



**LOVASTATİN ÜRETİCİ FUNGUSLARIN
TARANMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Abdul Saltuk Buğra DAŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ**

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LOVASTATİN ÜRETİCİ FUNGUSLARIN TARANMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Abdul Saltuk Buğra DAŞ

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**LOVASTATİN ÜRETİCİ FUNGUSLARIN TARANMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ danışmanlığında, Abdul Saltuk Buğra DAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 07 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile** kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof.Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

07 / 01 / 2019

Abdul Saltuk Buğra DAŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LOVASTATİN ÜRETİCİ FUNGUSLARIN TARANMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Abdul Saltuk Buğra DAŞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Lovastatin, HMG-CoA'nın mevolanata dönüşümünü katalizleyen HMG-CoA redüktaz enziminin yarışmalı inhibitörüdür, kalp ve damar hastalıkları tedavisinde ilaç olarak kullanılır. Bu tez çalışmasında topraktan izole edilen filamentöz fungusların, lovastatin üretimi yönünden taranması ve moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Yapılan izolasyonlarda toprak örneklerinden 52 adet fungus saflaştırılmış ve *Candida albicans* ile yapılan ön seçim işleminde 14 adet izolat pozitif sonuç vermiştir. Daha sonra bu 14 izolattan lovastatin ekstraksiyonu yapılarak, ekstraktlar saf lovastatinle ince tabaka kromatografisinde karşılaştırılmıştır. Lovastatinle benzer R_f değerine sahip bant veren 5 izolat belirlenmiş ve spektrum taraması yapılarak doğrulanmıştır. Seçilen 5 izolatin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve GenBank'a kaydedilmiştir. Sonuçta, soya unu eklenmiş sıvı besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonucu: *Fusarium solani* B5B, 20,9 mg/L; *F. oxysporum* C11, 22,28 mg/L; *Penicillium brevicompactum* C6, 28,34 mg/L; *P. commune* C9, 27,59 mg/L; *Sarocladium strictum* HA4 ise 43,77 mg/L lovastatin üretmiştir. Bu çalışmada lovastatin üretici yeni lokal izolatlar ortaya çıkarılmış olup, en yüksek verime sahip HA4 izolatı lovastatin üretimi için umut vaatetmektedir.

2019, 47 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lovastatin, HMG-CoA, Kolesterol, TLC

ABSTRACT

MS. Thesis

SCREENING AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LOVASTATIN PRODUCER FUNGI

Abdul Saltuk Buğra DAŞ

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Lovastatin is a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase which catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevolanate and is used as a drug in the treatment of cardiovascular diseases. In this thesis, we aimed to screen and molecular characterization of filamentous fungi isolated from soil for the production of lovastatin. 52 fungi were isolated from soil samples and 14 isolates were positive in the pre-selection process with *Candida albicans*. After extracting lovastatin from these 14 isolates, the extracts were compared with pure lovastatin in thin layer chromatography. 5 isolates with similar Rf values were determined and these bands confirmed by spectral scanning. Molecular characterization of 5 isolates selected was performed and recorded in GenBank. As a result, 7 days of incubation in soybean added liquid medium resulted in: *Fusarium solani* B5B, 20,9 mg/L; *F. oxysporum* C11, 22.28 mg/L; *Penicillium brevicompactum* C6, 28.34 mg/L; *P. commune* C9, 27.59 mg/L; *Sarocladium strictum* HA4, 43,77 mg/L produced lovastatin. In this study, new local isolates of lovastatin have been produced and the highest yield of HA4 is promising for lovastatin production.

2019, 47 Page

Keywords: Lovastatin, HMG-CoA, Cholesterol, TLC

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimimi süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bana bilgi ve uygulama konusunda destek olan Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında benden manevi desteğini esirgemeyen annem Ayşe DAŞ'a ve aileme sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Fatma BÖKE, Arş. Gör. Ayşe ÜSTÜN, Arş. Gör. Elanur TÜYSÜZ, Büşra ALBAYRAK, Alpgiray TURGUT, Büşra YAZICILAR ve Merve ŞİMŞEK'e en içten saygı ve sevgilerimi sunarım.

Abdul Saltuk Buğra DAŞ
Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolesterol	4
1.2. Lipoprotein	5
1.2.1. VLDL	7
1.2.2. LDL	8
1.2.3. HDL	8
1.3. Statinler	9
1.3.1. Statinlerin Kimyasal Yapısı	11
1.3.2. Statinlerin Biyosentezi	12
1.4. Lovastatin	13
1.4.1. Lovastatinin Etki Mekanizması	14
1.4.2. Lovastatinin Biyosentezi	16
1.4.3. Lovastatinin Mikrobiyal Üretimi	17
1.4.4. Lovastatinin Saflaştırılması	17
1.4.5. Diğer Uygulama Alanları ve Geleceği	18
1.5. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Cihazlar	24
3.1.2. Sarf Malzemeler	25
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	25
3.1.3.1. Patates Dekstroz Agar	25
3.1.3.2. Lovastatin Üretim Besiyeri	25

3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Fungusların İzolasyonu	25
3.2.2. Lovastatinin Üretimi	26
3.2.3. Lovastatinin Saflaştırılması.....	26
3.2.4. Lovastatin Üretici Fungusların Ön Seleksiyonu	26
3.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	27
3.2.6. Absorbans Spektrum Taraması	27
3.2.7. Standart Lovastatin Grafiğinin Hazırlanması.....	27
3.2.8. Lovastatinin Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmesi	27
3.2.9. Fungusların Klasik Yöntemlerle Teşhisi.....	27
3.2.10. Fungusların Moleküler Karakterizasyonu.....	28
3.2.11. İstatistiksel Analiz.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	30
4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Fungusların İzolasyonu	30
4.2. Lovastatin Üretimi ve Saflaştırılması.....	30
4.3. Lovastatinin Üretici Fungusların Ön Seleksiyonu	30
4.4. Lovastatinin Üretiminin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Doğrulanması...	31
4.5. Absorbans Spektrum Taraması	32
4.6. Standart Lovastatin Grafiğinin Hazırlanması.....	33
4.7. Lovastatinin Miktarının Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmesi	34
4.8. Fungusların Klasik Yöntemlerle Teşhisi	34
4.9. Fungusların Moleküler Karakterizasyonu	35
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CO ₂	Karbondioksit
dl	Desilitre
L	Litre
mg	Miligram
mmol	Milimol
OH	Hidroksil
SC	Süper kritik

Kisaltmalar

Apo	Apolipoprotein
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroksimetil Glutaril Koenzim A
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IDL	Ara Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LP	Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipaz
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Yüksek LDL Kaynaklı Damar Tıkanıklığı	4
Şekil 1.2 Kolesterolün Serbest ve Ester Yapısı	5
Şekil 1.3 Lipoprotein Yapısı	6
Şekil 1.4 Lipoprotein Yapıları	7
Şekil 1.5 Olgun HDL Oluşumu	9
Şekil 1.6 Statinlerin Kimyasal Yapıları	11
Şekil 1.7 Lovastatinin Biyosentez Yolağı.....	13
Şekil 1.8 Lovastatin Formları	14
Şekil 1.9 Atorvastatin İnhibitörüyle Kristalize Edilmiş HMG-CoA Redüktazın Yapısı	15
Şekil 1.10 Lovastatinin Kolesterol İnhibisyonu Üzerine Etki Mekanizması.....	16
Şekil 1.11 Lovastatinin Ubikuitin-Proteazom Yolunu Modüle Ederek Meme Kanseri Hücrelerinde Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri p21 ve p27'yi İndüklemeye Mekanizması	19
Şekil 4.1 Ekstraktların <i>C.albicans</i> 'a Karşı Oluşturduğu Zonların Bazıları	31
Şekil 4.2 Ön Seleksiyon Basamağında Zon Ekstraktların TLC Sonuçları	31
Şekil 4.3 Saf Lovastatinin 200-400 nm Arasındaki Spektrum Taraması.....	33
Şekil 4.4 Standart Lovastatin Grafiği	33
Şekil 4.5 TLC'den Elde Edilen Örnekler	34
Şekil 4.6 Fungus Türlerinin Besiyerinde ve Mikroskoptaki Görüntüleri	35
Şekil 4.7 Lovastatin Pozitif Örneklerin ITS PCR Sonrası Jel Görüntüleri.....	35
Şekil 4.8 BioEdit Programı ile DNA Sekanslarının Birleştirilmesi.....	36
Şekil 4.9 Türlerin Filogenetik Dendogramı	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Kanda Bulunması Gereken Kolesterol, LDL, HDL veTrigliserit Düzeyleri .	2
Çizelge 1.2 Tip 1, Tip 2 Statinler ve Moleküler Ağırlıkları.....	10
Çizelge 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri	24
Çizelge 3.2 10ng Kalıp DNA İçin50µl PCR Karışımı	28
Çizelge 3.3 PCR Programı	28
Çizelge 4.1 TLC’de Yürütülen Örneklerin R _f Değerleri	32
Çizelge 4.2 İzolatların Lovastatin Üretim Miktarları.....	34
Çizelge 4.3 Türlerin GenBank Erişim Numaraları	36



1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde ölümle sonuçlanan hastalıkların en büyük sebeplerinden biri kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarıdır. Türkiye İstatistik Kurumu(TÜİK) verilerine göre Türkiye’de ölüm nedenleri arasında 2015’de % 40,3’ü, 2016’da % 39,8’i ve 2017’de ise % 39,7’si dolaşım sistemi hastalıklarıdır. Dolaşım sistemi hastalıkları içerisinde ise iskemik kalp hastalıkları yaklaşık % 40’lık bir paya sahiptir. 1950’li yıllarda Dawber ve ekibinin yürüttüğü çalışmada kan kolesterolü ve koroner arter hastalığından kaynaklı ölümler arasındaki bağlantıyı meydana çıkarmak amacıyla yapılan Framingham çalışması yüksek kolesterol seviyesi ve koroner kalp hastalığından kaynaklanan mortalite arasında güçlü bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır (Kannel 1995; Ferah *et al.* 2014). Sonrasında yapılan birçok çalışma ise koroner kalp hastalığı mortalitesinin yüksek oranda, toplam kolesterolün yaklaşık %70’ini meydana getiren düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolüyle bağlantılı olduğunu, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol düzeyinin koroner kalp hastalığından kaynaklı mortalite ile ters orantılı olduğunu göstermiştir. LDL kolesterolünün koroner hastalıklarla olan ilişkisi nedeniyle, LDL seviyesinin düşürülmesi ile kalp ve damar yolu hastalığı riskinin azaltılabileceği belirlenmiştir (Tobert 2003) (Şekil 1.1).

Bu çalışmalardan sonra kolesterolün biyosentez yolağı araştırılmaya başlanmış ve ilaç endüstrisinin bir hedefi haline gelmiştir. 1971 yılında Akiro Endo ve arkadaşları kolesterol oluşum mekanizmasındaki hız sınırlayıcı enzim olan HMG-CoA redüktazı inhibe edebilecek metabolitleri belirlemek ve mikroorganizmalardan izole etmek için çalışmalar yapmışlardır (Endo 1992). Devam eden çalışmalarda *Penicillium citrinum* tarafından üretilen ML-236A, ML236B ve ML236C ismini verdikleri metabolitler izole edilmiştir. Bu çalışmalar oldukça etkili bir HMG-CoA redüktaz enzimi inhibitörü olan mevastatinin keşfedilmesine öncülük etmiştir (Endo *et al.* 1976). Sonrasında mevastatinin, HMG-CoA redüktaz enzim inhibisyonu üzerine biyokimyasal etkisi aynı ekip tarafından aydınlatılmıştır. Mevastatinin hem deney hayvanlarında hemde insanlarda LDL kolesterolünü önemli ölçüde düşürdüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kuroda *et al.*1979; Yamamoto *et al.* 1980).

1. GİRİŞ

2000’li yıllarda yaklaşık olarak 30 milyar dolarlık bir kolesterol ilaç endüstrisinin oluşması,1980 ve 1990’lı yıllarda mevastatinin analoglarının dünya çapında geliştirilmesine yol açmış, pravastatin, simvastatin ve lovastatin birçok ülkede onaylanarak piyasaya sürülmüştür (Ferah *et al.*2014).

Çizelge 1.1. Kanda Bulunması Gereken Kolesterol, LDL, HDL veTrigliserit Düzeyleri

DeğerlerKandaki kolesterol seviyesi	
0-200 mg/dl arası	istenilen seviye
200-239 mg/dl arası	sınırdaki seviye
240 mg/dl üstü	yüksek seviye
Kandaki LDL kolesterol seviyesi	
0-130 mg/dl arası	istenilen seviye
130-159 mg/dl arası	sınırdaki seviye
160 mg/dl ve üstü	yüksek seviye
Kandaki HDL kolesterol seviyesi	
0-35 mg/dl’nin arası	Düşük
Kandaki trigliserit seviyesi	
200 mg/dl	istenilen seviye
200-400 mg/dl	sınırdaki seviye
400-1000 mg/dl	yüksek seviye
1000 mg/dl	çok yüksek seviye

1978 yılında Alberts, Chen ve arkadaşları Merck Araştırma Laboratuvarlarında *Aspergillus terreus*’un fermantasyonu ile elde edilen sıvısından mevinolini (lovastatin) keşfettiler (Alberts *et al.* 1980). 1988’de lovastatinden tek farkı yalnızca yan zincirinde metil grubu bulunduran simvastatin onaylandı.1991 yılında pravastatin,1994’de fluvastatin, 1997’de atorvastatin, 1998’de serivastatin, 2003’de rosuvastatin ve 2009’da pitavastatin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanarak piyasaya sürüldü.

90.000’den fazla katılımcının oluşturduğu ve 5 yıl süren çalışmalar sonunda 14 farklı statinin meta-analiz çalışması statin tedavisinin kardiyovasküler vakaların insidansını %20 oranında azalttığı belirlenmiştir (Baigent *et al.* 2005). 2000’den fazla hastayı kapsayan bir başka çalışmada ise rosuvastatinin (10-40 mg), atorvastatinin (10-80 mg), simvastatinin (10-80 mg) ve pravastatinin (10-40 mg) belirtilen doz oranlarında 6

hafta takip süresince birbiriyle karşılaştırma yapılmış ve rosuvastatinin; atorvastatine göre %8, pravastatine göre %26, simvastatine göre %18 oranında daha fazla LDL seviyesi düşüklüğünü sağlayarak diğer statinlere göre oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Jones *et al.* 2003). Bütün bu çalışmalar sonunda statinlerin LDL seviyesini düşürücü etkisinden dolayı büyük bir ilaç pazarı oluşturduğu ve bu endüstrinin satışlarının 2006 yılında 23 milyar dolara ulaştığı bilinmektedir (Vantage 2008).

