Agar
IC ₅₀ :	%50 İnhibitör Konsantrasyon
L :	Litre

MEA	:	Malt Extract Agar
mg	:	Miligram
MHB	:	Mueller Hinton Broth
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NB	:	Nutrient Broth
NRP	:	Ribozomal Olmayan Peptidler
PBS	:	Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
PI	:	Propidyum İyodid
PKS	:	Poliketid Sentaz
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute's Medium
SDB	:	Sabouraud Dextrose Broth
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre

1. GİRİŞ

Kanser, eski çağlardan beri görülmesine rağmen günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 yılı tahmini verilerine göre 10 milyon ölüm oranı ile dünya çapında ölümlerin yaşandığı ikinci hastalık grubudur (<http-1>). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2020 verilerine göre erkeklerde en sık görülen kanser türleri arasında akciğer kanseri ilk sırada yer alırken, kadınlarda ise üçüncü sırada görülmektedir. Günümüzde artan hava kirliliği, sigara kullanımı, radyasyon, genetik faktörler gibi pek çok etmen kanser oluşumuna neden olmaktadır.

Akciğer kanseri; küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri olarak iki ana tiptedir. En sık görülen akciğer kanseri türü küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olup vakaların %85-90'ını oluşturur. Küçük hücreli akciğer kanseri ise daha az yaygın olup vakaların %10-15'ini oluşturmaktadır.

Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi operasyonlar gibi yöntemler uygulanmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi kanser hücrelerini öldürmeyi ve büyümesini engellemeyi amaçlayan tedavi yöntemlerinden olsa da sağlıklı hücrelere de zarar verdiği için ciddi yan etkilere sahiptir. Bu durum hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Ayrıca kanser tedavisine her hasta tedaviye farklı yanıtlar verebilmektedir. Bu problemler kanser tedavisini zorlaştırmakta ve araştırmacıları yan etkileri az olan alternatif tedavi yöntemleri aramaya yönlendirmektedir.

Sekonder metabolitler, organizma tarafından üretilen, organizmanın yaşamsal faaliyetlerinde etkisi olmayan bileşiklerdir. Sekonder metabolitler, primer metabolizmada kullanılan metabolitlerin manipülasyonu ve dönüşümü ile oluşan kompleks ürünleri içerir (Calvo, 2002; Pela, 2004). Mikrofunguslar sahip olduğu çeşitli metabolitler ile sağlık alanında önemli bir yere sahiptir. Funguslar ekosistemde her ortamda bulunabilen, yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ekstrem ortamlara da uyum sağlamış mikroorganizmalardır (Van Den Burg, 2003). Fungal

metabolitler birçok biyolojik aktiviteye sahip olması ve bitkilere göre laboratuvar ortamında geliştirilebilme kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir.

Mikrofunguslardan elde edilen metabolitlerin izolasyonu ve antimikrobiyal, antikanser, antihelmitik ve antiviral etkileri, ilk kez Dr. Frisvad ve Dr. Filtenborg tarafından araştırılmıştır (Frisvad J. C., 1989). Günümüzde mikrofungusların sekonder metabolitlerinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır.

Tez kapsamında *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri olarak belirlenen 9 fungus izolatının etil asetat ile elde edilen özütleri antioksidan, antimikrobiyal, A549 ve BJ hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Filamentöz Mikrofunguslar ve Genel Özellikleri

Funguslar klorofil içermeyen, heterotrofik ve ökaryotik organizmalardır. Makrofungus ve mikrofungus olarak iki gruba ayrılmaktadır. Makrofunguslar ‘şapkalı mantarlar’ olarakta bilinen grup içerisinde yer alır. Mikrofunguslar ise filamentözsüz mikrofunguslar (mayalar) ve filamentöz mikrofunguslar (küfler) olarak iki grupta incelenmektedir. Mikrofunguslar doğada hemen her yerde bulunan çok geniş bir topluluk olup Eukarya domaininde yer alan organizmalardır. Yaklaşık olarak 100.000 fungus türü tanımlanmış olup toplam fungus tür sayısının 1.5 milyon kadar olabileceği düşünülmektedir (Michael T. Madigan, 2002).

Bazı mikrofunguslar patojen özellikte olup insan, hayvan ve bitkilerde hastalıklara sebep olurken bazıları da bitkiler ile simbiyotik ilişkiler kurarak fayda sağlamaktadır. Çoğu mikrofungusun hücre duvarı bir glukoz türevi olan N-asetilglukozaminden yapılmış kitin içerir. Bazı fungal hücre duvarlarında ise kitin yerine mannanlar, galaktozanlar ve kitozanlar gibi polisakkaritler bulunur. Salgıladıkları ekstraselüler (hücre dışı) enzimler ile polisakkaritler ve proteinler gibi polimerik materyalleri monomerlerine parçaladıktan sonra karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak beslenirler (Madigan, 2002).

Filamentöz mikrofunguslar çoğu çok hücreli olan hif adında filamentler içerir. Hiflerin üzerinde eşeysiz üreme sporları oluşmaktadır. Hiflerin bir araya gelerek oluşturduğu topluluğa miselyum denir. Hifler, gelişme şekline göre vejetatif ve aerial olarak ikiye ayrılmaktadır. Vejetatif hifler, ortamda bulunan besin maddesi yüzeyinde gelişip yayılan, içine nüfuz ederek küflerin gelişimi için gerekli besin maddelerini almasını sağlayan hiflerdir. Aerial hifler ise; havaya doğru uzanan ve genelde küflerin üremesi için gerekli olan sporları taşımaktadır (Juni Arianti, 2020).

Funguslar 4 şubeye ayrılmaktadır:

- 1) Chytridiomycota: Bu şubede yer alan türler genellikle tatlı suda yaşayan saprofit funguslardır. Bölmesiz hiflere sahip olup, üremeleri zoosporlarla gerçekleşmektedir.
- 2) Zygomycota: Gelişmiş yapılara sahip funguslardır. Hifleri selüloz yapısında, bölmesizdir. Sitoplazmada çok fazla çekirdek bulunmaktadır. Zygomycota’da yer alan fungusların

üremeleri eşeysiz üreme ve eşeyli üremenin birbirini takip ettiği metagenez şeklinde gerçekleşir.

3) Ascomycota: Fungusların en geniş şubesidir. Bu grubun en belirgin özelliği; askus adı verilen kese şeklinde bir yapının içinde askospor olan hareketsiz sporların yer almasıdır. Eşeysiz üreme şeklinde ise bu askuslar görülmez. Bunun yerine konidia denilen sporlar aracılığı ile eşeysiz üreme gerçekleşmektedir. *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi mikrofunguslar bu şubede yer almaktadır.

4) Basidiomycota: Bu şubede bulunan fungusların en karakteristik özelliği, eşeyli üreme sonucu oluşan basidium denilen bir yapıdır. Basidiumlar genelde dört haploid spor içermektedir. Bu spora basidiospor denmektedir (İsmail, 2020).

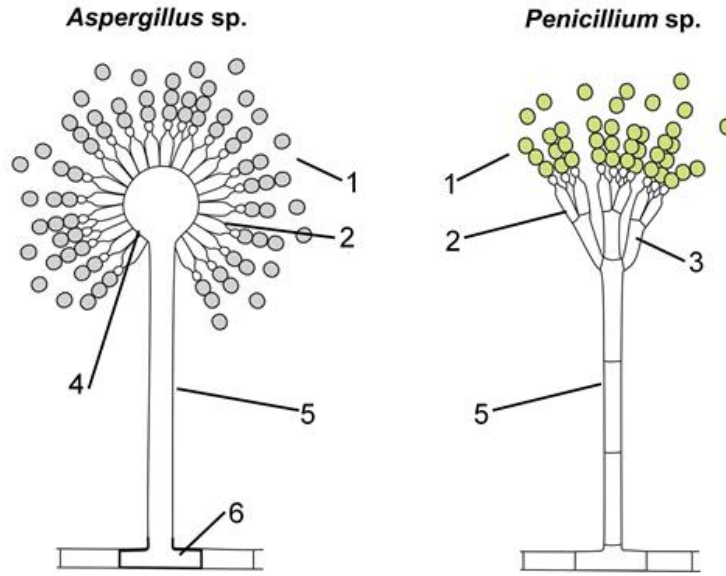
2.2. *Aspergillus* ve *Penicillium*

Aspergillus ismi ilk kez 1729 yılında, hristiyan ayinlerinde kutsal su serpmeye yarayan aspergillum adındaki bir alete olan benzerliği ile Micheli tarafından kullanılmıştır. (Micheli, 1729). *Penicillium* ise; 1809'da Link tarafından, konidiforların fırça benzeri yapılarından dolayı bu isim ile tanımlanmıştır. *Aspergillus* ve *Penicillium*, Eurotiales takımının içerisinde yer alan çok çeşitli habitatlara sahip, birçok sayıda tür içeren cinslerdir (Tsang, 2018). Her iki cinste genellikle toprak, bitki materyali ve gıdalar üzerinde bulunmaktadır. Bazı türleri yüksek/düşük sıcaklık, yüksek tuz oranı, asidik gibi ekstrem ortamlarda büyüyebilmektedir.

Ekstrem ortamlara adapte olmuş mikrofungusların ürettiği metabolitler biyolojik özellikleri bakımından çok çeşitlidir. Bu metabolitler biyoteknoloji, sağlık, tarım gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. *Aspergillus* ve *Penicillium*'un ürettiği metabolitlerin zararlı yönleri de bulunmaktadır. Mikotoksinler bu grupta yer alan insan, hayvan ve bitkilerde toksik etkiler gösterebilen sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinler organizma tarafından alındığında kişisel direnç ve konsantrasyona bağlı olarak ölümle sonuçlanabilen akut etkileri olabileceği gibi kanserojen, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik gibi etkileri de görülmektedir (Topal, 1999).

Aspergillus ve *Penicillium* cinsleri hem eşeyli hem de eşeysiz üreme özelliğine sahiptir. Ascomycota şubesinde yer alan bu mikrofunguslar genellikle konidia sporları

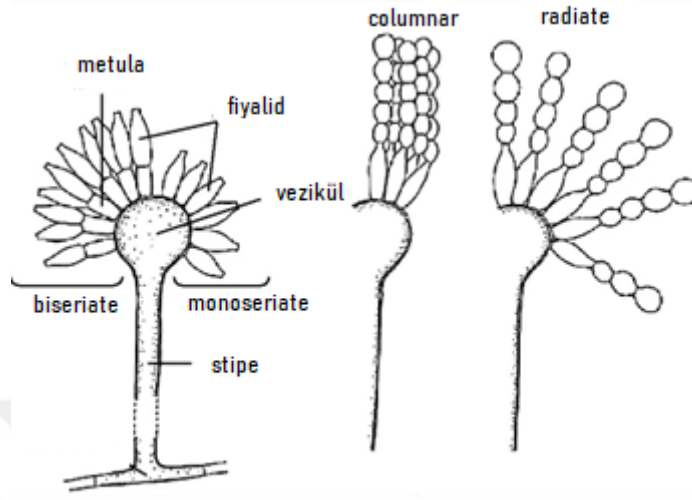
oluşturmaktadır. Konidiaları taşıyan hife konidiofor denmektedir. Konidialar eşeysiz üremenin bir sonucudur. Spor yapıları çok çeşitli olup küresel, yarı küresel, silindirik veya elips şeklinde olabilir. Konidiaların oluştuğu ve bu sporları taşıyan yapıya fiyalid denir. Fiyalidler de şekillerine göre silindirik, şişe benzeri, kısa veya uzun olabilir. Fiyalid, şekli bowling labutlarına benzeyen bir yapıya sahip ise ampulliform adını alır. Fiyalidlerin altında bir dal daha bulunuyorsa buna metula denmektedir. Metula *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin bazı türlerinde görülmektedir. İki cinsin konidiofor yapıları farklılık gösterir. *Aspergillus* cinsinin konidioforları bölmesiz ve dallanmamış iken *Penicillium* cinsi bölmeli ve dallanmış, fırça benzeri yapılar içerir. *Aspergillus* ve *Penicillium* arasındaki en belirgin fark bu özellikleridir. Şekil 2.2.'de *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri arasındaki farklar görülmektedir.



Şekil 2.1. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin mikroskopik yapıları (1) Konidia, (2) Fialid, (3) Metula, (4) Vezikül, (5) Konidiofor, (6) Vejetatif hifa (<http-2>)

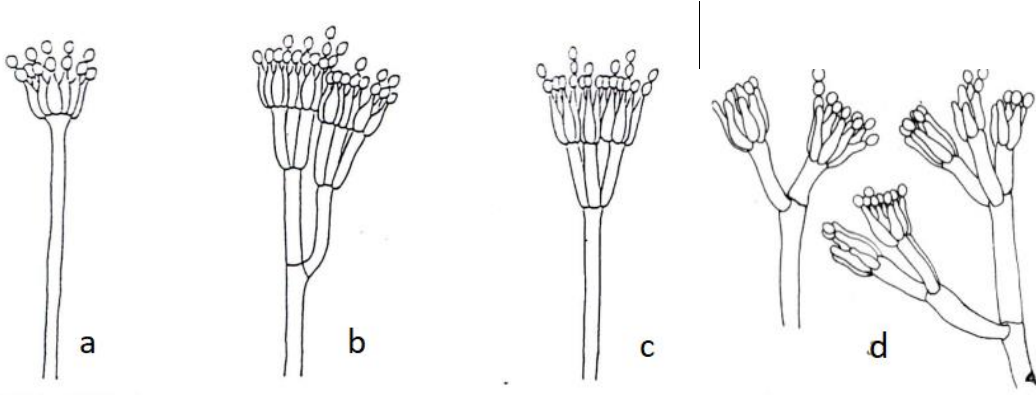
Aspergillus cinslerinde konidial başı taşıyan vezikül adında bir yapı bulunmaktadır. *Aspergillus* cinslerinde konidial başlar monoseriate ve biseriate olarak isimlendirilmektedir. Eğer fiyalidler direkt olarak veziküle bağlanıyorsa monoseriate, fiyalidlerin altında metula bulunuyorsa biseriate olarak ifade edilir (Guarro, 2010). Vezikül şekli uzun sopa benzeri olan yapılara clavate, konidia sporları sütunlu şekilde yukarı doğru

ise columnar ve yanlara doğru yayılmış ise radiate olarak isimlendirilmektedir. Bu özellikler *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında önemlidir.



Şekil 2.2. *Aspergillus* türlerinin konidyal baş yapıları (Guarro, 2010)

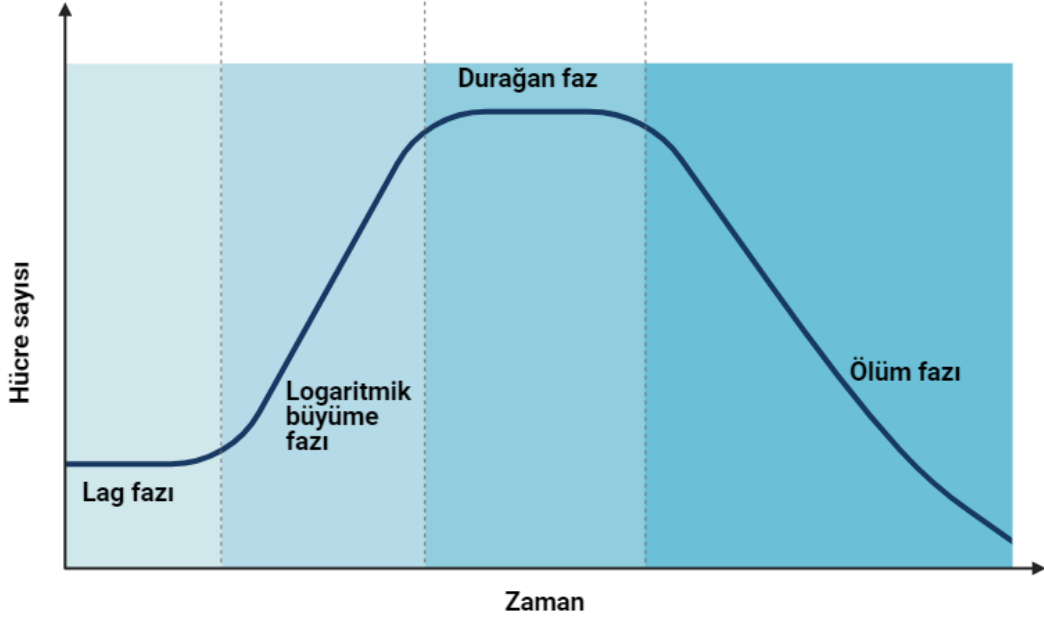
Penicillium cinslerinde ise konidioforlar dallanma şekillerine göre sınıflandırılmaktadır. Konidioforlar direkt olarak fiyalide bağlanıyorsa monoverticillate, konidioforlar sap ve fiyalid arasında üç veya daha çok metulaya sahip ise biverticillate, konidioforlar sap ve metula arasında başka bir dallanma içerirse terverticillate olarak adlandırılır. Dallanma terverticillate şeklinden daha fazla ve ekstra dallanma gösteriyorsa quarterverticillate denmektedir. Dallanma şekilleri *Penicillium*'un klasik tanımlanmasında kullanılmaktadır. (Pitt, 1979).



Şekil 2.3. *Penicillium* konidiofor dallanma şekilleri (a) Monoverticillate (b) Terverticillate (c) Biverticillate (d) Quarterverticillate (<http-3>)

2.3. Sekonder Metabolitler

Metabolizma faaliyetleri sonucu ortaya çıkan ürünlere metabolit denir. Metabolitler primer metabolitler ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler organizmanın büyüme, gelişme ve çoğalması için gerekli olan maddeler üretir. Sekonder metabolitler ise; logaritmik büyüme fazının sonunda üretilen, organizmanın yaşamsal faaliyetlerinde direkt olarak etkisi olmayan bileşiklerdir. Sekonder metabolitlerin çalışmaya başladığı ilk yıllarda bu metabolitlerin işlevsiz, atık maddeler olduğu düşünülmüştür (Paech, 1950; Mothes, 1955). Organizmada birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde rolleri bulunmaktadır. Sekonder metabolitler savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücreler arası haberleşme gibi olayların gerçekleştirilmesinde etkin rol oynayan bileşiklerdir (Cannell, 1998). Şekil 2.4.'de bir mikroorganizmanın üreme eğrisi gösterilmiştir. Sekonder metabolitler logaritmik büyüme fazının sonunda olan durağan faza geçişte üretilmeye başlarlar.



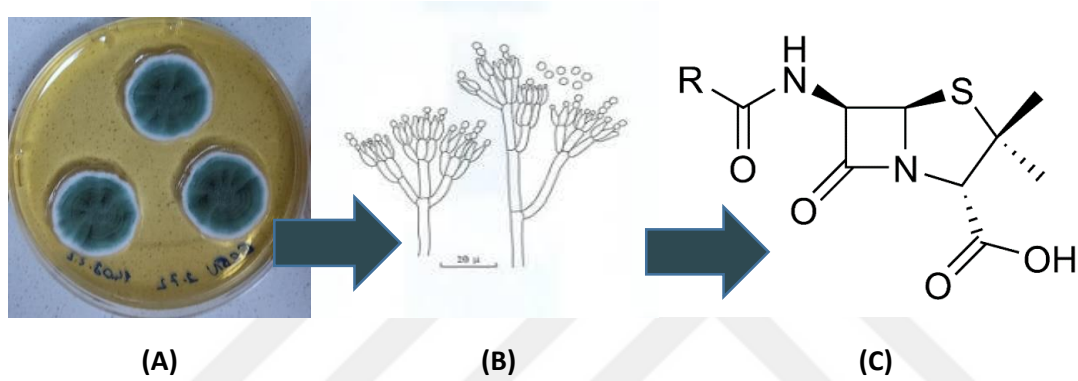
Şekil 2.4. Sekonder metabolit üretimi (Biorender aracılığı ile yapılmıştır.)

Bitkiler, mantarlar, bakteriler ve bazı denizde yaşayan organizmalar sekonder metabolitleri üretebilmektedir. Bugüne kadar yaklaşık 500.000 sekonder metabolit tanımlanmıştır (Bills, 2016). Bunların yaklaşık 350.000'i bitkilerden ve 70.000'i mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Kabaca 33.500 biyoaktif mikrobiyal metabolit tanımlanmıştır. Bu 33.500 mikrobiyal metabolitin yaklaşık %12'si bakterilerden elde edilen metabolitler, %41'i aktinomiset metabolitleri ve %47'si de fungus kökenli metabolitlerdir (Bills, 2016).

2.3.1. Fungal sekonder metabolitler

Mikrobiyal sekonder metabolitler çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve hormon, antibiyotik, toksin, anti-migren ajanı, anti-kanser ajanı olarak işlev görmektedirler (Bentley, 1997). Funguslar sekonder metabolit üretebilen organizmalardır. İlk fungal sekonder metabolit 1928'de Fleming tarafından keşfedilen penisilindir. 1940'lara gelindiğinde penisilinin ilaç öncü molekülü olarak kullanılması fungal sekonder bileşikler için dönüm noktası olmuştur. Penisilinin hastalıklardaki etkisi ve başarısı funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin çalışılmasında öncü olmuştur.

Sekonder metabolit üretiminde funguslar bitkilere önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Funguslar predatörlerine ve rakiplerine karşı kimyasal iletişim için veya patojenik funguslarda olduğu gibi hayvan ve bitki konakçılarına manipüle etmek için sekonder metabolitleri kullanmaktadırlar (Şentürk, 2019). Fungusları ürettiği sekonder metabolitlere göre sınıflandırmak mümkün değildir. Bunun sebebi ise; aynı metabolitin farklı fungus türleri tarafından sentezlenebilmesi veya aynı fungus türünün birçok farklı sekonder metabolit üretebilmesidir.



Şekil 2. 5. (A): Petride *Penicillium* görüntüsü, (B): *Penicillium* cinslerinin mikroskopik görüntüsü, (C): Penisilin'in kimyasal formülü

Aspergillus ve *Penicillium* çeşitli kimyasal yapıları ve birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen sekonder metabolitler üreten iki mikrofungus cinsidir. Bu metabolitler antimikrobiyal, antikanser, antifungal, antiviral gibi birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Fungusların ürettiği sekonder metabolitlerin sayısı oldukça fazla olup yalnızca küçük bir kısmının bilindiği varsayılmaktadır (Robey, 2021).

Funguslar, ekosistemde her ortamda bulunabilen, özellikle yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek basınç, yüksek tuz oranı gibi ekstrem ortamlara da uyum sağlamış organizmalardır. Bu sebeple ürettikleri metabolitler de birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu metabolitlerin bazıları yararlı iken bazıları da zararlı etkilere sahiptir. Birçok memeli canlıda ve bitkilerde toksik etki gösteren sekonder metabolitler fitotoksin ve mikotoksinlerdir. Aflatoksinler, trikotesenler, fumonisinler, okratoksin, sitokalsinler ve çeşitli indol-terpen bileşikler en yaygınları olup 1.000 kadar mikotoksin ve fitotoksin bulunmaktadır (Bräse, 2013; Bräse,

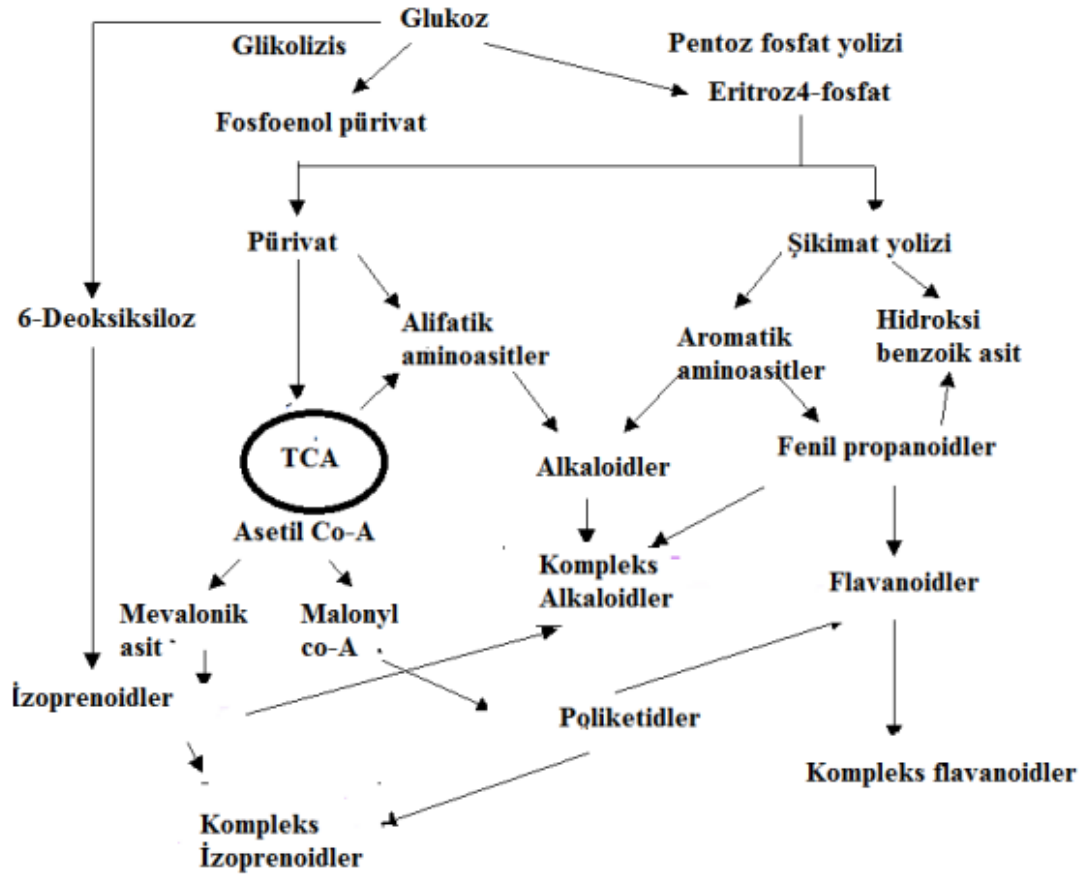
2009). Yüksek dozda alındıklarında akut toksik etkiye neden olmaktadır. Bazı semptomları şöyledir; deri nekrozları, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması) ve immunosupresif etkilere yol açarak ağır hastalıklara sebep olabilirler. Örneğin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen Aflatoksin B1, DNA hasarlarına yol açarak kanserojenik etki gösterir. Karaciğere etki ederek karaciğer kanserine yol açabilmektedir.

