

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPERGILLUS NIGER VE TRICHODERMA
***VIRILENTE* MANTARLARI ÜZERİNE**
FARMAKOĞNOZİK ARAŞTIRMALAR

Zehra TORUN

FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 114S916 numaralı BMBF projesi ile desteklenmiştir

ANKARA

2021

ETİK BEYAN FORMU

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Aspergillus niger* ve *Trichoderma virilente* Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Zehra TORUN

16.06.2021

KABUL ONAY FORMU

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalında

Zehra TORUN tarafından hazırlanan

“*Aspergillus niger* ve *Trichoderma virilente* Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.06.2021

Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Alper GÖKBULUT

Ankara Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. Didem DELİORMAN ORHAN

Gazi Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Mehmet Levent ALTUN

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Didem ŞÖHRETOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN FORMU	ii
KABUL ONAY FORMU	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xiv
ÇİZELGELER	xviii

1. GİRİŞ	1
1.1. Doğal Ürünler	1
1.1.1. Doğal Ürün Tanımı	1
1.1.2. Doğal Ürünlerin Tarihsel Kayıtları	1
1.1.3. Doğal Ürünler (Sekonder Metabolitler)	2
1.1.4. Doğal Ürün Kaynaklı İlaçlar	4
1.2. Deniz Kaynaklı Doğal Ürünler	9
1.2.1. Deniz Kaynakları Üzerine Genel Bilgiler	9
1.2.2. Deniz Kaynaklı Canlılar	13
1.2.3. Deniz Kaynaklarından Elde Edilen Başlıca Sekonder Metabolit Türleri	15
1.2.4. Deniz Kaynaklı İlaçlar ve Son Güncellemeler	21
1.2.5. Deniz Kaynaklı Mantarlar	29
1.3. <i>Aspergillus</i> Cinsi Mantarlar	34
1.3.1. Deniz Kaynaklı <i>Aspergillus niger</i> Mantarı Üzerine Çalışmalar	36
1.4. <i>Trichoderma</i> Cinsi Mantarlar	45
1.4.1. Deniz Kaynaklı <i>Trichoderma virilente</i> Mantarı Üzerine Çalışmalar	47
1.5. Çalışmanın Amacı	47

2. GEREÇ VE YÖNTEM	48
2.1. Gereç	48
2.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	48
2.1.2. <i>Trichoderma virilente</i>	50
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar	51
2.1.3.1. Cihaz ve Ekipmanlar	51
2.1.3.2. Çözücüler	52
2.1.3.3. Kimyasallar	52

2.2. Yöntem	53
2.2.1. Mantar İzolasyonu ve Saflaştırma	53
2.2.1.1. Kullanılan Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanışı	54
2.2.1.2. Mantar İzolasyonu	54
2.2.1.3. Mantarların Saflaştırılması	55
2.2.1.4. Saf Mantar Türlerinin Uzun Süreli Saklanması	56
2.2.1.5. Mantarların Tür Teşhis Tayinleri	56
2.2.1.6. Küçük Ölçekli Mantar Ekimi	57
2.2.1.7. Büyük Ölçekli Mantar Ekimi	58
2.2.2. Mantarların Ekstraksiyonu	59
2.2.3. Sekonder Metabolit İzolasyonu	59
2.2.3.1. Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK) Yöntemi	59
2.2.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Yöntemi	60
2.2.3.3. Açık Kolon Kromatografisi Yöntemi	61
2.2.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi	62
2.2.3.5 Madde 1 İzolasyonu	63
2.2.3.6 Madde 2 İzolasyonu	64
2.2.3.7 Madde 3 İzolasyonu	65
2.2.3.8 Madde 4 İzolasyonu	65
2.2.3.9 Madde 5 ve Madde 6 İzolasyonu	66
2.2.3.10 Madde 7 İzolasyonu	67
2.2.3.11 Madde 8 İzolasyonu	68
2.2.3.12 Madde 9 ve Madde 10 İzolasyonu	69
2.2.5 İzole Edilen Madde Teşhis Yöntemleri	70
2.2.5.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi	70
2.2.5.2 Gaz Kromatografisi (GK)/Kütle Spektrometresi (KS)	70
2.2.6 Aktivite Çalışmaları	71
2.2.6.1 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	71
2.2.6.2 ABTS Radikali Süpürücü Aktivite Tayini	71
2.2.6.3 Süperoksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	72
2.2.6.4 Nitrik Oksit (NO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	73
2.2.6.5 Antimikrobiyal Aktivite Tayini	73
2.2.6.6 Sitotoksik Aktivite Tayini	74
2.2.6.7 Antienflamatuar Aktivite Tayini	74
2.2.6.8 Antialerjik Aktivite Tayini	75
3. BULGULAR	76

3.1 Mantar Ekstraksiyon Bulguları	76
3.2. Sekonder Metabolit İzolasyonu Bulguları	77
3.2.1 Vakum Sıvı Kromatografi Bulguları	80
3.2.2 Açık Kolon Kromatografisi Bulguları	82
3.2.3 Madde 1 İzolasyon Bulguları	82
3.2.4 Madde 2 İzolasyon Bulguları	85
3.2.5 Madde 3 İzolasyon Bulguları	87
3.2.6 Madde 4 İzolasyon Bulguları	90
3.2.7 Madde 5 ve Madde 6 İzolasyon Bulguları	92
3.2.8 Madde 7 İzolasyon Bulguları	95
3.2.9 Madde 8 İzolasyon Bulguları	97
3.2.10 Madde 9 ve Madde 10 İzolasyon Bulguları	100
3.3. İzole Edilen Maddelerin Teşhis Bulguları	101
3.3.1 Madde 1 Teşhis Bulguları	104
3.3.2 Madde 2 Teşhis Bulguları	113
3.3.3 Madde 3 Teşhis Bulguları	122
3.3.4 Madde 4 Teşhis Bulguları	132
3.3.5 Madde 5 ve Madde 6 Teşhis Bulguları	139
3.3.6 Madde 7 Teşhis Bulguları	151
3.3.7 Madde 8 Teşhis Bulguları	156
3.3.8 Madde 9 ve Madde 10 Teşhis Bulguları	158
3.4. Aktivite Çalışma Bulguları	172
3.4.1. Antioksidan Aktivite Bulguları	172
3.4.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	173
3.4.3. Sitotoksik Aktivite Bulguları	174
3.4.4. Antienflamatuar Aktivite Bulguları	174
3.4.5. Antialerjik Aktivite Bulguları	176
4. TARTIŞMA	177
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	183
ÖZET	186
SUMMARY	187
KAYNAKLAR	188
ÖZGEÇMİŞ	214

ÖNSÖZ

“*Aspergillus niger* ve *Trichoderma virilente* Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” başlıklı bu doktora tezi çalışması, *Aspergillus* ve *Trichoderma* iki farklı mantar cinsinin birer türü üzerinde, ülkemiz denizlerinde yaşayan canlılardan elde edilen mantarlardan yapılan ilk çalışmadır. Bu tez çalışması, çalışma kapsamında elde edilen mantarların ve izole edilen bileşiklerin gösterdikleri biyoaktiviteye dair verileri kapsamaktadır.

Deniz kaynaklı mantarlarla çalışma konusunda beni yönlendiren, deneysel çalışmalarım ve tez yazım sürecinde derin bilgisini ve tecrübesini esirgemeyerek sonsuz desteğini hep hissettiğim, çalışkanlığı, özgünlüğü, hayata bakış açısı ve vizyonu ile bana çok şey katan danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Var oldukları her an için minnet duyduğum, hiç bir zaman beni yalnız bırakmayan, yaşadığım tüm zorluklarda en büyük destekçim olan hayatımın en büyük varlığı ve yaşama sevincim ailem, doktora eğitimimde de yanımda olarak ödeyemeyeceğim haklarına yenilerini eklemişlerdir. Birtanem annem başta olmak üzere ailemin bütün fertlerine en kalbi şükür ve minnetlerimi sunarım.

Sınır tanımayan dalış tutkusunu akademik bir katkıya dönüştüren, çalıştığımız materyalleri bizim için engin denizlerden toplayan kıymetli Dr. Bülent GÖZCELİOĞLU’na da teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım boyunca onlarla çalışmaktan gurur duyduğum, güzel ve unutulmaz anılar biriktirdiğim kıymetli arkadaşlarım Dr. Eczacı İbrahim Seyda URAS ve Dr. Eczacı Amine Dilara PİLEVNELİ’ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın sonuçlandırılmasında emeği yadsınamaz olan, yurtdışından buraya gelen ve rehberlik eden, saygıdeğer hocam Sherif Saed EBADA’ya şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarına gösterdikleri desteklerden dolayı sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ ve Muhiddin ÇERGEL'e içtenlikle saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile eğitimime önemli bir maddi destek sunmuş olan Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK)'na, araştırmamızı da içeren 114S916 numaralı BMBF projesini kabul eden TÜBİTAK'a sağlamış oldukları imkanlar için teşekkürlerimi sunarım.

Bana yaşamı ve yaşamın içerisinde tüm bu güzellikleri hediye etmiş olan Yaratıcıma şükretmeyi vazife bilirim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

^{13}C -NMR	Karbon nükleer manyetik rezonans
^1H - ^1H COSY	İki boyutlu bağıntılandırılmış homonükleer (H,H) spektroskopisi
^1H -NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
a/h	Ağırlık/Hacim
A23187	Mobil iyon taşıyıcı
A549	Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücre hattı
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADC	Antikor ilaç konjugatı
APT	Ekli Proton Testi
Ara-A	9- β -D-arabinofuranosiladenin
Ara-C	Sitozin arabinosid
B	Biyolojik makromolekül
BCMA	B hücresi olgunlaşma antijeni
CD	Farklılaşma kümesi
CDCl_3 -d	Dötere kloroform
CLSI M07-A9	Aerobik olarak büyüyen bakteriler için seyreltme antimikrobiyal duyarlılık testleri yöntemleri
CLSI M27-A3	Mayaların besiyeri seyreltme antifungal duyarlılık testi için referans yöntemi
c-Met	Tirozin-protein kinaz met
COX-2	Siklooksijenaz-2
CX-1	İnsan kolon kanseri hücre hattı
δ	Kimyasal kayma göstergesi
d	Dublet
Da	Dalton
DCM	Diklorometan
Dd	Dublet dublet

DEPT	Polarizasyon transferi ile distorsiyonsuz geliştirme
DHA	Dokosaheksenoik asit
DMEM	Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle's ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMXBA	3- (2,4-Dimetoksibenziliden) –anabazein
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil
DSMZ	İnsan lösemi ve karsinom hücre hatları
Du145	İnsan prostat kanseri hücre hattı
ENPP3	Ektonükleotid pirofosfataz / fosfodiesteraz aile üyesi 3
EPA	Eikosapentenoik asit
ESI	Elektron sprey iyonizasyonu
EtOAC	Etil asetat
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
gHMBC	Gradient seçici heteronükleer çoklu bağ korelasyonu spektroskopisi
gHMQC	Gradient seçici heteronükleer çoklu kuantum tutarlılığı spektroskopisi
GK	Gaz Kromatografisi
H116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
H1975	İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı
H	Hidrojen
HCT116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HeLa	Serviks kanseri hücre hattı
HepG2	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HIV-1 SF162	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü tip 1 ters transkriptaz
HL-60	Promyelositik lösemi hücre hattı
HL7702	İnsan karaciğer normal hücre hattı
Huh-7	İnsan hepatosit kaynaklı kanHser hücre hattı
Hz	Hertz

IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
İTK	İnce tabaka kromatografisi
<i>J</i>	Bağlantı sabiti
K562	İnsan ölümsüzleştirilmiş miyelojenöz lösemi hücre hattı
KB	Keratin oluşturan tümör hücre hattı HeLa'nın alt hattı
KS	Kütle Spektrometresi
L1210	Fare lenfositik lösemi hücre hattı
LIV-1	Çinko taşıyıcı SLC39A6
LY294002	2-Morfolin-4-il-8-fenilkromen-4-on
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
m	Metre
m	Multiplet
<i>m/z</i>	Kütle-yük oranı
MarinLit	Deniz doğal ürünleri literatürlerinin veritabanı
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre hattı
MCF-7	Göğüs kanseri hücre hattı
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> ₄	Dötere metanol
mg	Miligram
MHz	Megahertz
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MMAE	Monometilauristatin E
MMAF	Monometilauristatin F
Molt-4	Akut lenfoblastik lösemi kanser hücre hattı
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2- il)-2,5- difenil tetrazolyum bromür
Murin-38	İnsan kolon kanser hücre hattı
N	Değişmemiş doğal ürün
N	Azot

NADH	İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NaPi2b	Sodyum bağımlı fosfat nakil proteini 2b
NB	Botaniksel doğal ürün
NBT	Nitro mavi tetrazolyum
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NCI-H460	Küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı
ND	Doğal ürün
ng	Nanogram
NM	Doğal ürün mimikleri
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
NOESY	Nükleer overhauser etki spektroskopisi
NP	Doğal ürün
°C	Derece santigrat
örn	örneğin
Ω	Omega
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
ppm	Milyonda kısım
RBL-2H3	Bazofilik lösemi hücre hattı
S	Sentetik ilaç
S*	Sentetik ilaç (doğal ürün farmakofor)
s	Singlet
SD	Standart sapma
Sefadeks LH	Sephadex reçinesinin hidroksipropillenmiş formu
SO	Süperoksit
SCUBA	Kendi kendine yeten sualtı solunum cihazı
TGA	Avustralya Tedavi Ürünleri İdaresi
U	Ünite
UV	Ultraviyole

V	Aşı
vb	ve benzer/leri
VSK	Vakum sıvı kromatografi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WoRMS	Dünya Deniz Türleri Kaydı
XO	Ksantin oksidaz
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kaynağa / yıla göre yeni onaylanmış tüm ilaçlar	8
Şekil 1.2. 01 Ocak 1981 ile 30 Eylül 2019 tarihleri arasında onaylanmış tüm yeni ilaçlar	9
Şekil 1.3. 2014-2018 yılları arasında izole edilen deniz doğal ürünlerinin kaynak canlılarının yıllara göre dağılımları	15
Şekil 1.4. Sekonder metabolit üretimi için araştırılan <i>A. niger</i> suşlarına dair, bildirilen kaynakların / habitatların yüzde dağılımı.	37
Şekil 1.5. <i>Aspergillus niger</i> suşlarından elde edilen sekonder metabolit türleri.	38
Şekil 2.1. <i>Microcosmus vulgaris</i> tunikatı	49
Şekil 2.2. <i>Aspergillus niger</i> mantarının petri büyümesi	49
Şekil 2.3. <i>Axinella verrucosa</i> sünger	50
Şekil 2.4. <i>Trichoderma virilente</i> mantarının petri büyümesi	51
Şekil 3.1. <i>Aspergillus niger</i> mantarının ham ekstre YPSK kromatogramı	76
Şekil 3.2 <i>Trichoderma virilente</i> mantarının ham ekstre YPSK kromatogramı	77
Şekil 3.3. <i>Aspergillus niger</i> mantarı fraksiyon şeması ve izole edilen maddeler	78
Şekil 3.4. <i>Trichoderma virilente</i> mantarı fraksiyon şeması ve izole edilen maddeler	79
Şekil 3.5. Madde 1'i içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	83
Şekil 3.6. Madde 1'i içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	83
Şekil 3.7. İzole edilen saf Madde 1'in YPSK kromatogramı	84
Şekil 3.8. Madde 1'in maksimum UV absorpsiyonu	84
Şekil 3.9. Madde 2'yi içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	85
Şekil 3.10. Madde 2'yi içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	86
Şekil 3.11. İzole edilen saf Madde 2'nin YPSK kromatogramı	86
Şekil 3.12. Madde 2'nin maksimum UV absorpsiyonu	87
Şekil 3.13. Madde 3'ü içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	88
Şekil 3.14. Madde 3'ü içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	88

Şekil 3.15. İzole edilen saf Madde 3'ün YPSK kromatogramı	89
Şekil 3.16. Madde 3'ün maksimum UV absorbansı	89
Şekil 3.17. Madde 4'ü içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	90
Şekil 3.18. Madde 4'ü içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	91
Şekil 3.19. İzole edilen saf Madde 4'ün YPSK kromatogramı	91
Şekil 3.20. Madde 4'ün maksimum UV absorbansı	92
Şekil 3.21. Madde 5 ve Madde 6'yı içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	93
Şekil 3.22. Madde 5 ve Madde 6'yı içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	93
Şekil 3.23. İzole edilen Madde 5 ve Madde 6'nın YPSK kromatogramı	94
Şekil 3.24. Madde 5 ve Madde 6'nın maksimum UV absorbansı	94
Şekil 3.25. Madde 7'yi içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	95
Şekil 3.26. Madde 7'yi içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	96
Şekil 3.27. İzole edilen saf Madde 7'nin YPSK kromatogramı	96
Şekil 3.28. Madde 7'nin maksimum UV absorbansı	97
Şekil 3.29. Madde 8'i içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı	98
Şekil 3.30. Madde 8'i içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı	98
Şekil 3.31. İzole edilen saf Madde 8'nin YPSK kromatogramı	99
Şekil 3.32. Madde 8'nin maksimum UV absorbansı	99
Şekil 3.33. Madde 9 ve Madde 10'u içeren fraksiyonun izolasyon aşaması ITK plağı görseli	100
Şekil 3.34. <i>Aspergillus niger</i> mantarından izole edilen bileşikler	102
Şekil 3.35. <i>Trichoderma virilente</i> mantarından izole edilen bileşikler	103
Şekil 3.36. Rubrofusarin B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	105
Şekil 3.37. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H-NMR spektrumu	107
Şekil 3.38. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	108
Şekil 3.39. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	109
Şekil 3.40. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMBC spektrumu	110

Şekil 3.41. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMQC spektrumu	111
Şekil 3.42. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ROESY spektrumu	112
Şekil 3.43. Flavasperone bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	114
Şekil 3.44. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H-NMR spektrumu	116
Şekil 3.45. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	117
Şekil 3.46. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	118
Şekil 3.47. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMBC spektrumu	119
Şekil 3.48. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMQC spektrumu	120
Şekil 3.49. Flavasperone bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ROESY spektrumu	121
Şekil 3.50. Aurasperone B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	123
Şekil 3.51. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H-NMR spektrumu	126
Şekil 3.52. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	127
Şekil 3.53. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	128
Şekil 3.54. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMBC spektrumu	129
Şekil 3.55. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki gHMQC spektrumu	130
Şekil 3.56. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki NOESY spektrumu	131
Şekil 3.57. Fonsecinone D bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	133
Şekil 3.58. Fonsecinone D bileşiğinin CHCl ₃ - <i>d</i> 'deki ¹ H-NMR spektrumu	136
Şekil 3.59. Fonsecinone D bileşiğinin CHCl ₃ - <i>d</i> 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	137
Şekil 3.60. Fonsecinone D bileşiğinin CHCl ₃ - <i>d</i> 'deki ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	138
Şekil 3.61. α,α -Trehalose bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	140
Şekil 3.62. β,β -Trehalose bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	141
Şekil 3.63. α,α -Trehalose bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H-NMR spektrumu	144
Şekil 3.64. β,β -Trehalose bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H-NMR spektrumu	145
Şekil 3.65. α,α -Trehalose bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	146
Şekil 3.66. β,β -Trehalose bileşiğinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹³ C-NMR spektrumu	147
Şekil 3.67. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin MeOH- <i>d</i> ₄ 'deki ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	148

Şekil 3.68. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin MeOH- d_4 'deki gHMBC spektrumu	149
Şekil 3.69. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin MeOH- d_4 'deki gHMQC spektrumu	150
Şekil 3.70. Aurasperone A bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	152
Şekil 3.71. Aurasperone A bileşiğinin MeOH- d_4 'deki ^1H -NMR spektrumu	154
Şekil 3.72. Aurasperone A bileşiğinin MeOH- d_4 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu	155
Şekil 3.73. Nonanedioik asit dimetil ester bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	156
Şekil 3.74. Nonanedioik asit dimetil ester bileşiğinin GK-KS kromatogramı	157
Şekil 3.75. β -Sitosterol bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	159
Şekil 3.76. Ergosterol bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması	160
Şekil 3.77. β -Sitosterol bileşiğinin CHCl_3 - d_4 'deki ^1H -NMR spektrumu	165
Şekil 3.78. Ergosterol bileşiğinin CHCl_3 - d_4 'deki ^1H -NMR spektrumu	166
Şekil 3.79. β -Sitosterol bileşiğinin CHCl_3 - d_4 'deki ^{13}C -NMR spektrumu	167
Şekil 3.80. Ergosterol bileşiğinin CHCl_3 - d_4 'deki ^{13}C -NMR spektrumu	168
Şekil 3.81. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3 - d_4 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu	169
Şekil 3.82. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3 - d_4 'deki gHMBC spektrumu	170
Şekil 3.83. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3 - d_4 'deki gHMQC spektrumu	171

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Deniz canlılarından elde edilen ve piyasada bulunan onaylı ilaçlar.	25
Çizelge 1.2. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 3 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler.	26
Çizelge 1.3. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 2 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler.	27
Çizelge 1.4. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 1 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler.	29
Çizelge 1.5. Deniz kaynaklı <i>Aspergillus niger</i> mantarından elde edilen bileşikler ve biyoaktiviteleri.	38
Çizelge 2.1. Mantar üretimi için petri katı besiyeri maddeleri	54
Çizelge 2.2. Mantarların büyümesi için erlen katı besiyeri maddeleri	58
Çizelge 2.3. Analitik kolon kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	63
Çizelge 2.4. Madde 1 ve Madde 2 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	64
Çizelge 2.5. Madde 1 ve Madde 2 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	65
Çizelge 2.6. Madde 3, Madde 4, Madde 5 ve Madde 6 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	66
Çizelge 2.7. Madde 3, Madde 4, Madde 5 ve Madde 6 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	67
Çizelge 2.8. Madde 7 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	68
Çizelge 2.9. Madde 7 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	68
Çizelge 2.10. Madde 8 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	69
Çizelge 2.11. Madde 8 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi	69
Çizelge 3.1. <i>Aspergillus niger</i> mantarının %90 metanollü fazının VSK fraksiyonları	80

Çizelge 3.2. <i>Aspergillus niger</i> mantarının hekzan fazının VSK fraksiyonları	80
Çizelge 3.3. <i>Trichoderma virilente</i> mantarının %90 metanollü fazının VSK fraksiyonları	81
Çizelge 3.4. <i>Trichoderma virilente</i> mantarının hekzan fazının açık kolon kromatografisi fraksiyonları	82
Çizelge 3.5. Rubrofusarin B bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	106
Çizelge 3.6. Flavasperone bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	115
Çizelge 3.7. Aurasperone B bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	124
Çizelge 3.8. Fonsecinone D bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	134
Çizelge 3.9. α,α -Trehalose bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	142
Çizelge 3.10. β,β -Trehalose bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	143
Çizelge 3.11. Aurasperone A bileşiğine ait ^1H NMR analizleri	153
Çizelge 3.12. β -Sitosterol bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	161
Çizelge 3.13. Ergosterol bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri	163
Çizelge 3.14. Mantar ekstralarının antioksidan aktiviteleri	172
Çizelge 3.15. Mantar ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri	173
Çizelge 3.16. Mantar ekstralarının sitotoksikite aktivitesi (HCT116 hücre serisi)	174
Çizelge 3.17. İzole edilen seçilmiş bileşiklerin antienflamatuar aktiviteleri	175
Çizelge 3.18. İzole edilen seçili bileşiklerin antialerjik aktiviteleri	176

1. GİRİŞ

1.1. Doğal Ürünler

1.1.1. Doğal Ürün Tanımı

Sarker ve ark. (2006)'ın, Cannell (1998) ve Samuelsson ve Bohlin (1999)'den yaptığı aktarıma göre, en geniş anlamda doğal ürünler, doğal kökenli ürünler, bitkiler (örn; *Taxus brevifolia*'dan paklitaksel), hayvanlar (örn; Morina karaciğeri yağından A ve D vitaminleri) veya mikroorganizmalar (örn; *Streptomyces peucetius* kaynaklı doksorubisin) gibi herhangi bir karasal veya deniz kaynağından elde edilen, kurutma gibi basit bir koruma işlemi dışında herhangi bir işlem görmemiş bir organizmanın tamamını (örn; bir bitki, bir hayvan veya bir mikroorganizma) ve/veya bir kısmını (örn; bitki yaprağı, hayvan organı vb), bir organizmanın tamamının veya bir kısmının ve salgılarının ekstrelerini, bitkilerden, hayvanlardan veya mikroorganizmalardan izole edilen saf bileşikler (örn; alkaloidler, kumarinler, flavonoidler, glikozitler, lignanlar, steroidler, şekerler, terpenoidler, vb) içeren, bunun yanısıra bir organizma tarafından üretilirken o organizmanın hayatta kalması için kesin olarak gerekli olmayan küçük moleküller (mol wt <2000 amu) şeklinde tanımlanmaktadır.