Yapılan diğer bir klinik çalışmada ise hiperkolestrolemili hastalarda pitavastatin atorvastatin ve rosuvastatinin LDL seviyesine olan etkileri kıyaslandığında, bu üç statininde LDL seviyesini eşit derecede azalttığı gözlemlenmiştir (Saku *et al.* 2011). LDL seviyesinin yüksekliği koroner arter hastalığı için her ne kadar belirteç olsada, tedavi veya hastalık için tek başına sorumlu değildir. Aynı zamanda HDL seviyesinin düşüklüğü de önemli bir faktördür. Birçok koroner arter hastasının kanındaki LDL seviyesi istenilen seviyede olmasına rağmen, HDL seviyesi düşüktür. HDL seviyesinin düşüklüğü koroner arter hastalığının habercisi olduğu sonucuna ulaşılmış ve hastalık tedavisinde LDL seviyesi düşüklüğü kadar HDL seviyesi yüksekliğinde önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1.1). Statinlerin etkisi sadece LDL seviyesini düşürmekle kalmayıp aynı zamanda HDL seviyesinde % 5-10 oranında arttırdığı ve bu artışın doza bağlı olmadığı gözlenmiştir. Statinler etkin olarak LDL seviyesini düşürürler fakat HDL ve trigliserid seviyesi artışı ile kıyaslandığında etkileri çok daha düşüktür (Stein *et al.* 2000; Krauss *et al.* 1998)



Şekil 1.1. Yüksek LDL Kaynaklı Damar Tıkanıklığı (Anonim 2018a)

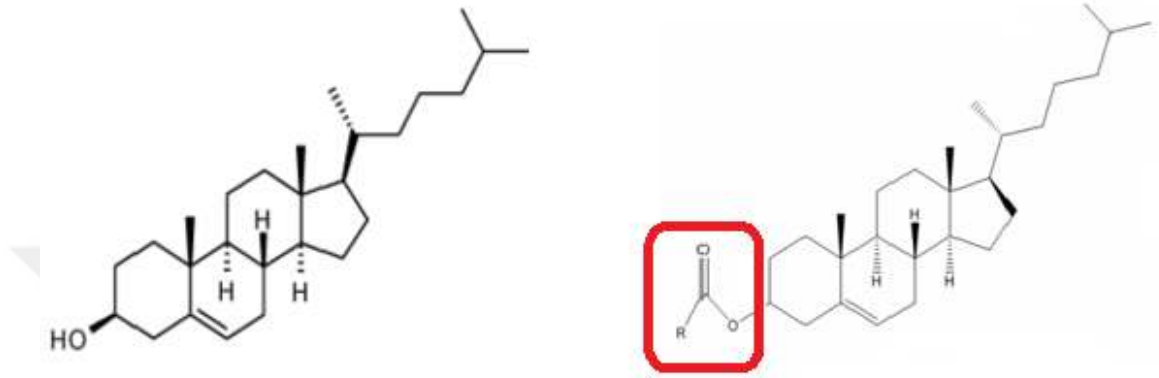
1.1 Kolesterol

Kolesterol; bir alkol ve bir steroidten oluşan bir sterol yapıdır. Kanda iki yapıda bulunur. Bunlar serbest yapı ve esterleşmiş yapıdır (Şekil 1.2). Kolesterol, plazmada çoğunlukla esterleşmiş halde bulunur. 3. karbondaki -OH grubuna ester bağı ile bir yağ asidi bağlanarak bu yapıyı kazanır. Esterleşme yapıyı daha hidrofobik hale getirir ve bu nedenle kolesterol ya bir lipoprotein molekülünün bileşeni olarak ya da safradaki fosfolipit ve safra tuzları tarafından çözünerek taşınır. Kolesterol, Şekil 1.10'da gösterildiği gibi yaklaşık 25 basamaktan oluşan bir dizi tepkime sonucu oluşur.

Kolesterol dışarıdan alınabildiği gibi çoğunlukla karaciğerde sentezlenir, küçük bir bölümü ise hepatosit zarlarında sentezlenir. Diyetle bulunan kolesterol hem serbest hem esterleşmiş yapıda bulunur fakat sadece serbest halde bulunan kolesterol emilir ve pankreas tarafından salgılanan sterol esteraz enzimleri ile bağırsak lümeninde hidrolize uğrar. Safra tuzları sterol esteraz enzimlerinin aktif forma dönüşmesinde ve esterleşmemiş kolesterolün emiliminde görev yapar. Mukoza hücrelerinde kolesterol yeniden esterleştirilerek genel dolaşıma verilir. Bütün büyümekte olan hayvan dokuları hücre zarı sentezlemek için kolesterolü kullanırlar, kolesterol hücre zarını oluşturan lipid moleküllerini birbirine bağlayarak membranın stabil kalmasında rol oynar. Aynı zamanda apolipoproteinlerin yapısına katılırlar, apolipoproteinler; fosfolipitler, kolesterol, kolesterol esterleri, triaçilgliserollerin değişik oranda birleşmesinden meydana gelirler.

1. GİRİŞ

Lipitlerle proteinlerin farklı bileşimleri, şilomikronlar ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler gibi birçok farklı yoğunlukta parçacıklar üretir. Bazı organlar steroid hormonları üretmek için kolesterolü bir çıkış maddesi olarak kullanırlar ve aynı zamanda kolesterol D vitamini üretiminin de öncüsüdür. (David and Michael 2013)



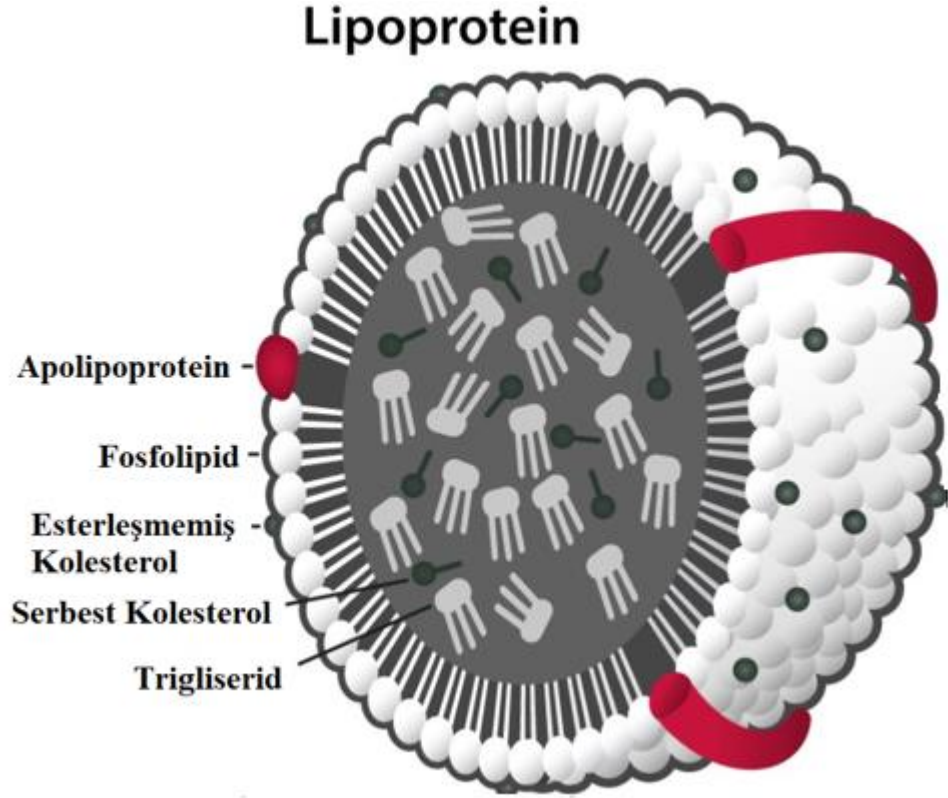
A: Kolesterolün serbest yapısı

B: Kolesterolün ester yapısı

Şekil:1.2. Kolesterolün serbest ve ester yapısı

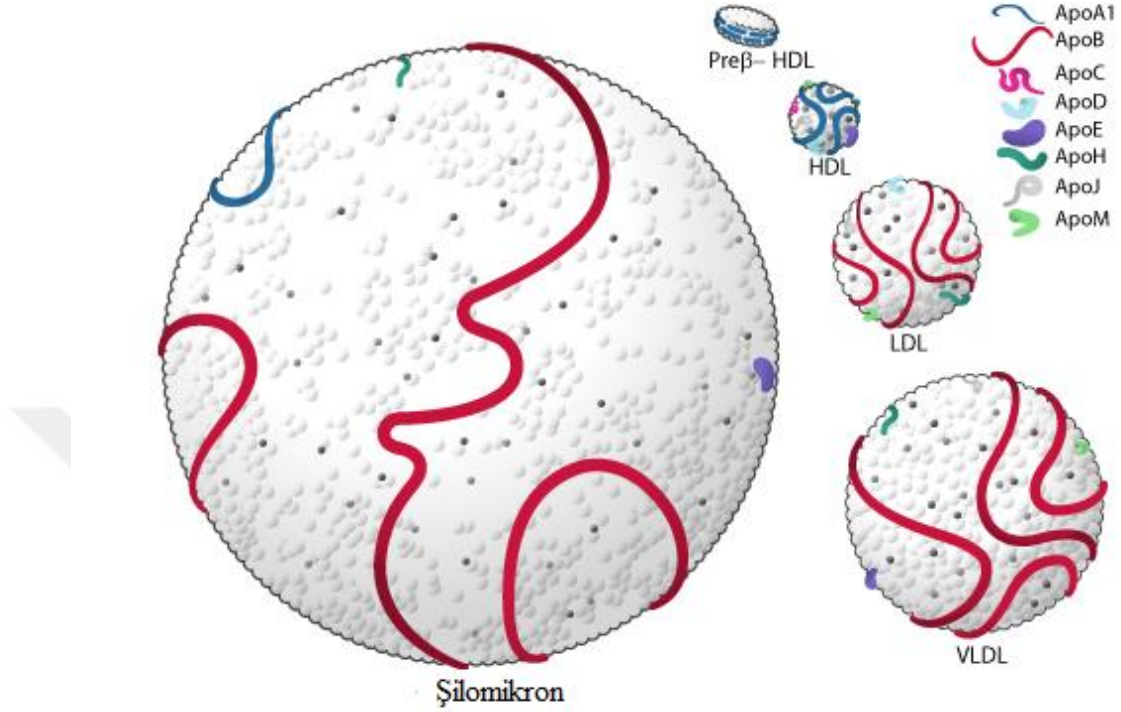
1.2.Lipoproteinler

Lipoproteinler; kolesterol, kolesterol esterleri, fosfolipidler ve trigliseridlerin çeşitli oranlarla birleşip apolipoproteinler olarak adlandırılan spesifik taşıyıcıların moleküler olarak bir araya gelmesiyle oluşan yapılardır. Lipoprotein partikülleri küre şeklinde bir yapıda bulunurlar, merkezde trigliseridlerin ve kolesterol esterlerinin hidrofobik lifleri, dış yüzeyde ise fosfolipidlerin ve kolesterolün hidrofilik kısımları bulunur (Şekil 1.3).



Şekil: 1.3.Lipoprotein Yapısı (Anonim2018b)

Lipoproteinler; Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein(VLDL), Ara Yoğunluklu Lipoprotein(IDL), LDL, HDL, Lipoprotein(Lp) şeklinde alt gruplara ayrılırlar, bu sınıflandırma ise bu yapıların ultrasantrifüjdeki yoğunluklarına göre belirlenir (Şekil 1.4). Şilomikronlar, lipoproteinlerin en büyük ve yoğunluğu en küçük olanıdır, yüksek miktarda trigliserid içerirler. Şilomikronlar ince bağırsağın epitel hücrelerinde sentezlenir ve lenf sistemi aracılığıyla taşınırlar. Şilomikronlar diyetle alınan yağ asitlerini, kullanılacakları veya enerji olarak depolanacakları dokulara taşırlar (David and Michael2013).



Şekil 1.4. Lipoprotein yapıları (Anonim 2018b)

1.2.1. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein(VLDL)

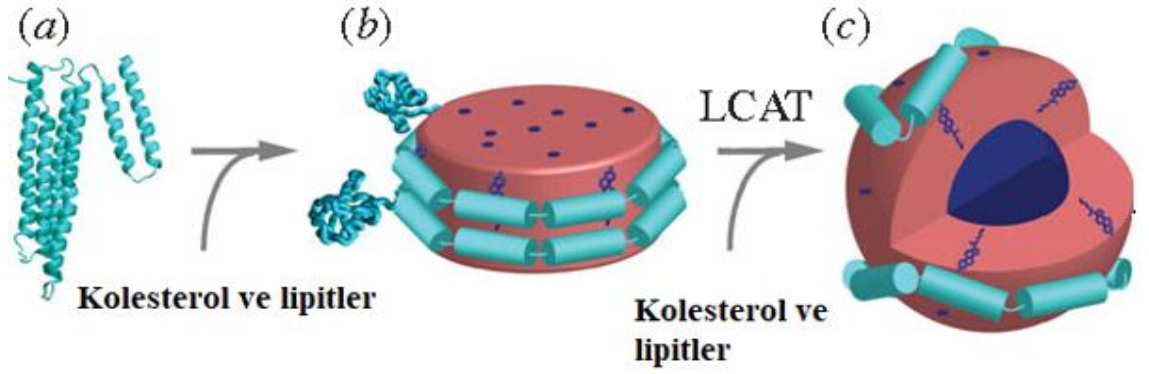
VLDL'ler, trigliseridleri karaciğerden depolamak için dokulara taşıma görevi yaparlar ve endojen trigliseridlere ek olarak serbest kolesterol, kolesterol esterleri fosfolipit, ApoB-100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III ve ApoE içerirler. ApoC-II, LPL'i aktive ederek VLDL trigliseridlerinden yağ asitlerinin serbest kalmasına neden olur. Böylece yağ asidi oranı gittikçe azalan VLDL'ler, yaklaşık olarak aynı miktarlarda trigliserid ve kolesterol içeren ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ile daha sonra düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) haline dönüşür. LPL aracılığıyla şilomikronlardan ve VLDL'lerden salınan yağ asitleri, yağ dokusu hücrelerinde trigliserid yapısında depolanır (David and Michael 2013).