Mikrofunguslar tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin antimikrobiyal, immünosüpresan, antikanser, kolesterol inhibitörü gibi insan sağlığı için yararlı birçok özellikleri yer almaktadır. *Penicillium notatum*'dan elde edilen penisilin bilinen ilk antibiyotiklerdendir. *Acremonium chrysogenum*'dan elde edilen sefalosporin, *Penicillium* cinslerinden üretilen griseofulvin, *Aspergillus terreus*'tan elde edilen kolesterol düşürücü olarak kullanılan statin, *Cylindrocarpon lucidum* ve *Tolypocladium inflatum*' dan elde edilen ve immün baskılayıcı olarak kullanılan siklosporin önemli örnekler arasındadır.

2.3.1.1. Sekonder metabolit biyosentezi

Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden sentezlenen kompleks bileşiklerdir (Calvo, 2002). Bu sebeple sekonder metabolitler primer metabolizmadan köken alan bileşikler olarak da tanımlanabilmektedir. Genel olarak sekonder metabolitler ekstrasellüler olarak sentezlenmektedir. Sekonder metabolit sentezinin başlamasında farklı hücresel stres koşulları sonucu oluşan önemli sinyaller rol almaktadır. Sekonder metabolizmanın sentezi kromozomal DNA üzerindeki gen kümeleri tarafından ve kısmen de olsa plazmidler tarafından kontrol edilmektedir (Robinson, 2001).

Fungal sekonder metabolitlerinin biyosentezinde yer alan genler, fungus genomu içerisinde kümelenmiş halde düzenlenir. Bu gen kümeleri içerisinde enzimler, düzenleyici proteinler, taşıyıcılar ve sekonder metabolit biyosentezinde ve düzenlenmesinde yer alan diğer bileşenleri kodlayan genler yer almaktadır.



Şekil 2.6. Sekonder metabolit biyosentezinin yolları (http-4)

2.3.1.2. Fungal sekonder metabolitlerin kimyasal yapısı

Fungal sekonder metabolitler kimyasal yapısına göre poliketidler, ribozomal olmayan peptidler, terpenoidler ve alkaloidler olarak sınıflandırılmaktadır. Terpenoidler ve poliketidler Asetil CoA'dan, ribozomal olmayan peptidler ise aminoasitlerden sentezlenmektedir. Şekil 2.6.'da sekonder metabolitlerin biyosentez yolları gösterilmiştir.

Poliketidler; çok sayıda bulunan ve çeşitliliği fazla olan fungal sekonder metabolitlerdir. Bu metabolitlerin sentezi poliketid sentaz (PKS) adlı büyük bir enzim ailesi tarafından katalizlenir. PKS enzimleri ketosentaz, açıl transferaz ve açıl taşıyıcı protein gibi tekrarlayan ünitelerden oluşmaktadır. Bu tekrarlayan üniteler, uzayan zincir ve katlanmalar

PKS enzimlerinin çeşitliliğini oluşturmaktadır (Hill, 2006). Aşağıda *Aspergillus* ve *Penicillium*'dan sentezlenen poliketidlere örnekler verilmiştir:

- *Penicillium* ve *Aspergillus*'tan elde edilen karsinojenik etkisi olan okratoksin ve aflotoksin birer poliketiddir.
- *Aspergillus terreus* tarafından üretilen lovastatin kolesterol düşürücü özelliğe sahip bir poliketiddir. Karaciğerde kolesterol sentezinde yer alan HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe eder.
- Bazı *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerinde bulunan patulin bir mikotoksindir. Gıda ürünlerine bulaşabilen, fazla miktarda tüketildiğinde insanlarda sağlık sorunlarına yol açabilmektedir.
- Aflatoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* olmak üzere bazı *Aspergillus* cinsleri tarafından üretilen bir grup poliketiddir. Kanserojenik özellikleri bulunmakta olup yer fıstığı, mısır gibi gıda ürünlerini kontamine edebilirler.
- *Penicillium notatum* tarafından üretilen penisilin de bir poliketiddir. Bakterilerin hücre duvarına etki eden bir antibiyotiktir.

Ribozomal olmayan peptidler (NRP); protein sentezi ribozom dışında başka bir mekanizma ile sentezlenirler. NRP'ler poliketidler gibi NRP sentazlar olarak bilinen büyük çoklu enzim ailesini içerir. Halka ya da dallı yapıda, nonproteinojenik aminoasitlerden oluşan metil, formil, halojen, hidroksil gibi modifiye yapılar içeren bir gruptur (Cantürk, 2015). Pek çok ribozomal olmayan peptid immünosüpresan ve antikanser özelliğe sahiptir. Bunlara örnekler:

- Bir immünosüpresan ilacı olan siklosporin, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus unilateralis* aspergillazin üreten bir ribozomal olmayan peptiddir.
- *Aspergillus terreus*'dan üretilen terrein ve *Penicillium brevicompactum*'dan üretilen brevianamid antikanser ve anti-inflamatuar özelliklere sahip NRP'lerdir.

Terpenoidler; beş karbonlu izopren birimlerinden oluşan bileşiklerdir. Monoterpenoidler (C10), sesquiterpenoidler (C15), diterpeneoidler (C20), sesterpenoidler (C25), triterpenoidler (C30) olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır. Ascomycota ve

Basidiomycota bölümlerine ait mikrofungusların mikotoksin, antibiyotik, antitümör özelliğe sahip terpenoidler ürettiği bilinmektedir (Schmidt-Dannert, 2015). Terpenoidlere örnekler:

- *Acremonium fusidioides* tarafından üretilen fusidik asit, gram pozitif bakteri enfeksiyonu tedavisinde kullanılan bir terpenoiddir (Fernandes, 2016).
- *Aspergillus fumigatus* tarafından elde edilen helvolik asit antikanser özellik gösteren bir triterpenoiddir (Mitsuguchi, 2009).

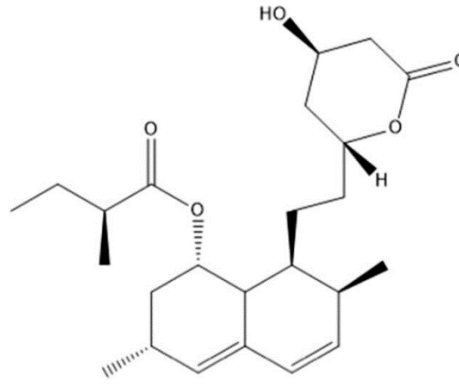
Alkaloidler; çeşitli kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile bilinen ve birçoğu farmakolojik özelliğe sahip azot içeren bileşiklerdir. Birçok fungal alkaloidi antibiyotik, antifungal, antikanser ve böcek öldürücü özelliktedir.

- Gliotoksin *Aspergillus* cinsleri tarafından üretilen immünoşüpresif ve sitotoksik aktiviteye sahip bir alkaloiddir.
- *Aspergillus* cinslerinden izole edilen stephacidin B antikanser bakımından önemli bir indol alkaloididir.

2.3.2. Fungal sekonder metabolitlerin antikanser özellikleri

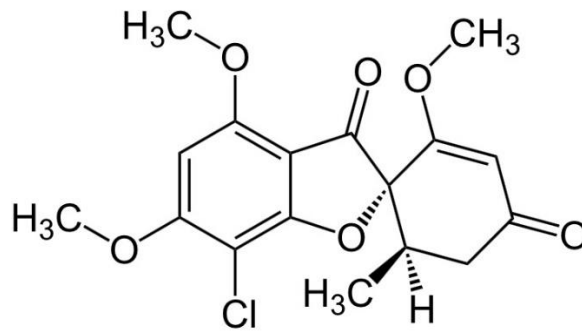
Kanser, hücrelerin normalin dışında kontrolsüz bir şekilde çoğalıp büyüdüğü, vücudun diğer bölümlerine yayılarak metastaz yapabildiği bir hastalık grubudur. Dünya genelinde en sık görülen ve ölümlere neden olan hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2020'de yaklaşık 10 milyon ölüme neden olmuştur. Fungal sekonder metabolitlerin antikanser özelliğinin keşfedilmesi sağlık alanında önemli gelişmeler arasındadır. *Aspergillus*, *Penicillium* cinsi mikrofunguslar antikanser özelliğe sahip sekonder metabolitler üretebilmektedir.

Statinler antikanser aktiviteye sahip bazı fungal sekonder metabolitlerden elde edilen poliketid yapılu bileşiklerdir (Bladt, 2013). Statin ailesi hem doğal hem de sentetik bileşikleri içermektedir. Lovastatin, mevastatin doğal bileşikler iken atorvastatin, serivastatin, rosuvastatin sentetik bileşiklere örneklerdir. Statinler aynı zamanda hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıkların klinik tedavisinde kullanılan iyi bilinen kolesterol sentez inhibitörleridir (Endo, 1976). Yapılan bir çalışmada *Aspergillus terreus* tarafından elde edilen lovastatinin serviks rahim ağzı kanseri olan HeLa hücre hattı üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri görülmüştür (SD Bhargavi, 2016).



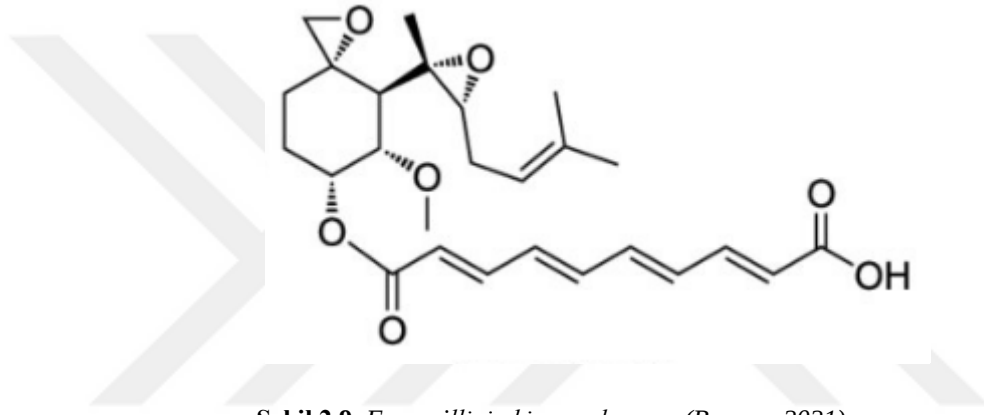
Şekil 2.7. Lovastatinin kimyasal yapısı (Cateni, 2021)

Yine poliketidlerden olan terrein, brefeldin A ve asperlin antikanser aktiviteler gösteren sekonder metabolitlerdir. *Aspergillus terreus* tarafından üretilen terrein MCF-7 hücre hattı olan meme kanseri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Liao, 2012). Bu bileşiğin bir kanser ilacı olan taksolden daha etkili olduğu gösterilmiştir. *Penicillium brefeldianum* tarafından üretilen brefeldin A metaboliti HL-60, K562 lösemi hücre hatları ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik etkiler göstermiştir (Shao, 1996). *Aspergillus nidulans*'tan üretilen asperlin bileşiğinin hücre proliferasyonunu azalttığı ve HeLa hücre hattında G2/M hücre döngüsünün durmasını teşvik ettiği keşfedilmiştir (He, 2011). *Penicillium griseofulvum*'dan izole edilen bir poliketid olan griseofulvin HeLa hücre hattında hücre çoğalmasını ve mitozu indüklediği ve ayrıca insan skuamöz hücreli karsinom olan SCC-114 hücre hattında sentrozomal kümelenmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Panda, 2005; Rebacz, 2007).



Şekil 2.8. Griseofulvinin kimyasal yapısı (http-5)

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda antikanser özellik gösteren terpenoidlerin çoğunluğu seskiterpenoid ve diterpenoidlere aittir (Wang L. W., 2011). *Penicillium* sp.'den izole edilen seskiterpenoid olan fudekadion A metaboliti insan akciğer kanseri NCI-H187, insan meme kanseri MCF-7 ve insan oral epidermoid karsinoma KB hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermiştir (Pittayakhajonwut, 2011). Bir başka seskiterpenoid yapılı terresiklik asit A, antifungal ve antikanser aktiviteleri ile *Aspergillus terreus*'tan izole edilmiştir (Hirota, 1986). Bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılan fumagillin bileşiği mikrofunguslar tarafından üretilen antikanser özellik gösteren bir terpenoiddir. Güçlü anjiyogenezi inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Bladt, 2013). Fumagillin ilk kez 1951 yılında *Aspergillus fumigatus*'tan izole edilmiştir (Eble, 1951).



Şekil 2.9. Fumagillinin kimyasal yapısı (Boysen, 2021)

Mikrofunguslar tarafından elde edilen antikanser aktiviteye sahip sekonder metabolitler, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde potansiyel kaynaklardır. Kimyasal yapıları ve çeşitli etki mekanizmaları ile kanser tedavisinde yeni tedavi yolları sağlayabilir özelliktedir. Bu etki mekanizmaları anjiyogenez, apoptoz, hücre bölünmesi ve immünomodülasyon gibi hücresel süreçlere müdahale etmektedir. Antikanser aktiviteye sahip fungal sekonder metabolitler yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde büyük öneme sahip olmaktadır. Literatürde mikrofungus kaynaklı birçok sekonder metabolit incelenmesine rağmen hala keşfedilmemiş birçok metabolit olduğu düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Fungus izolatları

Bu tez çalışması için kullanılan funguslar, daha önce Tuz Gölü'nden alınan su örneğinden izole edilmiş olup Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda muhafaza edilen, çalışma yapılmamış izolatlardır. +4 °C 'de buzdolabında Malt ekstrakt Agar (MEA) içeren yatık agar tüplerde stokları bulunan fungus izolatları taze MEA besiyeri içeren petrilere ekilerek aktiflenmeleri sağlanmış ve saflık kontrolleri yapılmıştır. İnkübasyon sonrası üreme gözlenen izolatlar deneylerde kullanılmak üzere tekrar yatık agara ekimleri yapılarak +4°C 'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.2. Standart bakteri ve maya suşları

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan standart bakteri ve maya suşları

Tür Adı	ATCC Kod Numarası
<i>Escherichia coli</i>	35218
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299
<i>Bacillus subtilis</i>	15245
<i>Candida albicans</i>	90028
<i>Candida krusei</i>	6258
<i>Candida parapsilosis</i>	22019
<i>Candida glabrata</i>	90030

Antimikrobiyal aktivite deneyi için kullanılan standart bakteri ve maya suşları Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Gliserol içerisinde stokları bulunan suşlar - 80°C'de saklanmaktadır. Deneyler için kullanılan bakteri suşları stoktan alınarak Nutrient Broth (NB) besiyerinde 37°C, 24 saat inkübe edilmiştir. Maya suşları ise Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerinde 30°C, 24-48 saat inkübe edilerek aktiflenmiştir.

3.1.3. A549 ve BJ Hücre hatları

A549 (ATCC, kodu; CCL-185) hücre hattı adenokarsinomik insan alveoler bazal epitel hücreleridir. İlk olarak 1972’de DJ Giard ve diğerleri tarafından geliştirilmiş bir hücre hattı olan A549 hücreleri, 58 yaşındaki beyaz bir erkeğin eksplante tümöründe kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ile kültüre edilmiştir (http-6). Adhere hücre özelliğine sahip bir hücre hattıdır. BJ (ATCC, kodu; CRL-2522) hücre hattı yenidoğan erkek bir bebeğin sünnnet derisinden alınan fibroblast hücrelerdir (http-7). A549 ve BJ hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection)’den temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

3.1.4.1. Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Çizelge 3.2. MEA içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Malt Ekstrakt	30,0 g
Pepton	1,00 g
Glukoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 mL

Hazırlanan besiyeri bileşenleri distile suda çözüldükten sonra 121 ° C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri steril kabinde petrilere dökülerek daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere +4 ° C’de buzdolabına kaldırılmıştır.

3.1.4.2. %17 NaCl Malt Ekstrakt Agar

Çizelge 3.3. %17 NaCl MEA içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Malt Ekstrakt	20,0 g
Pepton	1,00 g
NaCl	170,0 g
Glukoz	20,0 g
Agar	20,0 g
Distile Su	1000 mL

Bu besiyeri funguslarda halotolerant ve halofilik türlerin izolasyonu için kullanılmıştır. Hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dakika süre otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.4.3. Czapek Maya Ekstrakt agar (CYA)

Çizelge 3.4. CYA içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Maya Ekstrakt	5,0 g
Sukroz	30 g
Dipotasyum Fosfat	1,0 g
Czapek Konsantresi	10 mL
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

Hazırlanan besiyeri Czapek konsantresi hariç 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyerine steril kabinde %1 oranında Czapek konsantresi ilave edilmiştir. Bu besiyeri *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin klasik yöntemle tanımlanması için kullanılmıştır. İzolatlar; 5°C, 25°C ve 37°C'de CYA besiyerinde 7 gün süre ile inkübe edilmiştir.

3.1.4.4. Czapek Maya Ekstrakt Agar %20 sukroz (CY20S)

Çizelge 3.5. CY20S içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Maya Ekstraktı	5 g
Sukroz	200 g
Dipotasyum Fosfat	1 g
Czapek Konsantresi	10 mL
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

Czapek konsantresi hariç bütün besiyeri bileşenleri distile suda çözündürüldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyerin steril kabinde %1 Czapek konsantresi ilave edilmiştir. Bu besiyeri *Aspergillus* türlerinin tanımlanması için kullanılmıştır.

3.1.4.5. Czapek Dox Agar (CZ)

Çizelge 3.6. CZ içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Sukroz	30 g
Dipotasyum Fosfat	1 g
Czapek Konsantresi	10 mL
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

Tüm besiyeri bileşenleri Czapek konsantresi hariç distile suda çözündürüldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkarılan besiyeri içerisine steril kabinde %1 oranında Czapek konsantresi ilave edilmiştir. Bu besiyeri *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında kullanılmıştır.

3.1.4.6. %25 Gliserol Nitrat Agar (G25N)

Çizelge 3.7. G25N içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Maya Ekstraktı	5,0 g
Gliserol	250 g
Dipotasyum Fosfat	1 g
Czapek Konsantresi	10 mL
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

Czapek konsantresi hariç bütün besiyeri bileşenleri distile suda çözdürölüp 121 °C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyeri steril kabinde %1 oranında Czapek konsantresi ilave edilmiştir. Bu besiyeri *Penicillium* türlerinin tanımlanması için kullanılmıştır.

3.1.4.7. Antioksidan aktivite için kullanılan sıvı besiyeri

Çizelge 3.8. Antioksidan besiyeri içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Maya Ekstraktı	1,0 g
Sukroz	30 g
Polipepton	1,0 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Dipotasyum Fosfat	1 g
Distile su	1000 mL

Bütün besiyeri bileşenleri distile suda tamamen çözdüröldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri fungus izolatlarının antioksidan aktivite tarama testinde ve ekstraksiyon yapılabilmesi için kullanılmıştır.

3.1.4.8. *Mueller Hinton Broth (MHB)*

Çizelge 3.9. *MHB içeriği*

Malzeme	Miktar (g/mL)
Sığır eti ekstraktı	3 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözdürüldükten sonra pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Bu besiyeri antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.1.4.9. *Nutrient Broth (NB)*

Çizelge 3.10. *NB içeriği*

Malzeme	Miktar (g/mL)
Sığır eti ekstraktı	1 g
Maya ekstraktı	2 g
Pepton	5 g
Sodyum klorit	5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği saf suda çözdürülüp 10 mL'lik tüplere 5'er mL olacak şekilde hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan gecelik bakteri kültürlerinin hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.4.10. *Saboroud Dekstroz Broth (SDB)*

Çizelge 3.11. *SDB içeriği*

Malzeme	Miktar (g/mL)
Tripton	5 g
Pepton	5 g
Glikoz	20 g

Besiyeri bileşenleri saf suda çözündürüldükten sonra 10 mL'lik tüplere 5'er mL hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan maya kültürlerinin hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.4.11. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan besiyerleri

Çizelge 3.12. A549 hücre hattı besiyeri

Malzeme	Miktar (g/mL)
RPMI 1640	89 mL
Fötal sıgır serumu	10 mL
Penisilin-streptomisin çözeltisi	1 mL

Besiyeri bileşenleri steril kabin içinde hazırlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu besiyeri A549 hücre hattının üretilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 3. 13. BJ hücre hattı besiyeri

Malzeme	Miktar (g/mL)
DMEM	89 mL
Fötal sıgır serumu	10 mL
Penisilin-streptomisin çözeltisi	1 mL

Besiyeri içerikleri steril kabin içerisinde hazırlanarak +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. BJ hücre hattı için DMEM besiyeri kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve boyalar

3.1.5.1. %20 gliserol içeren stok çözeltisi

20 mL gliserol ve 80 mL distile su homojen hale getirildikten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan standart bakteri ve maya suşlarının -80°C’de stoklanabilmesi için kullanılmıştır.

3.1.5.2. %0.9’ luk fizyolojik tuzlu su çözeltisi

0,9 g sodyum klorür (NaCl) 100 mL distile su içerisinde homojen olana kadar karıştırılmış ve 121°C’de, 15 dakika otoklavlanmıştır. Çözelti antimikrobiyal aktivite testlerinde standart mikroorganizma miktarının azaltılması için kullanılmıştır.

3.1.5.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali 5 mg tartılarak 250 mL metanolde çözülmüştür. Çözeltinin homojen hale gelmesi için 15 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Deneyde kullanılmadan önce karanlıkta saklanmıştır. Her deney için taze hazırlanarak kullanılmıştır. Bu çözelti antioksidan aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.1.5.4. BHT (butilhidroksitoluen) çözeltisi

Çözeltinin hazırlanışı için 5 mg BHT (butilhidroksitoluen) tartılarak 5 mL metanol içerisinde çözülmüştür. Üzerine 5 mL distile su eklenmiştir. Elde edilen çözeltiden 300 µL alınarak 5 mL distile su eklenmiştir. Hazırlanan son çözelti DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tarama testinde referans madde olarak kullanılmıştır.

3.1.5.5. *MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) çözeltisi*

0,5 g (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (Sigma) tartılarak 100 mL fosfat tamponu içinde çözölmüştür. Hazırlanan çözelti çalışmalarda kullanılmak üzere - 20°C’de saklanmıştır. Stok çözelti 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Çözelti her çalışmadan önce taze hazırlanmıştır. Sitotoksik aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.1.5.6. *Spor süspansiyonunun hazırlanması*

Çizelge 3.14. *Spor solüsyonu içeriği*

Malzeme	Miktar (g/mL)
Tween 80	0,05 g
Agar	0,20 g
Distile su	100 mL

Yukarıdaki bileşenler distile suda çözdüröldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan çözelti steril kabinde 1 mL’lik endorf tüplere bölünmüştür. Fungus sporlarından öze ile alınarak endorf tüplerine aktarılmış ve vortekslenmiştir. Endorf tüpünden 3 µL alınarak petriye üç nokta ekim yapılmıştır. Spor solüsyonunun amacı fungus sporlarının daha az miktarda ve homojen şekilde dağılmasını sağlamaktır. Bu durum izolasyonu kolaylaştırmaktadır.

3.1.5.7. *Czapek konsantresi*

Çizelge 3.15. *Czapek içeriği*

Malzeme	Miktar (g/mL)
NaNO ₃	5,00 g
KCl	5,00 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
Distile su	100 mL

Bu çözelti *Aspergillus* türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan Czapek Maya Agar (CYA), %20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar (CY20S) ve Czapek Dox Agar (CZ) besiyerlerinin yapımında kullanılmıştır.

3.1.5.8. Laktofenol pamuk mavisi çözeltisi

Çizelge 3.16. Laktofenol pamuk mavisi içeriği

Malzeme	Miktar (g/mL)
Pamuk Mavisi (Cotton Blue)	0,075 g
Fenol kristal	20 g
Laktik Asit	20 mL
Gliserin	40 mL
Distile su	20 mL

Laktofenol pamuk mavisi solüsyonu hazırlamak için distile su, laktik asit ve gliserin karıştırılmıştır. Hafif ateşte ısıtılarak fenol kristalleri ilave edilmiştir. En son pamuk mavisi boyası ilave edilmiştir. Hazırlanan boya mikrofungusların boyanması için kullanılmıştır.

3.1.6. Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.17. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
İnkübatör	Binder, Almanya
Trinoküler mikroskop	Carl Zeiss, Almanya
Akış sitometri cihazı	BD Accuri C6, ABD
Rotary evaporator	Heidolph, Almanya
Ultrasonik su banyosu	Wisd, Kore
Otoklav	Alp, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Cedex XS	Innovatis, ABD
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
CO ₂ İnkübatör	Thermo Scientific, ABD
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Cytation 3 multi-mode reader	Bioteck, ABD
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Vorteks	Daihan, Güney Kore

3.1.7. Kullanılan kimyasallar ve malzemeler

Çizelge 3.18. Kimyasallar, malzemeler ve markaları

Kimyasal	Marka
Gram boyama seti	Norateks, Türkiye
Laktofenol pamuk mavisi	Tekkim, Türkiye
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma–Aldrich, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Tripan mavisi	Roche, Almanya
Etil asetat	Merck, Almanya
Tripsin-EDTA	Pan Biotech, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Mikrofungusların izolasyonu

Bu tez çalışması için kullanılan funguslar, daha önce Tuz Gölü'nden alınan su örneğinden izole edilmiş olup Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda muhafaza edilen, çalışma yapılmamış izolatlardır. Seçilen fungus izolatları MEA besiyerine petri plağında 3 çizgi olacak şekilde bunzen beki alevinde steril öze ile ekimleri yapılarak 7 gün 37°C'de inkübe edilmiştir. 7 gün sonunda oluşan fungus kolonileri gözlenmiştir. Saf olan fungus izolatları stok için yatık MEA besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Mikrofungusların klasik yöntemle tanımlanması

Fungus izolatları ilk aşamada cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bunun için izolatlarının farklı besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır. Besiyeri, inokülasyon tekniği ve inkübasyon koşulları morfolojik karakterleri etkilemektedir (Okuda T. , 1994; Okuda T. K., 2000). Bu sebeple her ekimin aynı şekilde olmasına özen gösterilmiştir.