1.1.2. Doğal Ürünlerin Tarihsel Kayıtları

Doğadan elde edilen ürünler, antik çağlardan günümüze, birçok hastalığın tedavisinde ve/veya hastalık belirtilerinin giderilmesinde kullanılmıştır. Cragg ve Newman (2005)'ın, Fallarino (1994)'dan aktardığı bilgilere göre; gargaralardan haplara, infüzyonlardan merhemlere kadar 700'den fazla bitki bazlı ilacı içeren Ebers Papirüsü M.Ö. 2900 yıllarında Mısır'da; günümüzde halen öksürük, soğuk algınlığı ve iltihabı gidermede kullanılan *Cupressus sempervirens* (Akdeniz servisi) ve *Commiphora* türlerinden elde edilmiş yağları belgeleyen çivi yazısı ve kil tabletler M.Ö. 2600 yıllarında Mezopotamya'da; M.Ö. 1100'lerde 52 farklı reçete bulunan *Materia Medica*, M.Ö. 100'lerde Çin'de; 365 adet ilaç içeren *Shennong Herbal* ve M.S. 659'da 850 tane ilaç kaydı bulunan *Tang Herbal* Çin'de ilk farmasötik kayıtlar olarak belgelenmişlerdir. M.Ö. 300'de şifalı bitkilerle ilgilenen Yunan filozofu ve doğal bilim insanı Theophrastus'un yanı sıra, M.S. 100'de Yunan hekim Dioscorides de şifalı bitkilerin toplanması, depolanması ve kullanımları ile ilgilenmiştir. Bu Greko-Romen bilgiler, Orta Çağ boyunca İngiltere, İrlanda, Fransa ve Almanya'daki manastırlar tarafından korunurken, Araplar bu bilgilere ek olarak Çin ve Hint bitkilerini de inceleyerek kendi kaynaklarının kullanımını genişletmişlerdir. 8. yüzyılda Farslı bir eczacı, hekim, filozof ve şair olan Avicenna ile ilk kez özel eczanelere sahip olan Araplar, *Canon Medicinæ* gibi çalışmalarla da eczacılık ve tıp bilimlerine büyük katkılar sağlamışlardır.

1.1.3. Doğal Ürünler (Sekonder Metabolitler)

Doğal bir ürün, doğada bulunan ve genellikle farmasötik ilaç keşfi ve ilaç tasarımında kullanım için farmakolojik veya biyolojik bir aktiviteye sahip olan canlı bir organizma tarafından üretilen kimyasal bir bileşik veya maddedir (Lahlou, 2013). Doğal ürünler, özellikle insan ve veterinerlik tıbbında, tarımda, çoklu kullanım edinmiş çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip geniş bir kimyasallar ailesini temsil etmektedir (Katz ve Baltz, 2016).

Tüm organizmalar, yaşamak, büyüme ve çoğalmak için gerekli olan yapıtaşlarını, enzimlerle iyileştirilmiş ve dikkatle düzenlenmiş kimyasal reaksiyonları içeren metabolik yollardan sağlamaktadırlar. Genel olarak değiştirme ve sentezleme yollarının, küçük varyasyonlar haricinde tüm organizmalarda esasen aynı olduğu bulunan şeker birimlerinden oluşan karbonhidratlar, aminoasitleri içeren proteinler ve nükleotidlere dayanan nükleik asitler gibi polimerik yapılar ve yağlar, primer metabolizma yollarından elde edilmiş primer metabolitlerdir (Dewick, 2002). Primer metabolik yolların aksine, doğada çok daha sınırlı dağılıma sahip bileşiklerle ilişkili olan sekonder metabolizma yollarından ise sadece spesifik organizmalarda veya organizma gruplarında bulunan ve türlerin bireyselliğini ifade eden sekonder metabolitler elde edilmektedir. Her koşulda üretilmesi gerekmeyen, büyük çoğunluğunun işlevleri ve organizmaya faydaları bilinmeyen bu bileşiklerin, yırtıcılara karşı savunma sağlayan toksik maddeler, aynı veya diğer türlere karşı dikkat çekici ve/veya uyarıcı olan uçucu maddeler ve renklendirici maddeler gibi belirli nedenlerle üretilmesi, üretici organizma için hayati derecede önemli olduğunu göstermektedir (Dewick, 2002; Dias ve ark., 2012).

Yapı taşlarının sayısının sınırlı olmasına rağmen, yeni sekonder metabolitlerin oluşumu sonsuz olabilmektedir. Primer ve sekonder metabolitler belirli genellemeler ile ayrılmasına rağmen bazı doğal ürün grupları her iki bölüme de girebilmektedir. Bunlara en iyi örnek yağ asitleri ve şekerlerdir. Çoğu primer metabolitlerin en iyileri olarak tanımlanırken, bazı üyeleri son derece nadirdir ve sadece belli başlı türlerde bulunmaktadır. Primer metabolizma (biyokimya) ve sekonder metabolizma (doğal ürün kimyası) şeklinde bölümlere ayrılarak bu karışıklığın önüne geçilebilmektedir (Dewick, 2002; Dias ve ark., 2012).

Sekonder metabolitlerin, benzersiz yapısal çeşitlilik sunmaları, birçoğunun nispeten küçük moleküller olması (<2000 Da), emilebilme ve metabolize edilebilme gibi ilaç benzeri özelliklere sahip olmaları ilaçların ana kaynağı olmalarını sağlamaktadır (Sarker ve ark., 2006).

1.1.4. Doğal Ürün Kaynaklı İlaçlar

Doğal ürünler, değiştirilmemiş bir durumda kullanılabilecek yeni ilaçlar gibi davranarak (örneğin, *Catharanthus roseus*'dan vinkristin); daha karmaşık molekülleri sentezlemek için kullanılan kimyasal “yapı taşları” sağlayarak (örneğin oral kontraseptiflerin sentezi için *Dioscorea floribunda*'dan diosgenin); yeni analogların tam sentezine izin vererek (örn., *Penicillium notatum*'dan penisilin sentetik analogları) ve yeni farmakolojik etkilerin bulunmasını sağlayarak ilaç araştırmalarını desteklemektedir (Sarker ve ark., 2006). Doğal ürünlerin birçoğu geleneksel tıpta kullanımlarına dayanan, klinik, farmakolojik ve kimyasal çalışmaların sonucunda ilk ilaçların temelini oluşturmuşlardır (Butler, 2004; Sarker ve ark., 2006). Doğanın bu mucizevi canlı çeşitliliğini anlayabilmek ve çalışmalarını bu yönde derinleştirmek için araştırmacılar, belli başlı bilimsel gruplandırmalar yapma ihtiyacı duymuşlardır. Bu gruplandırma en genel anlamda bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar olarak yapılabilmektedir.

Bitkiler, binlerce yıldır benzersiz ve yapısal olarak çeşitli sekonder metabolitler üretmek için bakteriler, böcekler, mantarlar gibi zararlılara ve hava koşulları gibi çevresel değişkenlere dayanacak şekilde gelişmiş ve adapte olmuşlardır. Etnofarmakolojik özellikleri sayesinde ilk ilaç keşiflerinde birincil ilaç kaynağı olarak kullanılmışlardır. Birçok farmasötik bileşik, ilaç tasarımı hayati öneme sahip olan bitkilerin sekonder metabolitlerini içermektedir. Söğüt ağacı *Salix alba* L.'nin kabuğundan izole edilen asetilsalisilik asit; *Papaver somniferum* L.'nin (afyon haşhaş) araştırılması sonucu morfinin eldesi en iyi bilinen örnekleridir. 1870'lerde ham morfinin asetik anhidrit içinde kaynatılması ile eroïn (diasetilmorfin) ve yanısıra morfinin dönüşümü ile kodein alkaloidleri bulunmuştur (Dias ve ark., 2012). *Digitalis purpurea* L. (yüksükotu)'nın bir kardiyotonik glikozit olan aktif bileşeni digitoksin ve benzerleri, konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde (Wagner ve Kenreigh, 2007); *Cinchona succirubra* Pav.ex Klotzsch'in kabuğundan izole edilen kinin, sıtma, ateş, hazımsızlık, ağız ve boğaz hastalıkları ve kanser tedavisinde (Woodward ve Doering,

1944); Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan izole edilen paklitaksel (Taxol) yumurtalık kanseri tedavisinde ve diğer tedavilere yanıt vermeyen meme kanseri tedavisinde (Wani ve ark., 1971); *Vinca rosea* olarak bilinen *Catharanthus roseus* bitkisinin yapraklarından izole edilen vinka alkaloidleri vinkristin ve vinblastin antitümör etkileriyle lösemiler, lenfomalar, nöroblastoma ve sarkomların tedavisinde (El-Sayed ve Verpoorte, 2007); *Hypericum perforatum* (sarı kantaron)'dan izole edilen iki bileşik hiperisin ve psödohiperin, HIV (insan immun yetmezlik virüsü) de dahil olmak üzere çeşitli retrovirüslerin sebep olduğu hastalıkların (Qu ve ark., 2009) tedavisinde kullanılmışlardır. *Pilocarpus jaborandi*'den elde edilen, L-histidin türevi alkaloid pilokarpin (Hancock, 2007), kronik açık açılı glokom ve akut aç kapanması glokomunun tedavisinde klinik ilaç olarak kullanılırken, 1994 yılında baş ve boyun kanserlerinde uygulanan radyasyon tedavisinin yan etkisi olan ağız kuruluğunu (kserostomi) tedavi etmek için ve aynı zamanda vücuttaki sodyum ve klorür konsantrasyonunun ölçümünde ter bezlerini uyarmak için kullanım onayı almıştır. 1998 yılında tükürük ve lakrimal bezlere zarar veren bir otoimmün hastalık olan Sjogren sendromunun tedavisi için onay almıştır (Dias ve ark., 2012; Mukherjee, 2019).

İnsan hastalıklarının, hayvanlardan elde edilen veya onlardan türetilen terapötikler kullanılarak iyileştirilmesi zooterapi olarak bilinmektedir (Costa-Neto, 2005). Hayvan bazlı ilaçlar, bütün bir hayvanı, hayvan vücudunun bazı kısımlarını, metabolizma ürünlerini (vücut salgıları ve dışkıları) veya hayvansal olmayan malzemeleri (yuvalar ve kozalar) içermektedir (Alamgir, 2017; Costa-Neto, 2005). Morina balığı, ringa balığı, somon ve kalkan balığı gibi yağlı balıklarda bulunan, artrit önlenmesine yardımcı olmasıyla insan sağlığı için büyük önem taşıyan çoklu doymamış esansiyel yağ asidi omega-3 bileşiği en iyi bilinen örneklerindendir (Costa-Neto, 2005). Yılanlardan, örümceklerden, akrelerden, böceklerden vb. elde edilen zehirler ve toksinler (kobralardan elde edilen bungarotoksin, kirpi balığından elde edilen tetrodotoksin gibi), yeni ilaçların geliştirilmesinde öncü bileşikler olarak kullanılmıştır. Örneğin Brezilya engerek yılanı *Bothrops jararaca* zehrinin bileşeni peptit yapılı teprotid, ACE (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) inhibitörü silazapril ve

kaptopril gibi antihipertansif ajanların gelişmesi için öncü bir bileşiktir (Alamgir, 2017; Costa-Neto, 2005). Ekvador zehirli kurbağa *Ameerega Bilinguis*'in deri ekstraktlarından elde edilen epibatidin güçlü analjezik etkili; Avrupa tıbbi sülüğü *Hirudo medicinalis* ve Meksika tıbbi sülüğü *Hirudo manillensis* 'de bulunan hirudin ve heparin antikoagülan etkili bileşiklerdir. Bunların yanı sıra, domuz derisi, balık derisi, inek derisi, kemik ve beyaz bağ dokusundan alınan kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen ilaç ve gıda sanayiinde kullanılan jelatin; *Apis spp* arıları tarafından üretilen bal ve balmumu; *Penaeus kerathurus* karidesi ve *Carcinus mediterraneus* yengeç kabuklarından türetilen amino polisakkarit kitin ve kitinin deasetillenmiş türevi kitosan; inek kıkırdağından elde edilen osteoartrit tedavisinde destek amaçlı kullanılan kondroitin sülfat önemli hayvansal kaynaklı doğal ürün bileşenleridir (Alamgir, 2017).

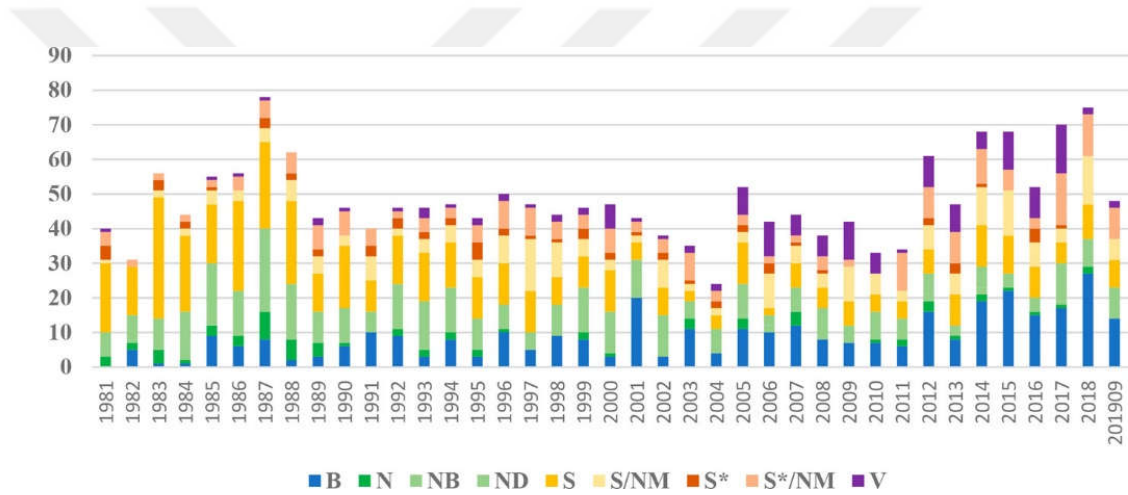
Binlerce yıldır insan yaşamının bir parçası olan mantarlar, gezegendeki en çeşitli ve bol miktarda bulunan ökaryotik organizmalardır (Zain Ul Arifeen ve ark., 2019). Yaşam döngüsünün en azından bir kısmını görünür bir enfeksiyon veya hastalık belirtisine neden olmadan, ağaçlar, çayırlar, algler ve otsu bitkiler içinde ve konakçı organizmayı etkilemeden bitki sapları, yaprak sapları, kökler ve yaprakların hücre içi alanlarında yaşayan endofitlerdir (Cragg ve Newman, 2005; Tan ve Zou, 2001). Endofitik mantarların önemini anlamak için bazı örneklerle bakıldığında, çok önemli bir antikanser bileşiği olan Taksol(Paklitaksel)'un *Taxus brevifolia* kabuğundan keşfinden yirmi yıldan fazla bir süreden sonra, Strobel ve ark. (1993) *Taxus brevifolia*'da bulunan *Taxomyces andreanae* endofitik mantarından da taksol izole etmişlerdir. İlerleyen yıllarda *Pestalotiopsis microspore*, *Seimatoantlerium tepuiense*, *Periconia sp* gibi endofitik mantarların da taksol ve türevlerinin üreticisi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ilk önce geleneksel tıpta kullanılan bir bitki olan *Camptotheca acuminata*'nın kabuğundan ve sapından izole edilen, antikanser bir bileşik olan kinolin indol alkaloidi kamptotesinin ve analoglarının, *Camptotheca acuminata*'da bulunan endofitik mantar kültürleri tarafından üretildiği bulunmuştur (Kusari ve ark., 2009).

1928'de Fleming'in *Penicillium notatum* mantarından antibakteriyel filtrat "penisilin"ın keşfi, en iyi bilinen örnektir (Wood, 1993). 1942-1944 yılları arasında penisilin G ile ilgili ilk klinik verilerin yayınlanmasından sonra, mikroorganizmalardan ve biyoaktif doğal ürünlerden yeni antibiyotikler keşfetme konusunda, dünya çapında yapılan çalışmalar sayesinde β -laktam (iki sefalosporin, altı karbapenem ve bir penem) ve glisilsiklinler adı verilen yeni geniş spektrumlu antibiyotik sınıfları keşfedilmiştir (Fabbretti ve ark., 2011; Williams, 1999). Mantar kültürlerinden elde edilen bu önemli keşifler diğer mikroorganizma türlerine olan ilgiyi de artırmıştır. 1953 yılında Edmund Kornfeld tarafından *Amycolatopsis orientalis* bakteri kültürlerinden elde edilen vankomisin 1958'de FDA tarafından onaylanmıştır. Penisiline aşırı duyarlı hastalarda şiddetli enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. *Saccharopolyspora erythraea* bakterisinden gelen makrolid eritromisin, gram pozitif koklara ve basillere karşı geniş spektrumlu etkileri sayesinde, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonları için kullanılmaktadır (Butler, 2004). Yapılan araştırmalar ile streptomisin, kloramfenikol, klortetrasiklin, sefalosporin C, eritromisin ve vankomisin gibi verimli sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu bileşikler veya bunların türevleri günümüzde halen ilaç olarak kullanılmaktadır (Butler, 2004; Dias ve ark., 2012).

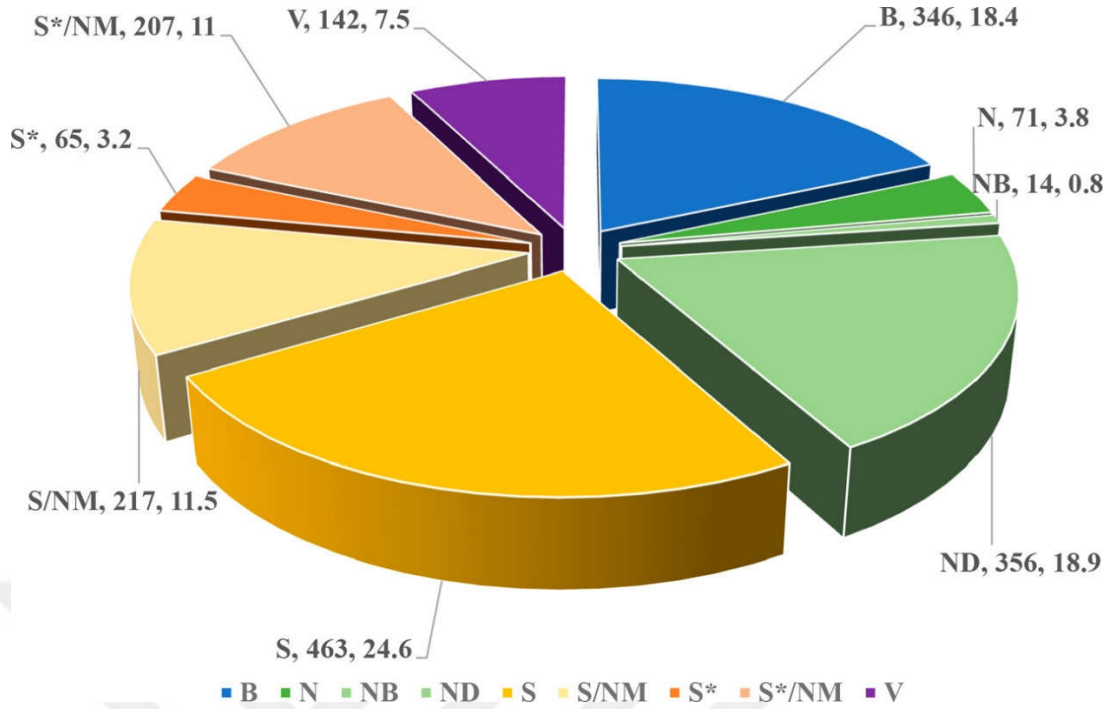
Poliporlar gibi makro mantarlar, farmakolojik olarak aktif bileşiklerin ana kaynağı olan, Ascomycota ve Basidiomycota (Basidiomycetes) şubesinde bulunan ağaç çürüğü mantarlarının büyük bir grubudur. Poliporlar, mantarların yaklaşık %75'i güçlü antimikrobiyal aktiviteler göstermeleri sayesinde yeni antibiyotiklerin keşfi için uygun bir kaynak olarak düşünülmüştür. Birçok bileşik antiviral, sitotoksik, antineoplastik, kardiyovasküler, antienflamatuar, immunosuppresif ve antikanser aktiviteler göstermiştir (Zjawiony, 2004). Mantar kaynaklarından türetilen yeni biyoaktif sekonder metabolitler, ilaç endüstrisi için önemli doğal ürünlerden olmuştur (Cragg ve Newman, 2005). Newman ve Cragg (2020), 1997 yılından beri devam ettirdikleri ve yıllık güncelleştirmelerle ilerledikleri araştırma çalışmalarıyla, önemli sayıda doğal ürün ilaç bileşenlerinin/öncülerinin aslında mikroplar ve/veya bu mikroorganizmaların "izole edildiği andaki konakçı" ile oluşan mikrobiyal

etkileşimleri sonucunda üretildiğine dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmalar doğal ürünler alanındaki çalışmaların simbiyotik etkileşimler yönünde genişletilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Newman ve Cragg (2020), 1997, 2003, 2007, 2012 ve 2016 yıllarında yapmış oldukları veri analizi odaklı derlemeye göre Ocak 1981 ile Eylül 2019 yılları arasında doğal kaynaklı 1881 yeni ilaç ve 1394 küçük molekül yeni kimyasal örnekler olarak güncellenen veriler Şekil 1.1 ve Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Kaynağa / yıla göre yeni onaylanmış tüm ilaçlar; n = 1881. B, Biyolojik makromolekül, genellikle bir organizma / hücre hattından izole edilen veya bir vekil konakçıda biyoteknolojik yollarla üretilen büyük (> 50 artık) peptit veya protein; N, Değişmemiş doğal ürün; NB, Doğal ürün “Botaniksel” (genel olarak bunlar yakın zamanda onaylanmıştır); ND, Doğal ürün türevi, doğal bir üründen elde edilir ve genellikle yarı sentetik bir modifikasyondur; S, Sentetik ilaç, genellikle mevcut bir ajanın rastgele taranması / modifikasyonu ile bulunan tamamen sentetik ilaç; S*, Sentetik ilaç (doğal ürün farmakofor), tamamen sentez ile yapılır, ancak farmakofor doğal bir üründür; V, Aşı; NM, Doğal ürün mimikleri(taklitleri) (Newman ve Cragg, 2020).