1.2.2. LDL

LDL, triaçilgliserol kaybederek VLDL'lerin bir kısmını orta yoğunluklu lipoprotein kalıntısına dönüştürür. VLDL'lerde triaçilgliserol kaybı devam ederse daha düşük yoğunluklu lipoprotein olan LDL'lere dönüştürülür. LDL'ler kolesterol ve kolesterol esterleri bakımından çok zengin, trigliserid açısından çok az yoğunluktadır. LDL'ler ana apolipoprotein olarak ApoB-100'ü içerirler ve karaciğer harici dokulara kolesterol taşıma işlemini gerçekleştirirler. Bu dokularda ApoB-100'ü tanımasını sağlayan özgül plazma zar reseptörleri vardır. Bu reseptörler kolesterol ve kolesterol esterlerinin hücre içine alımını sağlar (David and Michael 2013).

1.2.3. HDL

Yüksek yoğunluklu lipoproteinler olarak adlandırılan HDL'ler; LDL'lerden daha küçüktürler. HDL'ler çoğunlukla karaciğerde olmak üzere ince bağırsak duvarındada sentezlenirler, ince bağırsak duvarında sentezlenen HDL diskoidal şeklindedir ve içeriğinde ApoA-I, ApoA-II, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve az miktarda serbest kolesterol bulunur. Yeni sentezlenerek kan dolaşımına verilen HDL dolaşımında bulunan diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini toparlayarak küre şekilli olgun HDL şeklini alır (Şekil 1.5). Kolesterol bakımından zenginleşen HDL, karaciğere gittiği zaman kolesterolü bırakır ve bir kısmı safra tuzlarına dönüşür. Böylece HDL kolesterolü dokulardan karaciğere taşımış olur (David and Michael 2013).



A: Lipid içermeyen ApoA-I

B: Diskoidal HDL

C: Küresel HDL

Şekil 1.5. Olgun HDL Oluşumu (Amy Y. Shih 2009)

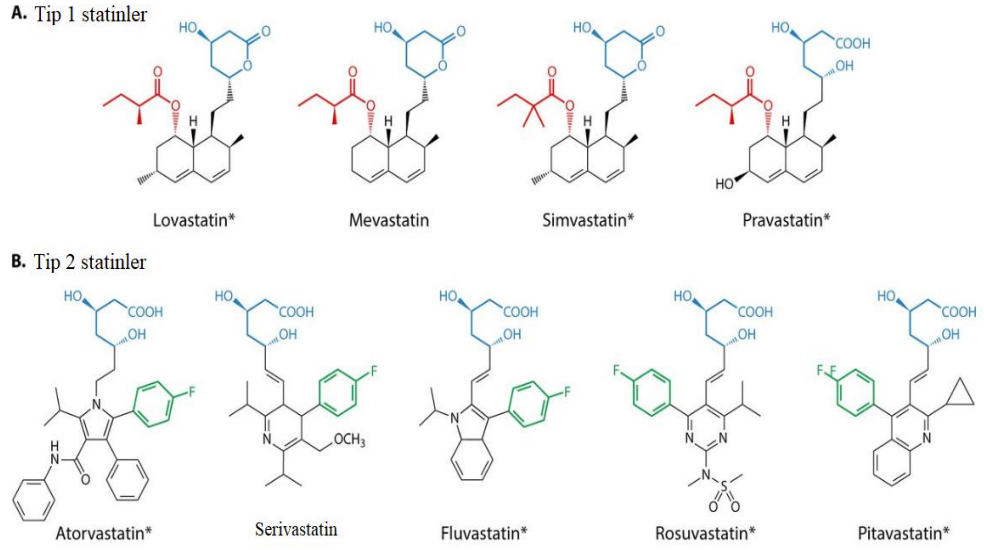
1.3. Statinler

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde lipitlerin düşürülmesi için ilk hedef LDL kolesteroldür. Statinler HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek hem karaciğer hücrelerinde kolesterol sentezini engeller hemde hücre yüzeyindeki LDL reseptörlerinin ekspresyonuna neden olarak ApoB içeren lipoproteinlerin klirensini artırır ve dolaşımdaki LDL kolesterol düzeyini azaltırlar (Ertaş 2009). Lipit düşürücü ilaçlar içerisinde yer alan statinler; standart dozlarda LDL kolesterol seviyesini % 25-45 oranında düşürürler. (Jones *et al.*1998) Aynı zamanda statinlerin LDL kolesterol seviyesini düşürmesinin yanında HDL kolesterol seviyesini %5-15 arttırmakta, trigliseridlerde ise %7-30 oranında azaltılmasına neden olurlar. Statinler yapısal farklarından dolayı Tip 1 ve Tip 2 olarak iki başlıkta incelenmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2.Tip 1, Tip 2 Statinler ve Moleküler Ağırlıkları

TİP 1	TİP 2
Lovastatin : 404.54 g/mol	Fluvastatin: 411.46 g/mol
Pravastatin: 424.53 g/mol	Serivastatin: 459.55 g/mol
Simvastatin: 418.57 g/mol	Atorvastatin: 558.64 g/mol
Mevastatin: 390.51 g/mol	Rosuvastatin:581.54 g/mol
	Pitavastatin: 421.46 g/mol

Lovastatin doğal bir molekül olup funguslardan izole edilmiştir, simvastatin ve pravastatin lovasatinin kimyasal modifikasyonlarıdır, ayrıca yapısal olarak da büyük oranda benzerlik gösterirler. Simvastatin ve lovastatin inaktif lakton yapıda bulunurlar ve 6 pozisyonunda bir metil grubuna sahiptirler, pravastatin ise 6 pozisyonundaki hidroksil grubu nedeniyle simvastatin ve lovastatinden ayrılır. Ayrıca simvastatin 2 pozisyonunda ek bir metil grubuna sahiptir. HMG-CoA redüktaz inhibisyonu için pravastatin aktif hidroksi-asit formunda bulunurken, simvastatin ve lovastatin inaktif lakton formunda bulunur ayrıca açık hidroksi-asit formuna dönüşmesi gerekir. Tip 2 statinlerinin hepsi (fluvastatin, serivastatin, atorvastatin, rosuvastatin) aktif hidroksi asit formlarında bulunur. Fluvastatin indol halka yapısında bulunurken, atorvastatin pirrol, rosuvastatin pirimidin bazlı halka yapısında bulunur. Lipofilik serivastatin ise piridin bazlı halka yapısına sahiptir (Hamelin and Turgeon 1998). Bu yapısal farklılıklar, lipofilisitedeki farklılıklara neden olur ve bu maddelerin hücre zarlarındaki geçiş durumlarını belirler. Pravastatin hücre zarlarını kolayca geçemezken, lovastatin ve simvastatinin hücre zarından geçişi oldukça kolaydır (Serajuddin *et al.*1991). Aynı zamanda pravastatin ve fluvastatin kan beyin bariyerinden geçemezken, lovastatin ve simvastatin kan beyin bariyerinden geçebilir (Guillot *et al.* 1993).



Şekil 1.6. Statinlerin Kimyasal Yapıları (Hennessy *et al.* 2016)

1.3.1. Statinlerin Kimyasal Yapısı

Statinler kimyasal yapılarında üç farklı bölgeye sahiptirler. Bu bölgeler HMG-CoA enziminin substratının analogu ve bu bölgeye statin bağlanmasını sağlayan hidrofobik halka sistemi ve farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplardır. Bütün statinlerde ana poliketit bölgesindeki hidroksi heksahidro naftalin halkası bulunur (Aktürk vd. 2006; Atlı ve Yamaç. 2012).

Statinler arasında lovastatin ve mevastatin doğal olarak bulunurken, fluvastatin, atorvastatin pravastatin, rosuvastatin, simvastatin ve serivastatin sentetik statinler olarak bilinirler. Lovastatin mevastatine ek olarak 6- α metil grubu ve metil bütirik zincirlerini bulundurur. Lovastatin biyosentezinde önemli rol alan monakolin J ve L’de, lovastatinde bulunan metil bütirik zincir yapısı yoktur. Sentetik statinlerin ve doğal statinlerin yapıları bakımından farklılıklar mevcuttur (Şekil 1.6). Sentetik statinlerde florofenil ve polar metan sülfomid grupları bulunur, simvastatinde ise 2. pozisyonda bir metil grubu mevcuttur. Bu yan gruplar, simvastatin lovastatin, fluvastatin ve atorvastatine lipofilik özellik kazandırır; pravastatin ve rosuvastatine ise hidrofobik özellik kazandırır. Statinlerdeki bağlantı bölgesi sayısı, HMG-CoA redüktaza bağlanma ilgisini belirler.

Sentetik statinlerde bulunan florofenil ve polar metan sülfomid grupları HMG-CoA redüktaza bağlanma ilgisini arttırmırlar (Atlı ve Yamaç. 2012).

1.3.2. StatinlerinBiyosentezi

Fungal lovastatin biyosentezinin başlangıcı asetat molekülleriyle oluşur. İki poliketit zinciri bağlanmasından sonra asetat ve metiyoninden oluşan ürün monakolin L'dir. Monakolin L'nin monooksijenazla hidroksilasyonundan sonra monakolin J oluşur. Monakolin J'nin esterifikasyonundan sonra son ürün olarak lovastatin bileşiği oluşur (Sorensen *et al.* 2003; Jia *et al.* 2010) (Şekil 1.7).

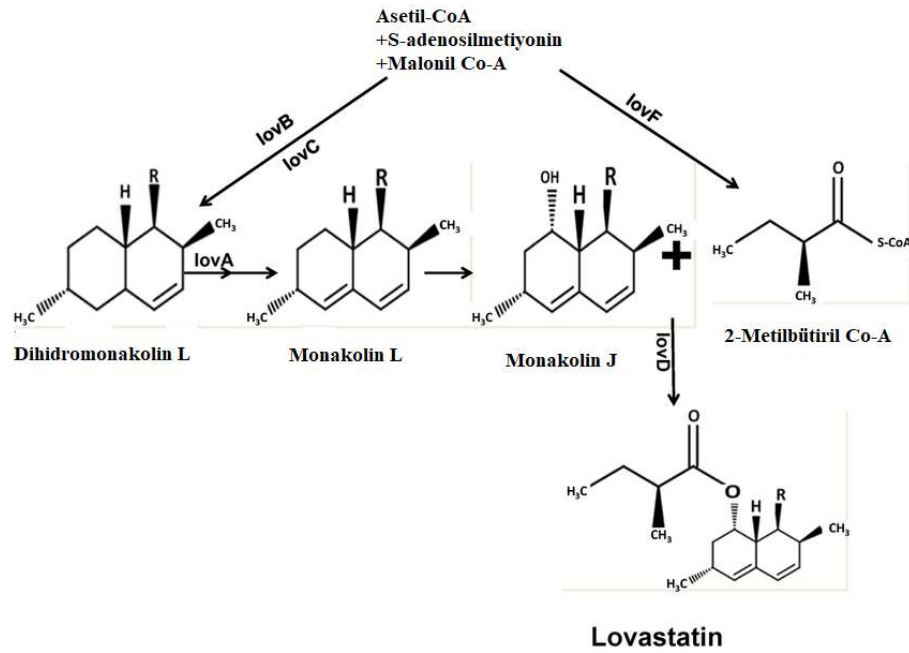
Lovastatin biyogenezinin araştırılmasında çoğunlukla *Aspergillus terreus* şısları model organizma olarak kullanılmaktadır. *A. terreus* 'un lovastatin üretimindeki sekonder metabolik yolağında öncül maddesi Asetil CoA'dır. Daha sonra Malonil CoA formu ile karboksilasyon yapılır. Statinlerin bazılarının yan zincirindeki metil grubu bazı funguslarda C6 metiyoninden türetilerek halka yapısı kapanmadan önce zincire eklenir. Ana zincir halkasal forma döner ve statinlerin bazılarında C8 yan zincirler tarafından esterlenerek, ana zincirde bulunan oksijen atomları ise öncül maddedeki oksijenin uzaklaştırılmasıyla yapılan aeorobik oksidasyonundan sonra eklenir (Atlı ve Yamaç. 2012).

Genetik araştırmalarında lovastatinin üretiminde rol alan iki poliketit zincirinin mekanizmaları çalışılmıştır (Manzoni and Rollini2002; Sorensen *et al.* 2003). *A. terreus*'un lovastatin üretimi inhibe edilen mutant şıslarında, multifonksiyonel poliketit sentaz sistem (PKSs), lovastatin nonketit sentazdan (LNKS) oluşur. LNKS, monakolin J'den metilbütiril yan zincir transferini sağlayan diketit sentaz (LDKS) ve heksahidronaftalin halka sistemi formundan ana poliketit zincir siklizasyonunu kapsar. LNKS, dihidromonakolin L'nin oluşmasını sağlayan biyosentetik yolağın ilk basamağında gerçekleşen reaksiyonları katalizler ve lovC ile etkileşen lovB geninin ürünüdür. Lovastatin üretiminin son basamağında LDKS; monakolin J deki 2-metilbütirik asitin bağlanmasını katalizleyen lovF tarafından yapılır. Aynı zamanda lovC'nin protein

1. GİRİŞ

rolünün lovB proteini aracılığıyla lovastatin yapısındaki nonketit zincirin doğru eklenmesi görevini üstlendiği belirlenmiştir. Aynı zamanda lovastatin biyosentezinde rol alan genlerden ORF1 veya lvrA geninin organizmayı lovastatine karşı dirençli hale getirdiği belirlenmiştir (Kennedy *et al.* 1999; Hutchinson *et al.* 2000).

Lovastatine duyarlı *A. nidulans*'ın bu gene sahip olduktan sonra lovastatine karşı dirençli hale geldiği ve *A. terreus*'un lovastatin biyosentezinde, lovastatinin kendi üretimini inhibe eden geri besleme kontrol mekanizması olduğu belirlenmiştir. (Hutchinson *et al.* 2000).