Aspergillus cinsi küflerin identifikasyonu için kullanılan besiyerleri CYA (5°C, 25°C ve 37°C), CZ, CY20S, MEA'dır. *Penicillium* cinsi küflerin identifikasyonu için ise CYA, G25N, MEA kullanılmıştır. 7 günlük inkübasyondan sonra petriler koloni rengi ve özelliği, pigment oluşumu, eksuda varlığı açısından morfolojik olarak incelenmiştir. Küflerin mikroskopik incelemesi için trinoküler mikroskop (Carl Zeis) kullanılmıştır. Konidial baş, stipe uzunluğu, spor yapıları gibi mikroskopik özellikleri incelenmiştir.

Mikrofungusların klasik yöntemle identifikasyonu makroskopik ve mikroskopik olarak iki şekilde incelenmiştir. Makroskopik incelemede koloni büyüme hızı, rengi, dokusu, eksuda ve pigment varlığı gözlemlenmiştir. Mikroskopik incelemede ise laktofenol pamuk mavisi boyası ile boyanan funguslar x40'luk objektifte ışık mikroskopunda mikromorfolojik yapıları (konidia, metula, fialid, stipe) değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. Laktofenol pamuk mavisi ile boyama

Mikrofungusların mikroskopik yapılarının incelenmesi için birden fazla boya bulunmaktadır. Laktofenol pamuk mavisi hif ve sporların incelenmesi için ideal bir boyadır. MEA besiyerinde 7 günlük inkübe edilen fungus izolatları mikroskopik görünümeleri incelenmek üzere laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak incelenmiştir. Bunun için ilk önce temiz bir lam üzerine bir damla laktofenol pamuk mavisi boyası konulmuştur. Üzerine fungus izolatından öze ile alınarak konulmuştur. Lamel ile kapatılarak 40x'lik objektifte mikroskopta incelenmiştir (Ener, 2009).

3.2.3. Mikrofunguslardan sekonder metabolit Ekstraksiyonu

Fungus izolatları antioksidan sıvı besiyerinde durgun halde, oda sıcaklığında 30 gün inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür sıvıları misellerinden ayrılmak üzere Whatmann No:1 kağıdından filtre edilmiştir. Elde edilen fermentasyon sıvısı ayırma hunisine alınarak 1:1 oranında etil asetat eklenmiştir. 3 kez etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Üst kısım olan organik faz rotavaporda (Heidolph, Almanya) uçurulmuş olup alt kısımda kalan kısım liyofilize edilmek üzere Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (AÜBİBAM) gönderilmiştir. Rotavaporda yoğunlaştırılarak elde edilen özütler cam kahverengi şişelere toplanarak deneylerde kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır (Colakoglu, 2002).

3.2.4. Antimikrobiyal aktivite testi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde Mikrodilüsyon Broth Yöntemi kullanılmıştır. Deneyde kullanılan bakteri suşları *E.coli* ATCC 35218, *K.pneumoniae* ATCC 700603, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 51299, *B.subtilis* ATCC 15245, *P.aeruginosa* ATCC 27853'dür. Maya suşlarından *C.albicans* ATCC 90028, *C.krusei* ATCC 6258, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.parapsilosis* ATCC 22019 kullanılmıştır. Bu deneyde funguslardan elde edilen sekonder metabolit özütlerinin antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.5. Mikrobroth dilüsyon yöntemi

Bu yöntemde standart mikroorganizmaların fungal sekonder metabolitlere karşı hassasiyetinin belirlenmesinde “U” tipi çukurlara sahip 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Kullanılan bakteri ve maya suşlarının gecelik kültür için besiyerine ekimleri yapılmıştır. Bakteri için Nutrient Broth besiyeri (NB), maya için Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerine ekim yapılarak 37°C’de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri ve mayalar steril kabin içerisinde %0,9’luk fizyolojik tuzlu su içerisinde Mcfarland 0.5 (10^8 kob/mL) olarak ayarlanmıştır. Mcfarland ayarlanan mikroorganizmalar bakteriler için çift kuvvet Mueller Hinton Broth, mayalar için çift kuvvet SDB besiyerinde 1:10 oranında seyreltilmiştir. Hazır hale gelen bakteri ve maya suşları her bir mikroorganizma için ayrı, 96 kuyucuklu plakalara 100 µL olacak şekilde dağıtılmıştır.

Fungal özütler 100 µL DMSO’da çözülmüştür. 900 µL steril distile su eklenerek DMSO’nun etkisi azaltılmıştır. Hazırlanan 1 mL’lik çözelti antimikrobiyal aktivite testinde kullanılmıştır. Fungal özütlerin steril distile su içerisinde 1600 µg’dan başlayan konsantrasyonlarda 12 kuyucuklu rezervuarda seri dilüsyonları yapılmıştır. Konsantrasyonlar 1600 µg, 800 µg, 400 µg, 200 µg, 100 µg’dır. Kontrol için kullanılan kloromfenikol ve ketakonazol için konsantrasyonlar 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg ve 12,5 µg’dır.

Dilüye edilen konsantrasyonlar 100 µL olarak 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır. Pozitif kontrol olarak bakteriler için kloromfenikol, mayalar için ketakonazol kullanılmıştır. Negatif kontrol için sadece mikroorganizma bulunan özüt içermeyen kuyucuklar ve mikroorganizma süspansiyonu içermeyen, sadece besiyeri içeren kontrol kuyucuğu bulunmaktadır. Plakalar 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda plakalarda üreme olup olmadığı resazurin ve MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ile boyanarak gözlenmiştir. Resazurin zayıf floresan, toksik olmayan, hücre geçirgen ve redoks duyarlı bir fenoksazin boyasıdır. Üremenin olduğu kuyucuklar resazurin ile boyandıysa pembe/kırmızı, MTT ile boyandıysa siyah renk gözükür. Üremenin olmadığı en son kuyucukta konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir (NCCLS, 2006).

3.2.6. Fungal sekonder metabolitlerin antioksidan aktivite tarama testi

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki testi kullanılmıştır. Funguslar antioksidan sıvı besiyerinde, durgun halde, oda sıcaklığında (25°C) 30 gün boyunca inkübe edilmiştir. Otuzuncu günün sonunda besiyerindeki kültür sıvısını misellerden ayırmak için Whatmann No:1 kağıdından filtre edilerek falkona toplanmıştır. Elde edilen filtratlardan 100 µL alınarak 2.9 mL DPPH çözeltisi ilave edilerek vortekste 30 sn karıştırılmıştır. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen çözeltilerin absorbans değerleri 517 nm dalga boyuna ayarlanmış, spektrofotometrede okunmuştur. Serbest radikal süpürücü etki % inhibisyon açısından aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Referans madde olarak BHT (butilhidroksitoluen) kullanılmıştır (Börühan Çetin, 2021).

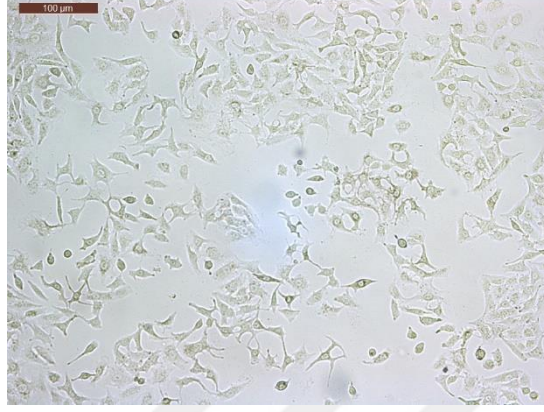
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örneğin absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100$$

3.2.7. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.7.1. A549 hücre hattının hazırlanması

Bu tez çalışması için kullanılan A549 hücre hattı, kültür ortamında geliştirilmek üzere %10 FBS (fötal sığır serumu), %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besiyeri hazırlanmıştır. -80 °C'den stoktan çıkarılan hücreler RPMI besiyeri içeren 25 cm³ lük flasklarda %95 bağıl nem, %5 CO₂ ve 37°C'de inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çoğalan hücreler inverted mikroskopta incelenerek yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak 75 cm³ lük flaslara aktarılmıştır. Bu işlem için önce küçük flastaki hücrelerin besiyeri serolojik pipet ile alınmıştır. 5 mL PBS ile yıkama yapılmıştır. PBS flastan uzaklaştırılarak 500 µL TE (Trypsin-EDTA) eklenerek CO₂ içeren inkübatörde 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. TE yapışan hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için uygulanmaktadır. 3 dakika inkübasyon sonrası hücreler inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. Eğer hücreler hala flask yüzeyinde yapışık halde ise mekanik güç veya hücre kazıyıcısı ile hücreler kaldırılmıştır. Flaska 5 mL besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize

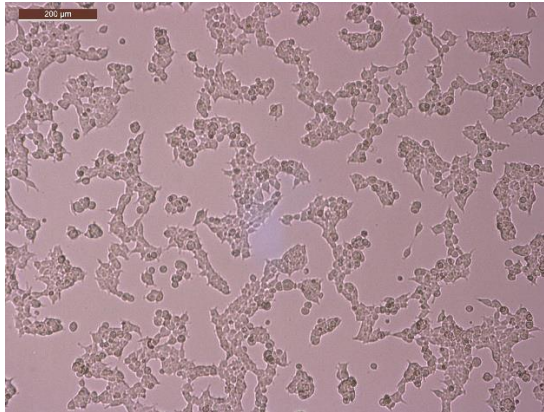
edilmiş olup hücreler 50 mL'lik steril falkon tüplerine alınmıştır. 5 dakika 1200 rpm de santrifüj edildikten sonra dikkatlice dökülerek supernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 15-20 mL taze besiyeri eklenerek resüspanse edilmiştir. Hücreler 75 cm³ lük flaska aktarılarak inkübatöre kaldırılmıştır.



Şekil 3.1. A549 hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü

3.2.7.2. BJ hücre hattının hazırlanması

Fibroblast bir hücre hattı olan BJ hücreleri de, A549 hücre hattında olduğu gibi stoktan çıkarılmış ve çoğaltılmıştır. BJ hücre hattı için medium olarak DMEM kullanılmıştır. Stok haldeki BJ hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerine alınarak 25 cm³ lük flasklarda %5 CO₂, %95 bağıl nem ve 37 °C inkübatörde inkübe edilerek deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır.



Şekil 3.2. BJ hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü

3.2.8. Hücrelerden stok yapılması

%5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilen hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında stok yapılarak deneylerde kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır. Hücrelerden stok yapmak için önce pasajlama işleminde olduğu gibi hücre içeren flasktaki besiyeri uzaklaştırılmış, PBS ile bir kez yıkanmış, TE eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet içeren falkona FBS ve %10 DMSO eklenerek hücreler kriyotüpe alınmış ve -80°C’de saklanmıştır.

3.2.9. Hücre sayımı

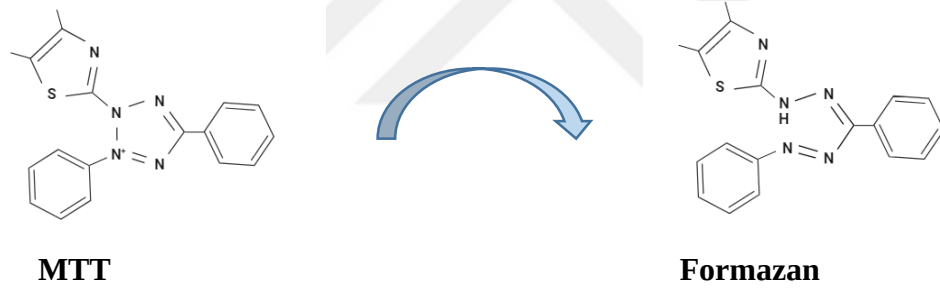
75 cm³ lük flaskta çoğaltılan A549 ve BJ hücre hatları deneylerde kullanılmak üzere hücre sayımı yapılmıştır. Bu işlem için flasktaki eski besiyeri uzaklaştırılmıştır, PBS ile yıkanmış ve 500 µL TE eklenmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Pellete 1 mL besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. 10 µL hücre süspansiyonundan alınarak 10 µL Tripan Mavisi boyası ile resüspanse edilerek Cedex Smart Slide (Roche, Almanya) kuyucuğuna yüklenmiş ve Cedex (Roch, Almanya) hücre sayım cihazında sayımı yapılmıştır. Tripan mavisi ölü hücreleri boyarken canlı hücreleri boyamamaktadır.

3.2.10. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi hücre aktivitesi ile absorbans arasında doğrusal bir ilişki sayesinde hücrelerin büyüme hızını, çoğalmasını ölçmede kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. MTT sarı renkli suda çözünen bir tetrazolyum boyası olup canlı hücrelerde salınan mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından geri dönüşümsüz formazan kristallerine indirgenir. MTT formazan kristallerinin miktarı ile ilişkili olan mitokondriyal aktiviteyi ölçerek canlı hücre sayısını belirlenmesini sağlar. Canlı ve çoğalan hücreler daha yüksek oranda MTT reaksiyonuna sahip iken ölü hücreler düşük oranda MTT indirgenmesine sahip olur. MTT uygulamasından sonra formazan kristalleri DMSO ile çözünerek spektrofotometrik analizi yapılır (Plumb, 2004).

Bu yöntem için flasklarda çoğaltılan hücreler 96 kuyucuklu plakalara hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucuk 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler plaka yüzeyine yapışmaları için 24 saat 37°C ve %5 CO_2 karbondioksit içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saatten sonra plakalardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Fungal özütler 1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hazırlanarak 100 μL olarak plakalara dağıtılmıştır. Pozitif kontrol olarak doksorubisin 50, 15, 10 ve 5 $\mu\text{M/mL}$ ve negatif kontrol olarak ise % 0,2 DMSO içeren RPMI besiyeri konularak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Renk körü için hücre içermeyen boş bir plakaya besiyeri içerisinde özütler eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

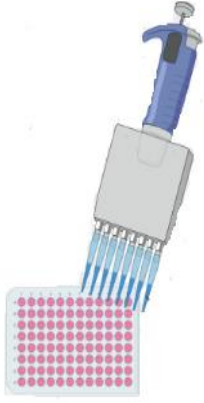
MTT solüsyonu her kuyuya 10 μL eklenerek formazan tuzlarının oluşması için 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırılarak 100 μL çözücü olarak DMSO eklenmiştir. Karanlıkta 10-15 dakika bekletildikten sonra 540 nm dalga boyunda ELİZA (Bio-Tek, ABD) cihazında okunmuştur.



Şekil 3.3. *MTT'nin formazana dönüşümü (Biorender aracılığı ile yapılmıştır.)*



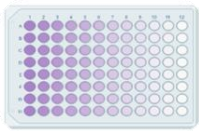
Hücreler 96 kuyucuklu'lu plakalara ekilmiştir
(5×10^3 hücre, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır)



Fungal özütler ve liyofilize örneklerin farklı konsantrasyonlarda A549 ve BJ hücre hatlarına uygulanmıştır



MTT boyası verilmiştir (3-4 saat inkübasyon)



Oluşan formazan kristalleri DMSO'da
çözülmüştür. Absorbans 540 nm'de okunmuştur.

Şekil 3.4. MTT aşamaları (Biorender aracılığı ile yapılmıştır.)

3.2.11. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Flow sitometrinin çalışma prensibi 1870'li yıllara kadar uzanmasına rağmen 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlanması, 1980 yılında ayırma işleminin bulunmasıyla son 20 yıldır sürekli değiştirilerek günümüze kadar gelmiştir (Kanev, 2016). Akış sitometrinin temel yaklaşımı hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içerik, sitoplazmik granülaritesi açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hücreler önce floresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya kullanılarak işaretlenir. Akış sitometrisinin çalışma prensibi şu şekildedir; bir sıvı içerisindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam veya quartzdan yapılmış akış kabinine gelir. Bu kabinin şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek sıra halinde lazer kaynağından geçişini sağlar.

Hücrelerin analizi için sistemde forward scatter (FS), side scatter (SS) ve floresan (FL-1, FL-2, FL-3 vb.) dedektörler bulunur. İleri saçılma grafiği (Forward scatter) ile yaklaşık büyüklüğü, yana saçılma grafiği (side scatter) ile yaklaşık granülaritesi, floresan grafiği ile yaklaşık floresan miktarı hakkında bilgi verir

Akış sitometri ile apoptotik hücre analizi yapılabilmektedir. Bunun için Annexin V-PI yöntemi kullanılmıştır. Apoptoz kısaca programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücrenin apoptoza gitmesi durumunda iç yüzeyde bulunan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken döneminde meydana gelir. Annexin V, PS moleküllerine bağlanabilen bir proteindir. Floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Annexin V, hücrelerin ani (istenmeyen) ölümü olan nekrotik hücrelerin yüzeylerine de bağlanabildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. PI direkt olarak DNA veya çift sarmallı RNA moleküllerine bağlanır. Boya ölü ve hasar görmüş hücelere bağlanırken sağlıklı hücelere bu bağlanma gerçekleşmez. PI ile geç apoptozdaki hücrelerin görünümü sağlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. Deney için çoğaltılan A549 hücreleri hücre sayımları yapıldıktan sonra 12 kuyucuklu plakalara (her kuyucuk 1 mL içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde) ekilerek 24 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelere MTT sonuçlarından elde edilen IC₅₀ değerlerine göre fungal özütler hücrelere uygulanmış ve tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler plakaların yüzeyinden kaldırılarak 15 mL'lik falkonlara alınmıştır. 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletine 1 mL PBS ile yıkama yapılarak santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Son yıkanmadan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Pellete 100 µL PBS eklenerek resüspanse edilmiştir. Ependorflara 5'er µL Annexin V ve PI boyaları konulmuştur. Ependorfa hücreler eklenerek 20-25 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ependorflara 1 mL Annexin binding buffer ve 4 mL PBS karışımından hazırlanan tampondan 200 µL eklenerek akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okumaları ve analizleri yapılmıştır.

3.2.12. Akış sitometride kaspaz-3 yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspaz-3 inflamasyon ve hücre ölümü gibi süreçleri kontrol eden endoproteaz ailesinden olan bir enzim grubudur. Hem dışsal (apoptotik) hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilmektedir.

Kaspaz-3 aktivasyonunun belirlenmesinde PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti (BD) kullanılmıştır. Deney için A549 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara (her kuyucuğa 1 mL içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde) ekimleri yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası fungal özütler Annexin V yönteminde olduğu gibi MTT sonuçlarından elde edilen IC₅₀ değerlerine göre hücrelere uygulanmıştır. 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler kaldırılarak 15 mL'lik falkonlara toplanmıştır. 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletine 1 mL PBS ile yıkama yapılmıştır. Son yıkamadan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine fiksasyon ve hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu eklenerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Süre sonunda santrifüj yapılarak pellet 2 kez 500 µL perm wash ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 50 µL perm wash ile resüspanse edilmiştir. Üzerine 10 µL antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 1000 µL perm wash eklenerek santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 350 µL perm wash ile

resüspanse edilmiştir. Hücreler ependorfa aktarılarak akış sitometri cihazında okunmuş ve analiz edilmiştir.

3.2.13. Sitotoksisite yöntemlerinin istatistiksel analizi

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizimi GraphPad Prizm 9.0 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler sırasında hücre gruplarının % canlılık grafikleri kontrol grubu maksimum değerlendirilerek çizilmiş olup, elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değerleri $p > 0.5$ fark yok, $p < 0.05$ (*) fark var, $p < 0.01$ (**) anlamlı fark var, $p < 0.001$ (***) önemli fark var, $p < 0.0001$ (****) çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikrofungusların Klasik Yöntemle Tanımlanması

Farklı besiyerlerine ekimleri yapılan fungus izolatları 7 gün inkübasyondan sonra koloni morfoloji özellikleri ve mikroskop görüntüleri açısından incelenmiştir. Sonuçlara göre 9 fungus izolatının 5 tanesi *Penicillium*, 3 tanesi *Aspergillus* cinsi olarak belirlenmiş ve bir izolat ise; tür tayini için Microbiota Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne gönderilerek hizmet alımı yapılmış, moleküler tanımlamasına göre; *Talaromyces flavus* olduğu belirlenmiştir. Fungus izolatlarının cins ve tür düzeyindeki sistematik sınıflandırılması aşağıda verilmiştir.

Alem: Fungi

Filum: Ascomycota

Sınıf: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Familya: Trichocomaceae

Cins: *Penicillium*

Alem: Fungi

Filum: Acsomycota

Sınıf: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Familya: Trichocomaceae

Cins: *Aspergillus*

Alem: Fungi

Filum: Ascomycota

Sınıf: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Familya: Trichocomaceae

Cins: *Talaromyces*

Tür: ***Talaromyces flavus***

Aspergillus ve *Penicillium* cinslerinin klasik tanımlanmasında kullanılan besiyerlerindeki koloni özellikleri aşağıda verilmiştir. *Aspergillus* cinsleri için kullanılan besiyerleri MEA, CYA 37°C, CYA 25°C, CYA 5°C, CY20S, CZ ve %17 NaCl MEA'dır. *Aspergillus* identifikasyonu için 'Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*' (Samson, 2014), 'Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics' (Diba, 2007) adlı teşhis kaynaklarından yararlanılmıştır.

Penicillium cinsleri için kullanılan besiyerleri ise MEA, CYA 37°C, CYA 25°C, CYA 5°C, G25N ve %17 NaCl MEA'dır. *Penicillium* identifikasyonu için 'Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*, A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins' (Frisvad J. C., 2004), 'The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*' (Pitt, 1979) adlı teşhis kaynaklarından yararlanılmıştır.

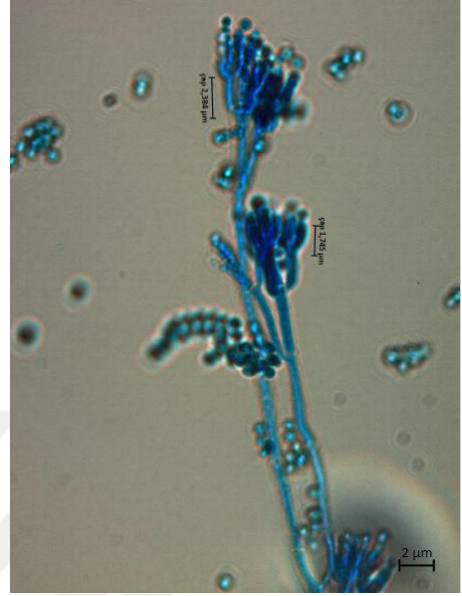
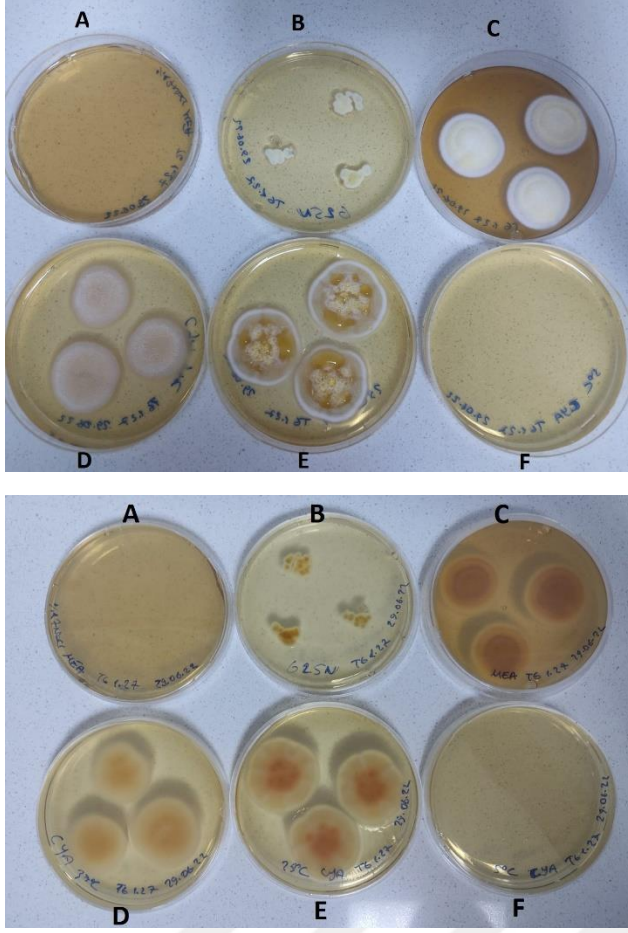
4.1.1. Koloni ve mikroskopik özellikleri

Penicillium sp. 1

Koloni özellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 30 mm, koloninin rengi açık sarıdan beyaza değişen, arkası hardal renk, dokusu ise kadifemsi. Eksudası yoktur.

CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 30 mm, koloni rengi ortası bal rengi kenarlar krem, arkası turuncu tonları olup dokusu kadifemsi, granüler yapılıdır. Sarı ve bal renkli, yoğun eksudalar vardır. CYA 37°C besiyerinde koloni çapı 25 mm, koloni rengi koyu krem, arkası renksiz, dokusu funiculose (lif) olup eksuda gözlenmemiştir. G25N besiyerinde mikro koloniler gözlenmiştir. CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde ise üreme görülmemiştir.