Şekil 1.2. 01 Ocak 1981 ile 30 Eylül 2019 tarihleri arasında onaylanmış tüm yeni ilaçlar, n=1881 (Newman ve Cragg, 2020).

1.2. Deniz Kaynaklı Doğal Ürünler

1.2.1. Deniz Kaynakları Üzerine Genel Bilgiler

Dünya yüzeyinin %70'inden fazlasını ve dünya biyosferinin %95'inden fazlasını kaplayan okyanuslar, özel fiziksel ve kimyasal koşullar nedeniyle, hemen hemen her alemden (bitki, hayvan, mikroorganizma gibi) farklı deniz organizmaları içermelerine ve birçok kimyasal yapı çeşitliliği gösteren moleküller vermelerine rağmen karasal organizmaların sahip olduğu uzun tarihsel tıbbi kullanımlarının aksine, farmakolojik uygulamada daha kısa bir geçmişleri bulunmaktadır (Schueffler ve Anke, 2014). Deniz ortamına erişimde güçlük çekilmesi, okyanus ortamının incelenmesi için özel

örnekleme tekniklerinin ve ekipmanlarının gerekliliği gibi zorluklar deniz ortamına ilginin gecikmesine sebep olmuştur (Tiquia-Arashiro, 2012). 1960'larda ve 1970'lerde Kendi kendine yeten güvenilir sualtı solunum cihazı (SCUBA) ile dalış, 1980'lerde insanlı dalgıçların kullanımı ve 1990'larda uzaktan kumandalı araçların (San-Martin ve ark.) kullanımı sayesinde 3 ila 40 m arasında değişen okyanus derinliklerinden deniz organizmalarının (algler, süngerler, tulumlular, tunikatlar, briyozoanlar vb.) toplanması mümkün hale gelmiştir (Cragg ve Newman, 2001; Dias ve ark., 2012). Bu sayede deniz doğal ürünlerine ilgi her geçen gün artmakta ve her yıl artan sayıda biyolojik olarak aktif deniz doğal ürünleri rapor edilmektedir. Bu bileşiklerin birçoğu klinik öncesi ve klinik çalışma alanlarına girmiştir (Giddings ve Newman, 2019).

Deniz ortamları, okyanuslar, denizler, haliçler, kutup deniz buzulu, tuzlu su ve deniz suyuna eşit tuz konsantrasyonlarına (%3 a/h) sahip sığ, derin ve gelgitli su toplulukları olarak tanımlanabilmektedir (Tiquia-Arashiro, 2012). Bu deniz dünyası az keşfedilmiş ekstrem ortamları temsil etmektedir. Kimyasal yenilik ise bu keşfedilmemiş ortamlara uyum sağlayan ekstromofil canlılarda ortaya çıkmaktadır. Bu ekstrem ortamlar tipik olarak "non-mezofilik" (sıcak veya soğuk), oligotrofik veya ozmotik stres, yüksek tuz konsantrasyonları, aşırı pH, sınırlı oksijen ve ışık, şiddetli radyasyon, yüksek metal konsantrasyonları ve yüksek basınçlara maruz kalma olarak karakterize edilebilmektedir (Giddings ve Newman, 2019).

Ekstrem ekosistemlerde yaşamak için deniz omurgalıları, deniz omurgasızları, bitkiler ve bunlarla ilişkili mikroorganizmalar ile sediment kaynaklı mikroorganizmalar gibi çok çeşitli organizmalar, sıcaklığı, hücre içi pH değerlerini, çözünen bileşimi, biyokimyasal redoks reaksiyonlarını ve diğer biyomoleküllerin üretimini, ayrıca DNA onarım proteinini ve lipid hasarını düzenleyen mekanizmaları sayesinde yeni kimyasal yapı iskeleti ve biyolojik aktivite bulundurma potansiyeline sahiptirler (Giddings ve Newman, 2019). Organizmaların hayatta kalmasını sağlayan farklı bir transkriptom, proteazom ve son olarak farklı bir metabolomun bulunduğu deniz ortamında, farklı sekonder metabolitlerin bu tür olağanüstü bir ortama uyum

sağlamak için özel gereksinimlerin sonucu olabileceği düşünülürken (Zin, 2018), yeni karbon iskeletleri, yüksek halojenasyon seviyeleri ve en önemlisi yeni biyoaktivite ile birlikte önemli kimyasal çeşitlilik sağlanmaktadır (Giddings ve Newman, 2019).

Deniz ortamındaki hemen hemen tüm yaşam biçimleri, farmasötikler, besin takviyeleri, kozmesötikler, zirai kimyasallar ve enzimler gibi etkinliklere sahip değerli bir yeni bileşik kaynağı açısından araştırılmıştır (Blunt ve ark., 2013; Kijjoa ve Sawangwong, 2004). İlaç formuna getirilebilecek denizden elde edilen doğal ürünlerin yüzdesi hala düşük olmasına rağmen, doğal ürünler kimyasının köklü bir alt disiplini haline gelmiş olan bu deniz doğal ürünleri, insan hastalıklarının tedavisi için ilaç formuna getirilebilecek öncülerin keşfedilmesinde önemli bir rol oynayan çok çeşitli biyolojik faaliyetler sergilemektedir (Faulkner, 2000; Liu ve ark., 2012; Nastrucci ve ark., 2012; Newman ve Cragg, 2012). Deniz kaynaklarından, antitümör, antimikrotübül, antiproliferatif, fotoprotektif, antibiyotik ve antienfektif gibi etkileri sayesinde, ilaç endüstrisinde son derece ilginç yüksek etkili bileşikler bulunmuştur (Bérdy, 2005; Mishra ve Tiwari, 2011; Molinski ve ark., 2009; Sudek ve ark., 2007). Hatta bazı çalışmalar deniz organizmalarının karasal organizmalardan daha biyoaktif doğal ürünler sunduğunu bildirmiştir (Zin, 2018). Deniz doğal ürünlerinin biyoaktiviteleri incelendiğinde en büyük grubu antikanser etkili bileşiklerin (% 56), ardından antibakteriyel (% 13) ve antifungal (% 5) etkili bileşiklerin oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, denizden elde edilen yeni doğal ürünlerin, küçük bir oranda olmasına rağmen, insektisit, antiviral, pestisit, vazoprotektif ve nöroprotektif gibi başka farmakolojik etkilere de sahip olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2015).

Mikroorganizmalar, algler ve omurgasızlar dahil olmak üzere deniz canlılarından çok çeşitli biyoaktivitelere sahip yaklaşık 30.000 yapısal çeşitlilikte doğal ürün keşfedilmiştir (Radjasa ve ark., 2011; Salomon ve ark., 2004). Deniz canlılarından gelen yeni bileşiklerin çoğu, yaklaşık %75'i omurgasızlardan esas olarak Porifera filumundan (süngerler) aynı zamanda Sölenter'lerden (çoğunlukla mercan) izole edilmiştir. Ek olarak, algler ve mikroorganizmalar da yeni metabolitlerin ana

kaynaklarıdır (Hu ve ark., 2011). Son yıllarda, antikanser, antitümör, antiproliferatif, antimikrotübül, sitotoksik, fotoprotektif ve ayrıca antibiyotik ve antifouling özellikler dahil olmak üzere biyolojik aktivite sergileyen poliketidler, alkaloidler, peptidler, proteinler, lipidler, glikozitler, izoprenoidler ve bunların türevleri gibi deniz organizmalarından farmakolojik potansiyele sahip önemli sayıda kimyasal yapılar keşfedilmiştir (Mayer ve ark., 2011; Rateb ve Ebel, 2011). Ayrıca, 1981'den 2008'e kadar olan dönemi kapsayan, antibakteriyel, antiviral, antiparazitik ve antifungal bileşikler dahil olmak üzere enfeksiyonu azaltmak için kullanılan tüm ilaçların yaklaşık %68'i ve antikanser ilaçlarının %63'ü doğal olarak bu organizmalardan türetilmiştir (Cragg ve ark., 2009).

1970'lerden bu yana, bildirilen “ekstremofiller”in sayısı artarken yeni örnekleme ve kültürleme metodolojileri, dergiler, MarinLit gibi veritabanları ve uluslararası sempozyumlar bu organizmaların çalışmasına destek vermektedir (Giddings ve Newman, 2019). Deniz taksonlarının adlarını küresel bir açık erişim envanteri olarak tasarlayan, bir biyolojik çeşitlilik bilgi sistemi olan Dünya Deniz Türleri Kayıdı (The World Register of Marine Species=WoRMS) veritabanı, 2007'nin sonlarında bir proje olarak kurulmuştur. 2008 yılında hali hazırda 122.500 deniz türü kayıta olurken, 230.000 deniz türünün olduğu tahmin edilmiştir. 2012 yılında 460.000 taksondan (alt türlerden aleme) 368.000'i tür adı olup bunlardan da 215.000'i kabul görmüştür (Costello ve ark., 2013). 15 Temmuz 2015'te tahmin edilen 230.000 deniz türüne ulaşılmıştır. 18 Aralık 2017 tarihli verilere göre 613.499 takson (alt türlerden aleme) adı içermektedir, 479.092'si tür adıdır ve 243.081'i deniz türü adı olarak kabul edilmiştir (Horton ve ark., 2017). Veritabanı, her tür için hali hazırda tutulan verilerin tutarlılığını ve kalitesini iyileştirmeye odaklanırken, aynı zamanda veritabanını her yıl açıklanan yaklaşık 2000 yeni deniz türünün eklenmesiyle güncel tutmaktadır (Horton ve ark., 2017).

1.2.2. Deniz Kaynaklı Canlılar

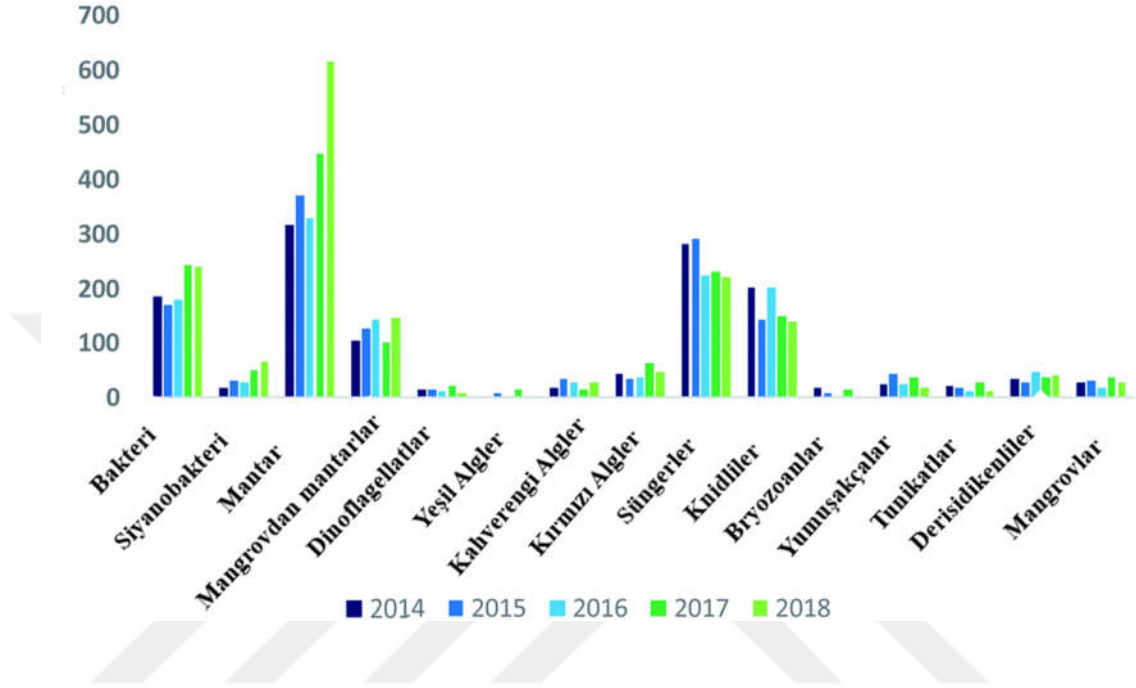
Okyanus, farklı fizyolojiye ve çevrelerine uyum sağlama kapasitesine sahip çok çeşitli canlı organizmalar için doğal bir yaşam alanıdır. Okyanuslar, dünyadaki çeşitli bitki ve hayvan türlerinin %80'inden fazlasını içermektedir (Malve, 2016). Omurgalı ve omurgasız deniz hayvanları, algler, fitoplanktonlar gibi deniz bitkileri ve deniz kaynaklı mikroorganizmaları gibi deniz organizmaları, farmasötik olarak aktif bileşiklerin zengin kaynakları olup antik çağlardan beri geleneksel Çin tıbbında tanınmaktadır (Kim, 2012a). Son zamanlarda, bilim insanlarının makroalgler, mikroyalgler, mantarlar, bakteriler, aktinomisetler, omurgasızlar ve omurgalılar gibi deniz kaynaklarından elde edilen sağlık açısından faydalı çeşitli farmasötik biyoaktif bileşikler araştırılmaları ile birlikte, deniz kaynaklarının, farmakolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin önemli bir kaynağı haline geldiğine dikkat çekmişlerdir (Kim, 2012a).

Süngerler (Porifera), sinir, sindirim ve dolaşım sistemine sahip olmayan, yiyecek ve oksijen temin etmek, atıkları gidermek için vücutlarından sürekli bir su akışını sürdüren sesil organizmalardır. Tüm süngerler "mevcut" veya "filtre" besleyiciler olarak sınıflandırılırken predatorlara karşı çok az fiziksel savunma araçları bulunmaktadır. Çok hücreli hayvanların ilki olarak kabul edilirler ve yaklaşık 500 milyon yılda çok az değişime uğramışlardır. Biyolojik olarak aktif bileşiklerin deniz kaynaklarından ilk göze çarpan keşfi, 1950'lerin başında Bergmann tarafından Karayip süngeri *Tethya crypta* (Önceki adı *Cryptotheca crypta*'dır)'dan, arabinosil nükleosidleri spongouridin ve spongotimidin bileşikleridir (Bergmann ve Stempien, 1957). Deniz süngerlerindeki alışılmadık arabino- veya ribo-pentosil nükleositlerin dikkate değer keşfi, doğal olarak oluşan nükleositlerin riboz ve deoksiriboz dışında şeker içerebileceğini gösteren ilk örnektir (Imhoff ve ark., 2011). Tanımlanmış olan yaklaşık 15.000 doğal ürünün % 30'u süngerlerden elde edilmiştir (Murti ve Agrawal, 2010).

Tunikatlar, Chordata filumunun bir alt filumu olup en büyük sınıfını oluşturanlar ascidiyanlar veya deniz üzümçüleri (Filum: Chordata, Sınıf: Ascidiacea). Tunikat adı, hayvanı saran ve biraz esnek bir iskelet oluşturan polisakkarit içeren tunikten gelmektedir (Shenkar ve Swalla, 2011). Larva formunda omurgalı benzeri kurbağa yavrusunun özelliklerini sergilerken, yetişkin formunda omurgasız filtre besleyicileri olduklarından dolayı omurgalılar ve omurgasızlar arasında benzersiz bir evrimsel konuma sahiptirler (Delsuc ve ark., 2006). Thaliacean'lar (pirozomlar, salplar ve doliolidler) serbest yüzerken (planktonik), sapsız formlar (ascidiyanlar) şeklinde sınıflandırılabilen tunikatlar, esas olarak iskele yığınları, gemi gövdeleri, kayalar ve çeşitli deniz canlılarının kabukları gibi katı yüzeylerde, hem sığ hem de çok derin sularda bulundukları için kayalarda, mercan molozlarında, iskele kazıklarında, hatta deniz bitkilerinde ve alglerde büyüyebilirler (Palanisamy ve ark., 2017; Santhanam ve Ramesh, 2019). Tunikatlardan elde edilen bileşikler, alkaloid türevlerinden peptidlere, poliketidlere, kinonlara ve steroidlere kadar kimyasal yapı çeşitliliği göstermektedir. Bu bileşikler genellikle sitotoksik, antibiyotik, immünosupresif aktiviteler, topoizomerazların ve siklin kinazların inhibisyonu gibi bir dizi biyolojik aktivitelerin yanı sıra in vitro ve in vivo olarak antitümör, antiviral ve antienflamatuar aktiviteler gibi çeşitli biyoaktiviteler de göstermektedirler (Dou ve Dong, 2019; Dumollard ve ark., 2017; Duran ve ark., 1998; Palanisamy ve ark., 2017; Watters, 2018). *Aplidium* sp. tunikatından izole edilen ilk metabolit geranilhidrokinon, lösemiye karşı sitotoksik etkili bir bileşiktir (Fenical, 1976; Rudali ve Menetrier, 1967). En iyi bilinen didemininler ise *Trididemnum* sp. türüne ait Karayip tunikatlarının tüm vücut homojenatlarından izole edilmiştir (Palanisamy ve ark., 2017).

Biyoaktif deniz doğal ürünleri, 2003-2018 yılları arasında yıllık olarak yayınlanan "Marine Natural Products" başlıklı bir dizi incelemenin konusunu oluşturmaktadır. Yapılmış önceki çalışmalarda bildirilen ortalama bileşik sayısı ile karşılaştırıldığında, deniz bakterileri, mantarlar ve siyanobakterilerden elde edilen yeni bileşiklerin sırasıyla %22, %85 ve %61 oranlarında artarken; süngerler, sölinteralar ve tunikatlardan elde edilen yeni bileşiklerin aynı dönemde sırasıyla %11, %16 ve %45 oranlarında azalmasıyla dikkat çekmektedir (Carroll ve ark., 2020).

Bunun en önemli nedeni olarak deniz omurgasızları ile karşılaştırıldığında, deniz mikroorganizmalarının kültürlenebilir olmaları, üzerinde yapılan çalışmaların kolayca yenilenebilir ve tekrarlanabilir olmaları gösterilmektedir (Blunt ve ark., 2015).



Şekil 1.3. 2014-2018 yılları arasında izole edilen deniz doğal ürünlerinin kaynak canlılarının yıllara göre dağılımları

1.2.3. Deniz Kaynaklarından Elde Edilen Başlıca Sekonder Metabolit Türleri

Deniz Farmakolojisi, deniz bitki ve hayvan türlerinde bulunan aktif farmakolojik özelliklere sahip maddelere odaklanan bir farmasötik bilimler dalıdır. Deniz ortamı, genellikle karasal doğal ürünlerde bulunmayan yapısal ve kimyasal özelliklere sahip, yeni biyoaktif doğal ürünler için olağanüstü bir kaynaktır. Deniz organizmaları ayrıca zengin bir nutrasötikler kaynağı ve çeşitli hastalıklarının tedavisi için potansiyel adaylar sağlamaktadırlar (Malve, 2016). Florotaninler, fenolikler, alkaloidler,

fukoksantin, sülfatlanmış polisakkaritler, biyoaktif peptitler, kitin ve kitosandan oluşan kitooligosakkaritler ve benzeri diğer biyoaktif bileşikler gibi birçok sekonder metabolit, farmasötik etkinlikleri bilinen deniz kaynaklı bileşiklere örneklerdir (Kim, 2012a). Bunların yanı sıra karakteristik yapısal özelliklerle ayırt edilen çok çeşitli ve değerli terpenoid yapılar da üretilmektedirler. Bazı yapısal sınıflar, örneğin, cembran, chamigren, amfilektan iskeletleri ve izonitril, izotiyosiyanat, izosiyanat, dikloroimin ve halojenli işlevsellikler gibi alışılmadık fonksiyonel gruplar, ağırlıklı olarak deniz metabolitlerinde bulunmaktadır (Kim, 2012b).

Florotaninler, floroglusinolün polimerizasyonu ile oluşturulan veya 1,3,5-trihidroksibenzen monomer birimleri olarak tanımlanan ve asetat-malonat yolağı yoluyla biyosentezlenen fenolik bileşiklerdir. Florotanninler, antioksidan, anti-HIV, antiproliferatif, antienflamatuar, radyoprotektif, antidiyabetik, anti-Alzheimer, antimikrobiyal ve antihipertansif aktiviteler dahil olmak üzere etkili çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir. Deniz yosunları arasında, yenilebilir kahverengi bir alg olan *Ecklonia cava*, diğerlerine kıyasla zengin bir florotanin kaynağıdır (Kim, 2012a).

Biyoaktif peptidler, ana protein dizisi içerisinde inaktif olan, ancak gastrointestinal sistem içerisinde sindirime uğrama, besin işleme veya fermantasyon gibi işlemler sonucunda serbest kalan, genellikle 3-20 aminoasit kalıntısı içeren, biyoaktivitesi bu aminoasitlerin yapısına ve sıralanışına bağlı olarak değişen kısa aminoasit zincirleridir. Deniz kaynaklı biyoaktif peptitler, büyük ölçüde deniz proteinlerinin enzimatik hidrolizinden elde edilmişlerdir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bu bileşiklerin antioksidan, antihipertansif veya ACE inhibisyonu, antikoagülan ve antimikrobiyal aktiviteler dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahip oldukları bildirilmiştir (Kim ve Mendis, 2006). Ayrıca, bu biyoaktif peptitlerin bazılarının, insan sağlığının iyileştirilmesi ve hastalık riskinin azaltılması yönünde nutrasötik potansiyele sahip oldukları tespit edilmiştir (Shahidi ve Zhong, 2008). Son zamanlarda, gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin kardiyovasküler hastalık riskini azaltmada olası rolleri tespit edilmiştir (Erdmann ve ark., 2008). 3000-5000 Da

aralığında moleköl ağırlığına sahip linear peptidler anemon toksinleri, güçlü kardiyostimulanlardır ve dijitalerin yerini alabilecekleri önerilmiştir, ancak hayvanlardaki işlevleri tam olarak bilinmemektedir. *Anthopleura elegantissima* anemonundan, *Polyorchis penicillatus* hidromedusadan ve *Renilla koellikeri* deniz menekşesinden elde edilen daha küçük peptidlerin, sölenteralar tarafından hareketliliği uyaran nöropeptidler olduğu bulunmuştur (Rinehart, 2008).