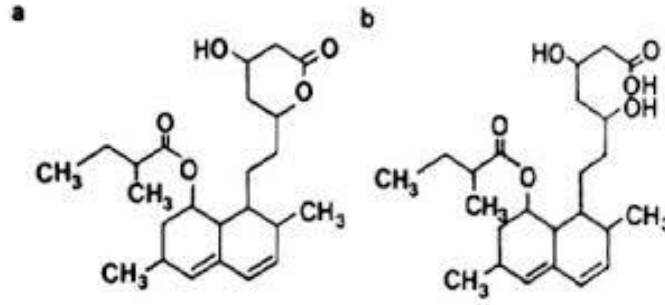


Şekil 1.7. Lovastatinin Biyosentez Yolağı (Mishal Subhan2016)

1.4. Lovastatin

Lovastatin; mevinolin, monacolin K ve mevacor olarak da adlandırılan statinler ilaç ailesine ait olan bazı filamentöz funguslardan izole edilen sekonder metabolitlerdir. 1987'de FDA tarafından onaylanan ilk statindir. Lovastatin kandaki kolesterol seviyesini

düşürücü ajan olarak HMG-CoA redüktazı yarışmalı inhibisyon etkisiyle inhibe ederek ilaç endüstrisinde kullanılan bir bileşiktir. Lakton formu ve hidroksi asit formu olarak iki formda bulunur (Şekil 1.8). Fermantasyon suyunda açık hidroksi asit formu (mevinolinik asit) olarak bulunur. İlaç olarak kullanıldığında ise kapalı lakton formu kullanılır. İn-vivo da lovastatinin lakton formu, açık hidroksi aside dönüştürülür, bu bileşiğin biyolojik olarak aktif formudur. Lovastatinin inhibe edici etkisi; açık hidroksi asit formunun HMG-CoA ile yapısal benzerliğinden kaynaklanır (Atlı ve Yamaç 2012).



A: Lakton Formu B: Hidroksi Asit Formu (Samiee *et al.* 2003)

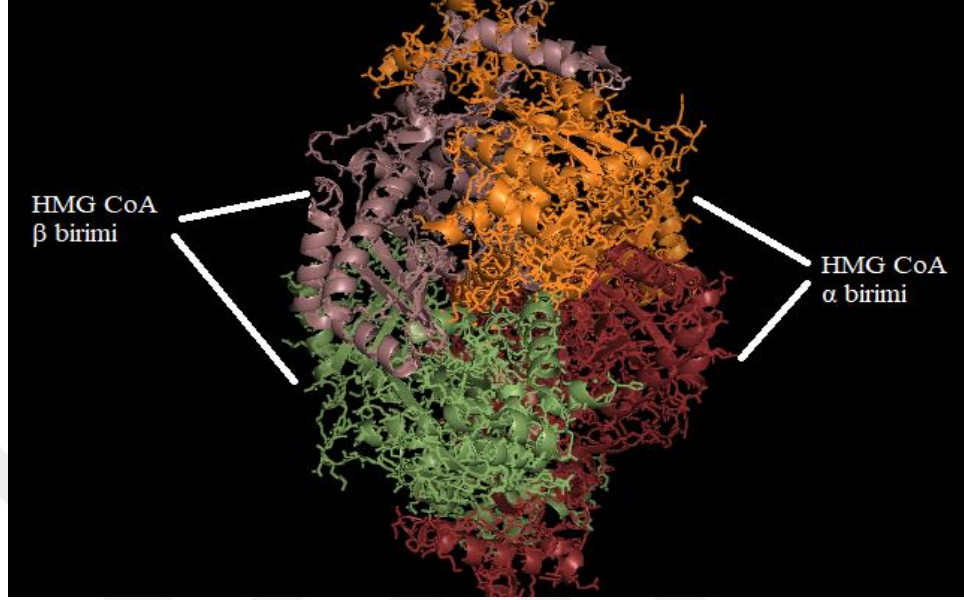
Şekil 1.8.Lovastatin Formları

1.4.1. Lovastatinin Etki Mekanizması

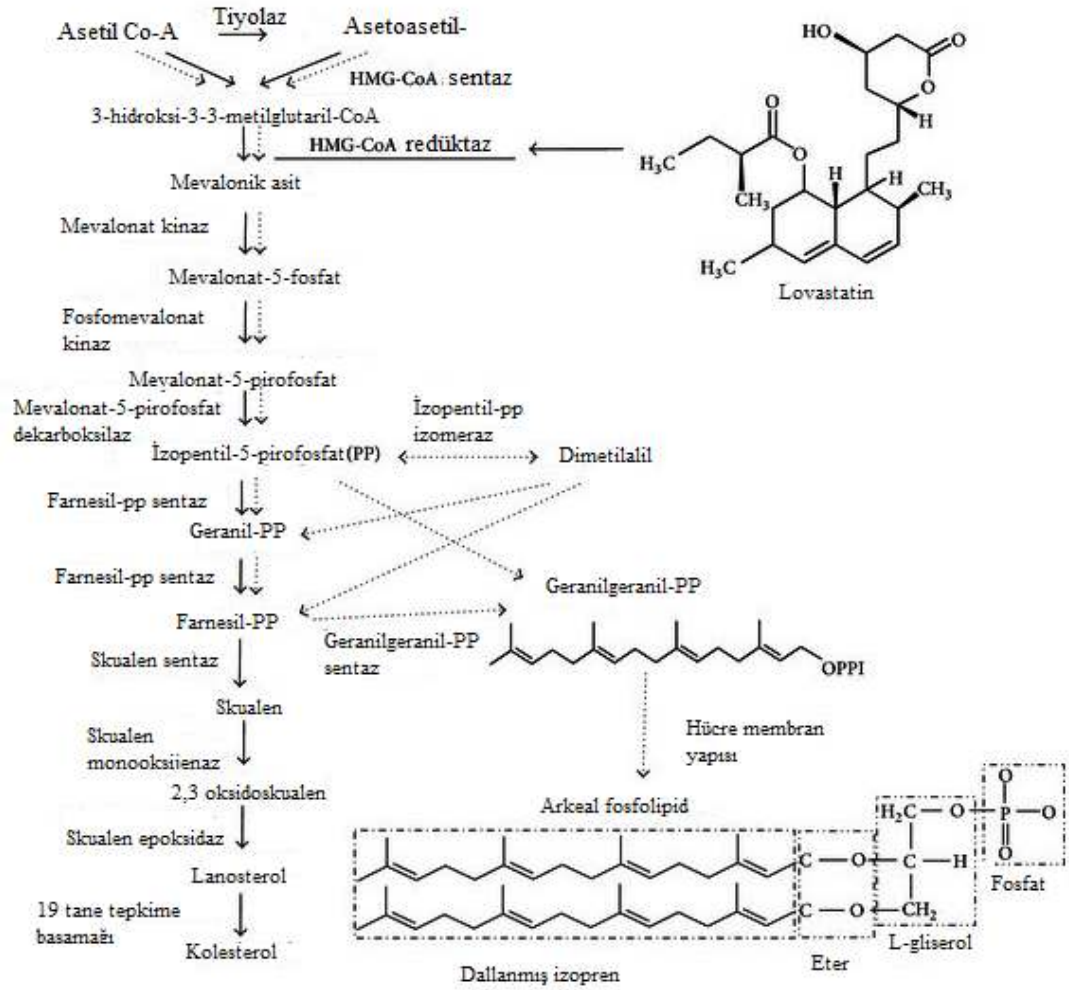
Lovastatin, kolesterol oluşum mekanizmasında (Şekil 1.10) mevalonik asitin oluşumunu engelleyerek kolesterol oluşum yolağını durdurur. Lovastatin HMG-CoA redüktazın yarışmalı inhibitörü olarak görev yapar (Şekil 1.9). Bu özelliklerinden dolayı lovastatin potansiyel bir kolesterol düşürücü ajan olarak kullanılır. Ayrıca son çalışmalarda lovastatinin koroner tedavisinde, kalp hastalıkları, böbrek hastalıkları, alzheimer hastalığı, kemik kırıkları vb. hastalıkların tedavisinin yanı sıra bazı tümörlerin in-vivo büyümesini baskılayabilme özelliğinden dolayı çeşitli tümör tiplerinin tedavisi için terapötik ajan olarak kullanılan çalışmalar mevcuttur. (Cummings and Bauer 2000; Wolozin 2002; Buemi *et al.* 2002) Lovastatinin antifungal aktivitesini ölçen çalışmalarda ise *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*,

1. GİRİŞ

Saccharomyces cerevisiae ve *Cryptococcus neoformans* gibi organizmalara antifungal etki gösterdiği belirtilmiştir (Macreadie *et al.*2006).



Şekil 1.9. Atorvastatin inhibitörüyle kristalize edilmiş HMG-CoA redüktazın yapısı. Atorvastatin, α ve β alt birimleri arasındaki arayüzlere bağlanır ve HMG-CoA redüktazın mevalonik asit oluşumunu engeller (Istvan and Deisenhofer 2000).



Şekil 1.10. Lovastatinin Kolesterol İnhibisyonu Üzerine Etki Mekanizması (Yong Meng Goh2013)

1.4.2. Lovastatin Biyosentezi

Monascus ruber ile ilgili yapılan ilk çalışma, monokolin J ve L'nin lovastatinin biyosentetik yolağında aracılık yaptığı belirlenmiştir. Monokolin L'nin hidroksilasyonla monokolin J'ye dönüştürüldüğü gözlemlenmiştir (Endo *et al.* 1985). Sonraki deneyler monokolin J'nin lovastatine dönüştüğünü göstermiştir (Kimura *et al.* 1990). *Aspergillus terreus*'la ilgili yapılan çalışmalarda ise lovastatinin biyosentetik yolunda iki poliketid zincir oluşturmak için baştan uca birbirine bağlanmış asetatlardan başladığı gözlemlenmiştir (Chan *et al.* 1983; Greenspan and Yudrovitz 1985; Moore *et al.* 1985; Shiao and Don 1987). Metil grubu bazı funguslarda C6 metiyoninden türetilerek halka yapısı kapanmadan önce zincire eklenir (Shiao *et al.* 1987). Daha sonra ana zincir C8'in yan zincirinden esterlenen bazı statinler ve ana zincirdeki oksijen atomları daha sonra aerobik oksidasyon yoluyla yapıya ilave edilirler. *M. Ruber* ve *P. citrinum*'da yapılan

bazı araştırmalarda benzer bir yol olduğu gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, lovastatinin polietilen yoluyla asetattan elde edildiği kanısına varılmıştır (Chakravarti and Sahai 2004; Endo *et al.* 1985). Yapılan diğer bir çalışmada, *A. terreus*'tan lovastatin biyosentezi için gerekli olan tip I poliketid sentaz (PKS) geni tanımlanmıştır. Günümüzde, lovastatinin ketid olmayan sentaz (LNKS) olarak isimlendirilen ürününün yedi aktif bölgesi olduğu gösterilmiştir (Hendrickson *et al.* 1999).

1.4.3. Lovastatinin Mikrobiyal Üretimi

Lovastatin başta *Monascus* sp., *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *A. niger* ve *Pleurotus* sp. olmak üzere bir çok fungus tarafından üretilir. Fakat ticari olarak *Monascus ruber*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. türleri sıklıkla kullanılır. Antihipokolesterolik ilaç olarak kullanılan lovastatin üretilmesi için genellikle *A. terreus* kullanılır (Lai *et al.* 2007; Pecyna and Bizukoje 2011; Subazini and Kumar 2011). Ticari üretimin temeli *A. terreus*'un büyük ölçekli fermantasyonuna dayanmaktadır. *A. terreus*'un fermantasyonu genel olarak 28°C ve pH: 5.8-6.3'te gerçekleştirilir. Ayrıca lovastatinin fermantasyonla üretimi, kimyasal sentezine göre daha düşük maliyetli bir işlemdir (Lai *et al.* 2001; Bizukoje and Ledakowicz 2007; Lai *et al.* 2007).

1.4.4. Lovastatinin Saflaştırılması

Lovastatin saflaştırılmasındaki metotlar, başlangıç olarak saflaştırma aşamasını içerir. *M. ruber*, *Pleurotus ostreatus* ve *A. terreus* ile yapılan çalışmalarda yaygın olarak kültür filtratları, etil asetat ile muamele edilmiştir (Yudkovitz 1985; Manzoni *et al.* 1998,1999; Kumar *et al.* 2000; Samiee *et al.* 2003; Ferrer *et al.* 2003; Greenspan and Yudrovitz 1985; Lee *et al.* 2006; Jia *et al.* 2010). Bazı çalışmalarda ise etil asetat yerine, asetonitril ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Askenazi 2003; Lopéz *et al.* 2003a; Porcel *et al.* 2006).

Bazı araştırmacılar ise, tarama işlemlerinin hızlandırılması için saflaştırmaya gerek kalmadan direkt kültür filtratından lovastatinin belirlenmesine yönelik metotlar geliştirmiştir (Ferrón *et al.* 2005; Hajjaj *et al.* 2001; Kysilka and Kren 1993). Bununla birlikte, lovastatin sıvı-sıvı ekstraksiyon etkinliğini optimize etmek için organik çözücü,

sıcaklık, pH şartlarına bakılarak çalışmıştır. Etanol ve metanol ekstraksiyonlarının *M. purpureus* kültürlerinden etil asetat ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında 20 kat daha fazla lovastatin sağladığı gözlemlenmiştir (Ajdari *et al.* 2011). Ayrıca, en fazla monokolin türevi, etanol ve metanol kullanılarak elde edilmiştir. Etanol ve metanol ekstraksiyonlarında, 30 dakika boyunca 60°C’de inkübasyonun, lovastatini daha etkili şekilde ekstrakte ettiği önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Lee *et al.* 2006).

M. ruber’den katı hal fermantasyonu ile lovastatin üretmek amacıyla çözücü olarak etil asetat kullanılmıştır. Çalışmaların bazılarında, kırmızı maya pirinçlerinde lovastatin üretmek için %80’lik metanol kullanılmıştır (Askenazi *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006; Song *et al.* 2012; Nigovic *et al.* 2013).

1.4.5. Lovastatinin Diğer Uygulama Alanları ve Geleceği

Alzheimer hastalığı beyin hücrelerinin bozulmasıyla meydana gelen bir hastalıktır. Nörotoksik β amiloid proteinlerinin üretilmesi ve birikimiyle meydana gelir. Yüksek kolesterol hastalarında lovastatin tedavisi alzheimer hastalığının yaygınlığında azalma göstermiştir. Bu çalışmalar hastaların %40’ında lovastatinin, kandaki A β seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Alzheimer hastalığının metabolizması ve sebepleri tam olarak anlaşılamasada, kolesterol metabolizması ve alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olduğunu yapılan çalışmalar sonrasında gösterilmiştir (Wolozin 2002).