Mikroskopik özellikleri: Konidiofor 27,97 µm, terverticillate, fialid 1,74 µm, metula 2,38 µm ve ramı 5,29 µm'dir. Stipe düz ve konidyumlar küreseldir.



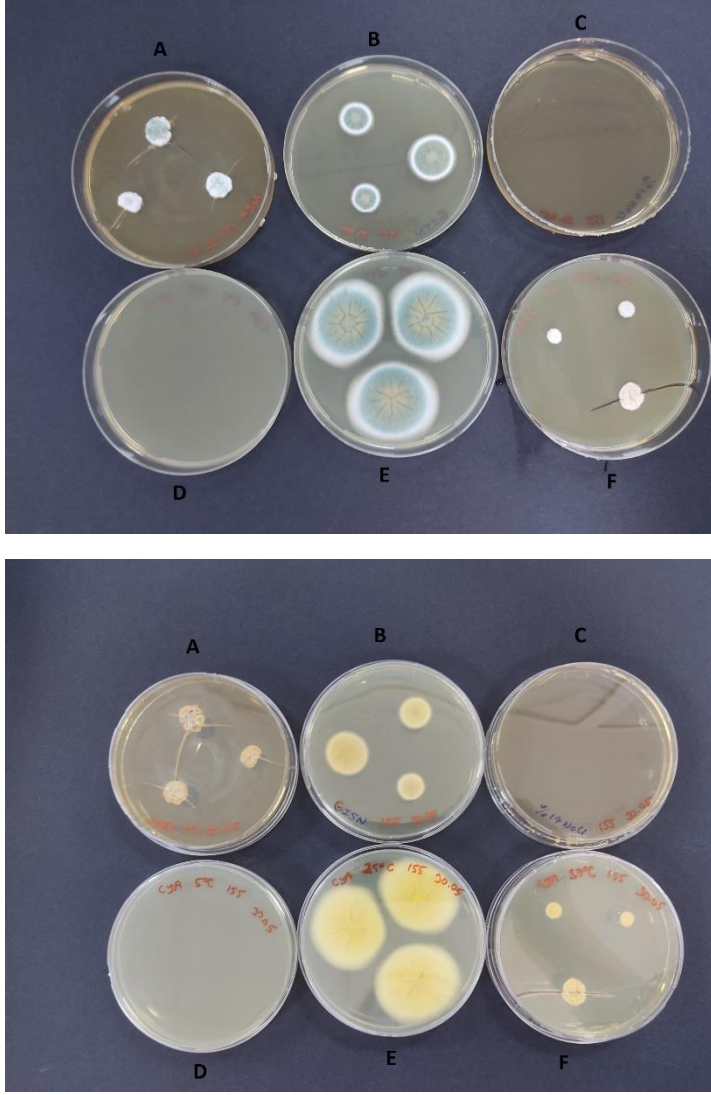
Şekil 4.1. *Penicillium sp. 1* izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüleri (A) %17 NaCl MEA, (B) G25N, (C) MEA, (D) CYA 37°C, (E) CYA 25°C, (F) CYA 5°C

Penicillium sp. 2

Koloni özellikleri: CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 40 mm, koloni rengi ortası kahverengiden turkuaza değişebilen, arkası renksizdir. Dokusu kadifemsi ve ışınsal yarıklıdır. Eksuda yoktur.

G25N besiyerinde koloni çapı 15-20 mm'dir. Kadifemsi dokuya sahip, koloni rengi ortası yeşil, kenarları beyaz renklidir. MEA ve CYA 37°C besiyerinde mikro koloniler görülmüştür. CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiyumlar küresel şekilli, konidifor monoverticillate, 5,72 µm, fiyalid çapı 0,539 µm ve ampulliform, metula 0,497 µm, stipe bölmelidir.



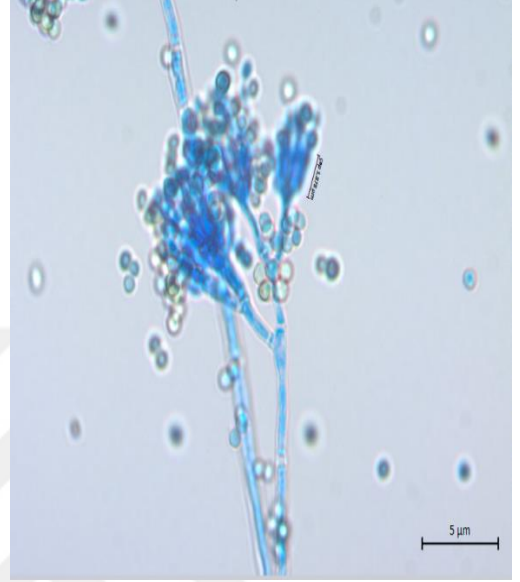
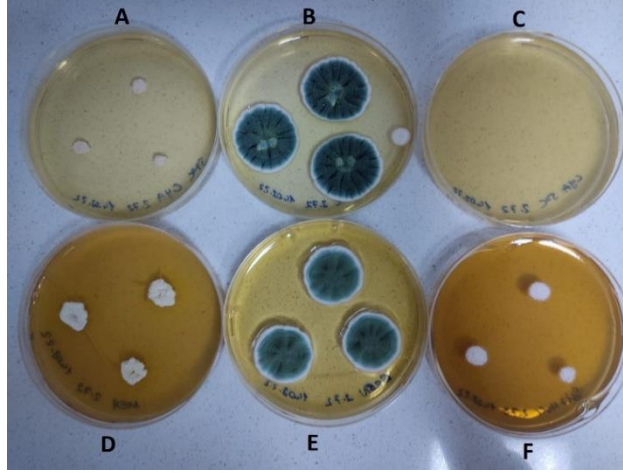
Şekil 4.2. *Penicillium sp. 2* izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüleri (A) MEA, (B) G25N, (C) %17 NaCl MEA , (D) CYA 5°C, (E) CYA 25°C, (F) CYA 37°C

Penicillium sp. 3

Koloni özellikleri: CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 25-30 mm, koloni rengi ortası yeşilimsi turkuaz, kenarları beyaz olup arkası sarı renktir. Dokusu kadifemsi ve ışınsal yarıklıdır. Koyu sarı renk eksuda görülmüştür.

G25N besiyerinde koloni çapı 25 mm, dokusu kadifemsi ve buruşuk şekilli, koloni rengi yeşilimsi mavi olup arka yüzü renksizdir. MEA, CYA 37°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde mikro koloniler görülmüştür. CYA 5°C besiyerinde ise üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiyumlar duvarlı ve küresel şekilli, quarterverticillate, konidiofor 25,16 µm, fialid 1,87 µm ve silindiriktir.



Şekil 4.3. *Penicillium* sp. 3 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) CYA 37°C, (B) CYA 25°C, (C) CYA 5°C, (D) MEA, (E) G25N, (F) %17 NaCl MEA

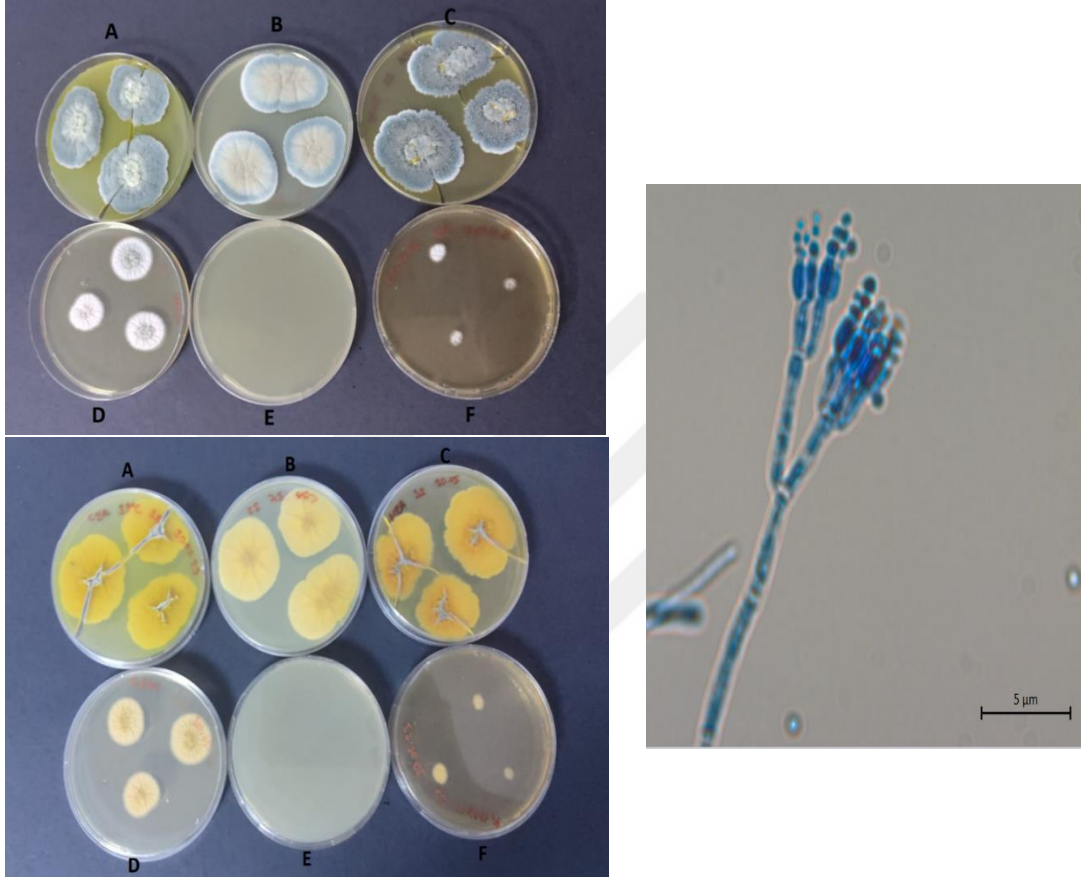
***Penicillium* sp. 4**

Koloni özellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 40 mm, koyu gri, koloniler asimetrik dağılmıştır. Dokusu kadifemsi olup petri arkası hardal renk tonlarındadır. Sarı ve şeffaf renklerde eksuda vardır.

CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 40-45 mm'dir. Koloni rengi ortası bej, kenarlara doğru yeşilimsi maviye değişebilen renklerde, arkası ise renksizdir. Kadifemsi dokuya sahiptir. CYA 37°C besiyerinde koloni çapı 35-40 mm, ortası açık yeşilden griye değişen

renk, dokusu kadifemsidir. Sarı renk pigment görülmüştür. G25N besiyerinde koloni çapı 20 mm, ortası gri, kenarları beyaz, ışınal yarıklıdır. %17 NaCl MEA besiyerinde mikro koloniler görülmüştür. CYA 5°C besiyerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiyumları oval veya elipsoidal, konidiofor terverticillate, fialid kısa ampulliform çapı 1,44 µm, metula 1,79 µm, rami 3,19 µm'dir.



Şekil 4.4. *Penicillium sp. 4* izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) CYA 37°C, (B) CYA 25°C, (C) MEA (D) G25N, (E) CYA 5°C, (F) %17 NaCl MEA

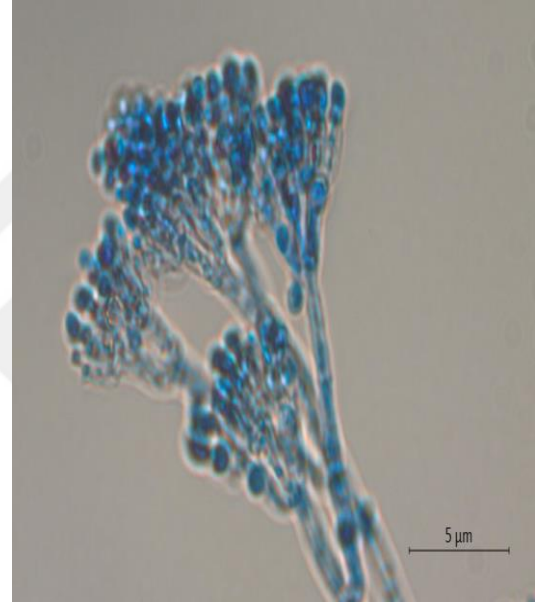
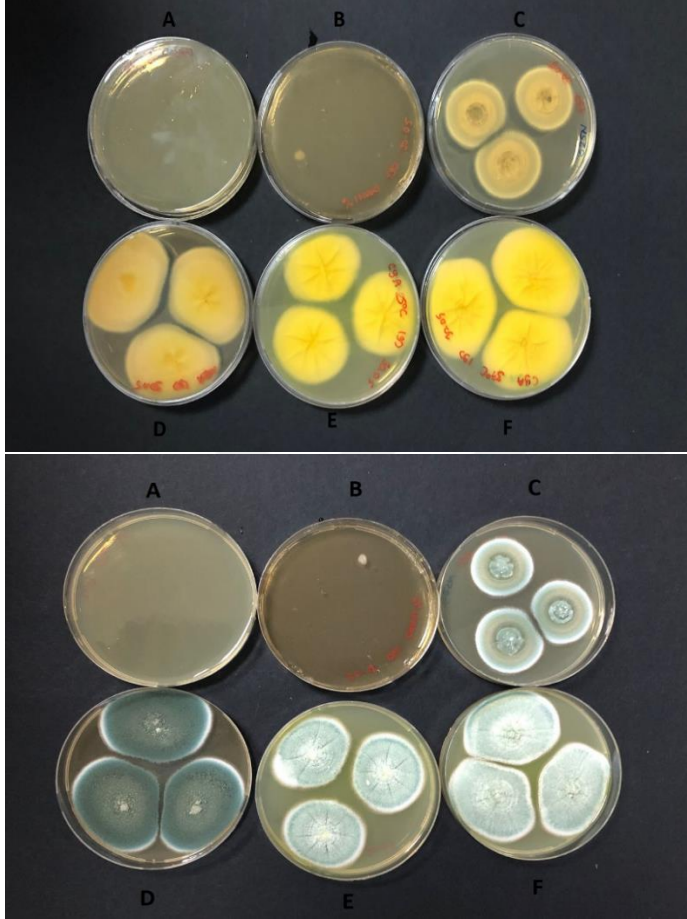
Penicillium sp. 5

Koloni özellikleri: CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 40 mm, dokusu kadifemsi ve ışınal, rengi yeşilimsi gri, arkası sarı renktir. Eksuda yoktur.

G25N besiyerinde koloni çapı 30 mm, yeşil-gri renk tonlarına değişen, arkası renksizdir. Koloni dokusu kadifemsidir. CYA 37°C besiyerinde koloni çapı 45-50 mm, kadifemsi doku, yeşilimsi gri koloni rengine sahip olup petrinin arkası sarı renktir. MEA

besiyerinde koloni çapı 50 mm, renk yeşilimsi mavi, kadifemsi ve düzdür. CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde üreme görülmemiştir.

Mikroskopik özellikleri: Konidiyumlar oval, quarterverticillate, fialid çapı 2,8 µm, metula 2,0 µm'dir.



Şekil 4.5. *Penicillium* sp. 5 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) %17 NaCl MEA, (B) MEA, (C) G25N, (D) CYA 5°C, (E) CYA 37°C, (F) CYA 25°C

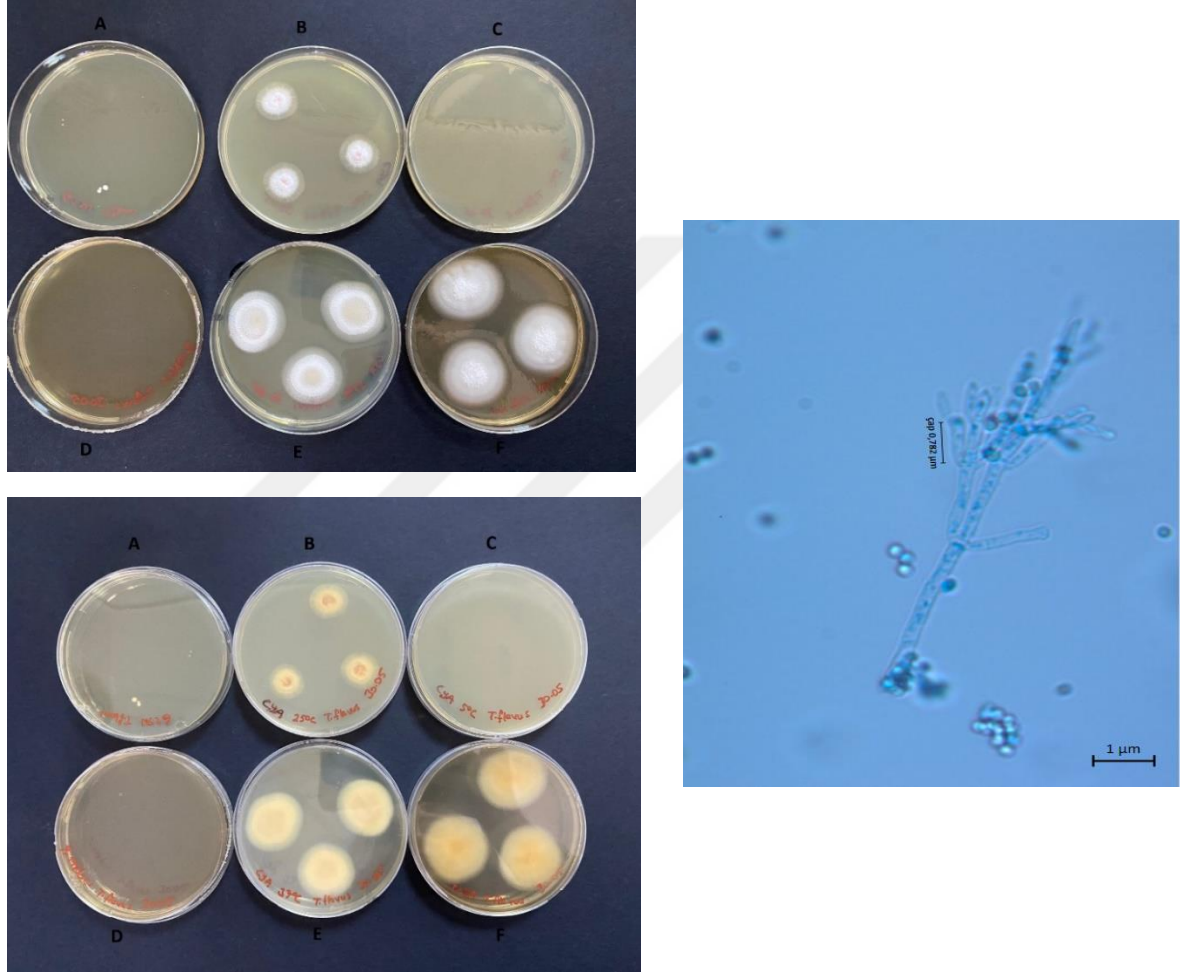
Talaromyces flavus

Koloni özellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 30-35 mm, tamamı beyaz renk, arkası renksizdir. Koloni dokusu pudramsı ve düzdür.

CYA 25°C besiyerinde koloni çapı 20 mm, dokusu pudramsı ve renk tamamen beyazdır. CYA 37°C besiyerinde koloni çapı 25-30 mm, dokusu pudramsı ve koloni rengi

krem ve beyaz renklerde olup arkası renksizdir. 7 günden daha uzun inkübe edilen kolonilerde kırmızı renk pigment görülmüştür. G25N, CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiofor terverticillate 4,44 µm, fialid 0,50 µm, metula 0,78 µm uzunluktadır. Konidyumlar küreseldir.



Şekil 4.6. *Talaromyces flavus*'un 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü
(A) G25N, (B) CYA 25°C, (C) CYA 5°C, (D) %17 NaCl MEA, (E) CYA 37°C, (F) MEA

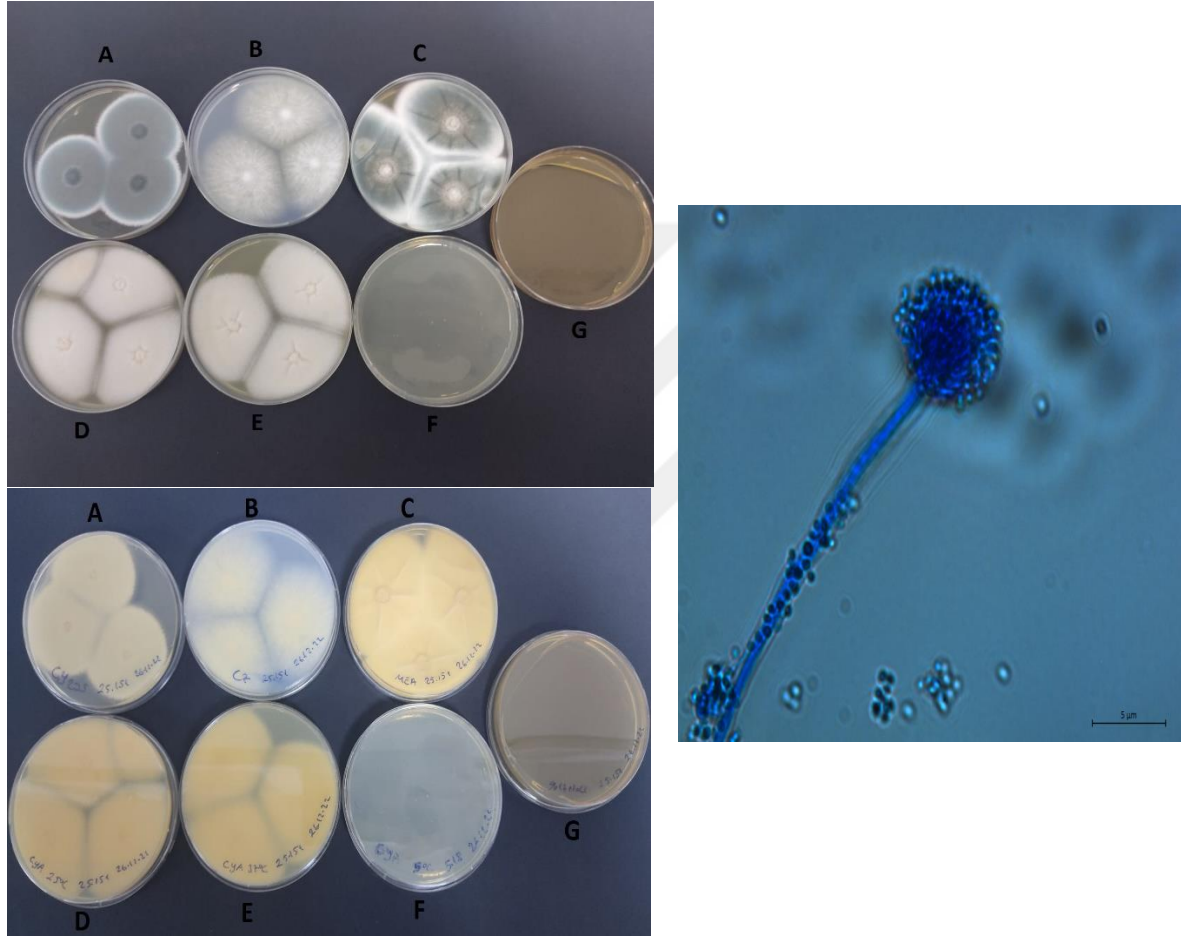
***Aspergillus* sp. 1**

Koloni özellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 70 mm, ortası yeşilimsi gri, kenarlar beyaz, dokusu kadifemsi ve ışınal yarıklıdır.

CYA 25°C ve CYA 37°C besiyerlerinde aynı koloni özellikleri görülmüştür. Koloni çapları 55-60 mm, tamamı krem renkli, kadifemsi ve düzdür. CZ besiyerinde koloni çapı 55-

60 mm, dokusu ynl ve ışınsal, koloni rengi ise krem-si-beyaz arasındadır. CY20S besiyerinde koloni çapı 45-50 mm, dokusu tozumsu ve düz, mavimsi gri renklidir. CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik zellikleri: Konidyo-forlar 20,6 µm ve düz duvarlıdır. Vezikül apı 4,09 µm, konidyal başlar kolumnardır. Konidiumlar elipstir.



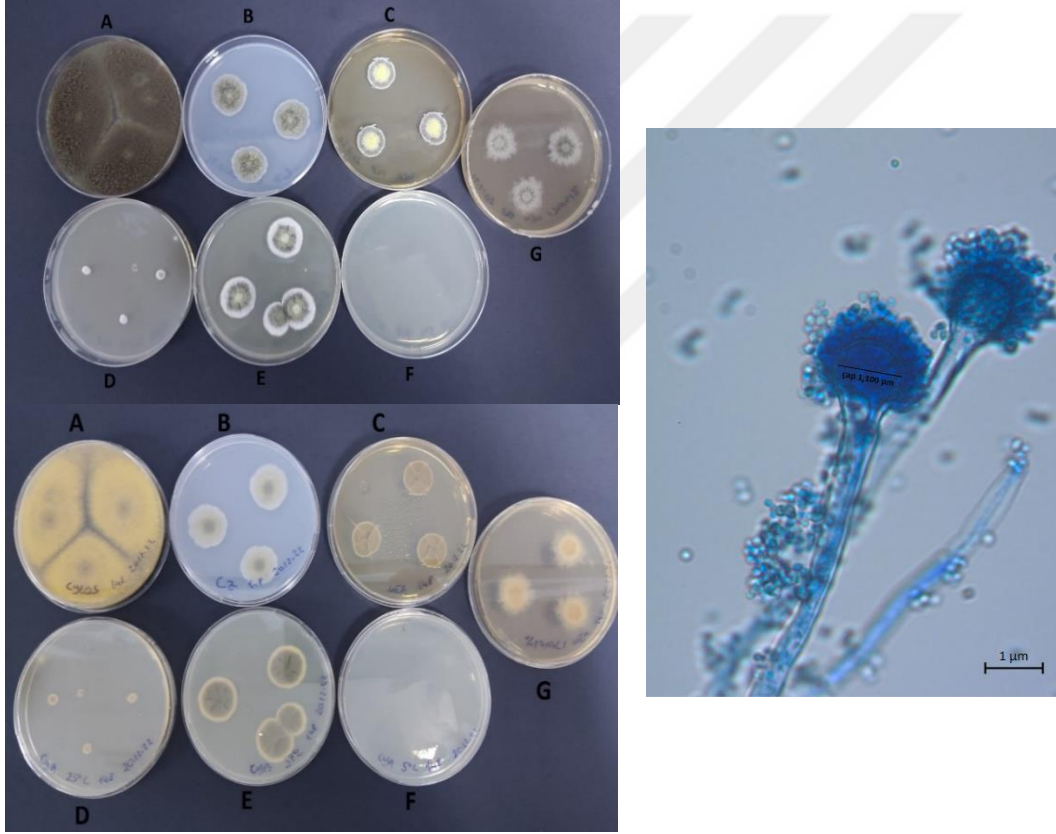
şekil 4.7. *Aspergillus sp. 1* izolatının 7 günlük n ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) CY20S, (B) CZ, (C) MEA, (D) CYA 25°C, (E) CYA 37°C, (F) CYA 5°C, (G) %17 NaCl MEA

Aspergillus sp. 2

Koloni zellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 15-20 mm, kadifemsi dokuya sahip, koloni rengi ortası sarıdan kenarlara doğru yeşilimsi griye değişen yapıdadır.