Son yıllarda, deniz alglerinden elde edilen, ayrıca memeliler ve omurgasızlar gibi hayvanlarda da yaygın bulunan sülfatlanmış polisakkaritler, çok çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteler gösteren, karmaşık bir makromolekül grubunu içeren, kimyasal olarak anyonik bileşiklerdir. Deniz algleri hayvansal olmayan sülfatlanmış polisakkaritlerin önemli bir kaynağıdır. Bu sülfatlanmış polisakkaritlerin kimyasal yapıları, kahverengi alglerde (Phaeophyceae) fukoidan bileşiği, kırmızı alglerde (Rhodophyceae) karragenan bileşiği ve yeşil alglerde (Chlorophyceae) ulvan bileşiği şeklinde alg türlerine göre değişiklik göstermektedir (Costa ve ark., 2010). Bu sülfatlanmış polisakkaritler, anti-HIV-1, antikoagülan, immunomodülatör ve antikanser aktiviteleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedirler (Kim, 2012b).

Kitin, dünya üzerinde selülozdan sonra en çok bulunan ikinci biyopolimer olup en çok bulunan polisakkarittir. Birçok mantarın koruyucu dış iskeletini oluşturan ve hücre duvarı olarak kabuklularda ve böceklerde yaygın olarak bulunan, genellikle yengeç ve karides kabuklarından hazırlanan, $\beta(1 \rightarrow 4)$ bağlantılı N-asetilglukozamin birimlerinin bir glikanıdır. Kitosan, kitinin alkali deasetilasyonu ile hazırlanan N-asetilglukozaminin kısmen deasetillenmiş bir polimeridir (Kim ve ark., 2006). Kitoooligosakkaritler ise kitosanın kimyasal veya enzimatik hidrolizi yoluyla üretilen, glukozamin birimleri içeren polikasyonik polimerlerdir. Kitoooligosakkaritler, toksisitelerinin az olması ve yüksek çözünürlükleri ile antioksidan, ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik, hipokolesterolemik, hipoglisemik, anti-Alzheimer, antikoagülan ve adipogenez

inhibisyon özellikleri gibi pozitif fizyolojik etkileri nedeniyle farmasötik ve tıbbi uygulamaları açısından, artan bir ilgi konusu olmuşlardır (Kim ve Rajapakse, 2005).

Poliketit, makrolit ve polieter türü bileşiklerle ilgili biyosentetik kanıtlar hala seyrek olmasına rağmen, asetat, propiyonat veya bütiratın doğrusal yoğunlaşmasıyla deniz türlerinden açıkça türetilen çok sayıda bileşik örneği bulunmaktadır. Poliketitlerin en basit örneklerinden biri olan Laurencin, bir bromonyum iyonu tarafından siklizasyonu tetiklenen, deniz ortamında yaygın olan haloperoksidazlardan birinin müdahalesiyle halojenin dahil edildiği kırmızı alg *Laurencia glandulifera*'dan türetilmiş bir bileşiktir. Peroksit grubundan sekonder metabolit özelliği taşıyan Plakortik asit ise linear poliketitten türetilmiş antifungal bir bileşiktir. Deniz türlerinden bir dizi polisiklik polieter toksinin izole edilmesi ile bazı önemli bileşiklere ulaşılmıştır. Polieterler arasında öne çıkan Briostatin I, bryozoan *Bugula neritina*'dan elde edilmiş bir antikanser ajan olarak faz çalışmalarına katılmıştır. Bir diğer bileşik olan Okadaik asit, başlangıçta *Halichondria okadai* ve *H. melanodocia* süngerlerinden ve daha sonra bir *Phakellia* türü olan *New England* süngerinden izole edilmiştir. Deniz planktonik mikroalglerin zararlı türleri arasında bulunan dinoflagellat *Gymnodinium breve* tarafından üretilen Brevetoksinler, daha karmaşık polieterlerdir (Rinehart, 2008).

Karotenoidler, bitkiler, algler, mantarlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, ancak hayvanlar tarafından sentezlenmeyen, pigmentli bileşikler ailesinden olup, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğer kronik hastalıklar da dahil olmak üzere insan hastalıklarını önlemede etkili olduğu düşünülmektedir (Agarwal ve Rao, 2000). *Synechocystis trididemni* tarafından üretilen Feofitin bileşiği, daha sonra Dedemnin'leri de üreten tunikat *Trididemnum solidum* tarafından değiştirilerek magnezyum yerine nikel içeren, vinil grubu yerine hidroksimetil grubu taşıyan ve uzun zincirli fitol esterin olmadığı Tuniklorin pigmentine dönüştürülmüştür. Bu durum Mavi-yeşil alg *Synechocystis trididemni* ve tunikat *Trididemnum solidum* arasındaki simbiyotik yaşıntının da önemine dikkat çekmektedir (Rinehart, 2008).

Terpenler ve steroller deniz kaynaklarından en çok elde edilen bileşik türlerindendir. Sölentera'lardan izole edilen seskiterpenoid antitümör bileşik Crassin asetat ve diterpenoid antifouling bileşik Renilla foulin C deniz organizmalarından elde edilen terpenlere iyi birer örnektirler. Kapnellenetriol örneğinde olduğu gibi bazı sistemler, ilk kez ve/veya sadece deniz ürünlerinde bulunmuştur ve halojen substituentleri gibi bazı fonksiyonel gruplar da deniz terpen metabolitlerinin karakteristiğini oluşturmaktadır. Örneğin, kırmızı alg *Laurencia* sp. türünden izole edilen Laurinterol, Gram-pozitif bakterilere karşı gösterdiği aktivite ile streptomisine rakip olmaktadır. İzosiyanopupukeanan'da olduğu gibi izonitril, izotiyosiyanat ve tiyosiyanat substituentleri, siyanür iyonundan kaynaklanan deniz terpenlerinin diğer bir karakteristik özelliğidir. HIV inhibitörleri olduğu bildirilen diterpenler Avarol ve Avaron'un yanı sıra antienflamatuar ajan olarak Manoalid de ilgi konusu olan deniz terpenlerindendir. Holothurian'lardan (Deniz Hıyar'ları) elde edilen birçok triterpen saponinin antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Holothurin A ile gösterilen bu bileşikler, genellikle bir dizi şeker substituentleri içeren, memeliler için de toksik olan bileşiklerdir (Rinehart, 2008).

Ökaryotik canlılar, plazma membranında %20-30 oranında yüksek steroller içermektedir. Farklı ökaryotik canlılara baktığımızda bitkilerde Fitosteroller (sitosteroller, stanoller vb.), mantarlarda Ergosterol ve hayvanlarda Kolesterol gibi membran güçlendirici yüksek steroller bulunmaktadır. Bunlar arasında triterpenik yapıdaki fitosteroller kolesterol düşürücü etkinlikleri ile dikkat çekmektedir (Kim, 2012b). Deniz sterolleri, S-adenosilmetiyoninden türetilen dallı karbonlara sahip Kolesterol'de olduğu gibi, yan zincirdeki karmaşık alkilasyon modelleri ile karakterize edilmektedir. Diğer bir deniz steroid sınıfı, esas olarak denizyıldızında bulunan yüksek oksijenli, karbonhidrat substituentli metabolitler olan saponinlerdir. Mosesin I gibi bazı deniz saponinleri, farklı dil balığı türleri tarafından antifeedant (diğer canlılar tarafından yenilmeyi önleyici) maddeler olarak üretilmektedirler ve eşlik eden bir polipeptitin güçlendirdiği etki ile köpekbalıklarının kovmaktadır (Rinehart, 2008).

Azot içeren heterosiklikler olarak da bilinen alkaloidler, en ilginç deniz sekonder metabolitleri arasındalardır. Karasal bitkiler tarafından üretilen alkaloidler gibi, birçoğu açık bir şekilde amino asit prekürsörlerinin siklizasyonu ile türetilmektedirler. Bu nedenle, koloni oluşturan *Eudistoma olivaceum* tunikatından elde edilen Ödistomin'ler, açıkça triptofandan (veya triptaminden) ve karasal β -karbolin'ler gibi ikinci bir amino asitten biyosentetik olarak türetilmektedirler. Ödistomin C, E, K ve L'nin tunikattaki işlevi bilinmemekle birlikte deniz organizmalarındaki en aktif antiviral ajanlar arasındadırlar. Benzer bir şekilde koloni oluşturan *Ecteinascidia turbinata* tunikatından elde edilen Ecteinascidin'ler, deniz kaynaklarından izole edilen en aktif antitümör ajanları arasındadırlar. Deniz organizmalarından elde edilen diğer sekonder metabolitlerin çoğunda olduğu gibi, Ecteinascidin'lerin de işlevi bilinmemektedir. *E. turbinata* larvalarının kimyasal olarak korunuyor olmasının ve hemen hemen her zaman diğer organizmalardan daha temiz bulunmasının sebebi olarak içerdikleri Ecteinascidin'lerden şüphelenilmektedir. Genellikle tunikatlarda veya süngerlerde bulunan, kondense edilmiş birkaç halkaya sahip bir dizi aromatik heterosiklikden oluşan deniz sekonder metabolitlerine özgü bileşikler sınıfına, Amfimedine örnek verilmektedir. Bu bileşikler genellikle memeli hücreleri için toksiktir (Rinehart, 2008).

Deniz kaynaklı organizmalardan mantarlar daha ayrıntılı olarak incelendiğinde en çok elde edilen sekonder metabolit türleri, alkaloidler, diketopiperazinler ve peptidleri de içeren azotlu bileşikler, poliketidler ve prenilasyonlu poliketidler (meroterpenoidler), terpenoidler ve lipidler şeklinde sınıflandırılabilir (Ebada ve Proksch, 2012). Deniz türevi mantardan elde edilen birçok çeşitli kimyasal yapıların bulunmasının yanı sıra, antimikrobiyal (Donia ve Hamann, 2003), antitüberküloz (El Sayed ve ark., 2000), antiviral (El Sayed, 2000), antiparazitik (Kayser ve ark., 2002), antihelmintik, antimalaryal, antiprotozoal, antikoagülan, antiplatelet, antienflamatuar, antidiyabetik etkiler ve antitümör etkiler de içeren geniş bir farmakolojik etkinlik yelpazesine sahiptir ve ayrıca bu bileşiklerden bazılarının kardiyovasküler, bağışıklık ve sinir sistemlerini de etkileyebileceği kanıtlanmıştır (Mayer ve ark., 2011; Mayer ve

ark., 2010; Waters ve ark., 2010). Güçlü etkinlikleri ile elde edilen bu metabolitler, klinik çalışmalarda yer almaktadır.

1.2.4. Deniz Kaynaklı İlaçlar ve Son Güncellemeler

Amerika Birleşik Devletleri'nde şu anda kullanılan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış onüç ve Avusturalya Tedavi Ürünleri İdaresi (TGA) tarafından onaylanmış bir adet deniz türevi ilaç piyasada bulunmaktadır. Ayrıca klinik denemelerin farklı aşamalarında ve klinik öncesi veri hattında çok sayıda deniz türevi bileşik yer almaktadır (Mayer, 2021).

Trabectedin (Yondelis®, ET-743), koloni oluşturan *Ecteinascidia turbinata* tunikatından izole edilmiş bir tetrahidroizokinolin alkaloididir. Bu bileşik, Avrupa Birliği'nde yumuşak doku sarkomunun tedavisi için ve platin duyarlı over kanseri vakalarının tekrarlayan durumlarında onaylanan ilk antikanser ajandır (Verweij, 2009; Yap ve ark., 2009). YONDELIS 1 mg IV konsantre infüzyonluk çözelti için toz preparatı Onko Koçsel İlaç San. Tic. A.Ş tarafından Türkiye ilaç piyasasında yerini almaktadır.

Brentuximab vedotin 63 (Adcetris®), tamamen sentetik bir Dolastatin 10 molekülü analoguna dayanan bir antikanser ajandır. Dolastatin 10, 1972 yılında deniz yabani tavşanı *Dolabella auricularia*'dan izole edilmiştir (Pettit ve ark., 1987). Hodgkin ve sistemik anaplastik büyük hücreli lenfoma tedavisi için onaylanan bir deniz kaynaklı ilaçtır (Firsova ve ark., 2017).

Eribulin mesilat (Halaven®), ilk kez 1986 yılında deniz süngeri *Halichondria okadaï*'den izole edilmiştir. Yapısal olarak basitleştirilmiş Halichondrin B'nin sentetik bir analogudur. Deniz türevi mikrotübül hedefli bir ajandır. Murin lösemi hücrelerinde yüksek sitotoksiteye sahip olduğu bulunmuştur. 2010 yılında FDA ve 2011 yılında EMEA(Avrupa, Orta-Doğu ve Afrika) tarafından metastatik meme kanseri için onaylanmıştır (Dumontet ve Jordan, 2010; Huyck ve ark., 2011).

Lovaza® (eski adıyla Omacor), balık yağlarından izole edilmiş birkaç Omega 3 yağ asidinin etil esterlerinden oluşan bir anti-hipertrigliseridemi ilaçtır. Deniz kaynaklı Omega-3 yağ asitlerinin, trigliseritleri ve düşük yoğunluklu kolesterolleri (LDL) azalttığı, kandaki yüksek yoğunluklu kolesterolleri (HDL) artırdığı kanıtlanmıştır. Beslenme ve statinler ile birlikte terapötik etkilidir (Pettit ve ark., 1987).

Zikonotid (Prialt®), koni salyangozu *Conus magus*'tan izole edilmiş doğal olarak oluşan bir peptit olan ω -konotoksinin sentetik bir formudur. Bu bileşik, 2004'te FDA onayı ve 2005'te EMEA onayı alan Morfin'den sonraki ilk intratekal analjezik ilaçtır. Şu anda kanser veya AIDS gibi ciddi kronik ağrılı hastalar için nitelendirilmektedir (Rauck ve ark., 2009; Staats ve ark., 2004).

Vidarabin (Vira-A®, arabinofuranosiladenin veya adenin arabinosid, Ara-A), ilk olarak Karayip süngeri *Tethya crypta*'dan izole edilen Spongouridin'den geliştirilen sentetik bir pürin nükleosididir (Bergmann ve Stempien, 1957). Şu anda Spongouridin, *Streptomyces antibioticus* gram pozitif bakterisinin fermantasyonundan elde edilmektedir (Hong ve ark., 1986). *Herpes simplex* virüsü tip 1 ve 2'nin neden olduğu tekrarlayan epitelyal keratit, akut kerato-konjonktivit ve ayrıca yüzeysel keratit için FDA tarafından onaylanmıştır (Mayer ve ark., 2010).

Sitarabin (Cytosar-U®, arabinosil sitozin veya sitozin arabinosit, Ara-C) ilk olarak bir Karayip süngeri *Tethya crypta*'dan izole edilen Spongotimidin'den geliştirilmiş sentetik bir pirimidin nükleosididir (Bergmann ve Stempien, 1957). Akut miyelositik lösemi, lenfositik lösemi, meningeal lösemi ve kronik miyelojenöz lösemnin patlama krizi fazı dahil olmak üzere farklı lösemi tiplerinde kullanılan, deniz kaynaklı bir antikanser bileşigi olarak 1969'da onaylanmıştır (Absalon ve Smith, 2009; Thomas, 2009).

Omega-3-karboksilik asit (Epanova®, Omthera Pharmaceuticals Inc., NJ, ABD), Eikosapentenoik asit(EPA) ve dokosaheksenoik asit (DHA) bileşiklerinin biyoyararlanımını, düşük yağlı diyetlerle en üst düzeye çıkarmak için geliştirilmiş yeni bir ω -3 serbest yağ asidi formülasyonudur ve hipertrigliseridemili hastaların tedavisinde p-3-asit etil esterler ile karşılaştırıldığında potansiyel bir terapötik avantaj sağlamaktadır (Kataoka ve ark., 2013).

Eikosapentaenoik asit etil esterleri (Vascepa®, icosapent etil; Amarin Pharma), şiddetli hipertrigliseridemili yetişkin hastalarda trigliserit düzeylerini düşürmek için diyetle ek olarak FDA tarafından Temmuz 2012'de onaylanmıştır. Icosapent etil, saf bir omega-3 yağ asididir ve bu endikasyon için FDA tarafından ilk kez onaylanan, sadece EPA içeren bir omega-3 ajanıdır (Fala, 2013).

Plitidepsin (Aplidin®, PharmaMar tarafından üretilmektedir), Dehidrodidemnin B, eEF1A2'ye bağlanan ve kanser hücrelerinde oksidatif stresi indükleyen bir ascidiyan depsi-peptiddir. İlk olarak 2018'de multipl miyelom, lösemi ve lenfoma tedavisi için Avustralya'da onaylanmıştır (Brönstrup ve Sasse, 2020; Dyshlovoy ve Honecker, 2020).

Polatuzumab vedotin (Polivy™, Genentech, Roche tarafından üretilmektedir), CD76b 'ye özgü monoklonal antikor polatuzumab ile konjuge MMAE'den (Monometil Auristatin E; simbiyotik deniz siyanobakterilerinin bir peptit toksini olan Dolastatin 10'un bir analogu) oluşan bir antikor ilaç konjugatı (ADC)'dir. İlaç, B hücreli lenfomaların, non-Hodgkin lenfomaların ve kronik lenfositik löseminin tedavisi için 2019 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Deeks, 2019; Dyshlovoy ve Honecker, 2020).

Enfortumab vedotin (PADCEV™, Astellas Pharma ve Seattle Genetics tarafından üretilmektedir), MMAE ve nektin-4'e özgü bir antikordan oluşan başka bir ADC'dir. 2019 yılında metastatik ürotelyal kanser tedavisi için onaylanmıştır (Dyshlovoy ve Honecker, 2020; Hanna, 2020).

Lurbinectedin (Zepzelca™, PharmaMar tarafından üretilmektedir), DNA'nın küçük yarığına bağlanan ve RNA polimeraz II'nin inhibisyonu ve degradasyonu yoluyla antikanser etkisini gösteren sentetik bir Trabectedin türevidir. İlaç, 2020 yılında metastatik küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisi için onaylanmıştır (Dyshlovoy ve Honecker, 2020; Markham, 2020b).

Belantamab mafodotin (Blenrep™, GlaxoSmithKline tarafından üretilmektedir), Mikrotübül inhibitörü Monometil Auristatin F (MMAF)'ye konjuge edilmiş B hücresi olgunlaşma antijenini (BCMA) hedefleyen bir antikor içeren, alanında birinci bir monoklonal antikor-ilâç konjugatıdır (ADC). MMAE'ye benzer şekilde, MMAF, tübülün polimerizasyonunu hedeflemektedir. İlaç, tekrarlayan ve refrakter multipl miyelomun tedavisi için 2020 yılında onaylanmıştır (Dyshlovoy ve Honecker, 2020; Markham, 2020a).

Çizelge 1.1. Deniz canlılarından elde edilen ve piyasada bulunan onaylı ilaçlar (Mayer, 2021).

Bileşik Adı	Tescilli Marka	Deniz Canlısı	Kimyasal Sınıf	Moleküler Hedef	Hastalık Alanı	Firma/ Enstitü
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep TM (2020)	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (MMAF)	BCMA	Kanser: Tekrarlayan / refrakter multipl miyelom	[GlaxoSmith Kline]
Lurbinektedin	Zepzelca TM (2020)	Tunikat	Alkaloid	RNA Polimeraz II	Kanser: Metastatik Küçük hücreli Akciğer Kanseri	[Pharmamar]
Enfortumab Vedotin-ejfv	PADCEVT M (2019)	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (MMAE)	Nektin-4	Metastatik ürotelyal kanser	[Astellas Pharma & Seattle Genetics]
Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	Polivy TM (2019)	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (MMAE)	CD76b & mikrotübüller	Kanser: Non-Hodgkin lenfoma, Kronik lenfotik lösemi, Lenfoma, B Hücreli lenfoma, Foliküler	[Genentech / Roche]
Plitidepsin**	Aplidin®	Tunikat	Depsipeptid	eEF1A2	Kanser: çoklu myelom, lösemi, lenfoma	[Pharmamar]
Trabektedin (ET-743)	Yondelis® (2015)	Tunikat	Alkaloid	Minör DNA oluğu	Kanser: Yumuşak Doku Sarkomu ve Yumurtalık Kanseri	[Pharmamar]
Omega-3-karboksilik asit	Epanova® (2014)	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi	[AstraZeneca]
Eikoza pentaenoik asit etil ester	Vascepa® (2012)	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi	[Amarin]

Çizelge 1.1. Devam

Brentuksimab vedotin (SGN-35)	Adcetris® (2011)	Yumuşakça/siyanobakteri	ADC(MM AE)	CD30 & mikrotübüller	Kanser: Anaplastik büyük hücreli sistemik malign lenfoma, Hodgkin hastalığı	[Seattle Genetics]
Eribulin Mesilat (E7389)	Halaven® (2010)	Sünger	Makrolid	Mikrotübüller	Kanser: Metastatik Meme Kanseri	[Eisai Inc.]
Omega-3-asit etil esterler	Lovaza® (2004)	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi	[GlaxoSmithKline]
Zikonotid	Prialt® (2004)	Koni salyangozu	Peptid	N-Tipi Ca kanalı	Ağrı: Şiddetli Kronik Ağrı	[Jazz Pharmaceuticals]
Vidarabin (Ara-A)	Vira-A® (1976)	Sünger	Nükleozid	Viral DNA polimeraz	Antiviral: Herpes Simplex Virüsü	[Mochida Pharmaceutical Co.]
Sitarabin (Ara-C)	Cytosar-U® (1969)	Sünger	Nükleozid	DNA polimeraz	Kanser:Lösemi	[Pfizer]

Çizelge 1.2. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 3 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler (Mayer, 2021).

Bileşik Adı	Tescilli Marka	Deniz Canlısı	Kimyasal Sınıf	Moleküler Hedef	Hastalık Alanı	Firma/Enstitü
Plinabulin (NPI-2358)	-	Mantar	Diketopiperazin	Mikrotübüller	Kanser: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Beyin Tümörü	[BeyondSpring Pharmaceuticals]
Tetrodotoksin	Halneur on™	Kirpi balığı	Guanidiniyum alkaloidi	Sodyum kanalları	Ağrı: Kronik Ağrı	[Wex Pharmaceutical Inc.]

Çizelge 1.2. Devam

Lurbinektedin (PM01183)	Zepsyre®	Tunikat	Alkaloid	RNA Polimeraz II	Kanser: Yumurtalık Kanseri, Meme Kanseri, SCLC	[Pharmamar]
Marizomib (Salinosporamid A; NPI-0052)	-	Bakteri	Beta-lakton-gamma lactam	20S proteazom	Kanser: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Pankreas Kanseri, Melanom, Lenfoma, Multipl Miyelom	[Triphase]

Çizelge 1.3. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 2 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler (Mayer, 2021).