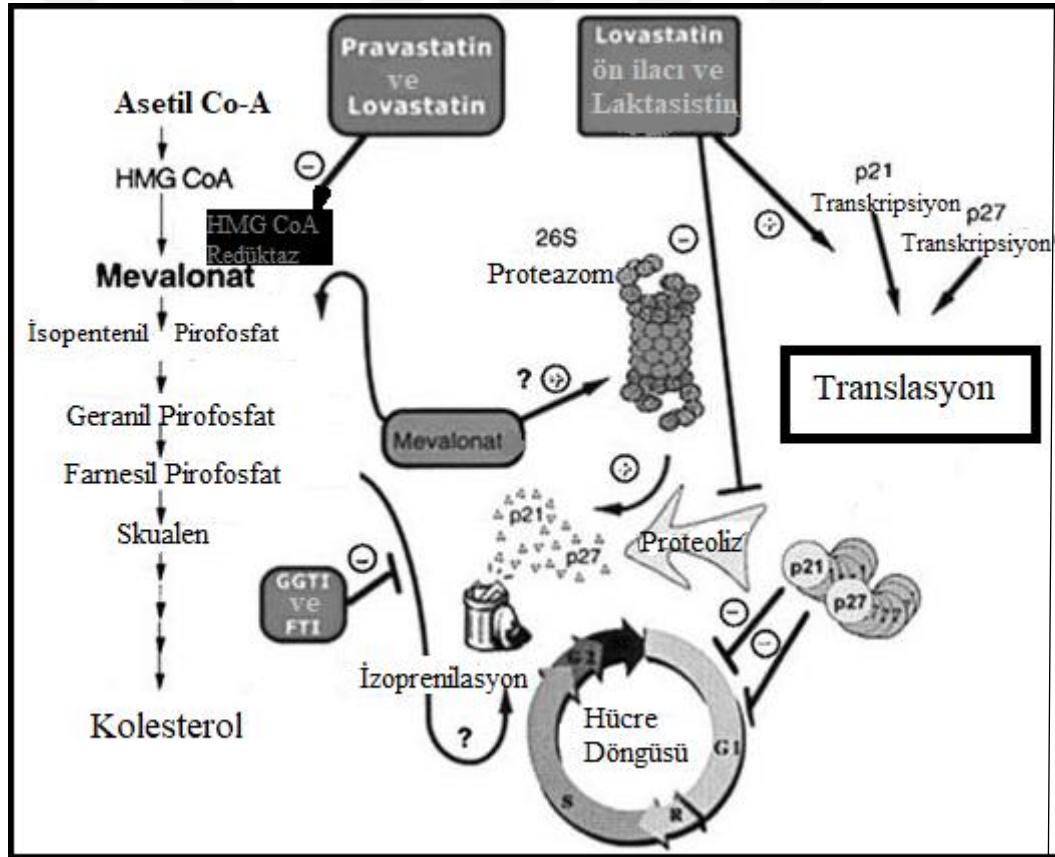
Lovastatin ayrıca böbrek hastalığının tedavisinde inflamatuvar yanıtı ve GTPaz RAS süperailisinin sitokin aktivitesini azaltır. Glomerülonefrit kaynaklı böbrek hasarlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Buemi *et al.* 2002).

Lovastatinin kemik oluşumu üzerindeki etkisi ilk olarak Mundy ve arkadaşları tarafından 1999 yılında gösterilmiştir. Statinlerin kemik oluşumu ve kemik mineral oranları üzerindeki yararlı etkisi ve kemik kırıkları riskini azalttıkları belirlenmiştir (Pahan *et al.* 2006). Kemik oluşumu üzerindeki lovastatin etkisi; nano dozajlarda lovastatin enjeksiyonu ile denenmiş ve yüksek dozajlarda in-vivo ve in-vitro’da kemik oluşumunu uyardığı gözlemlenmiştir. Özellikle belirli bölgelere uygulandığında femoral

1. GİRİŞ

kemik kırıklarının iyileştiği ve kortikal kırık boşluklarının azaldığı gözlenmiştir (Cummings and Bauer 2000).

Sharmila ve ark. tarafından yapılan çalışmada kanserli hücreler üzerinde lovastatinin antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise insan glioblastoma hücrelerinde kanser proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Xie *et al.* 2006). Statinlerin, birçok kanser hücresi tipinde antiproliferatif, antianjiyogenik ve proapoptotik etkileri yapılan birçok çalışmada mevcuttur. Lovastatinin proteazomun aktivasyonunu engelleyerek p21 ve p27'nin parçalanmasını inhibe edip kanser hücrelerindeki düzensiz büyümeleri engellediği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Sharmila *et al.* 1999) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Lovastatinin Ubikuitin-Proteazom Yolunu Modüle Ederek, Meme Kanseri Hücrelerinde Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri p21 ve p27'yi İndüklenme Mekanizması (Keyomarsi 1999).

1.5. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Günümüzde birçok alanda kullanılan fungal metabolitler ülkeler için ekonomik önem arz etmektedir. Özellikle sağlık alanında ilaç olarak kullanılan organik maddeler ülkelerin stratejik planlarında üst sıralarda yer almaktadır. Bilindiği gibi kolesterol günümüzde neredeyse her yaş grubundan birçok insanı etkilemektedir. Kolesterol düzenleyici ilaçlar bu nedenle dikkatleri üzerine toplamaktadır.

Filementöz funguslarla ilgili yapılan tarama çalışmalarında *Penicillium* (Hosobuchi *et al.* 1993; Konya *et al.* 1998; Bazaraa *et al.* 1998) ve *Aspergillus* türleri özellikle de *A. terreus* (Shindia 1997; Siamak *et al.* 2003) ön plana çıkmaktadır. Bunların yanında *A. parasiticus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. repens*, *A. umbrosus*, *A. versicolor*, *A. oryzae*, *Penicillium funiculosom*, *P. variable*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma viridae*, *T. longibrachiatum*, *Acremonium chrysogenum*, *Paecilomyces varioti*, *Pythium ultimum*, *Pleospora herbarum*, *Doratomyces stemonitis* ve *Scopolariopsis brevicaulis* türlerinin de yapılan tarama çalışmaları sonucu lovastatin üretici oldukları bildirilmiştir (Gunde-Cimerman *et al.* 1973; Shindia 1997; Siamak *et al.* 2003; Sree *et al.* 2011).

Lovastatin üretici organizmaların taranması genelde çeşitli koleksiyonlarda var olan ya da topraktan elde edilen izolatların taranması şeklinde olmuştur (Negishi *et al.* 1986; Samiee *et al.* 2003; Vilches Ferron *et al.* 2005; Sree *et al.* 2011). Bu çalışmaların sonucunda yeni lovastatin üretici türler literatüre kazandırılmış olmasına rağmen bu çalışmaların sayısı oldukça azdır (Mulder *et al.* 2015).

Bu tez çalışmasında fungusların topraktan izole edilerek, kolesterol düzenleyici özelliğe sahip olan lovastatin üretimi yönünden taranması ve moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Özellikle seçilen örneklem bölgesinin kendine has soğuk ve kurak iklim koşullarına sahip olması ve görece yüksek rakımda bulunması yönüyle yeni ya da lokal üretici türlerin literatüre kazandırılmasında avantajlı olacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

A.A. Shindia 1997’de yaptığı bir çalışmada Mısır’da topraktan alınan 14 fungus cinsine ait 25 tür mevinolin üretebilme yeteneğine göre taranmıştır. Çalışmada en iyi üreticinin *A.terrus* olduğu diğer potansiyel üreticiler ise *A. oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma viridae* olarak belirlenmiştir (Shindia 1997).

Manzoni ve arkadaşları 1999’da yaptıkları çalışmada bazı *Monascus* ve *Aspergillus* türlerini statinlerin üretimi için taramışlardır. En yüksek verimli üretici *A. terreus* suşları olarak belirlenmiştir. *A.terreus* BST izolatından soya fasülyesi unu ortamında 14 günde 230mg/L lovastatin, 118mg/L pravastatin elde edilmiştir. Statinlerin geri kazanımında ise lovastatinin *A.terreus*’da miselyuma yakın yerlerde kaldığı belirlenmiştir (Manzoni et al. 1999).

Hajjaj ve arkadaşları 2001’de yaptıkları çalışmada karbon ve azot kaynaklarının lovastatin biyosentezindeki etkisini araştırmak için bir ortam geliştirdiler. *A.terreus* tarafından metabolize edilen birkaç organik ve inorganik olarak tanımlanan nitrojen kaynağı arasından glutamat ve histidin en yüksek lovastatin biyosentez miktarını vermiştir (Hajjaj et al. 2001).

Samiee ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada 110 adet topraktan izole edilmiş fungus türü sıvı kültürde potansiyel lovastatin üreticisi olarak taranmış ve 9 türün lovastatin üreticisi olduğu TLC ve HPLC teknikleri kullanılarak kanıtlanmıştır. En iyi üretici *A. terreus* 55 mg/L olurken, *A. parasiticus* 4,5 mg/L, *A.fischeri* 2,0 mg/L *A.flavus* 9,0 mg/L , *A.umbrosus* 14,1 mg/L *Penicillium funiculosom* 19,3 mg/L , *Trichoderma viridae* 9,0 mg/L , *T. longibrachitaum* 1,0 mg/L , *Acremonium chrysogenum* 2,5 mg/L türleri lovastatin üreticisi olarak belirlenmiştir (Samiee et al. 2003).

Sayyad ve ark. 2007 da *Monascus purpureus* MTCC369 kullanılarak sıvı kültürde 5 besin parametresi taranmış ve yanıt yüzey metodolojisinin Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. En yüksek lovastatin konsantrasyonu 351mg/L ile (desktoz 29,59

2. KAYNAK ÖZETLERİ

g/L, NH_4Cl 3.86 g/L, KH_2PO_4 1.73 g/L, 0.86 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.19 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) oranındaki besi yerinden elde edilmiştir (Sayyad et al. 2007).

Porcel ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarında *A. terreus* ATCC 20542 suşunun sporla başlatılan sıvı besiyerinde biyokütle ve lovastatin üretiminin aşılama için kullanılmış olan sporların yaşına bağlı olduğu gösterilmiştir. Eski sporlardan başlatılan kültürlerin oldukça yüksek lovastatin oranları gösterdiği belirlenmiştir. İnokülasyon için kullanılan sporun 9 günden 16 güne değiştirilmesiyle %52 artış olduğu saptanmış ve 16 günlük sporla başlatılan kültürün 186.5 ± 20.1 mg/L verime sahip olduğu belirlenmiştir (Porcel et al. 2006).

Porcel ve arkadaşları 2006'da *A. terreus* tarafından lovastatin üretimi sırasında mekanik olmayan düşük yoğunluklu karıştırmanın etkilerini araştırmak için 20 L'lik karışımı gaz yolu ile sağlanan bulamaç bir balon reaktör kullanılmıştır. Fermantasyonlar %400 hava doygunluğu altında 0,5 ila 1,5 vvm arasında değişen gazlaşma oranlarında gerçekleştirilmiştir. Çok düşük türbülans ve düşük çözünmüş oksijen seviyelerinin lovastatin üretimini olumsuz yönde etkilediği görülmüştür. Lovastatinin en iyi üretimi ise aşırı derecede türbülans olmayan oksijen açısından zengin koşullar altında elde edilmiştir (Porcel et al. 2006).

Panda ve ark. 2010'da yaptıkları çalışmada *M. purpureus* ve *M. ruber* organizmalarının lovastatin üretim koşullarını optimize etmişlerdir ve maksimum lovastatin üretimi için denenmiş olan faktörlerin optimum değerleri *M. purpureus* ve *M. ruber* ko-kültürü için 29.46°C optimum sıcaklık, 13,89 gün fermantasyon süresi, 4,95 ml'lik inokülüm hacmi ve 6.03 başlangıç pH'sı, 9,68 g/L malt, dekstrozu 38,90 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,96 g/L ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,73 g/L ortamında 2,80 mg/g lovastatin üretimi gerçekleştirilmiştir (Panda et al. 2010).

A. terreus'un UV1718 suşu ile farklı substratlar ve bu substratların çeşitli kombinasyonları denenerek yapılan çalışmada maksimum lovastatin üretimi buğday kepeği destekli (DFM) besi ortamından elde edilmiştir. Ortam bileşenlerinin optimizasyonu için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılmış ve nem içeriği, substratın parçacık boyutu, di-potasyum hidrojen fosfat, eser iyon çözeltisi konsantrasyonu

optimize edilmiştir. Üretim verimi, optimize edilmemiş ortamlara göre 2,6 kat arttırılmıştır (Pansuriya and Singhal 2010).

Rashid' in 2014' te yaptığı çalışmada 17 fungal izolat izole edilmiş ve bunların 11 tanesinin lovastatin üreticisi olduğu bulunmuştur. *Fusarium pseudocircinatum* olarak tanılanan izolat, pirinç kepeği-kahverengi pirinç (1:1) ortamında $425 \pm 33,3$ mg/g ile belirlenmiştir (Syarifah Ab Rashid 2014).

Pandey ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada *Fusarium* spp. türlerinin potansiyel lovastatin üretim potansiyelleri incelenmiş ve 6 farklı *Fusarium* türünde; *Fusarium oxysporum* (NTCC 367), *F. moniliforme* (NTCC 390), *F. avenaceum* (NTCC 1056), *F. equiseti* (NTCC 1142), *F. solani* (NTCC 1145) ve *F. semitectum* (NTCC 1150) lovastatin üretimi katı ve sıvı besiyerinde üretim görülmüştür (Pandey *et al.* 2018).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarları (YUTAM) da yapılmıştır. Kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Cihaz Adı	Model
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Nanodrop	Thermo Scientific
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
PZR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST 3100F
Magnetik Karıştırıcı	Daihan, shr
+4 Soğutucu	Edesa
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Hassas Terazî	Shimadzu ATX 224

3.1.2. Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich (USA) ve Merck A.S. (USA) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1. Patates Dekstroz Agar

Patates dekstroz agar (PDA), 1 L'sinde 20 g dekstroz, 15 g agar ve 4 g patates infüzyonu bulunan bir besiyeridir. Ticari olarak satın alınmış toz besiyerinden 39 g tartılarak, 1 L saf suya eklenmiştir. Otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.3.2. Lovastatin Üretim Besiyeri

Bu besiyeri katı ve sıvı kültürde lovastatin üretimini teşvik etmek için kullanılmıştır. 50g sükroz, 20g soya unu, 1g KH₂PO₄, 1g NaNO₃ ve 0,5g MgSO₄ 7 H₂O tartılarak 1 L'de çözülerek pH 6,5'e ayarlandıktan sonra otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. Katı besiyeri için aynı besiyerine 15gr agar ilave edilerek hazırlanmıştır. 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Fungusların İzolasyonu

Örneklem bölgesi olarak 1800 metre ve üzeri rakıma sahip olan Erzurum ili seçilmiştir. Erzurum Merkez'de farklı bölgelerden toprak örnekleri alınarak, steril polietilen torbalarda laboratuvara getirilmiştir. Toprak örneklerinden hazırlanan seri dilüsyonlar, funguslar için standart besiyerlerine dökme plak yöntemi ile inoküle

edilmiştir. Petriler 10 gün süre ile incelenmiş, gözlenen filamentöz funguslar arka arkaya yapılan pasajlar sonucu saflaştırılmıştır.