CYA 37°C besiyerinde koloni çapı 15-20 mm, ortası açık sarıdan kenarlara doğru yeşilimsi gri, kenarlar beyaz, kadifemsi ve buruşuktur. CZ besiyerinde koloni çapı 20-25 mm, rengi yeşilimsi, dokusu yünlüdür. CY20S besiyerinde koloni çapı 65-70 mm, tamamı yeşilimsi kahverengi, koloni dokusu tozumsu, yünlü arasındadır. Bu besiyerinde aerial hifler görülmektedir. % 17 NaCl MEA besiyerinde koloni çapı 20 mm, koloni rengi yeşilimsi gri, dokusu tozlu, yünlü arası olup aerial hifler gözlenmiştir. CYA 25°C besiyerinde mikro koloniler görülmüştür. CYA 5°C besiyerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiofor düz ve 5,10 µm, vezikül 1,10 µm, düz stipe, konidial başlar biseriate ve radiate özelliktedir.



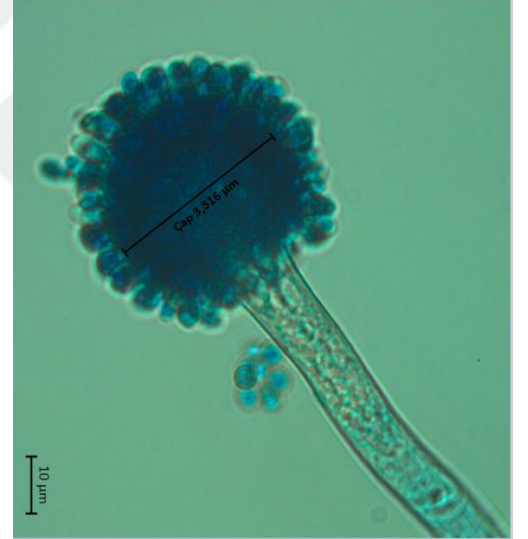
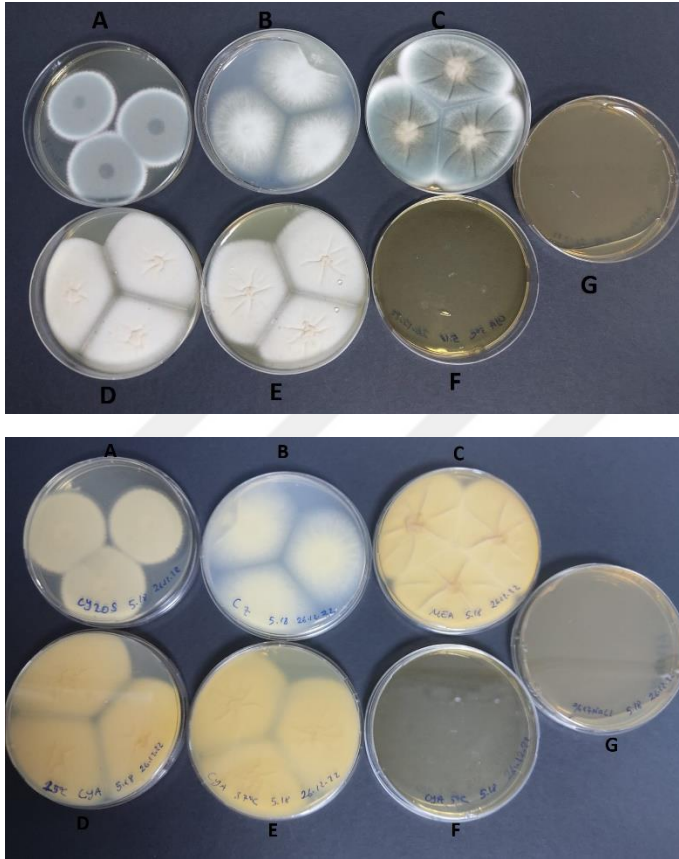
Şekil 4.8. *Aspergillus sp. 2* izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) CY20S, (B) CZ, (C) MEA, (D) CYA 25°C, (E) CYA 37°C, (F) CYA 5°C, (G) %17 NaCl MEA

Aspergillus sp. 3

Koloni özellikleri: MEA besiyerinde koloni çapı 65-70 mm, ortası yeşilimsi gri, kenarlar beyaz, dokusu kadifemsi ve ışınal yarıklıdır.

CYA 25°C ve CYA 37°C besiyerlerinde aynı koloni özellikleri görülmüştür. Koloni çapları 55-60 mm, tamamı krem renkli, kadifemsi ve düzdür. CZ besiyerinde koloni çapı 55-60 mm, dokusu yünlü ve ışınsal, koloni rengi ise krem-siyah arasındadır. CY20S besiyerinde koloni çapı 45-50 mm, dokusu tozumsu ve düz, mavimsi gri renklidir. CYA 5°C ve %17 NaCl MEA besiyerlerinde üreme olmamıştır.

Mikroskopik özellikleri: Konidiofor 4,65 µm, fialid 0,5 µm, vezikül 3,51 µm, monoseriate, konidyumlar küreseldir. Stipe pürüzlüdür.



Şekil 4.9. *Aspergillus* sp. 3 izolatının 7 günlük ön ve arka koloni görüntüsü ile mikroskopta konidiofor görüntüsü (A) CY20S, (B) CZ, (C) MEA, (D) CYA 25°C, (E) CYA 37°C, (F) CYA 5°C, (G) %17 NaCl MEA

4.2. 16S rRNA Dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi

9 fungus izolatından yüksek antioksidan, sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olan örnek moleküler identifikasyon için Microbiota Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Anonim

Şirketi'nde gönderilerek, DNA izolasyonu, sekans analizi için hizmet alımı yapılmıştır. Tür tayin analiz raporuna göre; DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen DNA'lar Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometrik ölçümleri yapılarak saflık ve miktar analizleri yapılmıştır. PCR kullanılarak 8 F ve 1387 R primerleri (Universal primerler) ile tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Sanger dizileme ile elde edilen okumalar bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlem için BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) ile eşleştirilerek en yakın tür belirlenmiştir. Sonuçlara göre fungus izolatı %99,01 benzerlik oranı ile *Talaromyces flavus* olarak belirlenmiştir.

Talaromyces flavus

Benzerlik Oranı: %99,01

TTCTCTGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAACTCCTACNTGATCCGA
GGTCAACCGTGGTAAAATATGGTGGTGACCAACCCCGCAGGTCCTTCCCGAG
CGAGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACCAGACGGACGTCGCCGCTGCCTT
TCGGGCAGGTCCCCGGGGGGGACCACACCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGG
CAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCAATG
TGCGTTCAAAGATTGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTT
TTGACAATTTTCATCGTACTCAGACAGCCCATCTTCATCAGGGTTCACAGAGCG
CTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGACGTGCGTCCCCCGGCGACCAGGTGGCCCC
GGTGGGCCCCGCCAAAGCAACAGGTGTAGAGAGACAAGGGTGGGAGGTTGGGC
CGCGAGGGCCCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACC
TTGTTACA ACTTTTACTTCC

4.3. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tarama testi

Fungus izolatlarının serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek için DPPH yöntemi uygulanmıştır. Sıvı antioksidan besiyerinde 30 gün inkübe edilen fungus izolatları misellerinden ayırmak üzere filtre kağıdından filtre edilmiştir. Taze hazırlanan DPPH çözeltisinden 2.9 mL, fungus izolatlarından elde edilen kültür sıvılarından 100 µL eklenerek 30 saniye vortekslenmiştir. Bu işlem referans madde olan BHT (butilhidroksitoluen) içinde uygulanmıştır. 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 517 nm

dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Serbest radikal süpürücü etkisi, % inhibisyon formülü ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1.'de fungus izolatlarının DPPH ile serbest radikal süpürücü etkisi antioksidan % aktivite olarak verilmiştir. Standart suş olarak *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium chrysogenum* ve referans madde olarak BHT (Butilhidrositoluen) kullanılmıştır. BHT'nin antioksidan yüzdesi % 41 olarak belirlenmiştir. *Penicillium sp 1*, *Penicillium sp 4*, *Talaromyces flavus*, *Aspergillus sp 2* ve *Aspergillus sp 3* % 41'in üzerinde serbest radikal süpürücü etki göstermiştir. Standart suşlardan *A.parasiticus* %40, *P.chrysogenum* ise %46 aktivite göstermiştir. Fungus izolatlarından elde edilen fermentasyon sıvılarından en yüksek % antioksidan değerlerine sahip olan izolatların sırasıyla *Penicillium sp. 4* %93, *Penicillium sp. 2*, %89 ve *Talaromyces flavus* % 75 antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarlarına karşı koruyucu bileşik gruplarıdır. Gıda endüstrisinde kullanılan sentetik antioksidanların bozulmaları durumunda bazı toksik ve kanserojenik bileşikler oluşabilmesi nedeniyle bu maddelerin kullanımı sınırlandırılmıştır (Arora, 2010). Doğal antioksidanlar serbest radikallere etki ederken yan etkiler göstermemektedir (Gebreyohannes, 2019).

Mikrofunguslardan elde edilen metabolitler incelenerek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Dominguete, 2018). Funguslar fitokimyasallar ve fenolik bileşikler gibi antioksidan özellikleri olan biyoaktif bileşiklerce zengin organizmalardır (PUIA, 2018). *Penicillium herquei*'den izole edilen antrovenetin isimli sarı bir pigment antioksidan aktiviteye sahip olup gıda katkı maddeleriyle birlikte kullanılabilir (Tavares, 2018). Bir tez çalışmasında DPPH yöntemi ile antioksidan tarama testi uygulanan 124 fungus izolatından 8 tanesi % 80'nin üzerinde antioksidan aktivite göstermiştir. Bu izolatların tür tayini sonuçlarına göre dördü *Aspergillus terreus*, ikisi *Penicillium flavigenum* ve diğer iki tanesi de *Penicillium polonicum* olduğu belirlenmiştir (Cantürk, 2013).

Çizelge 4.1. *Fungus* izolatlarının antioksidan aktivitesi % değerleri

Fungus izolatları	Antioksidan aktivite (%)
<i>Penicillium</i> sp. 1	89
<i>Penicillium</i> sp. 2	25
<i>Penicillium</i> sp. 3	24
<i>Penicillium</i> sp. 4	93
<i>Penicillium</i> sp. 5	18
<i>Talaromyces flavus</i>	75
<i>Aspergillus</i> sp. 1	38
<i>Aspergillus</i> sp. 2	46
<i>Aspergillus</i> sp. 3	44
<i>P.chrysogenum</i> NRRL 792	46
<i>A.parasiticus</i> NRRL 465	40
BHT	41



Şekil 4.10. *Fungus* izolatlarının antioksidan sıvı besiyerinde 30 günlük inkübasyon sonrası görüntüsü



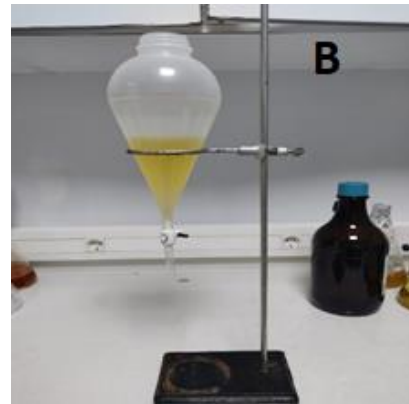
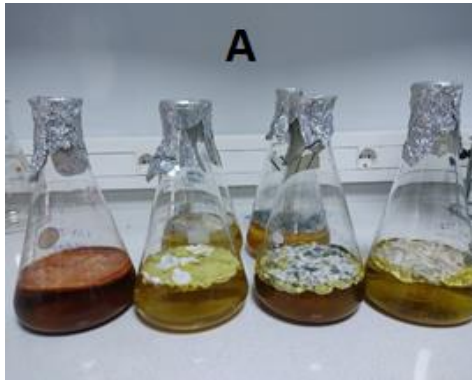
Şekil 4.11. *Fungus* izolatlarının DPPH çözeltisi ile inkübasyonu sonrası spektrofotometre küvetindeki görünümü

4.4. Fungus izolatlarının ekstraksiyonu

Fungus izolatlarının ekstraksiyonu için antioksidan sıvı besiyerinde 30 gün durgun halde inkübe edilen örnekler 30 günün sonunda fermentasyon sıvıları misellerinden ayrılması için Whatmann No:1 kağıdından filtre edilmiştir. Süzülen fermentasyon sıvıları etil asetat ile 1:1 oranda ekstrakte edilmiştir. Organik faz rotavaporda uçurulmuştur. Rotavaporda uçurulan faz, cam kahverengi şişeye toplanmıştır. Her fungus izolatının özütü tartıldıktan sonra +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 4.2. Fungal özütler ve tartım sonuçları

Fungal Özütler	Tartım Sonuçları
<i>Penicillium sp. 1</i>	62 mg
<i>Penicillium sp. 2</i>	28 mg
<i>Penicillium sp. 3</i>	10 mg
<i>Penicillium sp. 4</i>	39 mg
<i>Penicillium sp. 5</i>	20 mg
<i>Talaromyces flavus</i>	23 mg
<i>Aspergillus sp. 1</i>	22 mg
<i>Aspergillus sp. 2</i>	16 mg
<i>Aspergillus sp. 3</i>	20 mg





Şekil 4. 12 (A) Antioksidan sıvı besiyerinde 30 gün bekletilen fungus izolatları (B) Fermentasyon sıvısının 1:1 oranda etil asetat ile ekstraksiyonu (C) Rotavaporda organik fazın uçurulması

4.5. Mikrobrot Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

9 fungus izolatının özütlerinin antimikrobiyal aktivite testi mikrobrot dilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Test için standart bakteriler olarak *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 15245, maya için *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030 kullanılmıştır. Her fungal özüt için kullanılan konsantrasyonlar 1600, 800, 400, 200, 100 µg/mL'dir.

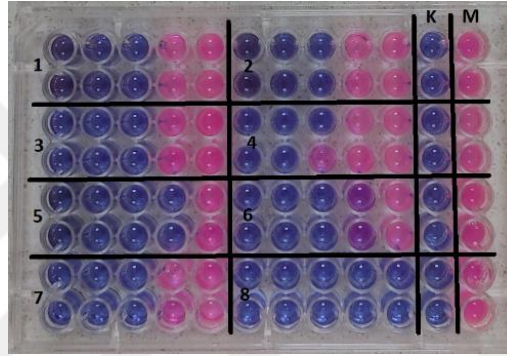
Fungus özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre *Aspergillus* sp. 1 özütleri *S.aureus*, *K. pneumoniae* ve *E.faecalis* bakteri suşlarında duyarlı olduğu bulunmuştur. *K.pneumoniae* tüm fungus izolatlarının özütlerinde duyarlı olarak belirlenmiştir. *Penicillium* sp. 3 bütün bakteri suşlarında aynı etki göstermiştir.

Mayalardan *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei* *Aspergillus* sp. 1 özütlerine en duyarlı suşlar olarak bulunmuştur. *Penicillium* sp. 2 ve *Penicillium* sp. 5 izolatlarının antikandidal etkisi gözlenmemiştir. Sonuçlara göre fungus özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi bakteri suşlarında mayalardan daha etkili çıkmıştır. Tüm özütlerin MİK değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

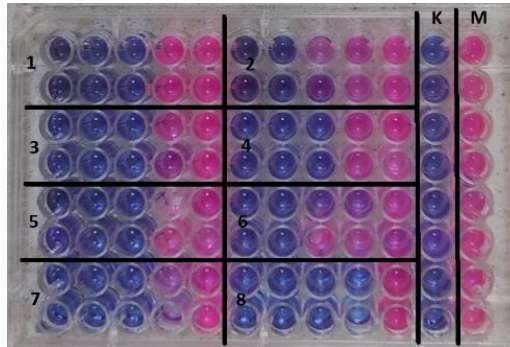
Mikrofunguslar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin antimikrobiyal aktivitesi eskilerden beri bilinmektedir. Buna en iyi örnek, *Penicillium chrysogenum* tarafından üretilen penisilinin keşfidir. Birçok farklı biyolojik aktiviteleri ve çeşitlilikleri ile

araştırmacıların ilgisini çeken *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi funguslar antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli bileşiklerin başlıca kaynaklarından biridir.

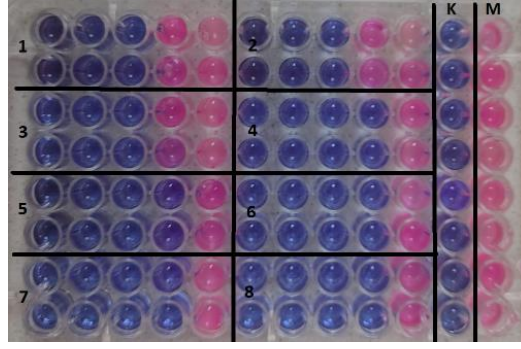
Bir çalışmada *Aspergillus versicolor* tarafından üretilen terpenoidler, poliketidler ve alkaloidler gibi sekonder metabolitler üreten iki yeni antimikrobiyal bisabolan seskiterpenoid türevi izole edilmiştir (Li, 2019). Bir tez çalışmasında *Aspergillus niger* LC3 izolatından izole edilen polipeptidler, *S.aureus* üzerinde önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Üstün, 2019). Başka bir çalışmaya göre *Penicillium canescens* tarafından izole edilen griseofulvin bileşiği *C.albicans*' a karşı önemli inhibitör aktivite göstermiştir (Wang J. P., 2023).



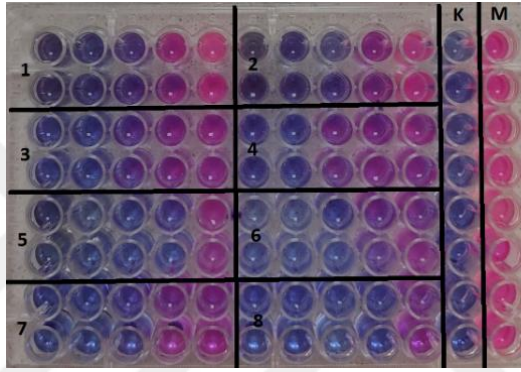
Şekil 4.13. Fungal özütlerin *E.faecalis*'te antimikrobiyal aktivite testi. Numaralar fungal özütleri göstermektedir. (1) *T.flavus* (2) *Penicillium* sp. 1 (3) *Penicillium* sp.2 (4) *Penicillium* sp. 5 (5) *Aspergillus* sp. 1 (6) *Aspergillus* sp. 3 (7) *Penicillium* sp. 4 (8) Kloramfenikol (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



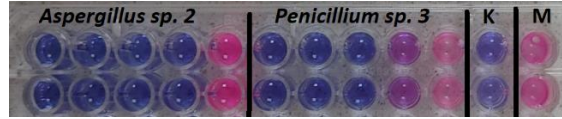
Şekil 4.14. Fungal özütlerin *B.subtilis*'te antimikrobiyal aktivite testi. Numaralar fungal özütleri göstermektedir. (1) *T.flavus* (2) *Penicillium* sp. 1 (3) *Penicillium* sp.2 (4) *Penicillium* sp. 5 (5) *Aspergillus* sp. 1 (6) *Aspergillus* sp. 3 (7) *Penicillium* sp. 4 (8) Kloramfenikol (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.15. Fungal özütlerin *K.pneumoniae* antimikrobiyal aktivite testi. Numaralar fungal özütleri göstermektedir. (1) *T.flavus* (2) *Penicillium sp. 1* (3) *Penicillium sp.2* (4) *Penicillium sp. 5* (5) *Aspergillus sp. 1* (6) *Aspergillus sp. 3* (7) *Penicillium sp. 4* (8) Kloramfenikol (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.16. Fungal özütlerin *S.aureus*'un antimikrobiyal aktivite testi. Numaralar fungal özütleri göstermektedir. (1) *T.flavus* (2) *Penicillium sp. 1* (3) *Penicillium sp.2* (4) *Penicillium sp. 5* (5) *Aspergillus sp. 1* (6) *Aspergillus sp. 3* (7) *Penicillium sp. 4* (8) Kloramfenikol (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.17. Fungal özütlerin *B.subtilis*'in antimikrobiyal aktivite testi (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.18. Fungal özütlerin *K.pneumoniae*'in antimikrobiyal aktivite testi (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.19. Fungal özütlerin *S.aureus* 'un antimikrobiyal aktivite testi gösterilmiştir. (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol



Şekil 4.20. Fungal özütlerin *E.faecalis* 'in antimikrobiyal aktivite testi (K) Besiyeri kontrol (M) Mikroorganizma kontrol

Çizelge 4.3. Bakterilerde antimikrobiyal aktivite mikrobrot dilüsyon yöntemi MİK değerleri (µg/mL)

Fungus izolatları	Bakteri Test Mikroorganizmaları (MİK değerleri (µg/mL))					
	<i>E.coli</i> ATCC 35218	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>B.subtilis</i> ATCC 15245
<i>Penicillium sp 1</i>	1600	400	400	1600	400	800
<i>Penicillium sp 2</i>	800	400	400	1600	400	400
<i>Penicillium sp 3</i>	400	400	400	400	400	400
<i>Penicillium sp 4</i>	Dirençli	400	200	Dirençli	400	400
<i>Penicillium sp 5</i>	1600	800	200	1600	800	400
<i>Talaromyces flavus</i>	Dirençli	400	400	Dirençli	400	400
<i>Aspergillus sp 1</i>	Dirençli	200	200	Dirençli	200	400
<i>Aspergillus sp 2</i>	1600	400	200	1600	400	200
<i>Aspergillus sp 3</i>	1600	400	200	1600	400	800
Kloramfenikol	50	25	25	50	12,5	25

Çizelge 4.4. Mayalarda antimikrobiyal aktivite mikrobrot dilüsyon yöntemi MİK değerleri (µg/mL)

	Maya Test Mikroorganizmaları (MİK değerleri (µg/mL))			
Fungus izolatları	<i>C.albicans</i> ATCC 90028	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	<i>C.glabrata</i> ATCC 90030
<i>Penicillium</i> sp 1	1600	800	800	1600
<i>Penicillium</i> sp 2	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
<i>Penicillium</i> sp 3	Dirençli	1600	Dirençli	200
<i>Penicillium</i> sp 4	200	1600	Dirençli	400
<i>Penicillium</i> sp 5	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
<i>Talaromyces flavus</i>	800	800	400	800
<i>Aspergillus</i> sp 1	200	200	200	Dirençli
<i>Aspergillus</i> sp 2	Dirençli	1600	1600	800
<i>Aspergillus</i> sp 3	200	400	200	1600
Ketokonazol	25	25	12,5	50

4.6. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Yöntem için hücreler 96 kuyucuklu plakalara 100 µL RPMI besiyeri içerisinde her kuyucuğa 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. İnkübasyon sonunda fungal özütler hücrelere uygulanmıştır. İlk olarak plakalardaki besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere 100 µL besiyeri içerisinde 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/mL konsantrasyonlarda fungal özütler ve ekstraksiyon sonrasında kalan sulu fazın liyofilize edilmesiyle elde edilmiş örnekler uygulanmıştır. Pozitif kontrol için doksorubisin 50, 15, 10 ve 5 µM/mL konsantrasyonlarda

hücrelere uygulanmıştır. Negatif kontrol için %0,2 DMSO içeren RPMI besiyeri konulmuştur.

Bütün konsantrasyonlar uygulandıktan sonra hücreler 24 saat inkübasyon için % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Süre sonunda hücrelere 10 µL MTT boyası verildikten sonra 4 saat inkübe edilmiştir. 96 kuyucuklu plakalar ters çevrilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan tuzlarının çözünmesi için 100 µL DMSO kuyucuklara eklenmiş ve 10-15 dakika bekletildikten sonra ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Okunan absorbans değerleri canlı hücre miktarını vermiştir.

Analiz sonuçları Microsoft Office Excel programında, absorbans değerleri yüzde değerlere çevrilerek hesaplanmıştır. Hesaplama kontrol grubunun ortalaması 100 olarak kabul edilmiş ve tüm konsantrasyonlar bu değere göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 9.0 programı ile istatistiksel analizleri yapılarak ve sitotoksik aktiviteyi gösteren grafikler bu program üzerinden yapılmıştır. Çizelge 4.5’ de fungus özütlerinin A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi IC₅₀ değerleri olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.5’ deki sonuçlara göre A549 hücre hattı üzerinde en düşük IC₅₀ değerine sahip fungus izolatı özütü *Penicillium* sp. 2 olmuştur. *Talaromyces flavus*, *Penicillium* sp. 2 izolatından sonra en düşük IC₅₀ değerine sahip izolat çıkmıştır. Liyofilize örneklerin A549 hücre hattında sitotoksik aktivitesi düşük olmuştur. Fungal özüt ve liyofilize örnekler sağlıklı bir hücre olan BJ hücre hattında da sitotoksik etki açısından değerlendirilmiştir. En düşük IC₅₀ değeri 289 µg/mL ile *Penicillium* sp. 2 izolatına ait özütde çıkmıştır. *Talaromyces flavus*’a ait özütler ise 344 µg/mL IC₅₀ değerine sahip çıkmıştır. Liyofilize örneklerinde ise en düşük IC₅₀ değeri 681 µg/mL ile *Talaromyces flavus*’a ait liyofilize örnekler olarak belirlenmiştir.