Bileşik Adı	Tescilli Marka	Deniz Canlısı	Kimyasal Sınıf	Moleküler Hedef	Hastalık Alanı	Firma/ Enstitü
GTS-21 (DMXBA)	-	Solucan	Alkaloid	$\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörü	Şizofreni, Alzheimer Hastalığı, Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, Endotoksemi, Sepsis, Vagal Aktivite	No Link
AGS-16C3F	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAF)	ENPP3 & mikrotübüller	Kanser: Renal Hücreli Karsinom	[Agensys & Astellas Pharma]
Plokabulin (PM184)	-	Sünger	Poliketid	Minor DNA oluşu	Kanser: Solid Tümörler	[Pharmamar]
Tisotumab Vedotin	HuMax®-TF-ADC	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAF)	Doku faktörü & mikrotübüller	Kanser: Yumurtalık Kanseri, Rahim Ağzı Kanseri, Endometriyum Kanseri, Mesane Kanseri, Prostat Kanseri (CRPC), Baş Boyun Kanseri (SCCHN), Özofagus Kanseri, Akciğer Kanseri (NSCLC)	[GenMab]

Çizelge 1.3. Devam

Ladiratuzumab vedotin (SGN-LIV1A)	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAF)	LIV-1 & mikrotubuller	Kanser: Meme Kanseri	[Seattle Genetics]
Briyostatin	-	Bryozoon	Macrolid laktone	Protein kinaz C	Alzheimer hastalığı	[Neurotropic BioScience]
Telisotuzumab vedotin (ABBV-399)	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	c-Met	Kanser: Solid Tümörler	[Abbvie]
Enapotamab vedotin (HuMax-AXL)	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	Axl RTK	Kanser: Yumurtalık Kanseri, Rahim Ağzı Kanseri, Endometriyal Kanseri	[Genmab]
RC-48	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2	Kanser: Ürotelyal Karsinom, İlerlemiş Kanseri, Mide Kanseri, İleri evre Meme Kanseri, Solid Tümörler	[RemeGen]
CAB-ROR2 (BA-3021)	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	ROR2	Kanser: Solid Tümör, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Üçlü Negatif Meme Kanseri, Yumuşak Doku Sarkomu	[BioAtla]
CX-2029 (ABBV-2029)	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	CD71	Kanser: Solid Tümör, Baş ve Boyun Kanseri, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Pankreas Kanseri, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	[AbbVie & CytomX Therapeutics]
W0101	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	IGF-R1	Kanser: İleri evre veya Metastatik Katı Tümörler	[Pierre-Fabre]

Çizelge 1.4. Deniz canlılarından elde edilen ve faz 1 çalışmaları gerçekleştirilen etken maddeler (Mayer, 2021).

Bileşik Adı	Tescilli Marka	Deniz Canlısı	Kimyasal Sınıf	Moleküler Hedef	Hastalık Alanı	Firma/ Enstitü
ARX-788	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2 & Mikrotübüller	Kanser: Meme kanseri, Mide kanseri	[Ambrex & Zhejiang Medicine]
XMT-1536	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Dolafleksin)	NaPi2b & Mikrotübüller	Kanser: Solid Tümörler	[Mersana Therapeutics]
ALT-P7	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2 & Mikrotübüller	Kanser: Meme kanseri, Mide kanseri	[3SBio & Alteogen]
MORAb-202	-	Sünger	ADC (Makrolid)	Mikrotübüller	Kanser: Solid Tümörler	[Eisai]
PF-06804103	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Auristatin varyantı)	HER2	Kanser: Meme Tümörleri, Mide Tümörleri, Özofagogastrik Bağlantı Tümörleri, Karsinom, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	[Pfizer & AbbVie]
Grifitsin	-	Kırmızı alg	Lektin	Karbonhidrat bağlayıcı	HIV önleme	[Center for Predictive Medicine]
ZW-49	--	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Auristatin varyantı)	HER2	Kanser: HER2 aracılı Kanseler	[Zymeworks & BeiGene]

1.2.5. Deniz Kaynaklı Mantarlar

Mantarlar, bitkiler ve hayvanlarla simbiyotik ilişkiler içinde gelişmeleri ve çeşitli ekosistemlerde besin döngüsünün ayrılmaz bir parçası olmaları nedeniyle karasal ortamlarda baskın bir rol oynamaktadırlar. Karasal biyosferde bir karbon kaynağının ve nemin bir arada bulunduğu her yerde, mantarların oluşması beklenirken bu durumun deniz biyosferi için de geçerli olup olmaması yönünde araştırmalar yapılmıştır (Zin, 2018).

Deniz mantarları, Durieu ve Montagne tarafından Cezayir'deki Akdeniz için endemik bir tür olan *Posidonia oceanica* deniz çayırının rizomundaki *Sphaeria posidoniae* (*Halothia posidoniae*) mantar türünün ilk kaydından bu yana incelenmektedir (Montagne, 1879). Deniz mantarları üzerine yayımlanan ilk araştırmadan (Barghoorn ve Linder, 1944) yaklaşık yirmi yıl sonra deniz mikologları, Johnson ve Sparrow (1961) ardından Kohlmeyer ve Kohlmeyer (1979) deniz mantarının ilk tanımlamasını yapmışlardır. Deniz mantarlarının genel kabul gören ekolojik tanımı “Zorunlu deniz mantarları, yalnızca deniz veya nehir ağzı habitatlarında yetişen ve spor yapan mantarlardır; fakültatif deniz mantarları ise tatlı su veya karasal ortamda büyüeyebilen ve muhtemelen deniz ortamında spor yapabilen mantarlardır” şeklindedir (Kohlmeyer ve Kohlmeyer, 1979). Doğal ürün araştırmacıları genellikle deniz ortamlarından toplanan mantarları sınıflandırmak için “deniz türevi” terimini kullanarak, deniz mantarlarını deniz ortamlarında tekrarlanabilir şekilde büyüeyebilen veya spor yapabilen; diğer deniz canlılarının simbiyontları olarak bulunan; veya gelişmek için deniz ortamlarında uyum sağlayan ve üreyen mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadırlar (Giddings ve Newman, 2019).

Mantarlar, derin denizler, hidrotermal menfezler, kutup sistemlerin, deniz sedimenti, kumsal ve dalgaların sürüklediği ağaç parçaları, algler, deniz omurgasızları ve omurgalıları veya bitkiler(Mangrovlar gibi) gibi çeşitli deniz ortamlarında bulunmaktadırlar. Okyanus havası bile çeşitli mantar türlerini içermektedir (Fröhlich-Nowoisky ve ark., 2012).

Deniz mantarları üzerine ilk çalışmalar, makroalgler yani deniz yosunlarından, kökleri sualtında bulunan ağaçlar ve deniz çayırından izole edilen bileşiklere odaklanmıştır. Sonrasında bunu 1970'lerde, mikroskopta yapılan önemli teknolojik ilerlemeler sayesinde, mantar morfolojisi ve taksonomisi üzerine yayınlanmış daha fazla çalışmalar izlemiştir. Otuz yıl sonra, geliştirilmiş yüksek verimli genomik sıralama yöntemleri, deniz kaynaklarından taksonları sınıflandırmada sıklıkla

kullanılmıştır (Singh ve ark., 2012). Ayrıca, metatranskriptomik sıralama, deniz topluluklarında bulunan mantarların, biyojeokimyasal döngüde organik maddenin ayrışması ve mineralizasyonu, konak organizmalarda parazitler, patojenler, mutualistler ve endobiyontlar gibi işlev görmesi, kimyasal savunmada veya dikkat çekici olarak görev alması gibi önemli rollerinden bazılarını ortaya koymaktadır (Giddings ve Newman, 2019).

1940'lı yıllarda Penisilin'in kullanımı ile başlayan "Antibiyotiklerin Altın Çağı" dönemi, yeni terapötiklerin kaynağı olarak mikroorganizmaların kapsamlı bir şekilde araştırılmasına öncü olmuştur. Deniz kaynaklı mantarlardan ilk doğal ürünün şans eseri keşfi, antibiyotik üreten organizma arayışında olan Brotzu'nun, 1945 yılında, Sardinia, Cagliari'deki bir kanalizasyon çıkışının yakınındaki mikrobiyal deniz suyunu incelemesi sonucu gram pozitif ve negatif bakterilerin büyümesini engelleyen bir mantar izole etmesi ile gerçekleşmiştir. 1948 tarihli raporda bu mantar, *Cephalosporium acremonium* olarak tanımlanmıştır (Brotzu, 1948). Kültüre alınarak yapılan araştırmalar sonucunda, Sefalosporin C ve Sefalosporin N (şimdi Penisilin N) gibi aktif bileşenler elde edilmiştir. Sefalosporin C, penisiline dirençli ve penisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı çok çeşitli biyoaktiviteler sergilemiştir (Newton ve Abraham, 1955). Biyoaktivitelerinin zayıf olmasına karşın, Sefalosporin C beta-laktamazlara duyarlılık göstermemiş ve bu sayede penisiline dirençli mikroplara karşı potansiyel biyoaktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Abraham ve Newton, 1956; Newton ve Abraham, 1956). Bu sonuçlar ile 7-aminosefalosporanik asit iskelet yapısı genişletilerek penisiline dirençli enfeksiyonları tedavi etmek için birçok Sefalosporin türevi üretilmeye başlanmıştır. Günümüzde beş farklı Sefalosporin türü bulunmaktadır (Giddings ve Newman, 2019). *Cephalosporium* cinsi daha sonra *Acremonium* olarak yeniden adlandırılmıştır. Çeşitli deniz türlerinden örneğin Japonya, Awajishima Adası'nda deniz çamurundan izole edilen *Acremonium* sp. AWA16-1 (Jang ve ark., 2006); Güney Çin Denizi'nde toplanan bir deniz sediment örneğinden izole edilen *A. persicinum* SCSIO 115 (Chen ve ark., 2012) türlerinden biyoaktif bileşiklerin üretildiği, ayrıca deniz omurgasızlarının ve alglerinin etkin bir şekilde simbiyotik *Acremonium* türlerinden birtakım başka biyoaktif bileşiklerin elde

edildiği bildirilmiştir (Giddings ve Newman, 2019). Ayrıca, deniz mantarları monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler, steroller ve meroterpenoidler gibi belirgin derecede yapısal olarak çeşitlendirilmiş terpenoidler içermektedir. Meroterpenoidler çoğunlukla mantar ve deniz organizmalarından izole edilirken, bakteriler ve yüksek bitkiler de bu tür biyosentezlenmiş karışık ürünler üretmektedir (Kim, 2012a). Her yıl yayınlanan yeni bileşiklerin sayısında, deniz kaynaklı mantarlardan elde edilen doğal ürünlerin sayısının hızla artmaya devam ettiği ve hala doruğa ulaşmadığı ifade edilebilmektedir (Rateb ve Ebel, 2011)

Deniz mantarlarından elde edilen tüm yeni kimyasal yapıların dörtte üçünün, deniz hayvanları (% 30,1), deniz bitkileri (% 42,5) gibi canlılardan izole edilen türlerinden elde edildiği, geri kalan bileşiklerin canlı olmayan kaynaklardan, en belirgin şekilde sedimentlerden (% 22,9) elde edildiği bildirilmiştir (Jin ve ark., 2016). Birçok kültür ekimine dayalı olan veya olmayan çalışma, deniz süngerlerinin, yumuşakçaların, tunikatların, alglerin ve diğer omurgasızların zengin bir deniz mantarı kaynağı olduğunu (Debbab ve ark., 2010), özellikle mangrov habitatlarının (% 25,5), alglerin (% 14,4) ve süngerlerin (% 9,2) mantar çeşitliliği için en önemli kaynaklar olduğunu göstermiştir (Zin, 2018). Mantarlar, çeşitli deniz organizmalarıyla veya bu organizmaların substratlarıyla ilişki halinde olup besin döngüsüne ve organik maddenin ayrışmasına yardımcı olmaktadır. Deniz mantarları parazitik, komensal (ortak yaşayan) veya mutualistik (birbirine bağımlı) olabilmektedirler. Sonuçta, mikroorganizma ve konak arasındaki etkileşim, konak mikrobiyomlar üzerinde derin etkileri olan kimyasal tepkimelere neden olmaktadır. Oldukça gelişmiş bu tepkimeler sonucunda, insan tıbbında klinik olarak potansiyel etkiye sahip benzersiz yeni moleküllerin yapı iskeletleri üretilmiştir (Boot ve ark., 2006; Boufridi ve Quinn, 2018; Debbab ve ark., 2010; González-Medina ve ark., 2016).

Deniz omurgasızları, farmakolojik özelliklere sahip bir dizi sekonder metabolit veren ve yeni ilaçların formülasyonuna yol açan ana organizma gruplarından biridir. Deniz omurgasızları arasında süngerler, bentik topluluğun önemli bir bölümünü

oluşturdukları ve biyokütlelerinin %40-60 kadarının ilişkili olduğu mikroplar tarafından oluştuğu için mantar araştırmalarında en çok çalışılan deniz yaşam alanı olmuşlardır (Gal-Hemed ve ark., 2011; Hu ve ark., 2011; Perdicaris ve ark., 2013). İlginç bir şekilde, bazılarının yakın zamanda karasal kaynaklardan elde edildiği öne sürülen, bazıları deniz ortamına özel olarak adapte olmuş ve bazıları halojene duyarlı olan *Acremonium* ve *Penicillium* gibi “karasal” taksonların birçoğu bu omurgasızlarda bulunmaktadır (Gal-Hemed ve ark., 2011). Süngerle ilişkili mantarlar, güçlü antibakteriyel ve antikanser aktiviteleri olan yeni metabolitler vermiştir (Jensen ve Fenical, 2000). Trikoharzin, *Mycale cecilia* süngeri ile ilişkili *Trichoderma harzianum* mantarından izole edilen ilk yeni metabolittir (Kobayashi ve ark., 1993). Gimnastatin A, B ve C, *Halikondria japonica* süngerinden izole edilen *Gymnasella dankaliensis* mantarının suşundan ilk yeni sitotoksik metabolitlerdir (Amagata ve ark., 1998). Sorbikillakton A, deniz süngeri *Ircinia fasciculata* ile ilişkili *Penicillium chrysogenum* mantarı tarafından üretilen bir başka antilösemik ajandır. Ayrıca antiviral ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Bringmann ve ark., 2007; Thakur ve Thakur, 2006). Deniz süngerleri, insanların sağlıklı yaşam süresini arttırmak için kullanılabilecek ilaç adayları, kozmetikler, besin takviyeleri ve moleküler problemler geliştirmek için zengin bir kimyasal çeşitlilik ve sağlık yararı kaynağı olarak kabul edilmektedir (Zin, 2018).

Ascidiyanlar olarak da bilinen diğer bir deniz omurgasız olan tunikatların da kültüre alınma yöntemlerinin gelişmesi sayesinde zengin mikrobiyal topluluklar barındırdığı bulunmuş ve bunların çeşitliliği hakkında bilgi edinilmiştir (Chen ve ark., 2017). Son yıllarda, tunikatlarla ilişkili artan sayıda mikroorganizma (mantarlar, bakteriler, aktinobakteriler ve siyanobakteriler dahil) izole edilmiştir (Schreiber ve ark., 2016). Tunikatlardan izole edilen, antibakteriyel, antifungal, antitümör ve antienflamatuar aktiviteler gibi çeşitli özellikler gösteren, alkaloidler, siklik peptidler ve poliketidler dahil olmak üzere 1000'den fazla doğal ürünün, ~%8'inin aslında simbiyotik mikroorganizmalar tarafından üretildiği kanıtlanmıştır (Chen ve ark., 2017; Chen ve ark., 2018; Schmidt, 2015). Diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, tunikatlardan tanımlanan mantarlar, toplam mikroorganizma topluluğunun yalnızca

küçük bir yüzdesini temsil etmektedir. Tunikatlarla ilişkili mantarların 25 cinsinden 22 cinsi (*Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bionectria*, *Botryosphaeria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Cochliobolus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Humicola*, *Meyerozyma*, *Microdiplodia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Plectosphaerella*, *Scopulariopsis*, *Talaromyces* and *Trichoderma*) Ascomycota filumuna aittir. Baskın cins *Penicillium*'dur, ardından *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Talaromyces* ve *Trichoderma* gelmektedir. Tunikatlar için mantarların önemi ve olası ekolojik rolleri belirsizliğini korumaktadır (López-Legentil ve ark., 2015).

Deniz mikroorganizmaları arasında mantarların, antimikrobiyal, antitüberküloz, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antiparazitik, antihelmintik, antimalaryal, antiprotozoal, antikoagülan, antiplatelet, antienflamatuar, antidiyabetik ve antitümör etkileri ve enzim inhibitörü özelliğindeki geniş bir farmakolojik aktivite spektrumuna sahip bileşikler içerdiği, ayrıca bazı bileşiklerin kardiyovasküler, bağışıklık ve sinir sistemlerini de etkileyebildiği kanıtlanmıştır. Bu sayede yeni biyoaktif sekonder metabolitlerin kaynağı olarak önemli bir rol kazanmıştır (Gamal-Eldeen ve ark., 2009; A. M. Mayer ve ark., 2011; Samuel ve ark., 2011; Waters ve ark., 2010). Mantarların antibakteriyel metabolitlerden ziyade zengin bir antikanser kaynağı olduğu bulunmuştur (Rateb ve Ebel, 2011).

1.3. *Aspergillus* Cinsi Mantarlar

1729'da Micheli tarafından adını alan *Aspergillus*, en eski mantar cinslerinden biridir. *Aspergillus*, oksijen açısından zengin ortamların hemen hepsinde bulunan, yüksek düzeyde aerobik olan, yalnızca eşeysiz yollarla çoğalan birkaç yüz küf türüne sahip bir cinstir (Ainsworth, 1976; Bennett, 2009). *Aspergillus*, eşeysiz sporları taşıyan ve taksonomisinin en önemli karakteri olan konidiyoforunun mikroskopik incelemesi

sırasında, Roma Katolik din adamlarının, asperges denilen ayin sırasında, kutsal su serpmek için kullandıkları aspergillum adındaki su fıskiyesine benzediği için bu adı almıştır (Ainsworth, 1976).

Thom ve Church (1926) tarafından ilk büyük monografi yayınlanan *Aspergilli*, küflü saman, organik gübre yığınları gibi birçok çürüyen bitki örtüsü üzerinde saprofit olarak bol miktarda büyürken, birçok *Aspergillus* türü, besinleri tükenmiş ortamlarda veya temel besinlerden tamamen yoksun ortamlarda oligotrofi göstererek büyümektedir. Bu çeşitli yaşam ortamları, *Aspergillus* türlerinin güçlü, istilacı bir doğaya sahip olduğunu göstermektedir. Doğal ortamdaki yaygınlıkları, laboratuvar ortamında yetiştirilme kolaylıkları ve türlerinin birçoğunun ekonomik yönden önemli olması gibi nedenlerle birçok mikolog ve mikrobiyologun ilgisini çekmiştir. Böylece *Aspergillus* en çok bilinen ve en çok çalışılan küf gruplarından biri haline gelmiştir (Bennett, 2010). Çok sayıda yararlı ekstraselüler enzim ve organik asit üretmenin yanı sıra, bu mantarlar ayrıca biyoteknolojide önemli sekonder metabolitler üretmektedirler. Antitümör, antimikrobiyal, anti-enflamatuar ve antioksidan aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren, steroller, terpen, peptidler, alkaloidler, poliketidler, laktonlar, halojenler vb de dahil olmak üzere çok sayıda yeni sekonder metabolit de izole edilmiştir (Lee ve ark., 2013; Wang ve Ding, 2018).

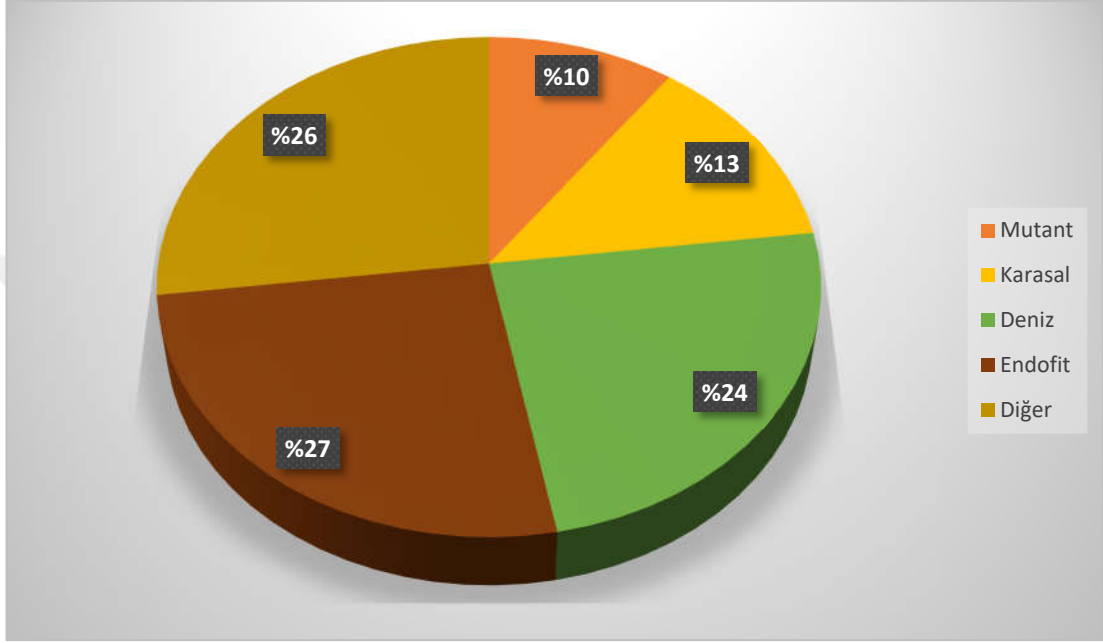
Lee ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada, deniz ve karasal kökenli *Aspergillus* sp'den elde edilen sekonder metabolitleri, kimyasal iskeletleri ve biyolojik aktiviteleri yönünden karşılaştırmışlar ve önemli bir farkın bulunmadığı, bu yüzden *Aspergillus*'un deniz ve karasal kökenli metabolik sistemlerinin oldukça benzer olduğu ve deniz kaynaklı *Aspergillus* sp'den karasal türüne göre farklı bir kimyasal sınıfın bulunmadığı sonucuna varmışlardır. *Aspergillus* sporlarının derin denizde yaşayabilmesi nedeniyle, karasal türlerin deniz ortamına dağılmış olabileceği ve önemli ölçüde çapraz kontaminasyonun meydana gelmiş olabileceği mümkün görülmüştür. Bununla birlikte, deniz kaynaklı *Aspergillus* cinsi mantarlar, yeni biyoaktif türevler üretmeleri nedeniyle, farmakolojik olarak değerli yeni bileşiklerin üretken bir kaynağı olarak

kabul edilmişlerdir. Bunu destekler nitelikte Wang ve Ding (2018), yaptıkları çalışmada, 2006'dan 2016'ya kadar deniz kaynaklı *Aspergillus*'tan 232 yeni sekonder metaboliti ve bunların çeşitli biyoaktivitelerini bildirmişlerdir. Böylece, hastalıkların tedavisinde ve insan sağlığını desteklemede daha biyoaktif metabolitlerin geliştirilmesi ile deniz kaynaklı *Aspergillus* cinsi mantarların, yeni terapötik ilaçlar için umut verici bir kaynak olacağı kanıtlanmıştır.