3.2.2. Lovastatinin Üretimi

Saflaştırılan funguslar PDA besi ortamına ekilerek, 28°C’de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ardından sporlar hasat edilerek Lingappa *et al.* (2004) tarafından *A. terreus* için tarif edilen sıvı besi ortamına alınarak ve 28°C’de 180 rpm’de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.3. Lovastatinin Saflaştırılması

Ekstraksiyon Siamak *et al.* (2003) tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır. Kısaca, elde edilen kültür filtratının pH’sı HCL kullanılarak 3’e düşürüldükten sonra eşit hacimde etil asetat ilave edilmiş ve ısıtıcılı karıştırıcıda 260rpm’de, 28°C 2 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ardından santrüfjle organik faz alınarak bir sonraki çalışma için kullanılmıştır.

3.2.4. Lovastatin Üretici Fungusların Ön Seleksiyonu

Ön eleme çalışması için Pushpa *et al.* (2016) ve Prabhakar and Lingappa (2011)’den modifiye edilen metot kullanılmıştır. Kısaca, PDA besi ortamı üzerinde mantar delici iğne ile 18 mm çapında delikler açılmış, 24 saatlik *Candida albicans* kültüründen bu plaklara yayma ekim yapıldıktan sonra, açılan deliklerin birine bir üst basamakta hazırlanan ekstrakt (100µl), birine negatif kontrol olarak etil asetat; pozitif kontrol olarak ise standart lovastatin ve lovastatin ürettiği bilinen *Monascus purpureus*’dan elde edilen ekstrakt eklenmiştir. Petriler 28°C’de 2 gün inkübasyona bırakılarak, inhibisyon zonunun gözlemlendiği fungus izolatları lovastatin üretici olarak seçilmiş bir sonraki çalışma için kullanılmıştır.

3.2.5. Lovastatin Üretiminin İnce tabaka Kromatografisi (TLC) ile Doğrulanması

Ön seleksiyon basamağında zon veren fungus türlerine ait ekstraktlardan 50µl alınarak F254 (MERCK) ince tabaka kromatografisine standart lovastatin ile yüklenmiştir. Yürütücü faz olarak 7:3 (v/v) diklorometan:etil asetat karışımı kullanılmıştır. Ardından bantlar iyodin buharı/UV’de görünür hale getirilerek R_f değerleri standartla lovastatinle karşılaştırılmıştır (Siamak *et al.* 2003).

3.2.6. Absorbans Spektrum Taraması

Lovastatin üretiminin doğrulanmasında 3. basamak olarak elde edilen ekstraktların absorbans spektrum taraması yapılmıştır. Kısaca, elde edilen ekstraktlar etilasetat içerisinde 200-400 nm aralığında 1nm’lik artışla spektrofotometrede taranmış ve elde edilen pik değerleri standart lovastatinle karşılaştırılmıştır (Lingappa *et al.* 2004).

3.2.7. Standart Lovastatin Grafiğinin Hazırlanması

10 ml asetonitril içerisinde 10mg standart lovastatin çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Ardından bu solüsyon kullanılarak 30-120µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 238nm’de absorbans ölçümü yapılarak standart grafik hazırlanmıştır (Lingappa *et al.* 2004).

3.2.8. Lovastatinin Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmesi

TLC’de standart lovastatin ile benzer R_f değerlerine sahip olan bantlar kazınarak, 1ml asetonitrilde çözülerek filtre edilmiştir. Filtratlar 238 nm’de ölçülerek lovastatin konsantrasyonları bir önceki basamakta hazırlanan standart grafiğe göre hesaplanmıştır (Lingappa *et al.* 2004).

3.2.9. Fungusların Klasik Yöntemlerle Teşhisi

Fungusların tayini, tek spor izolasyonu yapıldıktan sonra, saf koloniler halinde geliştirilen izolatların koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri incelenerek

Hasenekoğlu (1991)'e göre yapılmıştır. Her bir izolatdan hazırlanan preparatlar, 200-400-1000 büyültmeli mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.10. Fungusların Moleküler Karakterizasyonu

Lovastatin üretici olduğu belirlenen funguslar PDA besiyerine ekilerek bir hafta inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresinin sonunda katı besiyerinden bir öze dolusu alınarak PureLink® Genomic DNA Mini Kit ile ürün talimatları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole DNA, bütünlüğü ve saflığı açısından %0,8'lik agaroz jelde 75 V'da 45 dakika boyunca yürütülerek değerlendirilmiştir. DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 50µl'lik reaksiyon karışımında ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde, Çizelge 3.2'de belirtilen bileşenler sırasıyla 0,2ml'lik Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) tüpüne konulmuş ve Çizelge 3.3'de belirtilen şartlarda çoğaltım yapılmıştır.

Çizelge 3.2. 10ng Kalıp DNA için 50µl PZR Reaksiyonu Bileşenleri

Saf su	32,5µl
Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	3 µl
Primer (F)	2 µl
Primer (R)	2 µl
gDNA	2 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
Toplam	50 µl

Çizelge 3.3. PCR Programı

95°C	2dk	
95°C	30sn	} 30 döngü
56°C	1dk	
72°C	1dk	
72°C	10dk	
4°C	∞	

Ardından çoğaltılan DNA fragmentleri, %1 lik 1xTAE tampon içinde DNA markırı ile yürütölmüş ve ticari bir firma aracılığıyla DNA dizi analizi yaptırılmıştır. DNA dizi analiz sonucu, BLASTN 2.2.26+ programı kullanılarak GenBank'ta bulunan ribozomal sekanslar ile karşılaştırılarak değeriendirilmiştir (Maksumova *et al.*2000).

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında yapılan bütün deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak önemli olup olmadıkları, SPSS 15 paket programı kullanılarak, 0.05 önem seviyesinde tek yöllu ANOVA testi ile belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Fungusların İzolasyonu

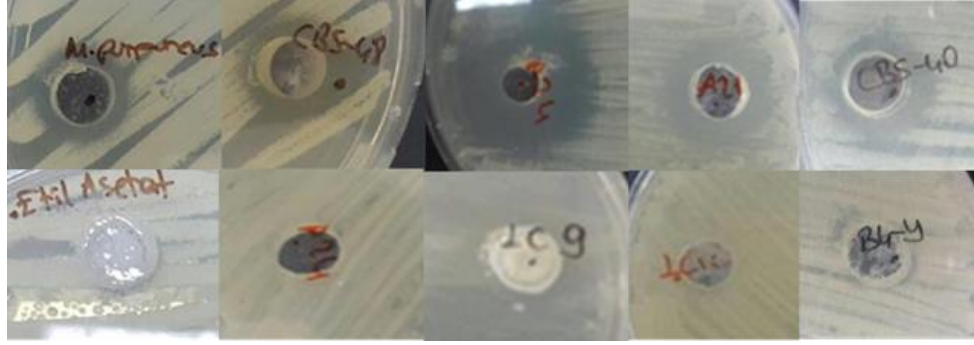
Tez çalışması kapsamında Erzurum Merkez’de 1800 metre ve üzeri rakıma sahip 20 adet noktadan yüzey toprakları alınarak, steril polietilen torbalara konulmuştur. Ardından laboratuvara getirilen toprak örneklerinden hazırlanan seri dilisyonlar PDA besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. İzolasyonlar sonunda 52 adet filamentöz fungus izolatu saflaştırılmıştır.

4.2. Lovastatinin Üretimi ve Saflaştırılması

Bir önceki basamakta saflaştırılan fungusların ön seçim işlemine alınması için lovastatin üretimini teşvik ettiği bilinen soya unu içeren besi ortamı hazırlanmış ve funguslar bu besiyerinde 1 hafta geliştirilmiştir. Kültür filtratlarının pH’sı HCL ile 3’e düşürüldükten sonra eşit hacim etil asetatla karıştırılmıştır. 2 saat inkübasyondan sonra organik faz alınarak evaporatörde uçurulmuştur.

4.3. Lovastatin Üretici Fungusların Ön Seleksiyonu

Ön eleme çalışması için kısaca, PDA besi ortamı üzerinde mantar delici iğne ile 18mm çapında delikler açılmış ve deliklerin birine; bir üst basamakta hazırlanan ekstrakt, negatif kontrol olarak etil asetat, pozitif kontrol olarak ise standart lovastatin ve lovastatin ürettiği bilinen *M. purpureus*’dan elde edilen ekstrakt eklenmiştir. Denemeye alınan 52 adet fungus izolatından 14 tanesine ait ekstraktın *C. albicans*’a karşı zon verdiği belirlenmiş ve bu izolatlar bir sonraki deney için seçilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Ekstraktların *C. albicans*'a Karşı Oluşturduğu Zonların Bazıları

Vilches Ferron *et al.* (2005) tarafından kullanılmaya başlanan tarama tekniği lovastatin üretici organizmaların belirlenmesinde kısa süreli ve ekonomik bir yöntem olarak kabul görmüştür. Tez çalışmasında da *Candida albicans* indikatör organizma olarak kullanılmış ve metodun işlevselliği doğrulanmıştır.

4.4. Lovastatin Üretimini İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Doğrulanması

Ön seleksiyon basamağında zon veren 14 fungus türüne ait ekstraktlardan 50 µl alınarak F254 (MERCK) ince tabaka kromatografisine standart lovastatin ile yüklenmiştir. Denemeye alınan 14 adet fungus izolatından 5 tanesine ait ekstraktın TLC'de standart lovastatinle aynı Rf değerinde bant verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.2). Bu izolatlara ait ekstraktlar bir sonraki deney için seçilmiştir.



Şekil 4.2. Ön Seleksiyon Basamağında Zon Ekstraktların TLC Sonuçları

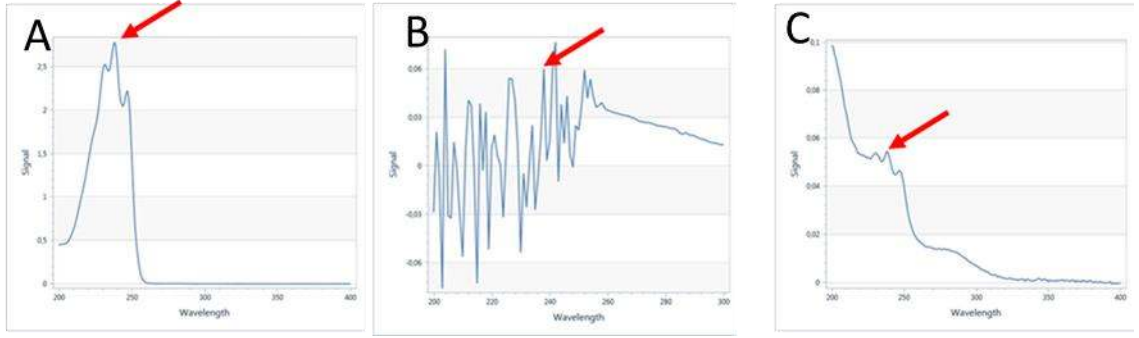
Çizelge 4.1.TLC’de Yürütülen Örneklerin Rf Değerleri

Fungus izolatları	Rf değerleri
Saf lovastatin	0,75
B5B	0,73
C6	0,71
C9	0,71
C11	0,72
HA4	0,75

Lovastatin üretici organizmaların taranması genelde çeşitli koleksiyonlarda var olan ya da topraktan elde edilen izolatların taranması şeklinde olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda birçok yeni lovastatin üretici tür literatüre kazandırılmıştır. Örneğin Samiee *et al.* (2003) Pers kültür koleksiyonundan elde edilen 110 fungusun taranması sonucu; bunlardan sadece 9 tanesinin lovastatin ürettiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise topraktan izole edilen fungusların aynı yöntemle taranması sonucu yaklaşık %32’sinin lovastatin üreticisi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada taranan 52 izolattan 5 tanesi lovastatin üretici olarak belirlenmiştir.

4.5. Absorbans Spektrum Taraması

Lovastatin üretiminin doğrulanmasında son basamak olarak elde edilen ekstraktların abzorban spektrum taraması yapılmış ve elde edilen pik değerleri standart lovastatin ile karşılaştırılmıştır(Şekil 4.3).

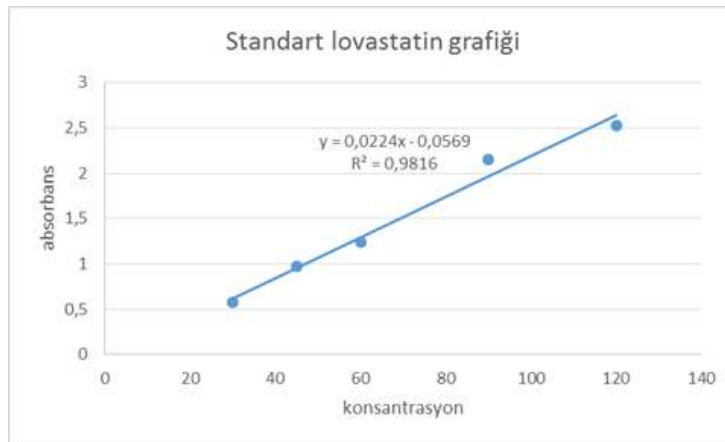


Şekil: 4.3.A. Saf lovastatinin 200-400 nm Arasındaki Spektrum Taraması; B. *Sarocladium strictum* (HA4)'e ait Ekstraktın 200-300 nm Arasındaki Spektrum Taraması; C. HA4'e ait Ekstraktın TLC'den Kazınarak Elde Edilen Saflaştırılmış Halinin 200-400 nm Arasındaki Spektrum Taraması

Absorbans spektrum analizi, ekstraktların 238nm dalga boyunda standartla benzer absorpsiyon pikine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca dalga boyu pikleri hem de TLC'de belirlenen Rf değerleri dikkate alındığında literatürde lovastatine (Lingappa *et. al.* 2004) ait verilerle uyum göstermektedir. Bu sonuçlar ekstraktlarda lovastatin varlığını doğrular nitelikte olup, aynı zamanda TLC ile alınan sonuçları doğrulamaktadır.