BJ hücre hattında ise fungal özütlerden en düşük IC₅₀ değeri 84 µg/mL ile *Penicillium* sp. 5 izolatına ait özüt olmuştur. *Penicillium* sp. 5 izolatına ait liyofilize örnekleri de 343 µg/mL IC₅₀ değeri ile en düşük çıkmıştır.

Talaromyces flavus izolatından elde edilen özüt ve liyofilize örnek kanser hücre hattı olan A549 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücre hattı olan BJ hücrelerinde düşük sitotoksik etki göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada T47D tümör hücre hattına karşı yapılan sitotoksik test sonucunda en düşük IC₅₀ değeri 111µg/mL ile *Penicillium* sp fungusunda bulunmuştur. *Aspergillus flavus* suşu, *Penicillium* sp ve deniz süngerinden izole edilen *Aspergillus fumigatus* farklı konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite göstermiştir. Tüm fungus özütleri sağlıklı hücrelere karşı toksik çıkmamıştır (Setyowati, 2021).

Başka bir çalışmaya göre *Tarenna asiatica* bitkisinden izole edilen endofitik *Aspergillus oryzae*'nin antikanser bir ilaç olan taksolü sentezleme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, bu fungus tarafından üretilen taksolün insan büyük hücreli akciğer kanseri olan NCI-H460 hücre hattına karşı aktivitesini değerlendirmiştir. Sonuçlara göre; *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen taksolün kanser hücrelerine karşı önemli bir aktivite sergilediği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalar, funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin antikanser aktivite açısından kanser tedavisinde önemli potansiyel kaynaklar olduğunu göstermektedir. (Suresh, 2020).

Çizelge 4.5. Fungal özüt ve liyofilize örneklerinin A459 hücre hattı için IC₅₀ değerleri

Fungus izolatları	IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)	
	Özütler	Liyofilize örnekler
<i>Penicillium</i> sp. 1	>500	>1000
<i>Penicillium</i> sp. 2	289	>1000
<i>Penicillium</i> sp. 3	>500	>1000
<i>Penicillium</i> sp. 4	>500	>1000
<i>Penicillium</i> sp. 5	>500	>1000
<i>Talaromyces flavus</i>	344	681
<i>Aspergillus</i> sp. 1	>500	>1000
<i>Aspergillus</i> sp. 2	>500	792
<i>Aspergillus</i> sp. 3	>500	>1000
Doksorubisin	91,18 µM/mL	91,18 µM/mL

Çizelge 4. 6. Fungal özütt ve liyofilize örneklerin BJ hücre hattı için IC₅₀ değerleri

	IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)	
Fungus izolatları	Özütler	Liyofilize örnekler
<i>Penicillium</i> sp. 1	>500	>1000
<i>Penicillium</i> sp. 2	434	727
<i>Penicillium</i> sp. 3	494	576
<i>Penicillium</i> sp. 4	>500	768
<i>Penicillium</i> sp. 5	84	343
<i>Talaromyces flavus</i>	>500	859
<i>Aspergillus</i> sp. 1	216	995
<i>Aspergillus</i> sp. 2	456	774
<i>Aspergillus</i> sp. 3	199	684

Çizelge 4.7. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri

Fungus izolatları	Fungal özütlerin konsantrasyonları				
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL
<i>Penicillium sp. 1</i>	45,91	58,95	61,66	64,20	66,13
<i>Penicillium sp. 2</i>	25,64	38,43	41	55,16	70,36
<i>Penicillium sp. 3</i>	46,25	57,92	59,87	64,50	72,18
<i>Penicillium sp. 4</i>	41,85	49	49,96	64,25	68,59
<i>Penicillium sp. 5</i>	41,53	47,49	52,65	68,33	79,53
<i>Talaromyces flavus</i>	32	41,98	49	54,54	65,75
<i>Aspergillus sp. 1</i>	35,42	53,82	61,19	63,78	80,26
<i>Aspergillus sp. 2</i>	43,62	44,48	55,21	66,90	76,71
<i>Aspergillus sp. 3</i>	32,54	43,17	64,97	76,80	81,29

Çizelge 4.8. Fungal liyofilize örneklerin A549 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri

Fungus izolatları	Fungal liyofilize örneklerin konsantrasyonları				
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL
<i>Penicillium sp. 1</i>	51,81	52,73	53,95	55,40	57
<i>Penicillium sp. 2</i>	53,20	57,91	74,49	59,51	65,20
<i>Penicillium sp. 3</i>	65,12	82,89	90,42	92,55	94,69
<i>Penicillium sp. 4</i>	55,69	58,35	64,46	79,62	87,79
<i>Penicillium sp. 5</i>	53,44	56,12	68,35	67,98	69,89
<i>Talaromyces flavus</i>	40,60	51,38	63,63	70,97	84,77
<i>Aspergillus sp. 1</i>	68,29	70,36	73,48	74,95	77,58
<i>Aspergillus sp. 2</i>	47,38	57,65	49,22	61,17	72,93
<i>Aspergillus sp. 3</i>	93,18	95,11	94,43	90,79	96

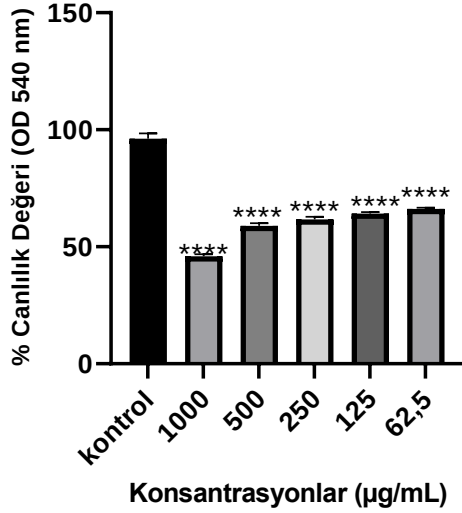
Çizelge 4.9. Fungal özütlerin BJ hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri

Fungal izolatları	Fungal özütlerin konsantrasyonları				
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL
<i>Penicillium sp. 1</i>	44,27	64,46	74,61	88,13	92,10
<i>Penicillium sp. 2</i>	25,66	38	45,53	69,36	84,19
<i>Penicillium sp. 3</i>	31,79	37,96	57,56	64,55	84,38
<i>Penicillium sp. 4</i>	34,16	47,37	57,92	73,47	85,68
<i>Penicillium sp. 5</i>	27,68	32,72	33,23	45,73	46,65
<i>Talaromyces flavus</i>	38	49,29	55,83	73,42	87,88
<i>Aspergillus sp. 1</i>	27,72	34,68	43,47	53,47	62,20
<i>Aspergillus sp. 2</i>	31,50	40,57	53,88	63,25	75,34
<i>Aspergillus sp. 3</i>	16,51	21,49	30,16	55	76,62

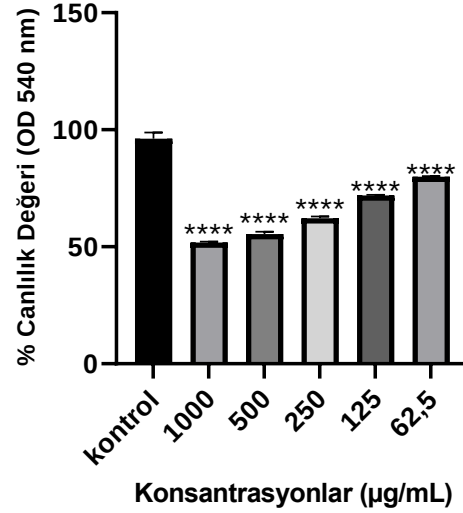
Çizelge 4.10. Fungal liyofilize örneklerin BJ hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri

Fungus izolatları	Fungal liyofilize örneklerin konsantrasyonları				
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL
<i>Penicillium sp. 1</i>	58,82	60,85	71,82	85,94	90,60
<i>Penicillium sp. 2</i>	43,54	52,53	59,09	81,12	88,20
<i>Penicillium sp. 3</i>	34,83	47,71	54,29	69,29	89,43
<i>Penicillium sp. 4</i>	45,42	54,34	61,66	76,29	83,74
<i>Penicillium sp. 5</i>	46,72	48,07	49,13	51	53,69
<i>Talaromyces flavus</i>	44,92	65,05	77,06	85,31	93,16
<i>Aspergillus sp. 1</i>	52,31	56,35	61,62	65,09	75,02
<i>Aspergillus sp. 2</i>	47,08	51,06	62,86	74,13	81,53
<i>Aspergillus sp. 3</i>	40,90	51,07	61,72	73,78	87,93

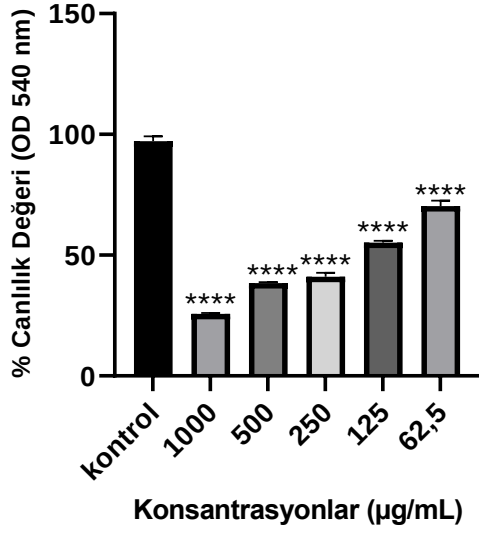
***Penicillium sp. 1* ekstraktı
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



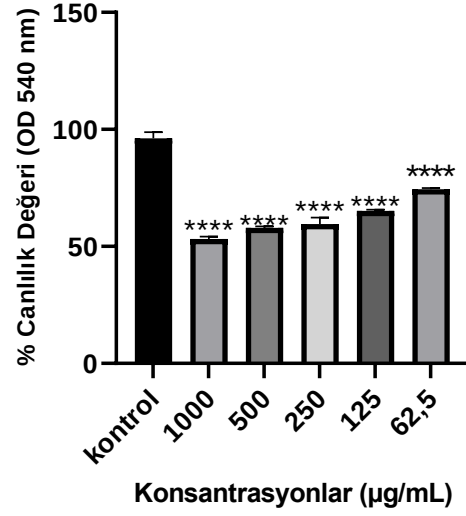
***Penicillium sp. 1* liyofilize
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



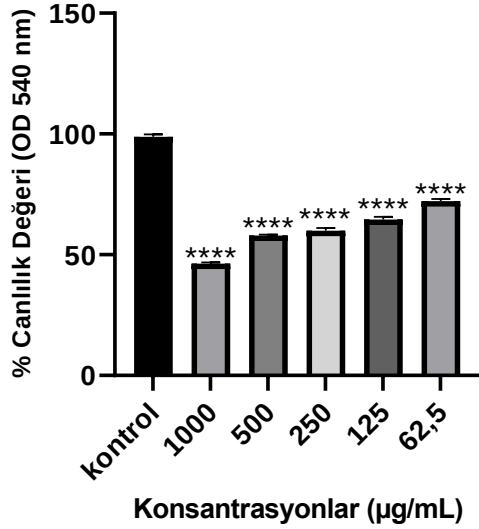
***Penicillium* sp. 2 ekstraktı**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



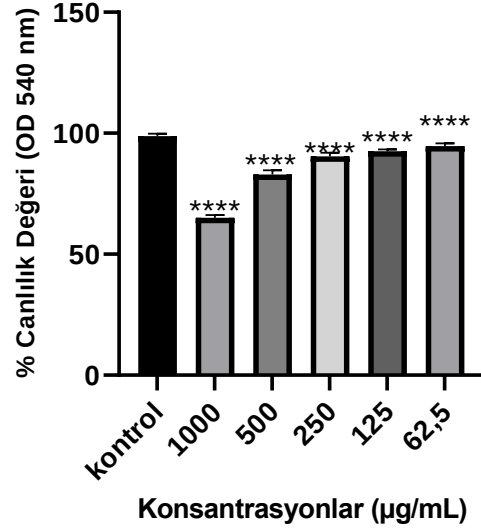
***Penicillium* sp. 2 liyofilize**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



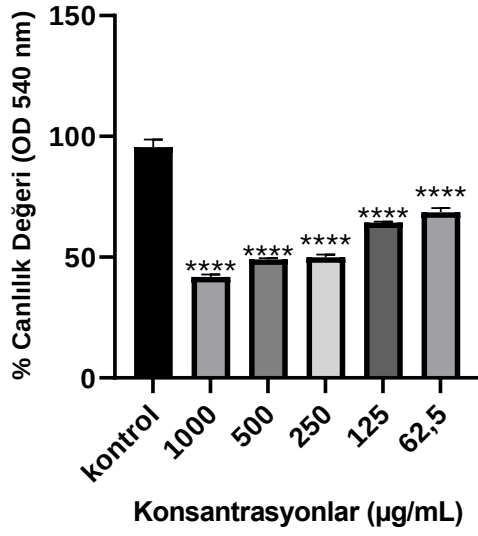
***Penicillium* sp. 3 ekstraktı**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



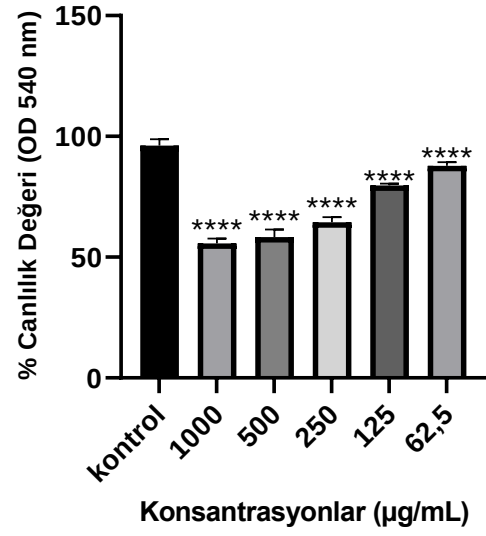
***Penicillium* sp. 3 liyofilize**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



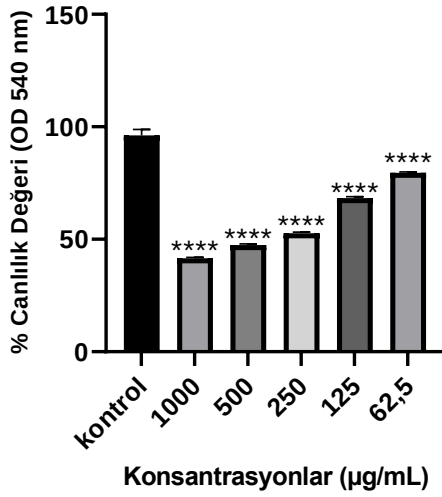
***Penicillium* sp. 4 ekstraktı**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



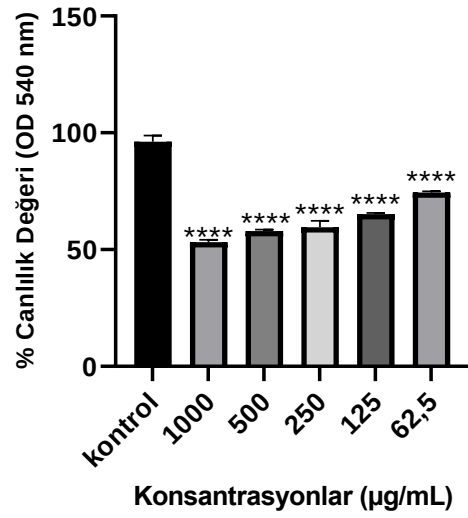
***Penicillium* sp. 4 liyofilize**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



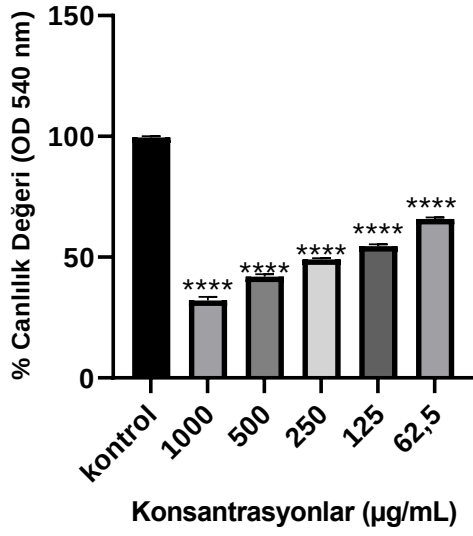
***Penicillium* sp. 5 ekstraktı**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



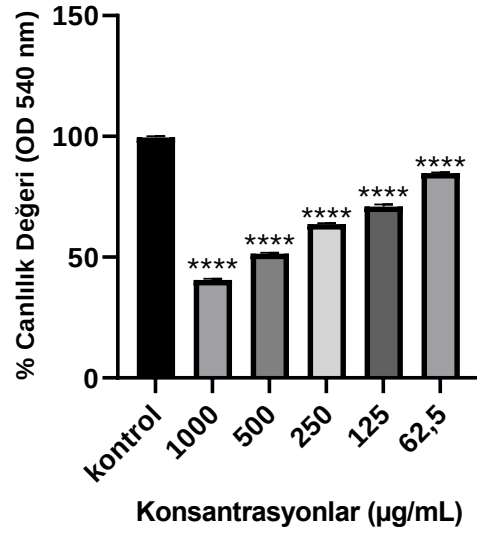
***Penicillium* sp. 5 liyofilize**
A549 hücre hattında sitotoksik etkisi



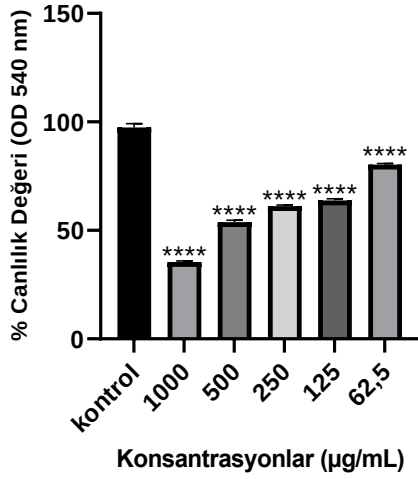
***T.flavus* ekstraktı A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



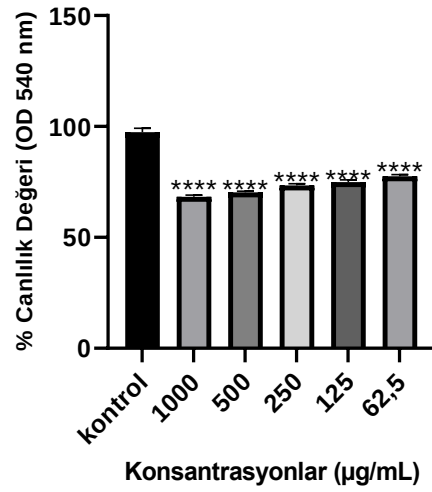
***T.flavus* liyofilize A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



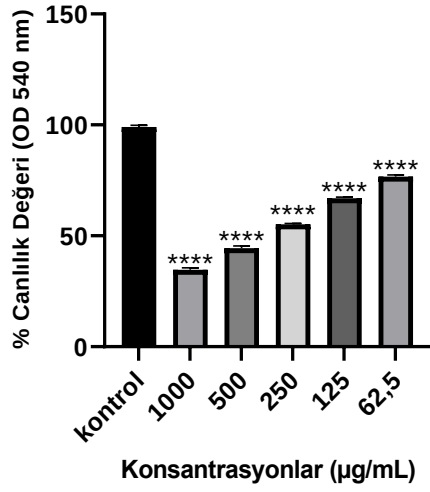
***Aspergillus* sp. 1 ekstraktı A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



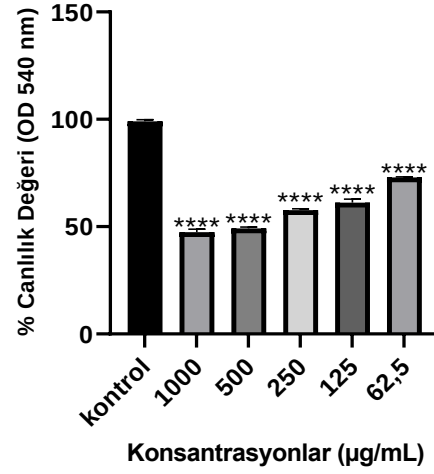
***Aspergillus* sp. 1 liyofilize A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



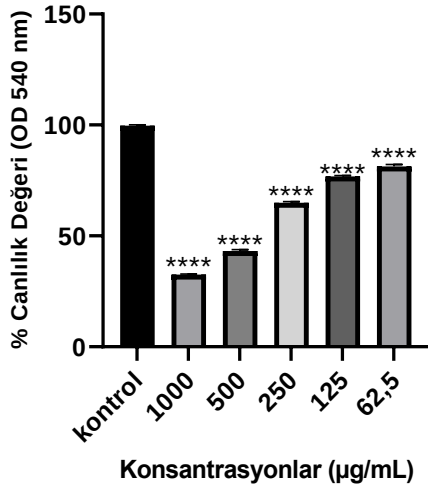
***Aspergillus* sp. 2 ekstraktı A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



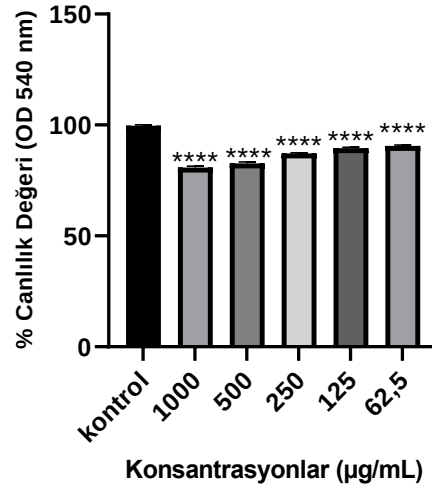
***Aspergillus* sp. 2 liyofilize A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**



***Aspergillus* sp. 3 ekstraktı A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**

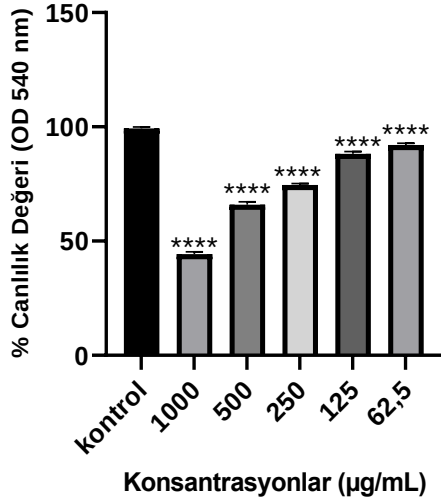


***Aspergillus* sp. 3 liyofilize A549 hücre hattında sitotoksik etkisi**

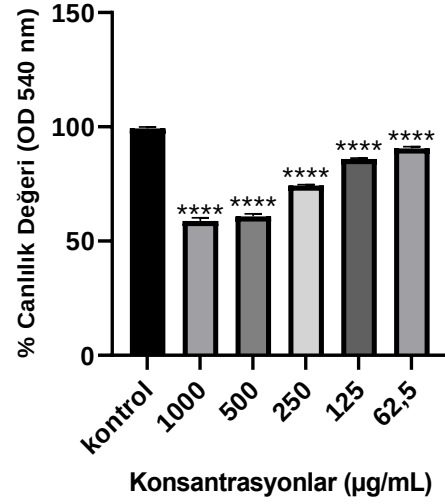


Şekil 4.21. Fungal özüt ve liyofilize A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemine göre değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$ $n=8$)

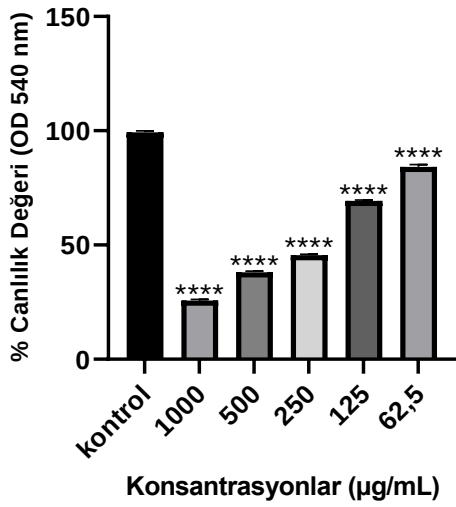
***Penicillium* sp. 1 ekstraktı**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



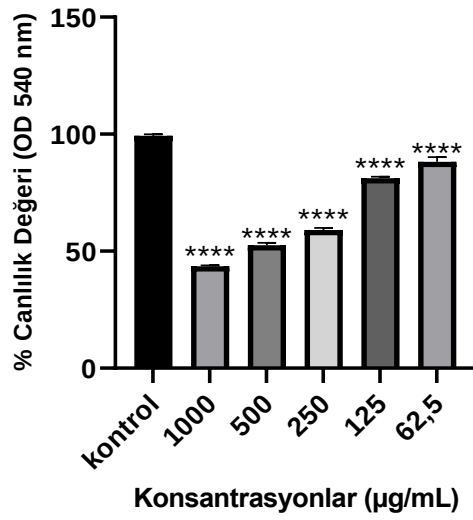
***Penicillium* sp. 1 liyofilize**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