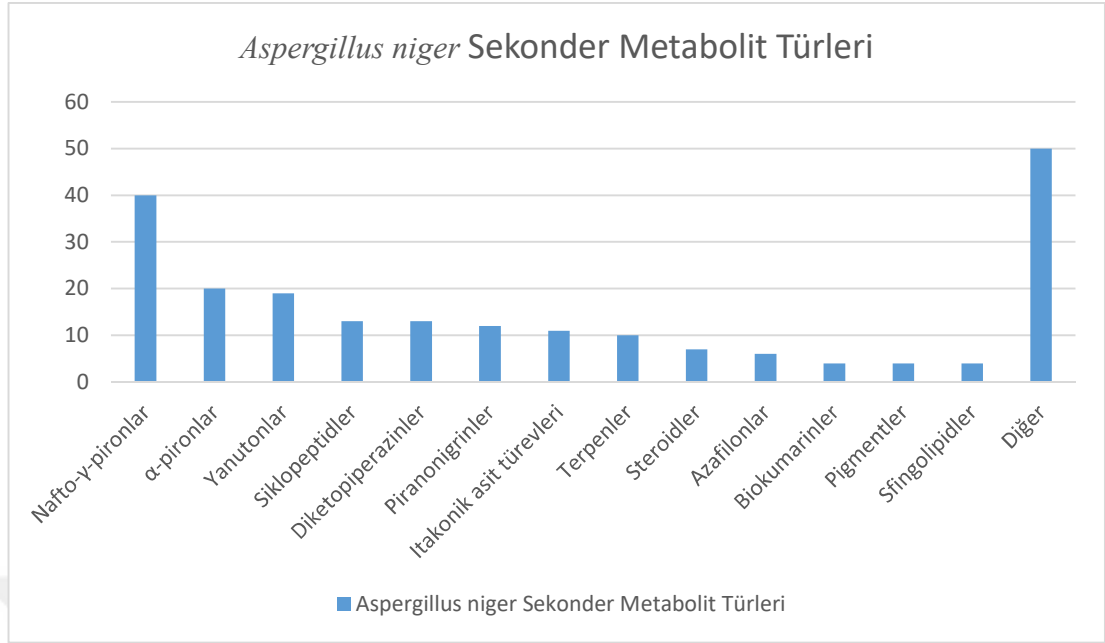
1.3.1. Deniz Kaynaklı *Aspergillus niger* Mantarı Üzerine Çalışmalar

Aspergillus niger (Tieghem, 1867), *Aspergillus* cinsi Nigri seksiyonundan türler olup, eşeysiz üremenin bir parçası olarak organizmanın vücudundan tomurcuklanan sporelerden oluşmuş karakteristik şekilli, yuvarlak, siyah konidial bir baş ile ince bir sap içermektedir. Tüm aerobik ortamlarda meydana gelen, kozmopolit bir aseksüel saprofit olarak kabul edilmektedir (Bennett, 2010; Varga ve ark., 2011). "Siyah küf" hastalığına neden olarak taze meyvelerin, tahılların ve mahsullerin hasat sonrası çürümesinden sorumludur ve depolanmış gıdaların en yaygın kirleticisi, kontaminantı olan fitopatogenik bir mantardır (Gautam ve ark., 2011). Currie (1917), düşük pH'da, şeker solüsyonu içerisinde *A. niger* mantarını kültürleyerek, gıda, kozmetik ve farmasötik formülasyonlarda yaygın kullanımı nedeniyle en değerli ticari kimyasal ürünlerden biri olan sitrik asiti yüksek miktarda biyosentezlediğini keşfetmiştir. Sitrik asit üretimine dayanan ilk çalışmaların ardından, gelişen biyoteknolojik ve analitik teknikler sonrasında bu mantarın, diğer filamentli mantarlarda meydana gelmeyen çok çeşitli yararlı proteinleri üretmiştir ve bu durum a-amilaz, oksidaz, katalaz, dehidrojenaz, hidrolaz, selüloz, pektinaz gibi çok sayıda hücre dışı enzimin üretimine önemli ölçüde katkı sağlamıştır. Transkriptomik ve metabolomik gibi moleküler biyoloji tekniklerinin gelişimi ile bazı suşlarının tam genom dizisinin aydınlatılması, sekonder metabolit genlerine dair önemli bir kavrayış kolaylığı sağlayarak doğal ürünlerin biyosentezinin anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir (Lima ve ark., 2019).

1917'den 2018'e kadar, *A. niger* suşlarının farklı kaynaklardan (Şekil 1.4), belli gruplar altında incelenen (Şekil 1.5) 213 adet sekonder metabolit ürettiği bulunmuştur. Özellikle deniz kaynaklı *A. niger* suşlarından elde edilen metabolitler Çizelge 1.6'da verilmiştir (Lima ve ark., 2019).



Şekil 1.4. Sekonder metabolit üretimi için araştırılan *A. niger* suşlarına dair, bildirilen kaynakların / habitatların yüzde dağılımı.



Şekil 1.5. *Aspergillus niger* suşlarından elde edilen sekonder metabolit türleri.

Çizelge 1.5. Deniz kaynaklı *Aspergillus niger* mantarından elde edilen bileşikler ve biyoaktiviteleri

Canlı Türü	<i>Aspergillus niger</i> suşu	Elde Edilen Kimyasal Bileşikler	Bileşiklerin Biyoaktiviteleri	Kaynakça
<i>Ceriops tagal</i> (mangrov)	JX-5	Nigerpiperazine A,	İnsektisit etki (<i>Helicoverpa armigera</i> Hubner)	(Bai ve ark., 2020)
		(-) asperazine,	-	
		(+) asperazine,	-	
		Fonsecinone A,	İnsektisit etki (<i>Helicoverpa armigera</i> Hubner)	
		İsoaurasperone A,	-	
		Asperpyrone D,	-	
		Asperpyrone C	-	

Çizelge 1.5. Devam

<i>Haliclona</i> sp. (sünger)	LS24	Nipyrone A, Nipyrone B,	Orta derece antibakteriyel (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>)	(Ding ve ark., 2019)
		Nipyrone C,	Antibakteriyel (<i>S. aureus</i> , <i>B. Subtilis</i>), Antitüberküloz (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	
<i>Zoanthidae</i> (knidliler ailesi)	102	Germicidin C Asperdiphenol A,	- Antibakteriyel ve sitotoksik aktivite testleri negatiftir	(Zhang ve ark., 2018)
		Fonsecione A,	-	
		Asperpyrone A,	-	
		Aurasperone A,	-	
		Dianhydro- aurasperone C,	-	
		Asperpyrone C,	-	
		Asperpyrone D,	-	
		Asperpyrone B,	-	
		Rubrofusarin B,	-	
		Flavasperon	-	
<i>Haliclona</i> sp. (sünger)	LS11	Asperitaconic acid A, Asperitaconic acid B, Asperitaconic acid C	Antibakteriyel etkili (<i>Staphylococcus aureus</i>), Sitotoksik etki bulunmamıştır (HepG2, HeLa)	(Ding ve ark., 2018)

Çizelge 1.5. Devam(2)

Sediment (Brezilya kuzeydoğu sahili)	BRF-074	Yeni bir ester furan türevi bileşik, Malformin A1, Malformin C, Cyclo (<i>trans</i> -4- hydroxy-L-Pro-L- Leu), Cyclo (<i>trans</i> -4- hydroxy-L-Pro-L- Phe), Cyclo (L-Pro-L-Leu), Cyclo (L-Pro-L-Phe), Pseurotin D, Pseurotin A, Chlovalicin, Cyclo (L-Pro-L-Tyr), Cyclo (L-Pro-L-Val),	Sitotoksik etki (HCT-116)	(Uchoa ve ark., 2017)
<i>Sargassum</i> sp (kahverengi alg)	SCSIO Jcsw6F30	Aspernigrin A, Aspernigrin B, Aspernigrin C, Aspernigrin D, Malformin C, Rubrofusarin, Rubrofusarin B, Fonsecin	Zayıf antiviral etki (HIV-1 SF162) - Güçlü antiviral etki (HIV-1 SF162) - Güçlü antiviral etki (HIV-1 SF162) Zayıf antiviral etki (HIV-1 SF162) - -	(Zhou ve ark., 2016)
Çamur tabakası (Jeonnam Eyaleti, Kore)	MSA 773	6,9- Dibromoflavasperone, Flavasperone, TMC-256A1, Aurasperone B	Güçlü radikal süpürücü etki (DPPH)	(Leutou ve ark., 2016)

Çizelge 1.5. Devam(3)

Çamur örneği (Liaoning Eyaleti, Çin)	2HL-M-8	Aurasperone H, İsoaurasperone A, Fonsecinone A, Fonsecinone B, Fonsecinone C, Fonsecinone D, Asperpyrone B, Asperpyrone C, Flavasperone	Orta düzey inhibitör (A549, HL-60) - - - Antiproliferatif etki (HL-60) - - - -	(Li ve ark., 2016)
<i>Sargassum sp</i> (kahverengi alg)	SCSIO Jcsw6F30	Aurasperone A, Fonsecinone D, Fonsecinone B, Aurasperone B, Fonsecinone A, Fonsecinone C, Asperpyrone D, Asperpyrone E, Aurasperone F, Asperpyrone A Aurasperone C,	Tamamı zayıf sitotoksik aktivite (K562, A549, Du145, H1975, MCF-7, Huh-7, HL7702, HL60, HeLa, Molt-4) Ayrıca COX-2 inhibitör aktivite	(Fang ve ark., 2016)
<i>Avicennia marina</i> (mangrov)	MA-132	Nigerasterol A, Nigerasterol B, Malformin A1, Malformin C	Güçlü antiproliferatif etki (HL60, A549) - -	(Liu ve ark., 2013)

Çizelge 1.5. Devam(4)

<i>Avicennia marina</i> (mangrov)	MA-132	Nigerapyrone A, Nigerapyrone B, Nigerapyrone C, Nigerapyrone D, Nigerapyrone E, Asnipyrone B, Asnipyrone A, Nigerapyrone F, Nigerapyrone G, Nigerapyrone H	- Sitotoksik (HepG2) - Orta veya zayıf sitotoksik (MCF-7, HepG2, A549) Orta veya zayıf sitotoksik (SW1990, MCF-7, HepG2, Du145, NCI-H460, MDA-MB-231) - Sitotoksik (A549) - - -	(Liu ve ark., 2011)
<i>Colpomenia sinuosa</i> (kahverengi alg)	EN-13	İsopyrophen, Aspergillusol, Pyrophen, cyclo-(L-Trp-L-Ile), cyclo-(L-Trp-L-Phe), cyclo-(L-Trp-L-Tyr)	Antimikrobiyal testleri negatif sonuç vermiştir	(Zhang ve ark., 2010)
Deniz suyu (Çin, Fujian bölgesi)	MF-16	Asperiamide B, Asperiamide C, Averufin, Nidurufin, Glycerlipid	- - Orta düzeyde inhibitör etki (<i>Tobacco Mosaic Virus</i>) -	(Wu ve ark., 2008)

Çizelge 1.5. Devam(5)

<i>Colpomenia sinuosa</i> (kahverengi alg)	EN-13	Nigerasperone A, Nigerasperone B, Nigerasperone C,	- - Zayıf antifungal (<i>Candida albicans</i>), orta düzeyde antioksidan (DPPH)	(Zhang veLi ve Wang, 2007)
		Aurasperone A, Aurasperone B,	- Zayıf antifungal (<i>Candida albicans</i>), orta düzeyde antioksidan (DPPH)	
		DianhydroaurasperoneC , Asperpyrone A, Asperpyrone C,	- - Zayıf antifungal (<i>Candida albicans</i>)	
		Fonsecinone A,	Zayıf antifungal (<i>Candida albicans</i>)	
		Fonsecinone B, Fonsecinone D Fonsecinone C	Orta düzeyde antioksidan (DPPH) -	
<i>Colpomenia sinuosa</i> (kahverengi alg)	EN-13	Ergosterimide, (22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta- 5,7,22-trien-3 β -ol, (22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta- 4,6,8(14),22-tetraen-3- one, (22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-5 α ,8 α - epidioxyergosta-6,22- dien-3 β -ol, (22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta-7,22- dien-3 β ,5 α ,6 β -triol	Herhangi bir biyoaktivite çalışması bulunmamaktadır	(Zhang veLi veProksch ve ark., 2007)
<i>Colpomenia sinuosa</i> (kahverengi alg)	EN-13	5,7-dihydroxy-2-[1-(4- methoxy-6-oxo-6 <i>H</i> - pyran-2-yl)-2- phenylethylamino]- [1,4]naphthoquinone	Orta düzeyde antifungal aktivite (<i>Candida albicans</i>)	(Zhang veLi veWang ve ark., 2007)

Çizelge 1.5. Devam(6)

Tanımlanmayan Mangrov	LL-LV3020	Pyranonigrin A, Pyranonigrin S, 3- <i>O</i> -Acetylpyranonigrin A, 3,7-Di- <i>O</i> -acetylpyranonigrin A, 3- <i>O</i> -Acetyl-7- <i>O</i> -methylpyranonigrin A, 3- <i>O</i> -Ethylpyranonigrin A,	Herhangi bir aktivite çalışması yapılmamıştır	(Schlingmann ve ark., 2007)
<i>Axinella damicornis</i> (sünger)	CBX 146 2002	Cycloleucomelone, Bicoumanigrin, Aspernigrin A, Aspernigrin B, Pyranonigrin A, Pyranonigrin B, Pyranonigrin C, Pyranonigrin D	- Orta düzeyde Sitotoksik(DSMZ) - Güçlü nöroprotektif etki (L-glutamik asite karşı) - - - -	(Hiort ve ark., 2004)
Tanımlanmayan Sünger	FT-0554	Nafuredin	NADH-fumarat redüktaz inhibitörü (<i>Ascaris suum</i> , domuz yuvarlak kurdu)	(Ui ve ark., 2001)
<i>Aplidium sp.</i> (Tunikat)	F97S11	Yanuthone A, Yanuthone B, Yanuthone C, Yanuthone D, Yanuthone E, 1-Hydroxyyanuthone A, 1-Hydroxyyanuthone C, 22-Deacetylyanuthone A	Herhangi bir aktivite çalışması yapılmamıştır	(Bugni ve ark., 2000)

Çizelge 1.5. Devam(7)

<i>Hyrtios proteus</i> (Sünger)	UCSC 94-1212	Asperic acid, Hexylitaconic acid, Malformin C, Pyrophen, Asperazine	Aktivite çalışması yoktur	(Varoglu ve Crews, 2000)
<i>Hyrtios proteus</i> (Sünger)	Verilmeyen	Asperazine	Sitotoksik (L1210, murin 38, H116, CX-1)	(Varoglu ve ark., 1997)

1.4. *Trichoderma* Cinsi Mantarlar

Trichoderma cinsi ilk kez Persoon (1794) tarafından tanımlanmıştır. Hypocreaceae familyasına ait *Trichoderma/Hypocrea* cinslerine atanan farklı türlerin morfolojik olarak ayırt edilmesi zordur. Bu karışılığın önüne geçebilmek adına *Trichoderma* cinsi bir ve aynı türün eşeysiz (anamorf) morfları ve *Hypocrea* cinsi de eşeyli (teleomorf) morfları olan birçok türle bağlantılı ayrı iki cins olarak değerlendirilmiştir. Şu anda *Trichoderma* cinsi, şeffaf fialidler ve 1 hücreli, yeşil veya şeffaf konidiyum içeren saprobik, eşeysiz üreyen, hızlı büyüyen, yeşil veya beyaz küfler olarak dünyanın her yerinde bulunabilen, toprak kökenli, yeşil sporlu askomisetlerdir (Jaklitsch, 2009; Schuster ve Schmoll, 2010).

Çok geniş olarak çalışılan *Trichoderma* türleri bitkileri koruma, vejetatif büyümeyi destekleme ve farklı zirai şartlar altında fitopatojenik ajanları kontrol etme yetenekleri nedeniyle biyopestisitler ve biyolojik gübreler olarak pazarlanmaktadır. Ayrıca, Epipolitiiodioksopiperazinler, sideroforlar gibi non-ribozomal peptidler ve peptaiboller (Yüksek seviyelerde standart olmayan amino asitlerin varlığı ile karakterize edilen non-ribozomal kısa peptitler) olarak bilinen bir peptaibiyotiklerin (potansiyel antibiyotikler) yanı sıra mikotoksinler ve poliketidler, pironlar, terpenler,

amino asitlerden türetilen metabolitler ve polipeptidler dahil antibiyotik aktivitesi olan 100'den fazla metabolite sahiptirler (Degenkolb ve ark., 2008; Rivera-Chávez ve ark., 2017; Sivasithamparam ve Ghisalberti, 1998). *Trichoderma* sp, toprak pH'ını düşüren ve fosfatların, mikro besinlerin ve demir, manganez ve magnezyum gibi mineral katyonların çözünmesine izin veren, özellikle nötr veya alkali topraklarda bitki metabolizması için yararlı olan glukonik, sitrik ve fumarik asitler gibi organik asitler üretmektedir (Benítez ve ark., 2004; Harman ve ark., 2004). *Trichoderma* sp'nin ilk karakterize edilen sekonder metabolitlerinden biri, peptid antibiyotik Paracelsin'dir (Brückner ve Graf, 1983; Brückner ve ark., 1984).

Karasal ortamdan elde edilen başarılarla rağmen, *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi diğer deniz kaynaklı mantarlarla karşılaştırıldığında deniz kaynaklı *Trichoderma* türlerine ilgi daha az olmuştur. Son zamanlarda, deniz sedimentleri, deniz süngerleri ve mangrovlar da dahil olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunan deniz kaynaklı *Trichoderma* cinsinin kimyası, farklı kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle geniş çapta incelenmiştir (Jat ve Agalave, 2013; Kamala ve Devi, 2012). Poliketidler, alkaloidler, terpenler ve peptidler dahil olmak üzere ilgi çekici ve güçlü aktivitelere sahip çok sayıda farklı yapının keşfedilmesiyle, yapısal olarak benzeri görülmemiş biyoaktif metabolitlerin ümit verici kaynağı olarak deniz kaynaklı *Trichoderma* türlerinin önemi artmaktadır (Su ve ark., 2018; Zeilinger ve ark., 2016).

Deniz kaynaklı *Trichoderma* türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin çoğu antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite göstermiştir. Trikodermanın C, Trikodermaketon A, Koniotrantrakınon ve Emodin gibi bazı bileşikler insan hastalıklarını tedavi etme potansiyeli göstermiştir (Su ve ark., 2018).

1.4.1. Deniz Kaynaklı *Trichoderma virilente* Mantarı Üzerine Çalışmalar

Trichoderma virilente, ilk kez W. M. Jaklitsch ve ark. (2013) tarafından bir tür kompleksi olarak kabul edilen *Trichoderma viridescens* fenotipik farklılaşması çok az olan veya hiç olmayan 13 filogenetik türden bir tanesi olarak tanımlanmıştır. *T. virilente* suşları Güney Avrupa'da yaygın olmasına rağmen, Hırvatistan'dan yalnızca bir eşeyli morf koleksiyonu olarak görülmüştür. Etimolojik olarak, 'Viri', *viridescens*'in ilk iki hecesini temsil ederken, 'lente', yavaş büyümeyi ve özellikle konidasyonun yavaş gelişimini ele alan yavaş anlamına gelmektedir. Ölü odun, ağaç kabuğu ve bunların üzerinde büyüyen mantar türü kültürleri ve eşeysiz morfları, tüm ortamlarda 25°C'de optimum büyüme, 30°C'de yavaş büyüme gösterirken, 35°C'de büyüme görülmemiştir (Jaklitsch ve ark., 2013). Teşhisinden günümüze kadar geçen sürede, *T. virilente* mantarı üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmamızda, Türkiye denizlerinden toplanan sünger ve tunikattan izole edilen mantar türlerinden, yeni sekonder metabolitler elde etmeyi, bu bileşiklerin biyoaktivitelerini incelemeyi amaçladık. Özellikle *Trichoderma virilente* mantarı üzerine, dahası deniz kaynağından elde edilmiş türü üzerine yapılmış ilk çalışma olması sebebiyle bu çalışmamızın bilim dünyasında etkili bir kaynak niteliği taşımasını, bunun yanı sıra Türkiye denizlerini, yeni sekonder metabolit arayışında değerli bir kaynak olarak bilim insanlarına sunmayı hedeflemekteyiz.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

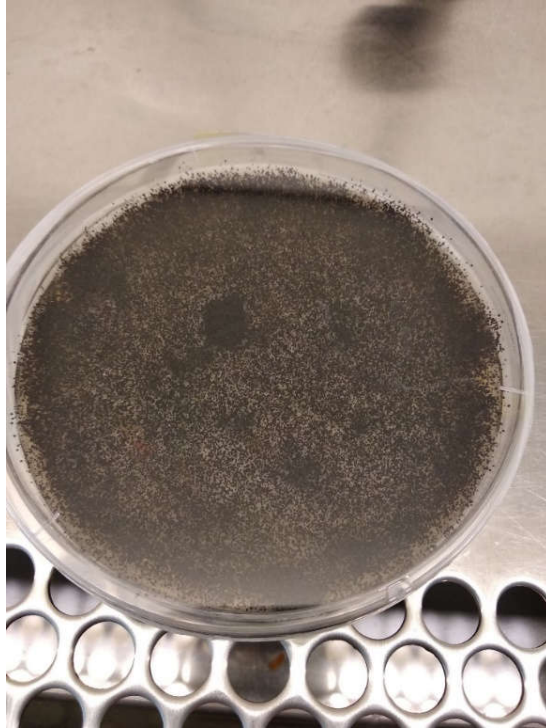
2.1. Gereç

2.1.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger, 2016 Nisan ayında Çanakkale Kömür Limanı'ndan (40°27'27.4"N; 26°30'39.0"E) toplanan *Microcosmus vulgaris* tunikatından elde edilmiştir. Biyolog Bülent Gözcelioğlu tarafından toplanan canlı, deniz suyu içerisinde hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Tunikatın iç kısmından alınan parça uygun besi yerinde mantar üretimine bırakılmıştır. Elde edilen saf mantarın tür teşhisi gerçekleştirilerek uluslararası gen bankasına 'MT273953' erişim kodu ile kaydı yapılmıştır (Konuklugil ve Gozcelioglu, 2020).



Şekil 2.1. *Microcosmus vulgaris* tunikası (Gianfrs, 2016)



Şekil 2.2. *Aspergillus niger* mantarının petri büyümesi

2.1.2. *Trichoderma virilente*

Trichoderma virilente, 2016 Nisan ayında Balıkesir Ayvalık'dan (39°20'10.6"N; 26°33'42.8"E) toplanan *Axinella verrucosa* süngerinden elde edilmiştir. Biyolog Bülent Gözcelioğlu tarafından toplanarak deniz suyu içerisinde hızlı bir şekilde laboratuvara getirilen canlının dış kısmından alınan parça uygun besi ortamında mantar üretimine bırakılmıştır. İzole edilen saf mantarın tür teşhisi yapılarak uluslararası gen bankasına 'MT273954' erişim kodu ile kaydedilmiştir (Konuklugil ve Gozcelioglu, 2020).