4.6. Standart Lovastatin Grafiğinin Hazırlanması

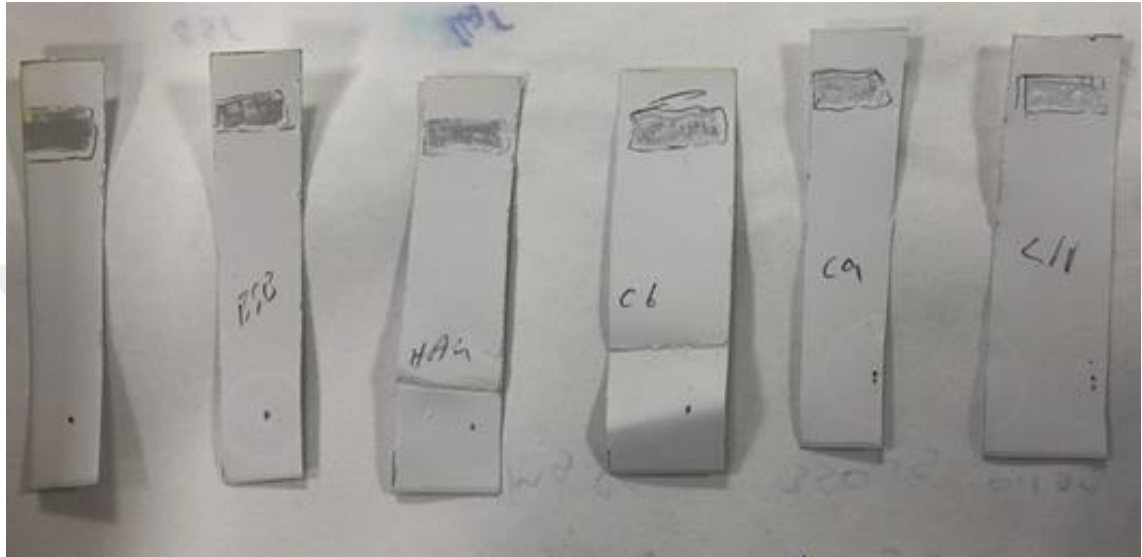
Saf lovastatinden 30-120 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 238 nm'de absorbans ölçümü yapılarak standart grafik elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4.Standart Lovastatin Grafiği

4.7. Lovastatinin Miktarının Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmesi

Seçilen 5 izolata ait TLC bantları kazındıktan sonra, 1 ml asetonitrilde çözülerek filtre edilmiştir (Şekil 4.5). Filtratlar 238nm’de ölçülerek lovastatin konsantrasyonları bir önceki basamakta hazırlanan standart grafiğe göre hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).



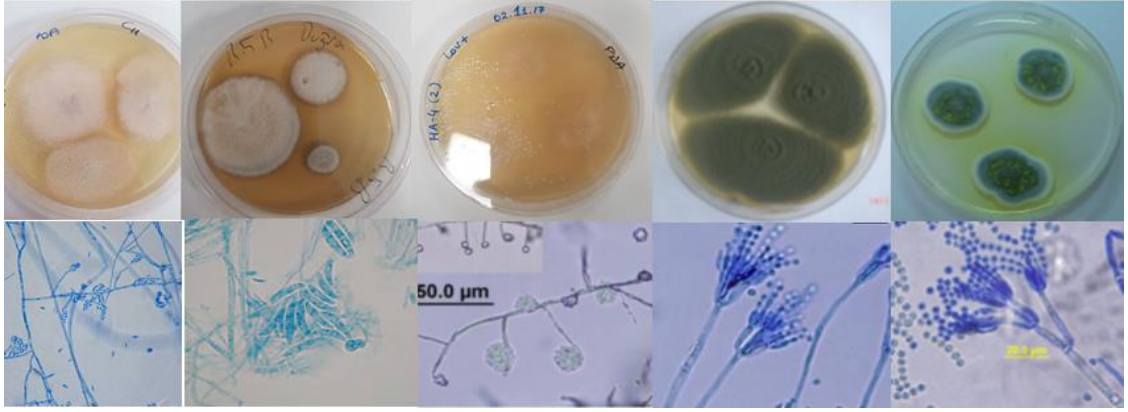
Şekil 4.5. TLC’den Elde Edilen Örnekler

Çizelge 4.2. İzolatların Lovastatin Üretim Miktarları

İzolat numarası	Lovastatin (mg/L)
B5B	20,90
HA4	43,77
C6	28,34
C9	27,59
C11	22,28

4.8. Fungusların Klasik Yöntemlerle Teşhisi

Yapılan mikroskopik inceleme sonucu B5B ve C11 izolatlarının *Fusarium*, C6 ve C9 izolatlarının ise *Penicillium* cinslerine ait olduğu; en yüksek lovastatin üretimine sahip olan HA4 izolatının ise *Sarocladium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Fungus Türlerinin Besiyerinde ve Mikroskoptaki Görüntüleri

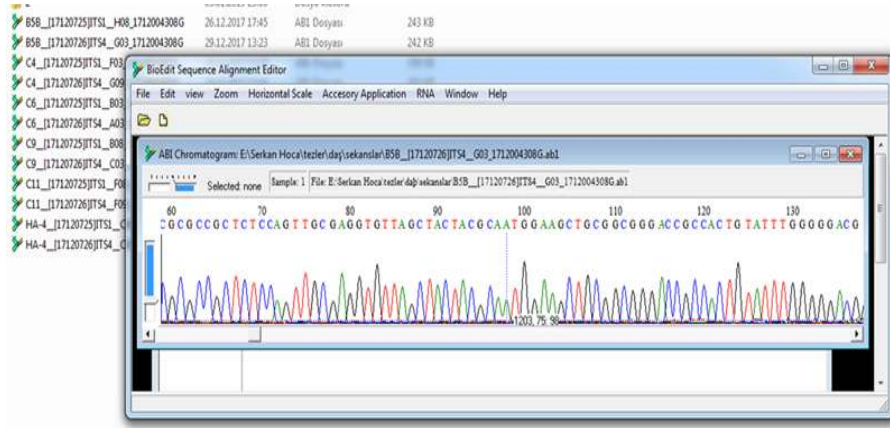
4.9. Fungusların Moleküler Karakterizasyonu

Seçilen 5 izolatın moleküler karakterizasyonu 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesi hedeflenerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen sekans verileri BioEdit programı ile birleştirildikten sonra BLASTN 2.2.26+ programı kullanılarak, GenBank'ta olan türlerle karşılaştırılmış (Maksumova *et al.* 2000)(Şekil 4.8) ve sonuçlarının mikroskopik incelemelerle desteklenmesi ile izolatlar tanımlanarak GenBank'a kaydedilmiştir (Çizelge 4.3). Filogenetik ağaç ise Mega 6 programı kullanılarak çizilmiş ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Lovastatin Pozitif Örneklerin ITS PCR Sonrası Jel Görüntüleri

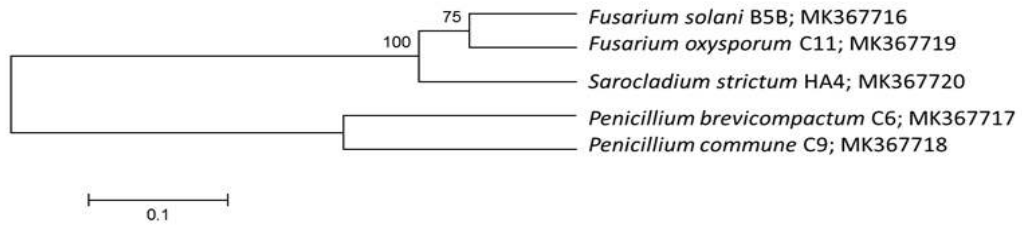
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.8. BioEdit Programı ile DNA Sekanslarının Birleştirilmesi

Çizelge 4.3. İzolatların Moleküler Tanı Sonuçları ve GenBank Erişim Numaraları

İzolat	Tür	GenBank erişim numarası
B5B	<i>Fusarium solani</i>	MK367716
C6	<i>Penicillium brevicompactum</i>	MK367717
C9	<i>Penicillium commune</i>	MK367718
C11	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK367719
HA4	<i>Sarocladium strictum</i>	MK367720



Şekil 4.9. Türlerin Filogenetik Dendrogramı

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Lovastatin üretici organizmaların taranması genelde çeşitli koleksiyonlarda var olan ya da topraktan elde edilen izolatların taranması şeklinde olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda birçok yeni lovastatin üretici tür literatüre kazandırılmıştır. Filamentöz funguslarla ilgili yapılan tarama çalışmalarında *Penicillium* (Hosobuchi *et al.* 1993; Konya *et al.* 1998; Bazaraa *et al.* 1998) ve *Aspergillus* türleri özellikle de *A. terreus* (Shindia 1997; Siamak *et al.* 2003) ön plana çıkmaktadır. Bunların yanında *A. parasiticus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. repens*, *A. umbrosus*, *A. versicolor*, *A. oryzae*, *Penicillium funiculosom*, *P. variable*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma viridae*, *T. longibrachiatum*, *Acremonium chrysogenum*, *Paecilomyces varioti*, *Pythium ultimum*, *Pleospora herbarum*, *Doratomyces stemonitis*, *Fusarium pseudocircinatum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. Equiseti*, *F. solani*, *F. semitectum* ve *Scopolariopsis brevicaulis* türlerinin de yapılan tarama çalışmaları sonucu lovastatin üretici oldukları bildirilmiştir (Gunde-Cimerman *et al.* 1973; Shindia 1997; Siamak *et al.* 2003; Sree *et al.* 2011; Pandey *et al.* 2018). Bu çalışmada ise *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium brevicompactum*, *P. commune* ve *Sarocladium strictum* olmak üzere 3 farklı cinse ait 5 filamentöz fungus lovastatin üreticisi olarak belirlenmiştir.

Fusarium cinsine ait iki tür hariç diğer organizmalardaki lovastatin varlığı bu çalışmada ilk kez gösterilmiştir. Fermantasyonun tipine, inkübasyon süresinin uzunluğuna ve besiyerinin bileşimine göre organizmaların ürettikleri lovastatin miktarları değişiklik göstermektedir. Ancak özellikle *A. terreus*'un lovastatin verimi diğer bütün türlerden daha yüksektir. Çeşitli çalışmalarda 900mg/L'ye kadar verim alındığı bildirilmiştir. Bu çalışmada *A. terreus* izole edilememiştir. Tez çalışmasında elde edilen B5B kodlu *F. solani* ve C11 kodlu *F. oxysporum* izolatlarından soya unu eklenmiş sıvı besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonucu, sırasıyla 20,90 ve 22,28 mg/l lovastatin verimi elde edilmiştir. Bu cinse ait lovastatin üretimi ile ilgili literatürde iki kayıt bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi 2018 yılında yayımlanmış olup, bu çalışmada izole edilen her iki *Fusarium* türünde lovastatin üretici olduğunu bildirmiş fakat bu çalışmada sadece zon ölçümü yapılmış olup, doğrulama basamakları ve üretim miktarı hesaplaması yapılmamıştır (Pandey *et al.* 2018). *Penicillium* cinsi diğer birçok endüstriyel ürün gibi lovastatin üretimi içinde önemli bir kaynak olarak literatürde yerini almıştır. Genelde *P.*

citrinum ve *P. chrysogenum* türleri lovastatin üretici türler olup; sıvı kültürde sırasıyla 61 ve 35 mg/L üretim verimine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada izole edilerek tanımlanan *P. brevicompactum* ve *P. commune* türleri ise sırasıyla 28,34 ve 27,59mg/ml verime sahiptir.

Mulder *et al.* (2015)'e göre tarama çalışmalarının neredeyse tamamında lovastatin ekstraksiyonu, miktar belirleme metotları ve büyüme koşulları farklı olduğu için üretim miktarlarının doğrudan karşılaştırılması mümkün değildir. Bu nedenle tez çalışmasında elde edilen üretim miktarlarının karşılaştırılması sağlıklı olmadığından çalışma sırasında en yüksek verime sahip olan izolat ön plana çıkarılmıştır.