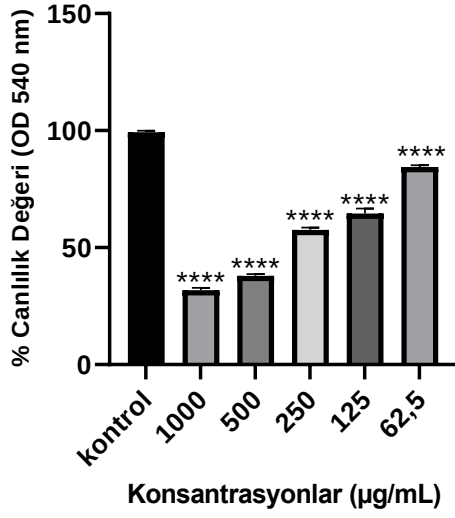
***Penicillium* sp. 2 ekstraktı**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



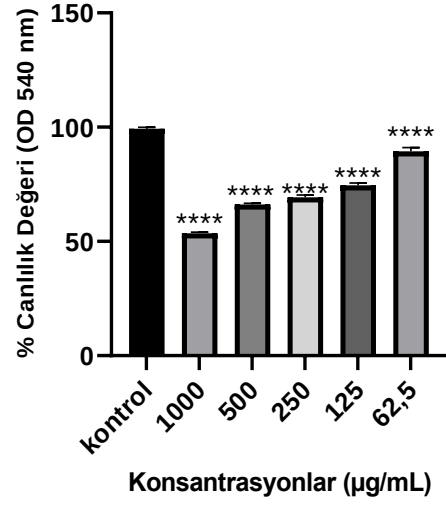
***Penicillium* sp. 2 liyofilize**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



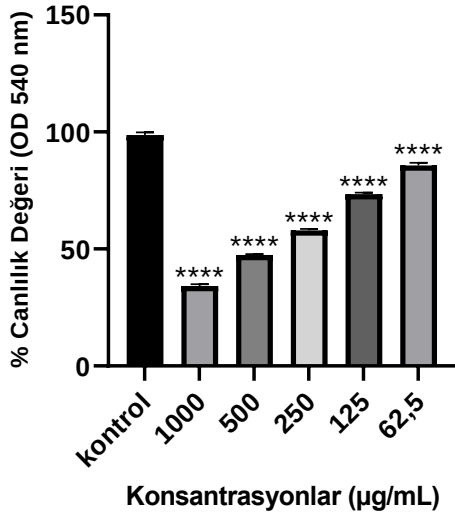
***Penicillium* sp. 3 ekstraktı**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



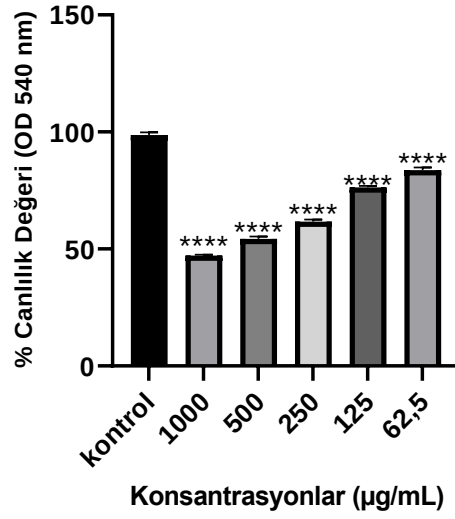
***Penicillium* sp. 3 liyofilize**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



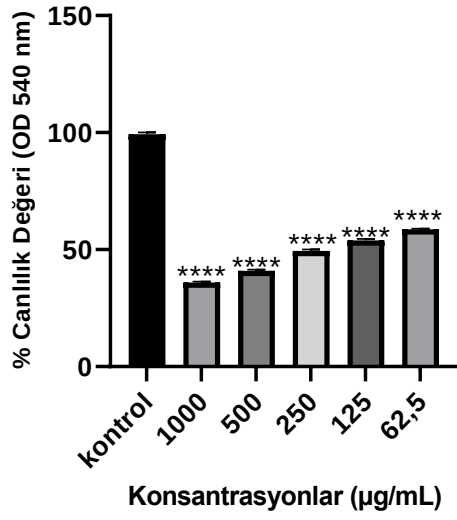
***Penicillium* sp. 4 ekstraktı**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



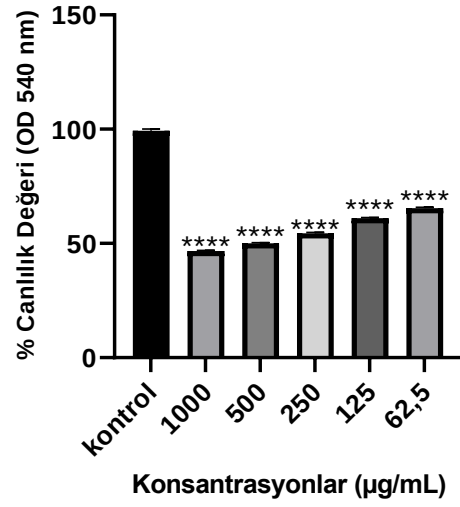
***Penicillium* sp. 4 liyofilize**
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



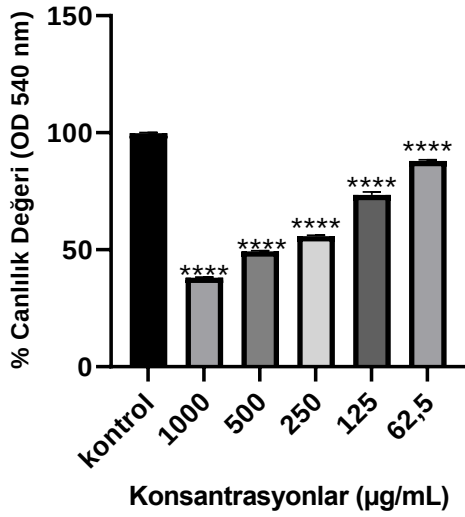
***Penicillium* sp. 5 ekstraktı
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



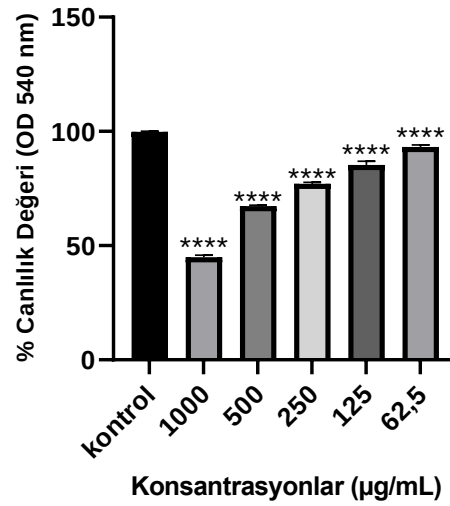
***Penicillium* sp. 5 liyofilize
BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



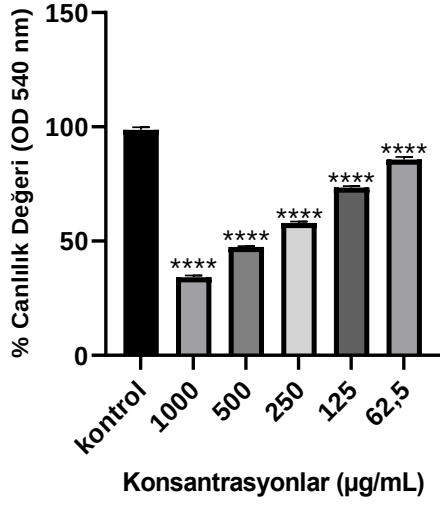
***T.flavus* ekstraktı BJ hücre hattında
sitotoksik etkisi**



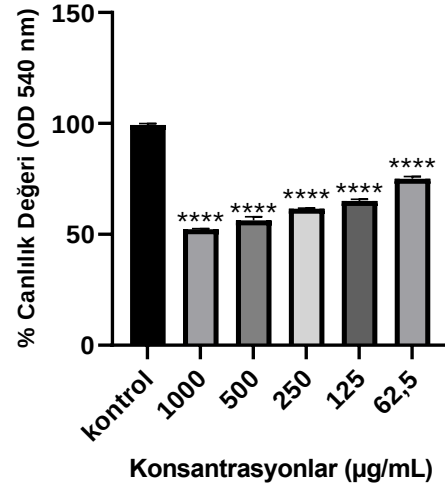
***T.flavus* liyofilize BJ hücre hattında
sitotoksik etkisi**



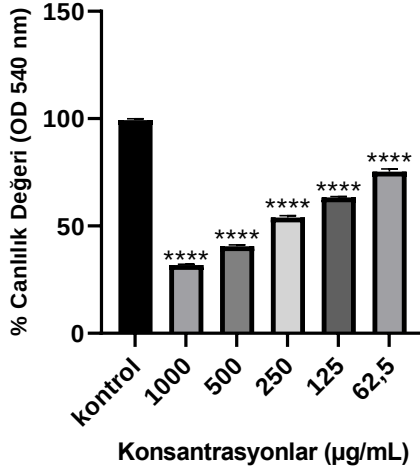
***Aspergillus* sp. 1 ekstraktı BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



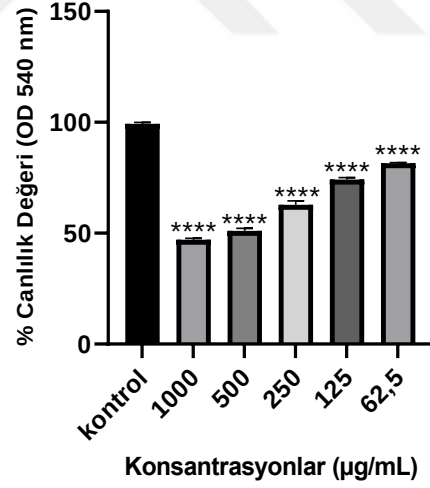
***Aspergillus* sp. 1 liyofilize BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



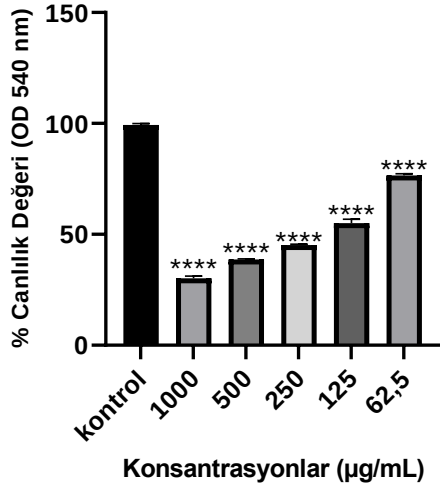
***Aspergillus* sp. 2 ekstraktı BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



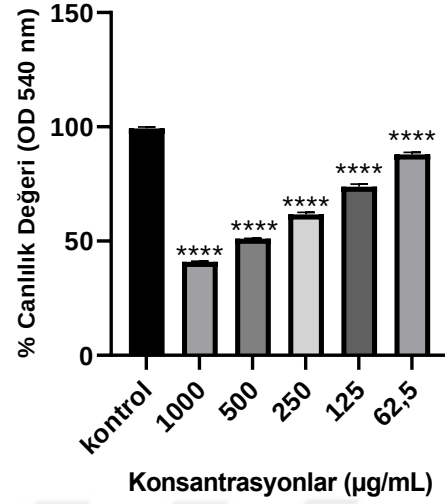
***Aspergillus* sp. 2 liyofilize BJ hücre hattında sitotoksik etkisi**



Aspergillus sp. 3 ekstraktı BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



Aspergillus sp. 3 liyofilize BJ hücre hattında sitotoksik etkisi



Şekil 4.22. Fungal özüt ve liyofilize örneklerin BJ hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemine göre değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$ $n=8$)

4.7. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

Annexin V hücrelerin PS (fosfatidilserin) moleküllerine bağlanabilen bir proteindir. Normalde iç yüzeyde bulunan PS molekülleri hücrenin erken apoptoz sürecinde dış yüzeye geçerler. Annexin V nekrotik hücrelerin yüzeylerine de bağlanabilmektedir. Bu iki hücre ölüm çeşidini ayırmak için PI boyası kullanılmaktadır. PI, DNA veya çift sarmallı RNA moleküllerine bağlanmaktadır. Bu boya ölü veya hasar görmüş hücrelere bağlanırken sağlıklı hücreler bağlanmaz. PI boyası ile geç apoptoz gözlenmektedir.

Tez çalışması için Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü kullanılmıştır. 12 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelere MTT testi sonuçlarına göre belirlenen IC_{50} değerleri üzerinden konsantrasyonlar uygulanarak tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler plakalardan kaldırılarak santrifüj edilmiştir. Pellet 2 kez soğuk PBS ile yıkanarak 100 µL PBS ile hücreler resüspanse edilmiştir. Her ependorfa 5 µL Annexin V, 5 µL PI boyaları koyularak üzerine hücreler eklenerek oda sıcaklığında 20-25 dakika karanlıkta inkübe

edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir ependorfa 1 mL Annexin buffer ve 4 mL PBS içeren solüsyondan 200 µL eklenerek akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) analiz edilmiştir.

Akış sitometride ölçülen sonuçlara göre canlı hücreler FITC-, PE-, erken apoptoz FITC+, PE-, geç apoptoz FITC+, PE+ ve nekroz FITC-, PE+ olarak gözlenmiştir.

Annexin V-PI yöntemi ile fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde apoptotik etkileri akış sitometri cihazından elde edilen sonuçlara göre; kontrol kısmında canlı hücreler % 96.9, nekrotik hücreler %0.1, erken apoptotik hücreler % 2.8 ve geç apoptotik hücreler % 0.2 olarak belirlenmiştir.

Penicillium sp. 1 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 64.8, nekrotik hücreler % 0.2, erken apoptotik hücreler % 27.2 ve geç apoptotik hücreler % 7.9 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 35,3 çıkmıştır.

Penicillium sp. 2 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 77.6, nekrotik hücreler % 0.2, erken apoptotik hücreler % 14.8 ve geç apoptotik hücreler % 7.3 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 22.3 çıkmıştır.

Penicillium sp. 3 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 72.9, nekrotik hücreler % 0.3, erken apoptotik hücreler % 19.8 ve geç apoptotik hücreler % 7.0 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı %27.1 çıkmıştır.

Penicillium sp. 4 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler %67.5, nekrotik hücreler % 0.4, erken apoptotik hücreler % 26.4 ve geç apoptotik hücreler % 5.7 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 32,5 çıkmıştır.

Penicillium sp. 5 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 72.9, nekrotik hücreler % 0.4, erken apoptotik hücreler % 21.2 ve geç apoptotik hücreler % 5.5 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 27.1 çıkmıştır.

Talaromyces flavus izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 52.1, nekrotik hücreler % 0.1, erken apoptotik hücreler % 36.1 ve geç apoptotik hücreler % 11.7 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 47.9 çıkmıştır.

Aspergillus sp. 1 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 46.1, nekrotik hücreler % 0.2, erken apoptotik hücreler % 47.9 ve geç apoptotik hücreler % 5.8 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 53.9 çıkmıştır.

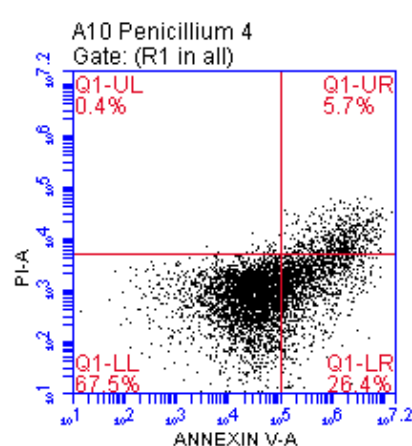
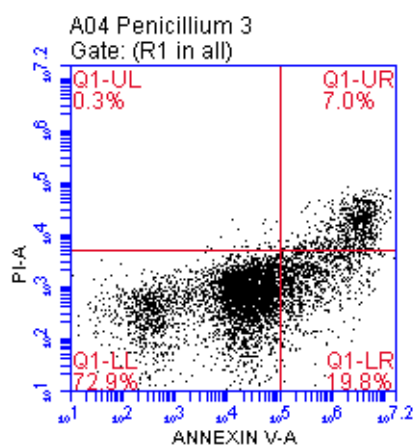
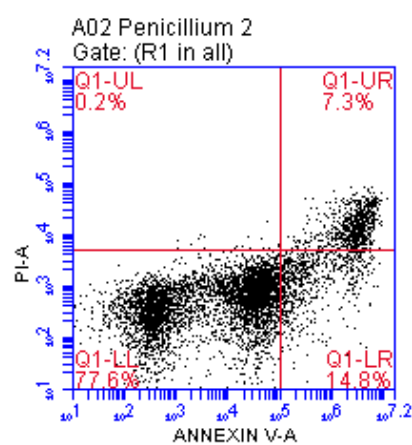
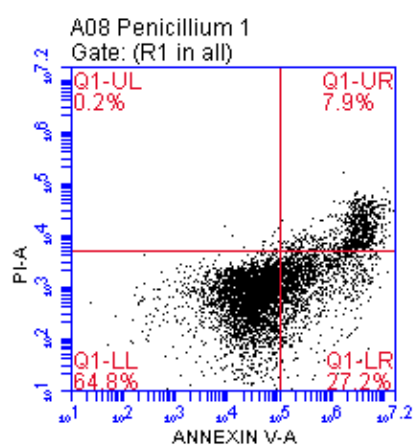
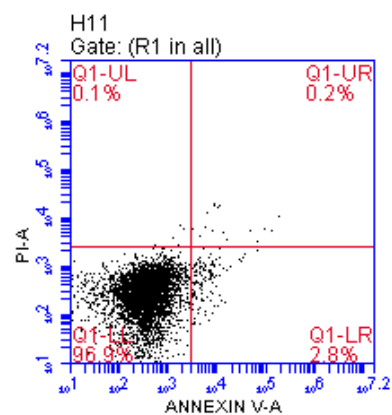
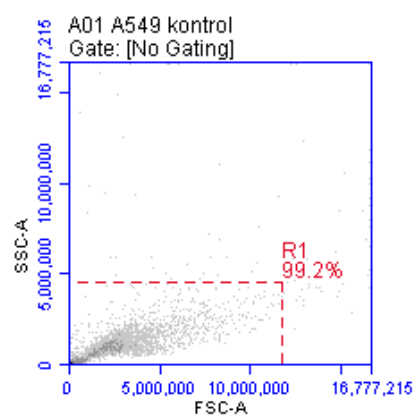
Aspergillus sp. 2 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 73.4, nekrotik hücreler % 0.1, erken apoptotik hücreler % 21.1 ve geç apoptotik hücreler % 5.4 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 26.6 çıkmıştır.

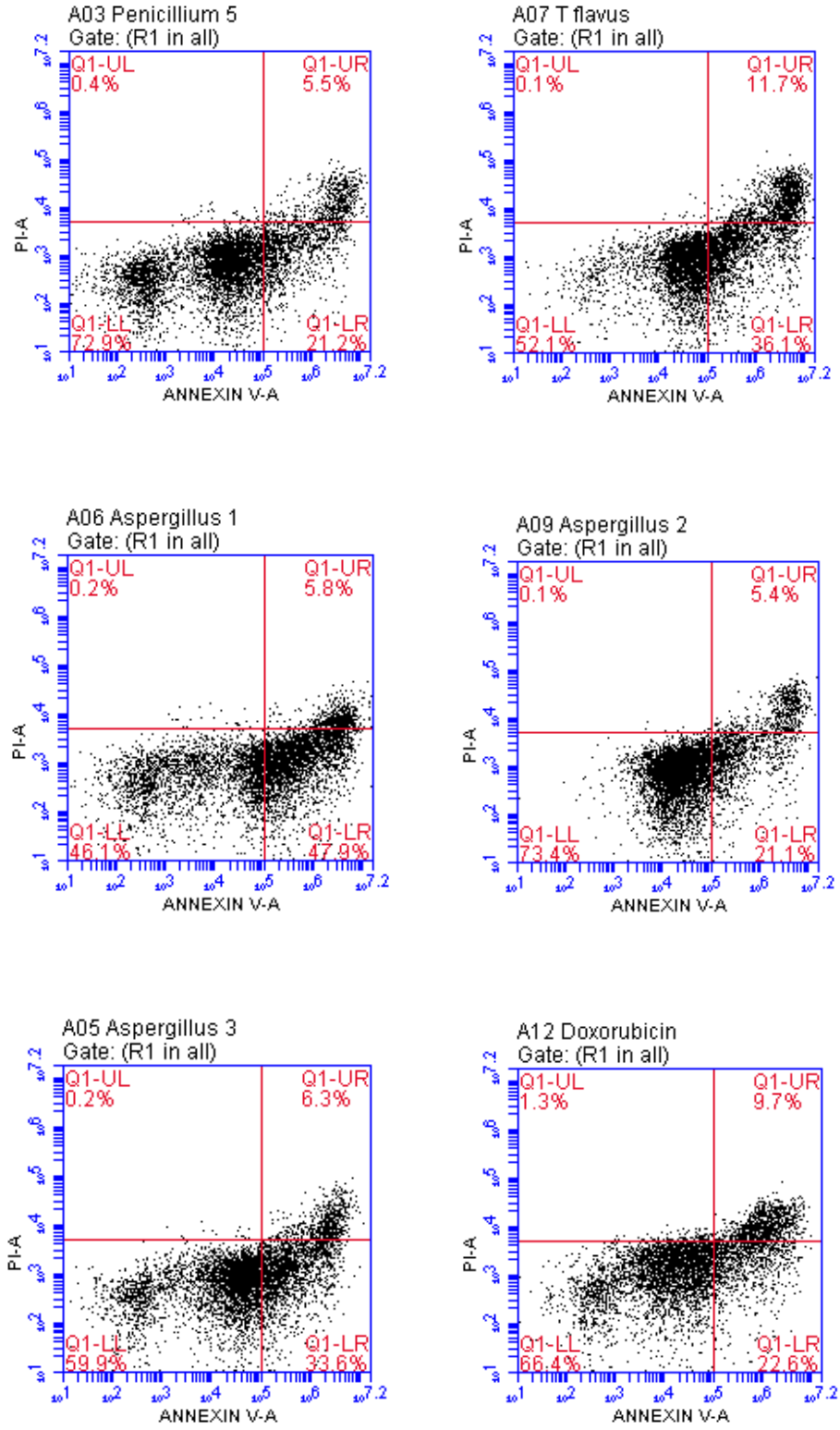
Aspergillus sp. 3 izolatının sonuçlarına göre canlı hücreler % 59.9, nekrotik hücreler % 0.2, erken apoptotik hücreler % 33.6 ve geç apoptotik hücreler % 6.3 olarak belirlenmiştir. Tüm apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranı % 40.1 çıkmıştır.

Toplam apoptotik hücre oranı % 53.9 olan *Aspergillus sp. 1* izolatının özütü A549 hücre hattına en yüksek apoptoz etki gösteren izolat olarak belirlenmiştir. *Talaromyces flavus* % 47.9 ve *Aspergillus sp. 3* %40.1 toplam apoptotik hücre oranları ile *Aspergillus sp. 1* izolatından sonra en yüksek apoptotik hücre oranları gözlenmiştir.