Şekil 2.3. *Axinella verrucosa* sünger (Zanskar, 2018)



Şekil 2.4. *Trichoderma virilente* mantarının petri büyümesi

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar

2.1.3.1. Cihaz ve Ekipmanlar

- ✓ Fungal Çeşitlilik Kiti
- ✓ Isıtıcı
- ✓ Kuyucuklu mikropipler
- ✓ Laminar flow kabin (Holten)
- ✓ Mikroplate okuyucu
- ✓ NMR (Agilent)
- ✓ Rotavapor R-300 (Büchi)
- ✓ Spektrofotometre (Schimadzu)
- ✓ Ultrasonik su banyosu

- ✓ UV lambası
- ✓ YPSK (Agilent 1100 Series)

2.1.3.2. Çözücüler

- ✓ Aseton (Merck)
- ✓ Asetonitril (Merck)
- ✓ Diklorometan (Merck)
- ✓ Etil asetat (Merck)
- ✓ Hekzan (Merck)
- ✓ Kloroform (Merck)
- ✓ Metanol (Merck)
- ✓ Petrol eteri (Merck)

2.1.3.3. Kimyasallar

- ✓ 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonikasit) diamonyum
- ✓ 2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) (Merck)
- ✓ 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoliumbromid
- ✓ 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasit
- ✓ Anisaldehit Reaktifi
- ✓ Askorbik asit
- ✓ Deniz tuzu (Sigma-Aldrich)
- ✓ Distile Su (Merck Millipore)
- ✓ Kersetin (Sigma-Aldrich)

- ✓ McCoy's 5A medium (Sigma-Aldrich)
- ✓ Mueller Hinton Agar (MHA,Oxoid) (Merck)
- ✓ Mueller Hinton Besiyeri (MHB, Difco) (Merck)
- ✓ Sabouraud %2 Dekstrozu Agar (Sigma-Aldrich)
- ✓ Sefadeks LH- 20 Kolon dolgu materyali (Sigma-Aldrich)
- ✓ Silika jel 60 F254 İnce Tabaka Kromatografisi plağı (MERCK)
- ✓ Silika jel 60 Kolon dolgu materyali (Merck)
- ✓ Streptomisin ve glutamin (Sigma-Aldrich)
- ✓ Ultra Saf Su (Merck Millipore)

2.2. Yöntem

2.2.1. Mantar İzolasyonu ve Saflaştırma

Denizden toplanan canlılar laboratuvar ortamına hızlı bir şekilde getirildikten sonra uygun besiyerlerinde mantar üretimine bırakılmıştır. Saf olarak izole edilen mantarların önce küçük ölçekli ekiminden elde edilen ekstrenin YPSK analizleri ve biyoaktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle büyük ölçekli ekimi yapılan mantarın ekstraksiyon işlemi sonrasında, ekstrenin fraksiyonlanmasına ve devamında sekonder metabolit izolasyonuna geçilmiştir.

2.2.1.1. Kullanılan Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanışı

Çizelge 2.1'de verilen maddeler bir şişe içerisinde karıştırıldıktan sonra otoklav cihazında 121⁰C'de 20 dk tutularak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra alınan besi ortamı bir miktar soğuduktan sonra steril laminar kabin içerisinde steril petri kaplarına aktarılmış, petri kaplarındaki besiyerinin donması beklenmiştir.

Çizelge 2.1. Mantar üretimi için petri katı besiyeri maddeleri

Sabouraud Dekstroz Agar	65 g
Deniz Tuzu	35 g
Distile Su	1000 ml

2.2.1.2. Mantar İzolasyonu

Deniz suyu içerisinde laboratuvara getirilen canlıdan bir parça ekim için alınmış ve kalan örnek %70'lik etanol içerisine aktararak buzdolabına kaldırılmıştır. Steril kabin içerisinde canlıdan alınmış olan parça öncelikle uzunlamasına ikiye ayrılarak iç kısımdan ve dış kısımdan alınan parçaların ekimleri yapılmıştır.

Steril kabin altında, *Microcosmus vulgaris* tunikatının iç yüzeyinden 1x1 boyutlarında parçalar alınmıştır. Alınan parçalar öncelikle ilk bidistile su içerisinde 30 saniye bekletilmiş ve bir sonraki bidistile suya alınmış, burada da 30 saniye bekletildikten sonra sonuncu bidistile su içerisinde 30 saniye bekletilerek kirliliklerinden arındırılmıştır. Temizlenen parçalar, %70 etanol içerisinde 120 saniye bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve steril gazlı bez ve/veya pamuk ile kurutulmuştur. Bek alevi önünde bu parçalar katı besiyeri bulunan petrilere her petride

en az üç parça olacak şekilde steril pens yardımıyla aktarılmıştır. Petri kapları hava teması kesilecek şekilde parafilmle kapatılmış ve petri üzerine mantar üremesinin görülebileceği şekilde, canlı adı, canlının hangi kısmından parça alındığı ve ekim tarihi not edilmiştir. Hazırlanan petri kapları 25 °C'de 14 gün süreyle mantar üremesi için inkübatöre alınmıştır.

Aynı şekilde *Axinella verrucosa* süngerinin dış kısmından 1x1 boyutlarında parçalar alınmıştır. Alınan parçalar, ilk bidistile su içerisinde 30 saniye bekletilmiş ve bir sonraki bidistile suya alınmış, burada da 30 saniye bekletildikten sonra sonuncu bidistile su içerisinde 30 saniye bekletilerek kirliliklerinden arındırılmıştır. Temizlenen parçalar, %70 etanol içerisinde 120 saniye bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve steril gazlı bez ve/veya pamuk ile kurutulmuştur. Bek alevi önünde bu parçalar katı besiyeri bulunan petrilere her petride en az üç parça olacak şekilde steril pens yardımıyla aktarılmıştır. Petri kapları hava teması kesilecek şekilde parafilmle kapatılmış ve petri üzerine mantar üremesinin görülebileceği şekilde, canlı adı, canlının hangi kısmından parça alındığı ve ekim tarihi not edilmiştir. Hazırlanan petri kapları 25 °C'de 14 gün süreyle mantar üremesi için inkübatöre alınmıştır.

2.2.1.3. Mantarların Safılaştırılması

Petri kabına aktarılan kesitlerden aynı petri üzerinde birden fazla mantar üreyebilmektedir. Bu durumda petri üzerine yayılmış olan mantarlar, steril özeler yardımıyla taze hazırlanmış besiyeri bulunan petrilere ayrı ayrı aktarılarak tekrar büyümeleri için beklenmiştir. Bu işlem petride tek bir tür mantar oluşana kadar devam etmiştir. Petri üzerine mantar kodu ve ekim tarihi not edilmiştir.

2.2.1.4. Saf Mantar Türlerinin Uzun Süreli Saklanması

Tek bir petri kabında tamamen aynı tür mantar büyümesi gözlenerek saf mantar türü elde edilmiştir. Yine steril kabin altında, elde edilen bu mantar, petride bulunan katı besiyeri ile birlikte küçük parçalar halinde alınarak yarısına kadar %80 gliserinli ortam bulunan eppendorflara aktarılmıştır. Hazırlanan eppendorflar parafilm ile kapatılmış, üzerine mantar kodu ve eppendorfun hazırlandığı tarih etiketlenmiştir. Gerek görüldüğü takdirde tekrar kullanmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklanmaktadır. Belirli aralıklarla bu mantar türlerinin petri ekimleri yapılarak canlılığı kontrol edilmiş ve yeni eppendorflara yeni tarihli olarak hazırlanmış ve dolaba kaldırılmıştır.

2.2.1.5. Mantarların Tür Teşhis Tayinleri

Mikroorganizma çalışmalarında, tam ve net bir teşhisin yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada kullanılacak olan mantarların DNA amplifikasyonu yöntemi ile beraber ITS bölgelerinin dizi analizleri yapılarak taksonomik tanıları yapılmıştır. Saflaştırılmış mantar türlerinin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Mantar kültürlerinden DNA izolasyonunda yerli bir kit olan Biospeedy® Fungal DNA İzolasyon kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. İzole edilen DNA'ların spektrofotometrik olarak kaliteleri değerlendirildikten sonra mantar türünü tayin etmek üzere PCR tabanlı Biospeedy® Fungal Çeşitlilik Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır.

Kit, fungi genomik DNA'sında ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine özgü olan ileri primer (TCCTCCGCTTATTGATATGC) ve geri primer

(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) çiftini ve optimize qPCR (Gerçek Zamanlı PCR) kimyasallarını içermektedir. Tüm reaksiyonlar Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) qPCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış ısı döngüsü programı ve qPCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C- 95°C arasında erime eğrisi analizi uygulanmıştır. Sonuçlar q-PCR Biorad CFX Connect Software 3.0'da analiz edilmiştir.

Elde edilen fungal amplikonların sekans dizileri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ile ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, USA) belirlenmiştir. Her bir mantar örnek için elde edilen sekans dizileri Chromas software package version 1.45'de analiz edilmiştir. Elde edilen sekanslar, NCBI DNA data bankasında ITS bölgesi belirlenmiş bilinen mantar türler ile karşılaştırılmış (BLAST- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)) ve en çok benzeyen türler ile eşleştirilmiştir. Benzerlik oranı $\geq$ %98 olan türlerin aynı olduğu kabul edilmiştir (Sun ve ark., 2012).

2.2.1.6. Küçük Ölçekli Mantar Ekimi

Saf mantarın -80 °C'de korunan örneğinden SDA besiyeri ile hazırlanmış petrilere ekimi yapılmıştır. Bir hafta süre ile inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Çizelge 2.2'ye göre, katı besiyeri 3 adet 1 litrelik erlende taze olarak hazırlanıp ağzıları kauçuk tıpa ile kapatıldıktan sonra otoklovda 121 °C'de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Petride büyümüş olan mantarlar steril kabin altında, steril bir alet yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve taze hazırlanan katı besiyeri içeren erlenlere aktarılmıştır. Kauçuk tıpanın etrafı parafilm ile hava almayacak şekilde kapatılmış ve erlen üzerine mantar kodu ve/veya adı ve aktarım tarihi not edilmiştir. Mantarların

yeterli büyüklüğe erişip metabolit üretimini gerçekleştirebilmeleri için, ekim yapılan erlenler ışıktan uzak serin bir ortamda 4 hafta süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda erlenlerin içinde büyümüş olan mantarlar etil asetat ile ekstraksiyona tabi tutulmuşlardır. Küçük ölçekli ekimden elde edilen bu ekstratların İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.2. Mantarların büyümesi için erlen katı besiyeri maddeleri

Pirinç	100 g
Yapay Deniz Tuzu	3,5 g
Distile Su	100 ml

2.2.1.7. Büyük Ölçekli Mantar Ekimi

Besiyeri hazır olan 2-3 adet petri kabına -80 °C’de korunan mantar örneğinden ekim yapıp bir hafta süre ile büyümeye bırakılmıştır. Büyük ölçekli ekim için 20-30 adet petri hazırlanmış ve daha önce büyütülmüş olan petrilerdeki mantarlar, steril öze yardımı ile bu petrilerin hepsine sürgü yöntemi ile aktarılmıştır. Yine bir hafta süre ile inkübatörde mantar büyümesi gerçekleştirilmiş ve 2 litrelik 60 erlen küçük ölçekli ekim için hazırlanan besiyeri hazırlanmıştır. Otoklavda 121°C’de sterilize edilen erlenlere, steril kabin altında petrideri büyüyen mantarlar küçük parçalar halinde aktarılmış ve kauçuk tıpa etrafı parafilmle kapatılıp erlenler etiketlendikten sonra 4 hafta süre ile mantar büyümesi için karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Miselyum oluşumları incelenerek büyüme durumu kontrol edilen mantarların ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir.

2.2.2. Mantarların Ekstraksiyonu

Erlenlerdeki mantar miselyumu içeren kültür ortamı, laboratuvar ortamında üzerini tamamen kapatacak şekilde etil asetat eklenerek bir günlük maserasyona bırakılmıştır. Çözücü yardımıyla yumuşamış olan kültür küçük parçalara ayrılarak yüzey teması artırılmış ve 24 saat beklemiş olan erlenlerdeki etil asetatlı ekstre süzülerek rotavaporda, kazan sıcaklığı 38 °C, soğutma suyu sıcaklığı 3,5 °C ve 90 rpm devirde, çözücüsünden kurtarılmıştır. Ekstre edilen kültür ortamı üzerine tekrar etil asetat eklenmiş ve çalkayıcı yardımıyla daha fazla temas halinde bırakılarak her 24 saat sonunda süzme ve yoğunlaştırma işlemi yapılmıştır. Bu süreç, etil asetat renksiz kalana kadar 4 kez tüketme şeklinde devam etmiştir. Tüm işlem sonunda etil asetatı uzaklaştırılmış mantar ham ekstresi elde edilmiştir.

2.2.3. Sekonder Metabolit İzolasyonu

Her iki mantar ekstresi için elde edilen ekstreler ayrı ayrı vakum sıvı kromatografisi metoduyla fraksiyonlara bölünüp sonrasında ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi ve YPSK gibi kromatografik yöntemlerle sekonder metabolit izolasyon sürecine başlanılmıştır.

2.2.3.1. Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK) Yöntemi

Her bir mantar türünün, büyük ölçekli ekimi sonrasında elde edilen ham ekstresi hekzan ve %90'lık metanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Hekzan fazına

renk geçişi bitene kadar sıvı- sıvı ekstraksiyona devam edilmiştir. Oluşan 2 faz kuruluğa kadar uçurulmuştur. Fraksiyonlamada kullanılacak en nonpolar çözücü olan hekzan ile karıştırılarak süspanse edilen 70-230 mesh aralığındaki silikajel 60, 50 cm uzunluğunda 12 cm çapındaki cam filtreli vakum kolonunun 30 cm yüksekliğine kadar doldurulmuştur. Vakum yardımı ile hekzan çekilerek silikanın kolona oturması beklenmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır. Silikanın kolon içerisinde düzgün bir şekilde sabitlenmesinin ardından, %90'lık metanol fazı tamamen solvandan kurtarıldıktan sonra çok az miktarda metanol içerisinde çözülerek bire bir miktarda silikajele yedirilmiş ve kolondaki silika üzerine düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. zerine bir miktar kuru silika konularak çözücü aktarımı sırasında ekstrenin bulunduğu silikanın etkilenmesi engellenmiştir. Sabit fazı silika jel dolgu maddesi olan vakum sıvı kromatografisinde, mobil faz olarak sırasıyla Hekzan:Etil Asetat; Diklorometan:Metanol veya Kloroform:Metanol zclerinin değişen orandaki karışımları kullanılarak metanol fazı ve/veya hekzan fazı polaritelerine göre fraksiyonlara ayrılmıştır.

2.2.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Yöntemi

İTK analiz yönteminde, üzeri silikajel 60 F₂₅₄ kaplanmış, 20x20 cm ölçülerindeki alüminyum plaklar kullanılmıştır. Plaktan 10x10 cm ölçülerinde parçalar alınmış, alt kısmın 1 cm yüksekliğinden başlangıç ve st kısmın 1 cm altından bitiş çizgileri belirlenmiştir. Analiz edilecek ekstre ve fraksiyonlar çok az miktarlarda çözünebildiği bir solvan ile sıvı hale getirilerek İTK kılcalı yardımıyla plak üzerine çizilen başlangıç noktasına küçük bir spot oluşturacak şekilde uygulanmıştır. Plak uygun solvan sistemi ile doyurulmuş olan 5x15x20 cm ölçülerindeki İTK tankının içine yerleştirilerek solvan sisteminin plak üzerinde yürümesi takip edilmiştir. Solvan sistemi bitiş çizgisine ulaştığında plak tanktan çıkarılarak kurutulmuş, 254 ve 366 nm UV ışık altında plak üzerinde oluşan spotlar gözlenmiştir.

Bu İTK plakları ayrıca preparatif olarak madde izolasyonunda da kullanılmıştır. Daha öncesinde İTK analizi yapılan fraksiyonlardan, UV ışık altında belirlenen spotlar, saf bir şekilde preparatif İTK yöntemi ile elde edilebilmektedir. Preparatif uygulamada, 20x20 cm ölçülerindeki İTK plağının alt kısmın 1,5 cm yüksekliğinden başlangıç ve üst kısmın 1,5 cm altından bitiş çizgileri belirlenmiştir. Preparatif madde izolasyonu yapılacak fraksiyon ekstresi uygun bir çözücü ile sıvılaştırılmıştır. Başlangıç çizgisinin sağından ve solundan 1'er cm içeride olacak şekilde, İTK kılcalı yardımı ile fraksiyon ekstresi, başlangıç çizgisi üzerine ince bir çizgi halinde uygulanmıştır. Bu işlem birkaç kez aynı plak üzerinde tekrarlanmıştır. Belirli bir doygunluğa ulaşan İTK plağı, analiz yönteminde belirlenen solvan sistemi ile doyurulmuş 5x20x25 cm ölçülerindeki İTK tankının içine yerleştirilerek solvan sisteminin plak üzerinde yürümesi takip edilmiştir. Solvan sistemi bitiş çizgisine ulaştığında plak tanktan çıkarılarak kurutulmuştur. Plak üzerinde oluşan ve saf olarak elde etmeyi amaçladığımız maddelerin bulunduğu bölge 254 ve 366 nm UV ışığı altında belirlenmiş ve İTK plağından silika ile birlikte alınmıştır. İzole edilen maddeyi içeren silika tozu, uygun bir solvanda çözülerek filtreden geçirilmiş böylece silikadan kurtarılmıştır. İzole edilen maddenin saflığı, tekrardan İTK analizi ve ayrıca YPSK analizi ile kontrol edilmiştir.

2.2.3.3. Açık Kolon Kromatografisi Yöntemi

Bu kromatografik yöntem, çalışmamızda genellikle VSK'dan elde edilen fraksiyonları alt fraksiyonlarına ayırmada kullanılmıştır. YPSK analizi ve İTK analizleri sonucu polariteleri birbirine çok yakın olan maddeleri içeren, düşük miktardaki fraksiyonlar için sefadeks dolgu maddesi bulunan kolon sistemi kullanılmıştır. Uygun solvan/lar ile süspanse hale getirilen sefadeks 30 cm yüksekliğe kadar cam filtreli 4 cm çaplı kolona yaş yükleme şeklinde doldurulmuş ve üzerinden birkaç kez aynı solvan geçirilerek kolonun sabitlenmesi sağlanmıştır. Solvan, sefadeks üst sınırına kadar getirildikten sonra alt musluk kapatılmış ve çok az miktarda aynı

solvan ile homojen bir sıvı haline getirilen fraksiyon, bir pipet yardımı ile sefadeks üst sınırına yakın bir konumda kolon çeperinden eşit oranda sızdırılmıştır. Fraksiyonun tamamı sızdırma işlemi ile sefadeks üzerine uygulandıktan sonra alt musluk yavaşça açılarak tüm ekstrenin sefadekse yerleşmesi sağlanmıştır. Ekstre sefadeks üst sınırına kadar geldiğinde musluk kapatılmış ve üzerine aynı solvan yine bir pipet yardımıyla bu sefer daha yukarıdan olacak şekilde kolon çeperinden sızdırılmıştır. Ekstre, üzerindeki solvanın geçişi ile tüplere az miktarda alınmış ve İTK analizleri sonucu benzer spotlar içeren tüpler birleştirilerek VSK fraksiyonunun, alt fraksiyonlar elde edilmiştir. Her bir fraksiyon hem İTK hem de YPSK analizleri ile madde izolasyonu aşamasına geçilmiştir.

Farklı polaritedeki maddeleri içeren ve miktarı yüksek olan fraksiyonlar ve ekstreler için ise silikajel 60 dolgulu açık kolon sistemleri kullanılmıştır. *Trichoderma virilente* mantarının hekzan fazı miktarının VSK uygulaması için az olması sebebi ile sabit fazı silikajel 60 olan açık kolon kromatografisinde gradient çözücü sistemi (hekzan:etil asetat:metanol) kullanılarak fraksiyonlama yapılmıştır. Hekzan ile süspanse hale getirilen silikajel 60, 30 cm yüksekliğe kadar cam filtreli 4 cm çaplı kolona yaş yükleme şeklinde doldurulmuştur. Çok az miktarda hekzan ile sıvılaştırılan ekstre birebir oranında silikaya tamamen emdirilerek kolona aktarılmıştır. Üzerine az miktarda toz silika eklenmiş ve değişen oranlardaki çözücü sistemi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır.

2.2.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi

Elde edilen her bir fraksiyon ve her bir madde için YPSK analizi yapılmıştır. Analiz için standart bir çalışma sistemi kullanılmıştır. P 580, Dionex pompa, UVD 340 S-Photo DiodeArrayDedector, Dione dedektör parçaları bulunan Agilent 1200 Series

YPSK cihazında, Phenomenex HyperClone 5 μ ODS(C18) (250 x4,6 mm, 5 mikron partikül büyüklüğü) analitik kolonu ile 1 ml/dak akış hızında, 20 μ l enjeksiyon hacminde, metanol-asitli su (%0,2 fosforik asit içeren bidistile su) mobil fazı ile Çizelge 2.3’de verilen sisteme göre analiz işlemi yapılmıştır.

Çizelge 2.3. Analitik kolon kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Metanol (%)	Su (%0.02 H ₃ PO ₄) (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	1
5	10	90	1
10	30	70	1
15	40	60	1
20	60	40	1
30	70	30	1
40	80	20	1
55	10	90	1
60	10	90	1

Analiz sonucuna göre sekonder metabolit izolasyonu için uygun olan fraksiyon/lar belirlenmiştir. Bu fraksiyon/lardan ve/veya alt fraksiyon/larından, Eclipse XDB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μ m) semi-preparatif kolon kullanılarak, daha hızlı bir akış ile daha yüksek enjeksiyon hacminde, madde izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir maddenin izolasyonu için, YPSK mobil faz çözücü sistemi, analiz için kullanılan çözücü sistemine göre, akış hızı ve enjeksiyon hacmi YPSK kromatogramına göre özel olarak belirlenmiştir.