Çalışmada en yüksek lovastatin verimi *Sarocladium strictum* HA4 izolatına ait olup, 43,77 mg/L lovastatin ürettiği belirlenmiştir. Literatürde aynı cinse ait başka bir tür olan *Acremonium chrysogenum*'un 2,5 mg/L'lik (Samiee *et al.* 2003) verimi ile karşılaştırıldığında bu izolatın lovastatin üretimi için ümit vadettiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında literatüre lovastatin üretici yeni lokal türler kazandırılmıştır. Sonraki çalışmalar ile ilgili öneriler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır;

- Lokal izolatlara ait lovastatin üretimi için fermantasyon çeşidi, inkübasyon koşulları, besiyeri bileşenleri optimize edilmeli ve üretim miktarları kontrol suşu olan *A. terreus* ATCC 20542 izolatı ile karşılaştırılarak değerlendirilmelidir.
- Saflaştırılan lovastatinlerin ileri teknikler ile karakterizasyonları gerçekleştirilmelidir.
- HMG CoA redüktaz aktiviteleri değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Ajdari, Z. Ebrahimpour, A. M. Abdul, M. Hamid , M. Mohamad, R. Ariff, A. B. 2011 Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *J Biomed Biotechnol*, 1-9.
- Aktürk, O. ve Altuntaş, İ. 2006. Hiperkolesterolemi oluşturulan ratlarda, HMGCoA redüktaz inhibitörü ilaçlarla (Statinler) tedavinin hipokampal NMDA reseptörü subunitlerine etkisi. Thesis, kitap.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J. and Hoffman, C. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7), 3957–3961.
- Anonymous, 2008. Therapeutic focus-cancer antibodies to take over from dominant statins.
- Anonymous, 2008. Web Sitesi: [www. evaluatepharma.com](http://www.evaluatepharma.com), Erişim Tarihi: 14.12.2018.
- Askenazi, M. 2003. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nat. Biotechnol*, 21, 150–156.
- Atlı, B. ve Yamaç, M. 2012. Fungal Metabolit Olarak Statinler: Aktivite, Biyosentez ve Üretim. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 10(2) 1-12.
- Baigent, C. Keech, A. Kearney, PM. Blackwell, L. Buck, G. and Pollicino, C. 2005. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366(9493), 1267-78.
- Bazaraa, W.A. Hamdy ,M.K. Toledo, R. 1998. Bioreactor for continuous synthesis of compactin by *Penicillium cyclopium*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, (2):192–202
- Bizukoje, M. Ledakowicz, S. 2007. A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*, 130, 422-435.
- Buemi, M., Senatore, M., Corica, F., Aloisi, C., Romeo, A., Cavallaro, E. and Frisina, N. 2002. Statins and progressive renal disease. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 76–84.
- Chakravarti, R. Sahai, V. 2004. Compactin a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 618–624.
- Chan, J.K. Moore, R.N. Nalashima, T.T. Vederas, J.C. 1983. Biosynthesis of mevinolin. Spectral assignment by doublequantum coherence NMR after high carbon-13 incorporation. *J Am Chem Soc*, 105, 3334–3336.
- Cummings, S. R., and Bauer, D. C. 2000. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? *JAMA*, 283(24), 3255–3257.
- Endo, A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 33(11), 1569–1582. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464741>

- Endo, A. Kuroda, M. and Tsujita, Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot (Tokyo), 29(12), 1346-8.
- Endo, A. Negishi, Y. Iwashita, T. Mizukawa, K. and Hiram, M. 1985 Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. J Antibiot (Tokyo), 38, 444-448.
- Ertas, F. S. 2009, Yaşam boyu tedavi perspektifinde statinler. Türk Kardiyol Dern Arş, 37, 29-36.
- Ferah, I. Avşar, U. and Albayrak, A. 2014. Are Statins Reliable Drugs as Mentioned? Indications and Risks for Statins. Journal of clinical and analytical medicine, 5(4), 341-6.
- Ferrer, M. Esquinas, A. Leon, M. Gonzalez, G. Alarcon, A. Torres, A. 2003. Noninvasive ventilation in severe hypoxemic respiratory failure: a randomized clinical trial. Am J Resp Crit Care Med, 168, 1438–1444.
- Greenspan, M.D. and Yudrovitz, J.B. 1985. Mevinolinic acid biosynthesis by *Aspergillus terreus* and its relationship to fatty acid biosynthesis. J Bacteriol, 162,704–707.
- Guillot, F. Misslin, P. and Lemaire, M. 1993. Comparison of fluvastatin and lovastatin blood-brain barrier transfer using in vitro and in vivo methods. J. Cardiovasc. Pharmacol. 21, 339–346.
- Gunde-Cimerman, N. Friedrich, J. Cimerman, A. and Benicki, N. (1973) Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Lett, (111): 203-206.
- Hajjaj, H., Niederberger, P., and Duboc, P. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology, 67(6), 2596-2602.
- Hamelin, B. A. and Turgeon, J. 1998. Hydrophilicity/ lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences, 19(1), 26–37.
- Hasenekoglu, I. (1991). Toprak mikrofungusları. Cilt I–VII. Erzurum: Atatürk Üniv. Yay.
- Hendrickson, L. Davis, C. R. Roach, C. Nguyen, D. K. McAda, P. C. and Reeves, C. D. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. Chem. Biol., 6, 429–439.
- Hennessy, E. Adams, C. Reen, F.J. and O’Gara, F. 2016. Is there potential for repurposing statins as novel antimicrobials?. Antimicrob Agents Chemother, 60,5111–5121.
- Hosobuchi, M. Fukui, F. Tatsukawa H, Suzuki and T. Yoshikawa, H. 1993. Morphology control of preculture during production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. J Ferment Bioeng 76, 476–4
- Hutchinson, C. R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S, Auclair, K. and Vederas, J., (2000). Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. Antonievan Leeuwenhoek 78: 287–295.
- Istvan, E.S. and Deisenhofer, J. 2000. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. Biochim Biophys Acta. 1529, 9–18.

- Jia, Z. Zhang, X. Zhao, Y. and Cao, X. 2010. Enhancement of Lovastatin Production by Supplementing Polyketide Antibiotics to the Submerged Culture of *Aspergillus terreus*, Appl Biochem Biotechnol, 160, 2014–2025.
- Jones, P. H., Davidson, M. H., Stein, E. A., Bays, H. E., McKenney, J. M. and Miller, E. 2003. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). The American Journal of Cardiology, 92(2), 152–160.
- Jones, P. Kafonek, S. Laurora, I. and Hunninghake, D. 1998. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). Am J Cardiol, 81, 582-7.
- Kannel, W. B. 1995. Clinical misconceptions dispelled by epidemiological research. Circulation, 92(11), 3350–3360.
- Kennedy, J. Auclair, K. Kendrew, S.G. Park, C. Vederas, J. C. and Hutchinson, C. R. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science, 284, 1368–1372.
- Keyomarsi, K. 1999. Web Site: <https://slideplayer.com/slide/224882/> Erişim tarihi; 2018
- Kimura, K. Komagata, D. Murakawa, S. and Endo, A. 1990. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin J to monacolin K (mevinolin). J Antibiot (Tokyo), 43, 1621-1622.
- Konya, A. Jekkel, A. Suto, J. Salat, J. 1998 Optimization of compactin fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol, (20):150–152
- Krauss, R. M. 1998. Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management. The American Journal of Medicine, 105(1A), 58S–62S.
- Kumar, M.S. Jana, S.K. Senthil, V. Shashanka, V. Kumar, S.V. and Sadhukhan, A.K. 2000. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. Process Biochemistry, 36, 363-368.
- Kuroda, M. Tsujita, Y. Tanzawa K. and Endo A. 1979. Hypolipidemic effects in monkeys of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Lipids, 14(6), 585-9.
- Kysilka, R. and Křen, V. 1993. Determination of Lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. Journal of Chromatography A, 630, 415-417.
- Lai, L.S. Hung, C.S. Lo, C.C. .2007. Effects of lactose and glucose on production of itaconic acid and lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. J Biosci Bioeng, 104, 9-13.
- Lai, L.S.T. Kuo, C.M. and Tsai, S.Y. 2001. Influence of increased dissolved oxygen tensions by agitation on the secondary metabolite production by a mutant of *Aspergillus terreus* in a 5L fermentor. J Chin Inst Chem Eng, 32, 135–142.
- Lee, C. L. Wang, J. J. Kuo, S.L. Pan, T.M. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent—monacolin K and antiinflammation agent monascin. Appl Microbiol Biotechnol, 72, 1254–1262.
- Lingappa, K. Vivek Babu, C.S. Siddalingeshwar, K. and Pramod, T. 2004. Isolation, screening and rapid confirmation of lovastatin producing strains of *Aspergillus terreus*. Indian Journal of Microbiology, 44(2), 133–135.

- Lopez, O.L. Kuller, L. H. Fitzpatrick, A. Becker, D. Beauchamp, J. N. 2003. Evaluation of dementia in the Cardiovascular Health Cognition Study. *Neuroepidemiology*, 22:1-12.
- Macreadie, I. G. Johnson, G. Schlosser, T. and Macreadie, P. I. 2006. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett*, 262:9-13.
- Maksumova, L. Ohnishi, K. Muratkhodjaev, F. Zhang, W. Pan, L. Takeshita, A. and Ohno, R. 2000 Increased sensitivity of multidrug-resistant myeloid leukemia cell lines to lovastatin. *Leukemia*, (14), 1444-1450
- Manzoni, M. and Rollini, M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 555-564.
- Manzoni, M. Bergomi, S. and Rollini, M. 1999. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 21: 253.
- Manzoni, M. Rollini, M. Bergomi, S. Cavazzoni, V. 1998. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnol. Tech*, 12, 529-532.
- Moore, R.N. Bigam, G. Chan, J.K. Hogg, A.M. Nakashima, T.T. Vederas, J.C. 1985. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevinolin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen atoms by carbon-13 NMR and mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 107, 3694-3701.
- Mulder, K.C.L. Mulinari, F. O. L. F. Soares, M.S.F., Magalhães, B. S. and Parachin, N. S. 2015. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnology Advances*, (33), 648-665.
- Negishi, S. Cai-Huang, Z. Hasumi, K. Murakawa, S. and Endo, A. 1986. Productivity of monacolin K (mevinolin) in the genus *Monascus*. *J Ferment Eng.*, (64), 509-512
- Nigovic, B. Sertic, M. Mornar, A. 2013 Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem*, 138 (1), pp. 531-538
- Pahan, K. 2006. Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(10), 1165-1178.
- Panda, B. P. Javed, S. and Ali, M. 2010. Optimization of Fermentation Parameters for Higher Lovastatin Production in Red Mold Rice through Co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food Bioprocess Technol.*, 3(3), 373-378.
- Pandey, V.V. Verma, S. Gupta, N. Varshney, V.K. and Pandey, A. 2018. Screening of different *Fusarium* species for bioassay of lovastatin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 127-139.
- Pecyna, M. and Bizukojc, M. 2011. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. *J Biotechnol*, 151, 77-86.
- Porcel, P.E.M. Casas Lopez, J.L. Sanchez Perez, J.A. Fernandez Sevilla, J.M. Garcia Sanchez, J.L. Chisti, Y. 2006. *Aspergillus terreus* broth rheology, oxygen transfer and lovastatin production in a gas-agitated slurry reactor. *Ind Eng Chem Res*, (45), 4837-4843.

- Prabhakar, M. and Lingappa, K. 2011. Screening of *Aspergillus terreus* Klvb28 mutants by bioassay method for the overproduction of lovastatin (A vital statin in coronary heart disease). Research Journal of Biotechnology, 6(3), 33–35.
- Pushpa, H. Priyata, H. Nomita Devi, K. Onya, N. Vijayalakshmi, A. and Ramesh, D.H. 2016. Screening of lovastatin (HMG-CoA reductase inhibitor) from edible wild mushrooms. Current Research in Environmental & Applied Mycology 6(3), 190–196, Doi 10.5943/cream/6/3/6
- Sharmilla, R., Gray-Bablin, J., Herliczek, T. W. and Keyomarsi, K. 1999. The Biphasic Induction of p21 and p27 in Breast Cancer Cells by Modulators of cAMP Is Posttranscriptionally Regulated and Independent of the PKA Pathway. Experimental Cell Research, 252(1), 211–223.
- Rashid, S. A.B. Darah, I. and Aryantha, N. P. 2014 Isolation and Screening of Lovastatin Producing Fungi: *Fusarium pseudocircinatum* IBRL B3-4 as a Potential Producer. Journal of pure and applied microbiology, Vol. 8(3), p. 1763-1772.
- Saku K., Zhang B., and Noda K. 2011. Randomized head-to-head comparison of pitavastatin, atorvastatin, and rosuvastatin for safety and efficacy (quantity and quality of LDL): the PATROL trial. Circ J. Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society, 75(6), 1493–1505.
- Samiee, S.M. Moazami, N. Haghighi, S. Mohseni, F.A. Mirdamadi, S. and Bakhtiari, M.R. 2003 Screening of lovastatin production by filamentous fungi. Iran Biomed J, 7, 29–33.
- Sayyad, S.A. Panda, B.P. Javed, S. and Ali, M. 2007 Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology Appl. Microbiol. Biotechnol., (73), pp. 1054-1058.
- Serajuddin, A. T., Ranadive, S. A. and Mahoney, E. M. 1991. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. Journal of Pharmaceutical Sciences, 80(9), 830–834.
- Sharmilla, R. Porter, D.C. Chen, X. Herliczek, T. Lowe, M. and Keyomarsi, K. 1999. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. Proc Natl Acad Sci USA, (96) 7797-7802.
- Shiao, M.S. and Don, H.S. 1987. Biosynthesis of mevinolin, a hypocholesterolemic fungal metabolite, in *Aspergillus terreus*. Proc Natl Sci Counc Repub China B, 11, 223-231.
- Shindia, A.A. 1997. Mevinolin production by some fungi. Folia Microbiol, (42), 477-480
- Song, F. El-Demerdash, A. Lee, S.J. Smith, R.E. 2012. Fast screening of lovastatin in red yeast rice products by flow injection tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, (57), pp. 76-81
- Sorensen, J. L., Auclair, K., Kennedy, J., Hutchinson, C. R. and Vederas, J. C. 2003. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the lovA and lovC genes. Organic & Biomolecular Chemistry, 1(1), 50–59.

- Sree, D. K. Venkateswara, R. J. Lakshmi, N. M. SaiKrishna, K. 2011 Isolation and screening of lovastatin producing *Aspergillus terreus* fungal strains from soil samples. *IJPT*, (3), 2772-2782.
- Stein, E. Plotkin, D. Bays, H. Davidson, M. Dujovne, C. and Korenman, S. 2000. Effects of simvastatin (40 and 80 mg/day) in patients with mixed hyperlipidemia. *Am J Cardiol*, 86(4), 406-11.
- Subazini, T.K. and Kumar, G.R. 2011. Characterization of Lovastatin biosynthetic cluster proteins in *Aspergillus terreus* strain ATCC 20542. *Bioinformation*, 6, 250–254.
- Subhan, M. Faryal, R. and Macreadie, I. 2016. Exploitation of *Aspergillus terreus* for the Production of Natural Statins. *J Fungi*, 2,13.
- Tobert, J. A. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 517–526.
- Vantage, EP. 2008. Therapeutic focus cancer antibodies to take over from dominant statins. London Evaluate Pharma,
- Vilches Ferron, M. A. Casas Lo'pez, J. L. Sa'nchez Pe'rez, J. A. Ferna'ndez Sevilla, J. M. and Chisti, Y. 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World J Microb Biot*, 21, 123–125.
- Wolozin, B. 2002. Cholesterol and Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 525–529.
- Xie, X., Watanabe, K., Wojcicki, W. A., Wang, C. C. C. and Tang, Y. 2006. Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Acyltransferase. *Chemistry & Biology*, 13(11), 1161–1169.
- Yamamoto, A. Sudo, H. and Endo, A. 1980. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 35(3), 259-66.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Abdul Saltuk Buğra DAŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.09.1990 Erzurum
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +905388384135
e-mail : bugra.das@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Erzurum Lisesi	2007

ÜSTÜN AYŞE, TURGUT ALPGİRAY, ALBAYRAK BÜŞRA, DAŞ ABDULSALTUK BUĞRA, YAZICI AYŞENUR (2018). Antibiofilm Effect of Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against Staphylococcus aureus. International Symposium on Applied Sciences and Engineering (ISASE 2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4512296)