Çizelge 4.11. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde apoptotik etkilerinin belirlenmesi

Fungus izolatları	Canlı %	Nekroz %	Erken apoptoz %	Geç apoptoz %
Kontrol	96,9	0,1	2,8	0,2
<i>Penicillium sp. 1</i>	64,8	0,2	27,2	7,9
<i>Penicillium sp. 2</i>	77,6	0,2	14,8	7,3
<i>Penicillium sp. 3</i>	72,9	0,3	19,8	7,0
<i>Penicillium sp. 4</i>	67,5	0,4	26,4	5,7
<i>Penicillium sp. 5</i>	72,9	0,4	21,2	5,5
<i>Talaromyces flavus</i>	52,1	0,1	36,1	11,7
<i>Aspergillus sp. 1</i>	46,1	0,2	47,9	5,8
<i>Aspergillus sp. 2</i>	73,4	0,1	21,1	5,4
<i>Aspergillus sp. 3</i>	59,9	0,2	33,6	6,3
Doksorubisin	66,4	1,3	22,6	9,7





Şekil 4. 21. Fungal özütlerin Annexin V-PI yöntemi ile A549 hücre hattına karşı apoptotik etkisinin akış sitometride değerlendirilmesi

4.8. Akış sitometride kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

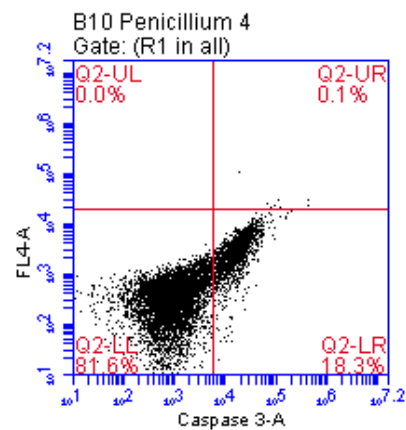
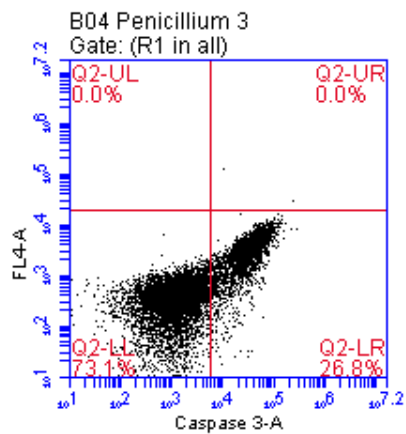
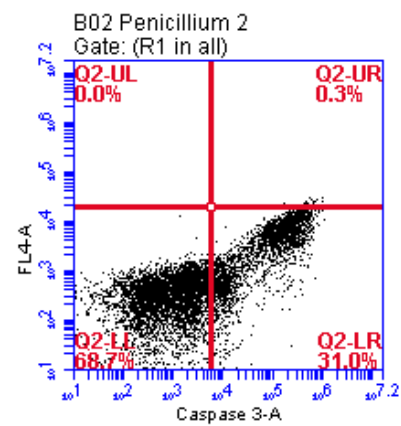
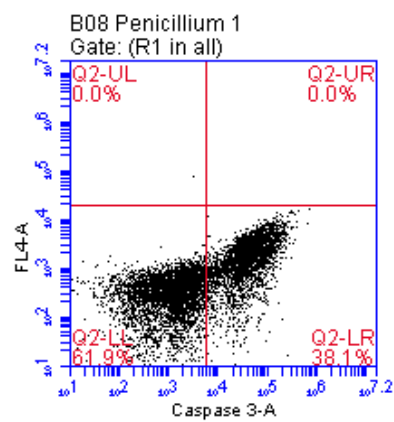
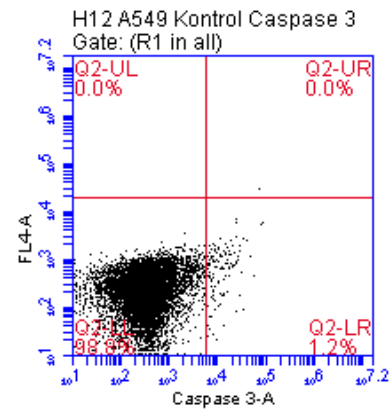
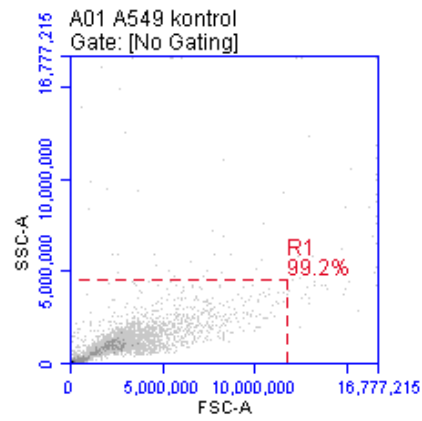
Kaspaz 3 aktivasyonunun değerlendirilmesinde “PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti (Katalog no: 550914, BD)” kullanılmıştır. A549 hücre hattı 12 kuyucuklu plakalara her kuyucukda 2 mL içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyondan sonra fungal özütler IC_{50} değerleri üzerinden konsantrasyonlar uygulanarak tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat inkübe edildikten sonra hücreler kaldırılarak santrifüj edilmiş ve iki kez soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra supernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu eklenmiş ve 20 dk buzda bekletilmiştir. Bu işlem hücre zarında por açmak için uygulanmıştır. Hücreler tekrar santrifüj edilerek 500 µL yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve resüspanse edilmiştir. En son ayrı ependorflara 10 µL antibody Anti kaspaz 3 eklenmiş ve üzerine 100 µL resüspanse edilen hücreler konularak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübe sonrası ependorflara 1000 µL yıkama solüsyonu eklenerek santrifüj edilmiştir. Hücre pelletine 350 µL yıkama solüsyonu ilave edilerek resüspanse edilmiş ve akış sitometri cihazında okunmuştur.

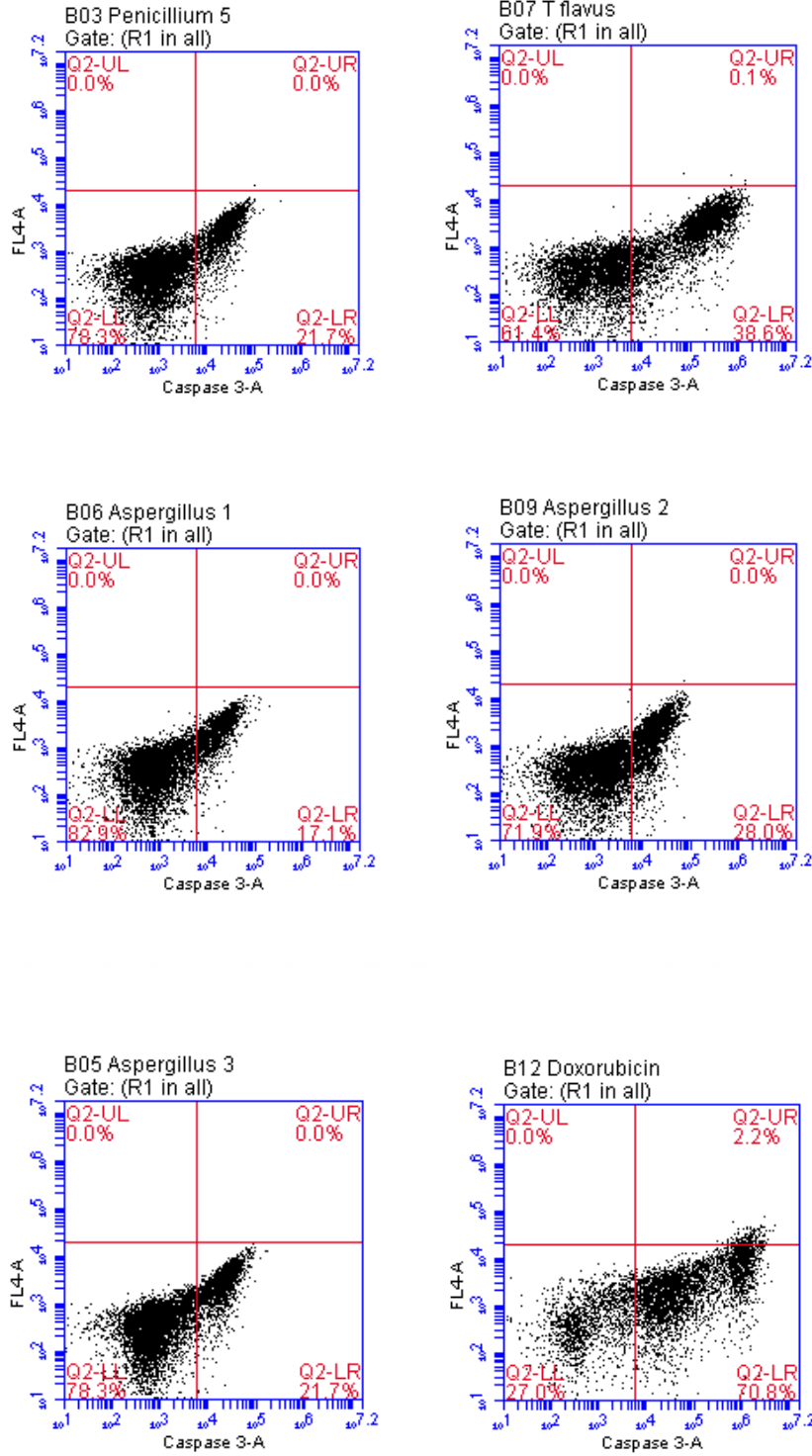
Çizelge 4.12.’de kaspaz 3 aktiviteleri gösterilmiştir. Sonuçlara göre kontrol grubunda % 1.2 ve pozitif kontrol olan doksorubisin % 70.8 kaspaz 3 aktivitesi göstermiştir. Annexin V-PI yöntemi ile apoptoz sonuçlarına paralel olarak kaspaz 3 oranlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Fungus izolatlarından en yüksek kaspaz 3 aktivite gösteren izolatlar sırasıyla % 38.6 oran ile *Talaromyces flavus* ve % 38.1 oran ile *Penicillium* sp. 1’dir.

Kaspazlar, inflamasyon ve hücre ölümü gibi süreçleri kontrol eden endoproteaz ailesinden olan bir enzim grubudur (McIlwain, 2013). Yapılan bir çalışmaya göre bir deniz alginden izole edilen *Aspergillus* sp. izolatının etil asetat ile ekstresi HeLa hücre hattında kaspaz 3, 7 ve 10 aktivitesinde artış göstermiştir (Taritla, 2021).

Çizelge 4.12. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde kaspaz 3 aktiviteleri (%)

Fungus izolatları	Kaspaz 3 Negatif (%)	Kaspaz 3 Pozitif (%)
Kontrol	98,8	1,2
<i>Penicillium</i> sp. 1	61,9	38,1
<i>Penicillium</i> sp. 2	68,7	31
<i>Penicillium</i> sp. 3	73,1	26,8
<i>Penicillium</i> sp. 4	81,6	18,3
<i>Penicillium</i> sp. 4	81,6	18,3
<i>Penicillium</i> sp. 5	78,3	21,7
<i>Talaromyces flavus</i>	61,4	38,6
<i>Aspergillus</i> sp. 1	82,9	17,1
<i>Aspergillus</i> sp. 2	71,9	28
<i>Aspergillus</i> sp. 3	78,3	21,7
Doksorubisin	27	70,8





Şekil 4.23. Fungal özütlerin A549 hücre hattı üzerinde kaspaz 3 aktivitelerinin akış sitometri cihazında belirlenmesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında; 9 fungus izolattan 8 tanesi klasik yöntemlerle cins düzeyinde, 1 tanesi ise hem klasik hem de moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır, fungus izolatlarının ekstraksiyon işlemi, DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite testi, antimikrobiyal aktivite testi, fungal özüt ve liyofilize örneklerin A549 ve BJ hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Fungus izolatları klasik yöntemle identifikasyonu yapılarak cins ve tür düzeyinde sınıflandırılmıştır. Laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak mikroskopta incelenen fungus izolatlarından 3 tanesinin *Aspergillus*, 6 tanesinin ise *Penicillium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan bir tanesi moleküler yöntemle *Talaromyces flavus* olarak tanımlanmıştır. Fungus izolatları daha önce Tuz Gölü'nden izole edilmiş olması sebebiyle identifikasyon için seçilen besiyerleri arasında %17 NaCl içeren MEA besiyeri konulmuştur. *Aspergillus* sp. 2 izolatu hariç diğer izolatlarda %17 NaCl MEA besiyerinde üreme görülmemiştir.

DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite belirlenmesinde pozitif kontrol olarak sentetik antioksidan olan BHT kullanılmıştır. BHT sonucundan elde edilen % inhibisyon eşik değeri olarak kabul edilmiştir. 5 fungus izolatu BHT % 41 olarak belirlenen eşik değerinin üzerinde çıkmıştır. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip izolatlar sırasıyla *Penicillium* sp. 4 % 93, *Penicillium* sp. 1 % 89, ve *Talaromyces flavus* %75 olarak belirlenmiştir.

9 fungus izolatu sekonder metabolit eldesi için etil asetat ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Sulu faz ise liyofilize edilmiştir. Elde edilen etil asetat özütleri ile liyofilize örnekler antimikrobiyal aktivite, A549 ve BJ hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkileri yönünden araştırılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite için mikrobrot dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 9 fungus izolatının özüt ve liyofilize örnekler 6 bakteri ve 4 maya suşunda uygulanmıştır. Liyofilize örneklerde etki görülmemiştir. MİK değeri sonuçlarına göre tüm fungal özütler 200-400 µg/mL konsantrasyonlarda *K.pneumoniae* ATCC 700603 suşuna karşı etkili çıkmıştır. Bu sonuç önemlidir çünkü *K.pneumoniae* akciğerde yıkıcı hasarlara neden olan gram negatif bir bakteridir. *E.coli* ATCC 35218 suşuna karşı sadece *Penicillium* sp. 3 izolatu özütü 400 µg/mL konsantrasyonda etkili olmuştur. *S.aureus* ATCC 25923 suşuna karşı 200 µg/mL

konsantrasyon ile en etkili özüte sahip izolat *Aspergillus* sp. 1'dir. *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı, *Penicillium* sp. 3 özütü (400 µg/mL) dışında diğer özütler etkisiz çıkmıştır. *E.faecalis* ATCC 27853 suşuna karşı *Aspergillus* sp. 1 özütü 200 µg/mL konsantrasyon ile en etkili değerde çıkarken *Penicillium* sp. 5 özütü 800 µg/mL ve diğer özütler 400 µg/mL konsantrasyonlarda etkili olmuştur. *B.subtilis* ATCC 15245 suşuna karşı, *Aspergillus* sp. 2 özütü 200 µg/mL konsantrasyonda en etkili çıkmıştır. *Penicillium* sp. 3 tüm bakteri suşlarında 400 µg/mL konsantrasyonda etkili olmuştur. Maya suşlarından *C.albicans* ATCC 90028 suşuna karşı *Penicillium* sp. 4, *Aspergillus* sp. 1 ve *Aspergillus* sp. 3 izolatlarının özütleri 200 µg/mL konsantrasyonda etkili bulunmuştur. *Aspergillus* sp. 1 özütü *C.albicans* ATCC 90028, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 suşlarına karşı 200 µg/mL konsantrasyon ile mayalara karşı en etkili izolat olmuştur. *Penicillium* sp. 5 özütü ise hiçbir maya suşuna etki göstermemiştir.

Fungus izolatlarının özüt ve liyofilize örneklerin A549 ve BJ hücre hatlarında MTT yöntemi ile sitotoksik etkisi yönünden değerlendirilmiştir. Kanser ilaç geliştirme çalışmalarında kanser hücrelerine verilen hasarın en yüksek, sağlıklı hücrelere ise en düşük olması tercih edilir. Bu sebeple tez çalışmasında sağlıklı hücre hattı olarak BJ hücreleri kullanılmıştır. A549 hücre hattına uygulanan özüt ve liyofilize örneklerin aynı konsantrasyonlarda BJ hücre hattına da uygulanmıştır. *Penicillium* sp. 2 izolatının özütü A549 hücre hattı üzerinde en düşük IC₅₀ değerine sahip (289 µg/mL) olmuştur. A549 hücre hattı üzerinde liyofilizeler özütlere göre daha düşük sitotoksik etki göstermiştir.

Talaromyces flavus'un özüt ve liyofilize örneklerin A549 hücre hattı üzerinde yüksek anti-proliferatif etkiye sahip iken BJ hücrelerinde düşük anti-proliferatif etki görülmüştür.

A549 hücre hattı üzerinde apoptotik etkilerin değerlendirilmesi için Annexin V-PI yöntemi ve Kaspaz 3 aktivitesi çalışılmıştır. Liyofilize örneklerin MTT sonuçlarına göre A549 hücre hattında sitotoksik etkisi düşük olması sebebiyle sadece fungus izolatlarının özütleri uygulanmıştır. Annexin V-PI yöntemi ile akış sitometride ölçülen sonuçlara göre erken apoptoz daha fazla yüzde de bulunmuştur. Toplam apoptotik hücrelerin oranı en yüksek çıkan özütte sahip izolatlar sırasıyla *Aspergillus* sp. 1 %53,9, *Talaromyces flavus* % 47,9 ve *Aspergillus* sp. 3 % 40,1'dir. Annexin V-PI yönteminde gözlenen apoptotik etkiler Kaspaz 3 aktivite testinde de görülmüştür. *Talaromyces flavus* özütü % 38,6 ve *Penicillium* sp. 1 özütü % 38,1 oran ile en yüksek kaspaz aktiviteleri göstermiştir.

Ülkemizde akciğer kanseri teşhisi konulan kişi sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ise birçok yan etkiye sahip olup hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Ayrıca ilaç direnci de kanser tedavisini zorlaştırmaktadır. Funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin antikanser özellikleri kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar getirebilir. Fungal sekonder metabolitlerin kansere karşı çeşitli etki mekanizmaları geliştirmesi nedeniyle, farklı kanser türleri ve kanserin farklı aşamalarında etkili tedaviler sunabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi mikrofungusların ürettiği sekonder metabolitlerin antimikrobiyal, antikanser, antioksidan olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Fungal sekonder metabolitler doğal bileşikler olarak sentetik bileşiklere kıyasla daha az yan etkiler gösterebilmektedir. *Talaromyces flavus*'un etil asetat özütünün A549 kanser hücre hattına sitotoksik etki gösterirken BJ sağlıklı hücre hattına daha az sitotoksik etki göstermesi yeni anti-kanser ajanların keşfi açısından potansiyel taşımaktadır. Ayrıca fungal kaynaklı metabolitlerin ilaç etkeni olarak kullanımı daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir yaklaşım sağlayabilir. Bu metabolitler çeşitli etki mekanizmaları, doğal olmaları, birçok biyolojik aktiviteye sahip olmaları gibi özellikleri ile kansere karşı mücadelede yeni ve etkili tedavi yöntemleri sunacaktır.

KAYNAKÇA

- Arora, D. S. (2010). Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 765-777.
- Bahadır, N. A. (2012). Bazı Fungal Türlerin Standart ve İçeriği Değiştirilmiş Besiyerlerindeki Mikroskopik ve Makroskopik Yapılarının İncelenmesi. *Mantar Dergisi*, 2(1-2), 49-56.
- Bentley, R. (1997). Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs. *Perspectives in Biology and Medicine*, 40(3), 364-394.
- Bills, G. F. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6.
- Bladt, T. T. (2013). Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules*, , 18(9), 11338-11376.
- Boysen, J. M. (2021). Natural products in the predatory defence of the filamentous fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 17(1), 1814-1827.
- Börühan Çetin, M. C. (2021). Screening of antioxidant activity of mycelia and culture liquids of fungi from Turkey. *Microbiology*, 90, 133-143.
- Bräse, S. E. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109(9), 3903-3990.
- Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C. S., Lindner, S., Linsenmeier, A. M., Masters, K. S., Meister, A. C., Ruff, B. M., & Zhong, S. (2013). Progress in the chemistry of organic natural products. The chemistry of mycotoxins. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 97, v-300.
- Calvo, A. M. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.
- Cannell, R. J. (1998). How to approach the isolation of a natural product. *Natural Products Isolation*, 1-51.
- Cantürk, Z. (2013). Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Aspergillus* ve *Penicillium* Cinsi Türlerle ait Metabolitlerin Antioksidan ve Anti-proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi. *Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi*.
- Cantürk, Z. (2015). *Aspergillus* Ve *Penicillium* Cinslerine Ait Sekonder Metabolitler Ve Sınıflandırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, Cilt: 13 Sayı: 2 Sayfa: 1-8.
- Cateni, F. G. (2021). Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 1-45.

- Chandra, P. &. (2012). Optimization of antioxidant potential of *Penicillium granulatum* Bainier by statistical approaches. . *International Scholarly Research Notices*.
- Colakoglu, G. (2002). Extraction of *Aspergillus niger* Van Tieghem, an allergenic microfungus, and application of toxicity test. *Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32, 286-289.
- Diba, K. K. (2007). Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 23(6), 867.
- Dominguete, L. &. (2018). Filamentous fungi as source of biotechnologically useful metabolites and natural supplements for neurodegenerative diseases treatment. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 295-300.
- Eble, T. E. (1951). Fumaglllin, an Antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1(1), 54-8.
- Endo, A. K. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *The Journal of Antibiotics*, 29(12), 1346-1348.
- Ener, B. &. (2009). The microscopic appearance of aspergillus species prepared from clinical materials/Klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda aspergillus türlerinin mikroskopik görünümü. *Journal of Pediatric Infection*,, 140-141.
- Fernandes, P. (2016). Fusidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*,, 6(1), a025437.
- Frisvad, J. C. (1989). erverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81(6), 837-861.
- Frisvad, J. C. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49(1), 1-174.
- Gebreyohannes, G. N. (2019). Investigation of antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of *Auricularia* and *Termitomyces* species of mushrooms. *The Scientific World Journal*,.
- Guarro, J. X. (2010). Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. *Aspergillosis: from Diagnosis to Prevention*, 7-32.
- He, L. N. (2011). Asperlin induces G2/M arrest through ROS generation and ATM pathway in human cervical carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,, 409(3), 489-493.
- Hill, A. M. (2006). The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. *Natural Product Reports*,, 23(2), 256-320.

- Hirota, A. N. (1986). Terrecyclic Acid A, A New Antibiotic From *Aspergillus Terreus* Iv. Absolute Stereochemistry Of Terrecyclic Acid A. *The Journal of Antibiotics*,, 39(1), 149-152.
- İsmail, O. R. (2020). Kültür Mantarı *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer Üzerine Bir Araştırma: Taksonomik Durumunun ve Doğru Adının İncelenmesi. *Mantar Dergisi*, 12(2), 87-93.
- Juni Arianti, N. K. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Fungi Endofit Pada Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*). (*Doctoral dissertation, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis*).
- Kanev, M. &. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, , 20.1: 33-38.
- Li, X. D. (2019). Antimicrobial sesquiterpenoid derivatives and monoterpenoids from the deep-sea sediment-derived fungus *Aspergillus versicolor* SD-330. *Marine Drugs*, 17(10), 563.
- Liao, W. Y. (2012). Asperjinone, a nor-neolignan, and terrein, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. *Journal of Natural Products*,, 75(4), 630-635.
- McIlwain, D. R. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.
- Michael T. Madigan, K. S. (2002). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Palme Yayıncılık.
- Micheli, P. A. (1729). *ova plantarum genera iuxta Tournefortii methodum disposita quibus plantae 1900 recensentur, scilicet fere 1400 nondum observatae, reliquae suis sedibus restitutae; quarum vero figuram exhibere visum fuit, eae ad 550 aeneis tabulis 108 graphice expressae s. Typis Bernardi Paperinii*.
- Mitsuguchi, H. S. (2009). Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidanes: functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus*. . *Journal of the American Chemical Society*,, 131(18), 6402-6411.
- Mothes, K. (1955). Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology*,, 6(1), 393-432.
- NCCLS. (2006). Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, . *National committee for clinical Laboratory Standards*, Approved standard. 7th ed. Wayne, PA, M7–A7 p.
- Okuda, T. (1994). Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. *Mycologia*, 86(2), 259-262.
- Okuda, T. K. (2000). Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classific*, 83-99.

- Paech, K. (1950). *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Springer, Berlin Heidelberg. Springer. adresinden alındı
- Panda, D. R. (2005). Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28), 9878-9883.
- Pela, F. (2004). Biological Activities of Fungal Metabolites. In *Handbook of Industrial Mycology*, (pp. 68-111). CRC Press.
- Pitt, J. I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press Inc. Ltd.
- Pittayakhajonwut, P. D. (2011). Two new drimane sesquiterpenes, fudecadiones A and B, from the soil fungus *Penicillium* sp. BCC 17468. *Planta Medica*, 77(01), 74-76.
- Plumb, J. A. (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 165-169.
- PUIA, I. C. (2018). Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal mushroom with important health benefits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 343-349.
- Rebacz, B. L. (2007). Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer research*, 67(13), 6342-6350.
- Robey, M. T. (2021). An interpreted atlas of biosynthetic gene clusters from 1,000 fungal genomes. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, , 118(19), e2020230118.
- Robinson, T. S. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 284-289.
- Samson, R. A. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 141-173.
- Sánchez-Moreno, C. L.-C. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Schmidt-Dannert, C. (2015). Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Biotechnology of Isoprenoids*, 19-61.
- SD Bhargavi, V. P. (2016). Purification of Lovastatin from *Aspergillus terreus* (KM017963). *Research Article*, 17 (8), 3797-3803.
- Setyowati, E. P. (2021). Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract from Fungus *Trichoderma reesei* strain JCM 2267, *Aspergillus flavus* strain MC-10-L, *Penicillium* sp, and *Aspergillus fumigatus* Associated with Marine Sponge *Stylissa flabelliformis*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(10), 5126-5132.
- Shao, R. G. (1996). Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. *Experimental Cell Research*, 227(2), 190-196.

- Suresh, G. K. (2020). Mycosynthesis of anticancer drug taxol by *Aspergillus oryzae*, an endophyte of *Tarenna asiatica*, characterization, and its activity against a human lung cancer cell line. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101525.
- Şentürk, Ş. &.-G. (2019). Fungal Biyokontrol Ajanları ve Metabolitleri. *Mantar Dergisi*, 10(1), 70-83.
- Taiz L, Z. E. (2010). *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Fifth Edition. Sinauer Associates.
- Taritla, S. K. (2021). Optimization of PhysicoChemical Parameters for Production of Cytotoxic Secondary Metabolites and Apoptosis Induction Activities in the Culture Extract of a Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 542891.
- Tavares, D. G. (2018). Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 148-154.
- Topal, S. N. (1999). Türkiye'nin gezici mikoflorasının mikotoksin profilleri. *Gıda*, 24 (2).
- Tsang, C. C. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era-Past, present and future. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 197-210.
- Üstün, A. (2019). *Aspergillus Nıger* Lc3 İzolatından Antibakteriyel Polipeptit İzolasyonu. *Yüksek Lisans Tezi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*, Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213-218.
- Venkatachalam, P. &. (2021). Modulation of Bax and Bcl-2 genes by secondary metabolites produced by *Penicillium rubens* JGIPR9 causes the apoptosis of cancer cell lines. *Mycology*, 12(2), 69-81.
- Wang, J. P. (2023). Polyketides with antimicrobial activities from *Penicillium canescens* DJJ-1. *Phytochemistry*, 206, 113554.
- Wang, L. W. (2011). Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(12), 1056-1074.
- Wong, W. D. (2002). HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ve malign hücre: tümöre özgü apoptozun tetikleyicileri olarak statin ilaç ailesi. *Lösemi*, 16 (4), 508-519.

http-1: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (erişim tarihi: 13.03.2023)

http-2:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:04_03_21a_conidiophores,_Aspergillus,_Penicillium,_Eurotiales,_Ascomycota_\(M._Piepenbring\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:04_03_21a_conidiophores,_Aspergillus,_Penicillium,_Eurotiales,_Ascomycota_(M._Piepenbring).png) (erişim tarihi: 09.06.2023)

http-3:

https://is.muni.cz/el/1431/podzim2017/Bi6620c/um/Mikroskopicke_houby_cviceni_2017.pdf (erişim tarihi: 03.06.2023)

http-4: <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/26/lect26.htmL> (erişim tarihi: 21.05.2023)

http-5:

<https://www.stabilis.org/Monographie.php?IdMolecule=1132&IdOnglet=Biblio&codeLanguage=TR-tr> (erişim tarihi: 04.06.2023)

http-6: <https://www.atcc.org/products/ccl-185> (erişim tarihi: 21.06.2023)

http-7: <https://www.atcc.org/products/crl-2522> (erişim tarihi: 21.06.2023)