2.2.3.5 Madde 1 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından alınan 4. fraksiyonundan elde edilmiştir. Analitik kolon kullanılarak 1 ml/dk akış ve 20 μ l enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.4’de verilen solvan sistemi

kullanılarak fraksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogramı ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak toplanan iki adet maddeden birincisidir. İzolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.5'te verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

2.2.3.6 Madde 2 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından alınan 4. fraksiyonundan elde edilmiştir. Analitik kolon kullanılarak 1 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.4'de verilen solvan sistemi kullanılarak fraksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak toplanan iki adet maddeden ikincisidir. İzolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.5'te verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Madde 1 ve Madde 2 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Metanol (%)	Su (%0.2 H ₃ PO ₄) (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	1
5	10	90	1
10	30	70	1
15	40	60	1
20	60	40	1
30	70	30	1
40	80	20	1
55	10	90	1
60	10	90	1

Çizelge 2.5. Madde 1 ve Madde 2 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Metanol (%)	Bidistile Su (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	3
3	60	40	3
8	70	30	3
19	80	20	3
20	10	90	3

2.2.3.7 Madde 3 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından elde edilen 5. fraksiyonundan elde edilmiştir. Fraksiyon, İlk önce sefadeks dolgulu açık kolon sisteminde metanol kullanılarak 7 alt fraksiyona ayrılmıştır. Bu alt fraksiyonlardan 5. alt fraksiyon tekrar sefadeks kolonda aseton ile 3 fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 2. fraksiyonun analitik kolon kullanılarak 2 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.6'da verilen solvan sisteminde analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak YPSK yöntemi ile 3 pik toplanmıştır. Bunlardan birincisi olan bu maddenin izolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.7'de verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

2.2.3.8 Madde 4 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından elde edilen 5. fraksiyonundan elde edilmiştir. Fraksiyon, İlk önce sefadeks dolgulu açık kolon sisteminde metanol kullanılarak 7 alt fraksiyona ayrılmıştır. Bu alt fraksiyonlardan 5. alt fraksiyon tekrar sefadeks kolonda aseton ile 3

fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 2. fraksiyonun analitik kolon kullanılarak 2 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.6'da verilen solvan sisteminde analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak YPSK yöntemi ile 3 pik toplanmıştır. Bunlardan ikincisi olan bu maddenin izolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.7'de verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

2.2.3.9 Madde 5 ve Madde 6 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından elde edilen 5. fraksiyonundan elde edilmiştir. Fraksiyon, İlk önce sefadeks dolgulu açık kolon sisteminde metanol kullanılarak 7 alt fraksiyona ayrılmıştır. Bu alt fraksiyonlardan 5. alt fraksiyon tekrar sefadeks kolonda aseton ile 3 fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 2. fraksiyonun analitik kolon kullanılarak 2 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.6'da verilen solvan sisteminde analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak YPSK yöntemi ile 3 pik toplanmıştır. Bunlardan üçüncüsü olan ve teşhis sonucu 2 madde içerdiği anlaşılan pikin izolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.7'de verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

Çizelge 2.6. Madde 3, Madde 4, Madde 5 ve Madde 6 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Metanol (%)	Su (%0.2 H ₃ PO ₄) (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	2
5	10	90	2
10	30	70	2
15	40	60	2
20	60	40	2
30	70	30	2

Çizelge 2.6. Devam

40	80	20	2
55	10	90	2
60	10	90	2

Çizelge 2.7. Madde 3, Madde 4, Madde 5 ve Madde 6 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Metanol (%)	Bidistile Su (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	3
5	40	40	3
18	70	30	3
19	80	20	3
20	100	0	3

2.2.3.10 Madde 7 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından elde edilen 8. fraksiyonundan elde edilmiştir. Bu fraksiyon silika dolgulu açık kolon sisteminde Kloroform: Metanol karışımının gradient (100:0-0:100) uygulanması ile 11 alt fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 1. alt fraksiyon sefadeks dolgulu açık kolon sisteminde aseton solvanı kullanılarak 7 fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 2. fraksiyonun analitik kolon kullanılarak 1 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.8’de verilen solvan sisteminde analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak YPSK yöntemi ile pik toplanmıştır. İzolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.9’da verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

Çizelge 2.8. Madde 7 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Asetonitril (%)	Su (%0.2 H ₃ PO ₄) (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	1
5	10	90	1
10	30	70	1
15	40	60	1
20	60	40	1
30	70	30	1
40	80	20	1
55	10	90	1
60	10	90	1

Çizelge 2.9. Madde 7 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Asetonitril (%)	Bidistile Su (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	3
5	60	40	3
15	70	30	3
25	80	20	3
30	10	90	3

2.2.3.11 Madde 8 İzolasyonu

Aspergillus niger mantarının %90 metanol fazı ekstresinin VSK uygulamasından elde edilen 8. fraksiyonundan elde edilmiştir. Bu fraksiyon silika dolgulu açık kolon sisteminde Kloroform: Metanol karışımının gradient (100:0-0:100) uygulanması ile 11 alt fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 6. fraksiyonun analitik kolon kullanılarak 1 ml/dk akış ve 20 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.10'da verilen solvan sisteminde analizi gerçekleştirilmiştir YPSK analizi kromatogram ve UV spektrumu sonucunda, semi-preparatif kolon kullanılarak YPSK yöntemi ile izole edilmiştir. İzolasyon aşamasında, 3 ml/dk akış ve 30 µl enjeksiyon hacmi ile çizelge 2.11'de verilen solvan sistemi kullanılmıştır.

Çizelge 2.10. Madde 8 bulunan fraksiyonun analizi için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Asetonitril (%)	Su (%0.2 H ₃ PO ₄) (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	1
5	10	90	1
10	30	70	1
15	40	60	1
20	60	40	1
30	70	30	1
40	80	20	1
55	10	90	1
60	10	90	1

Çizelge 2.11. Madde 8 izolasyonu için kullanılan YPSK gradient çözücü sistemi

Zaman	Asetonitril (%)	Bidistile Su (%)	Akış (ml/dk)
0	10	90	3
5	20	80	3
10	30	70	3
15	40	60	3
16	100	0	3
18	100	0	3

2.2.3.12 Madde 9 ve Madde 10 İzolasyonu

Trichoderma virilente mantarının ham ekstresinin sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi sonrasında ayrılan hekzan fazı ekstresi silika dolgulu açık kolon kromatografisi yönteminde hekzan: etil asetat: metanol çözücüleri kullanılarak 9 fraksiyona ayrılmıştır. Buradan elde edilen 2. Fraksiyondan, Petrol eteri: Etil asetat (8:1,8) çözücü karışımı kullanılarak preparatif İTK yöntemi ile bu madde toplanmıştır. UV altında tek spot vermesine rağmen iki ayrı madde olduğu teşhis yöntemi ile bulunmuştur.

2.2.5 İzole Edilen Madde Teşhis Yöntemleri

2.2.5.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapı teşhisi için Varian marka 600 MHz proton frekansındaki super iletken NMR cihazı kullanılmıştır. ^{13}C frekansı 150 MHz dir. Sahip olduğu one NMR probe sayesinde ^1H , ^{13}C (APT, DEPT, DECOUPLED, COUPLED), ^{31}P , ^{19}F , ^{11}B vb gibi çekirdeklerin analizini kolayca sadece software kontrolü ile yapılmıştır. Ayrıca 2D NMR analizlerinden COSY, HMBC, HMQC yapılmış olup, cihaz sıvı Azot ve sıvı Helyumla soğutulmaktadır.

2.2.5.2 Gaz Kromatografisi (GK)/Kütle Spektrometresi (KS)

Yağ formunda elde edilen bileşikler, kütle spektrumları GK/KS sistemi ile analiz edilmiştir. Agilent 5975 GK/KS sistemi, HP-Innowax (60 m $\times$ 0.25 mm Ø, 0,25 μm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C’dir. 70 eV elektron enerjisi ile 35-450 m/z kütle ağırlığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C’de 10dk, 4°C/dk artışla 220°C’ye, 220°C’de 10 dk, 1°C/dk artışla 240°C’ye yükselen toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” ve Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 3.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmıştır (Demirci ve ark., 2008).

2.2.6 Aktivite Çalışmaları

Mantar ekstraktları üzerinde antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite testleri yapılmıştır. Mantarlardan izole edilen ve yapısı aydınlatılan maddeler üzerinde antialerjik ve antienflamatuar aktivite testleri yapılmıştır.

2.2.6.1 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Serbest radikal süpürücü aktivite testi DPPH maddesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5; 156,25; 78,125 µg/ml örnekler) (50 µl) kuyucuklarda (96'lık-eliza plakları) hazırlanmış olup her örneğin üzerine DPPH çözeltisinden (150 µl) ilave edilmiştir. 30 dakika 37°C ve karanlıkta inkübe edildikten sonra Dimetilsülfoksit (DMSO) ile oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedilmiştir. Kontrol olarak, DMSO ve DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Azalan absorbans geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal süpürücü aktivitesini vermiştir. Referans madde olarak Kersetin ve Askorbik asit kullanılırken sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) ile ifade edilmiştir (Shirwaikar ve ark., 2006).

2.2.6.2 ABTS Radikali Süpürücü Aktivite Tayini

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali, 7 mM ABTS çözeltisi ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturulup 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Kullanmadan önce

metanol ile (pH=7,4), absorbans 734 nm’de $0,7 \pm 0,025$ olacak şekilde seyreltilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625; 312,5; 156,25; 78,125 µg/ml) örnekler (25 µl) kuyucuklarda (96’lık-eliza plate) hazırlanmış ve her örneğin üzerine ABTS.+ çözeltisinden (275 µl) ilave edilmiştir. Örneklerin absorbansları 734 nm’de 1-6 dakika süresinde okunmuştur. Elde edilen sonuçlar hem IC₅₀ olarak hem de Troloks eşdeğerine karşı elde edilmiştir. Troloks eğrisini elde etmek için 8 farklı konsantrasyon (2,45; 1,22; 0,612; 0,306; 0,153; 0,076; 0,03; 0,01 mM) Troloks hazırlanmış ve 25 µl her konsantrasyon üzerine 275 µl ABTS. Çözeltisi eklenerek absorbans 734 nm’de okunmuştur. Deneyler üç tekrarda yapılmıştır. Refesans madde olarak Kersetin ve Askorbik asit kullanılırken sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) ile ifade edilmiştir (Huang ve ark., 2011).

2.2.6.3 Süperoksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Alkalin DMSO yöntemi deney ortamında, DMSO tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitro Mavi Tetrazolyum) ile renkli diformazan bileşiği oluşturmasına dayanmaktadır. Bu yöntem de 1 ml alkalin DMSO (0.9 ml DMSO + 0,1 mL 5 mM NaOH) üzerine 0,1 mL NBT (1mg/ml) ve 0,3 mL farklı konsantrasyonlarda ekstre (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5; 156,25; 78,125 µg/ml) ilave edilmiştir ve son hacmin 1,4 ml olmasına dikkat edilerek 560 nm’de absorbans ölçülmüştür. Refesans madde olarak Kersetin ve Askorbik asit kullanılırken sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) ile ifade edilmiştir (Harput ve ark., 2011).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[(\text{Absorbans kontrol} - \text{Absorbans örnek}) / \text{Absorbans kontrol}] \times 100}{100}$$

2.2.6.4 Nitrik Oksit (NO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Her ekstreden farklı konsantrasyonda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625,312,5, 156,25, 78,125 µg/mL) 60 µl 96'lık plaklara konulmuştur. Ekstrelerin üzerine 60 µl sodyum nitroprusit (10 mM) ilave edilip ve 25 °C de 150 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 120 µl Griess reaktifi (%1 sülfanilamit, %0,1 naptiletilen diamin dihidroklorit, %2,5 H₃PO₄) eklenip 577 nm'de absorbans ölçülmüştür. Refesans madde olarak Kersetin ve Askorbik asit kullanılırken sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) ile ifade edilmiştir (Tsai ve ark., 2007).

2.2.6.5 Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal duyarlılık testi, modifiye mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak bakteriler için CLSI M07-A9'da mayalar için CLSI M27-A3'de belirtilen standartlara göre uygulanmıştır. Kapalı mikroplakalar nemli ortamda 35 °C'de bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat inkübe edilmiştir. Ekstrenin mikroorganizmanın makroskobik büyümesini tamamen inhibe ettiği en düşük konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu(MIC) olarak kabul edilmiştir. Bu test için Gram pozitif olarak; *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram negatif olarak; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 574 ve maya olarak *Candida albicans* 10231 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kullanılmıştır. Bakteri türleri için Siprofloksasin referans madde olarak kullanılırken, maya türleri için Mikonazol referans madde olarak seçilmiştir (Neumann, 2009).

2.2.6.6 Sitotoksik Aktivite Tayini

Mantar ekstralarının sitotoksik etkinliklerinin ölçülmesinde Mossman tarafından geliştirmiş olan ölçüm metodu kullanılmıştır. HCT-116 kolon kanseri hücreleri (2×10^4 hücre / kuyucuk) 96'lık ve 39'luk plaklara ekilmiştir. %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra, kuyucuklardaki besiyeri değişik konsantrasyonlardaki (1-2000µg/ml) ekstre çözeltilerini içeren taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler, ekstralar ile 24 saat inkübe edildikten sonra, her bir kuyucuktaki besiyeri aspire edilmiştir. Stok MTT solüsyonu 5 mg/ml konsantrasyonda fosfat tampon çözeltisinde (PBS) hazırlanmıştır ve kuyucuklara eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi MTT'yi mor renkli formazan yapısına indirgemıştır. Süre sonunda kuyucuklara, oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak amacıyla 100'er µl DMSO ilave edilmiş ve 550 nm'de absorbanslar okunmuştur. Referans madde olarak Kampotesin kullanılırken sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) ile ifade edilmiştir (Mosdam, 1983).

2.2.6.7 Antienflamatuvar Aktivite Tayini

İnsan nötrofilleri, bildirilen prosedürü takiben sağlıklı yetişkin gönüllülerin (20-30 yaş) venöz kanından elde edilmiştir (Korinek ve ark., 2017). Aktive edilmiş nötrofiller tarafından süperoksit anyon oluşumunun ölçümü, referans kaynakta belirtildiği üzere Ferrisitokrom c'nin azaltılmasına dayanmaktadır. Aktifleştirilmiş nötrofiller tarafından elastaz salımı, referans alınan yöntem doğrultusunda elastaz substratı olarak N-metoksisukinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid kullanılarak belirlenmiştir. Konsantrasyon, ham ekstralar için 1 ila 10 µg/mL ve saf bileşikler için 0,3 ila 10 µM olarak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak LY294002 kullanılmıştır.

Referans madde olarak Genistein kullanılırken sonuçlar % inhibisyon ve IC₅₀(μ M) olarak ifade edilmiştir (Ebada ve ark., 2020).

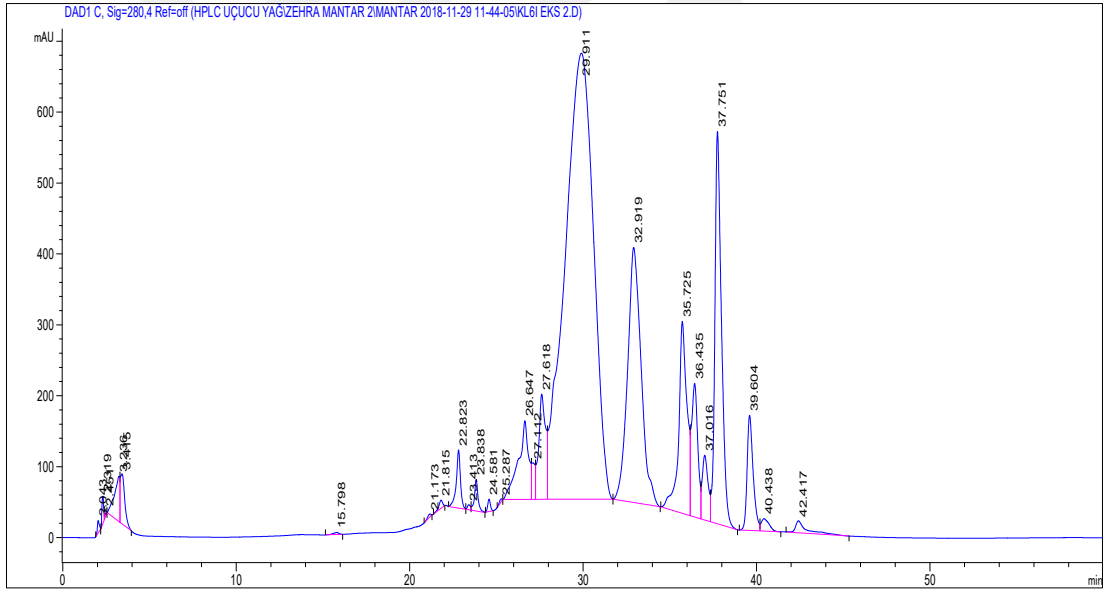
2.2.6.8 Antialerjik Aktivite Tayini

Mukozal mast hücresinden türetilmiş sıçan bazofilik lösemi hücreleri (RBL-2H3), Bioresource Collection and Research Center'dan (Hsin-Chu, Tayvan) temin edilmiştir. Hücreler, 10 cm hücre kültürü kaplarında % 10 fetal sığır serumu (FBS), 100 U/mL Penisilin ve 100 μ g/ml Streptomisin içeren Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle's medyasında (DMEM) % 5 CO₂ ile nemlendirilmiş hava olan bir bölmede 37 °C'de kültüre alınmıştır. Numunelerin (ham ekstre için 10 ila 100 μ g/mL ve saf bileşikler için 1 ila 400 μ M) bazofilik lösemi hücre hattı (RBL-2H3) üzerindeki potansiyel sitotoksik etkileri, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] MTT testi baz alınarak belirlenmiştir. Referans madde olarak Azelastin kullanılırken sonuçlar % inhibisyon ve IC₅₀(μ M) olarak ifade edilmiştir (Korinek ve ark., 2016).

3. BULGULAR

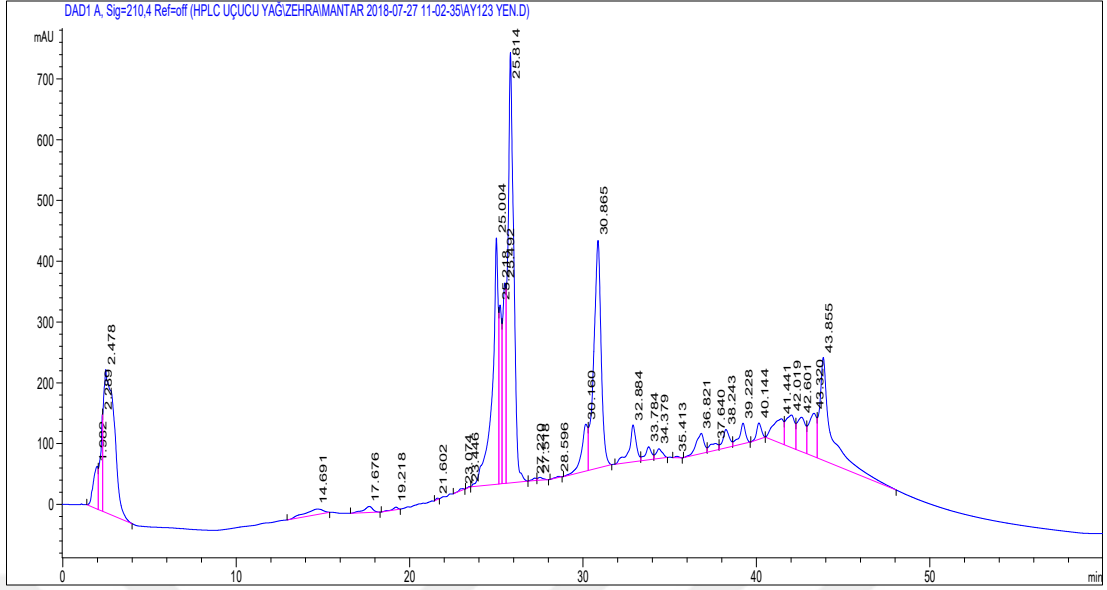
3.1 Mantar Ekstraksiyon Bulguları

Aspergillus niger mantarının 11,0247 g olan ham ekstresinin sıvı-sıvı fraksiyonlaması sonrasında, 9,1655 g %90'lık metanol fazı ekstresi ve 1,6828 g olan hekzan fazı ekstresi elde edilmiştir. Ham ekstre YPSK kromatogramı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *Aspergillus niger* mantarının ham ekstre YPSK kromatogramı

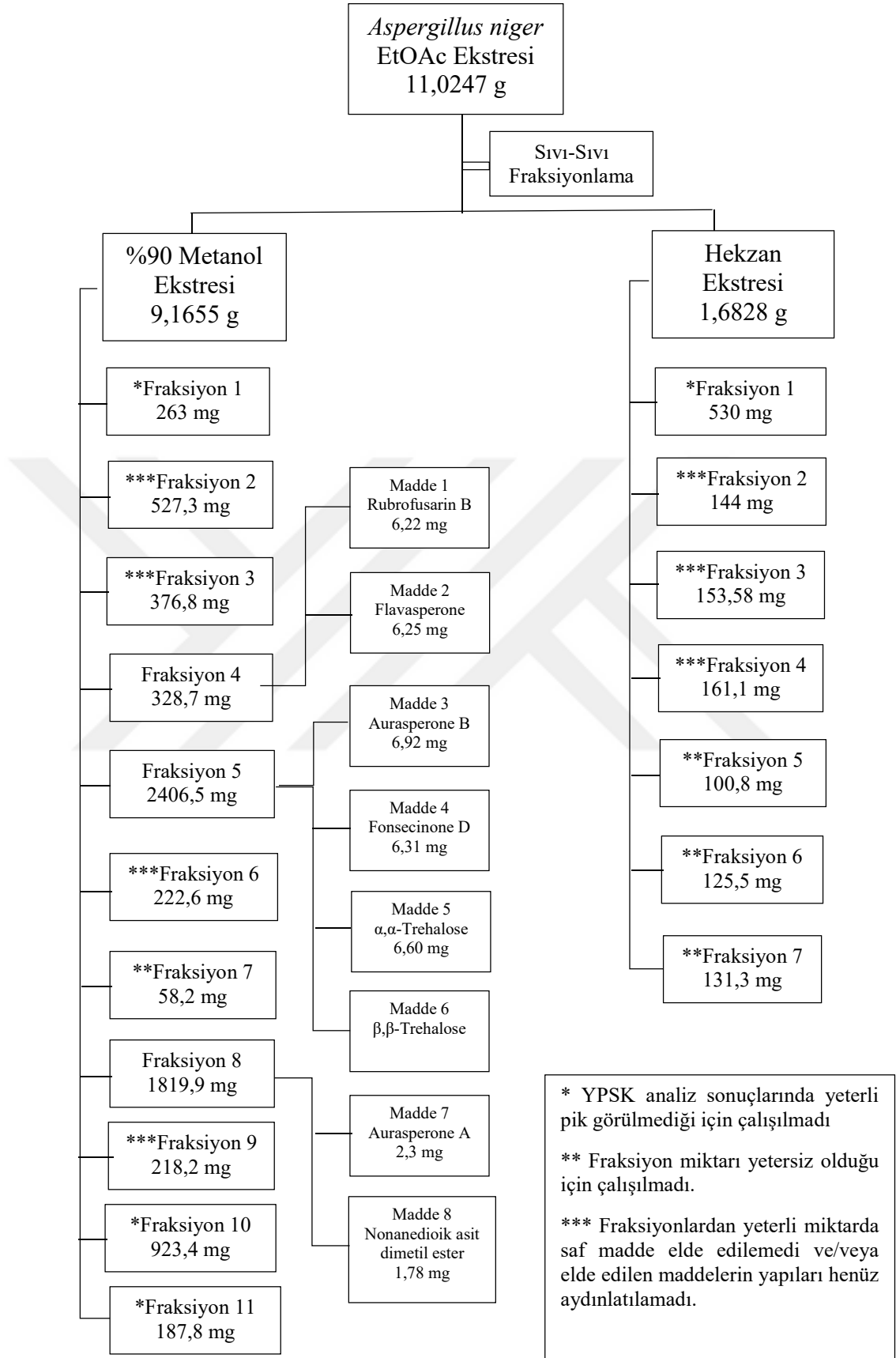
Trichoderma virilente mantarının 6,3869 g ham ekstresinin sıvı-sıvı fraksiyonlaması sonrasında, 3,8723 g %90'lık metanol fazı ekstresi ve 1,7542 g hekzan fazı ekstresi elde edilmiştir. Şekil 3.2'de ham ekstresinin YPSK kromatogramı verilmiştir.



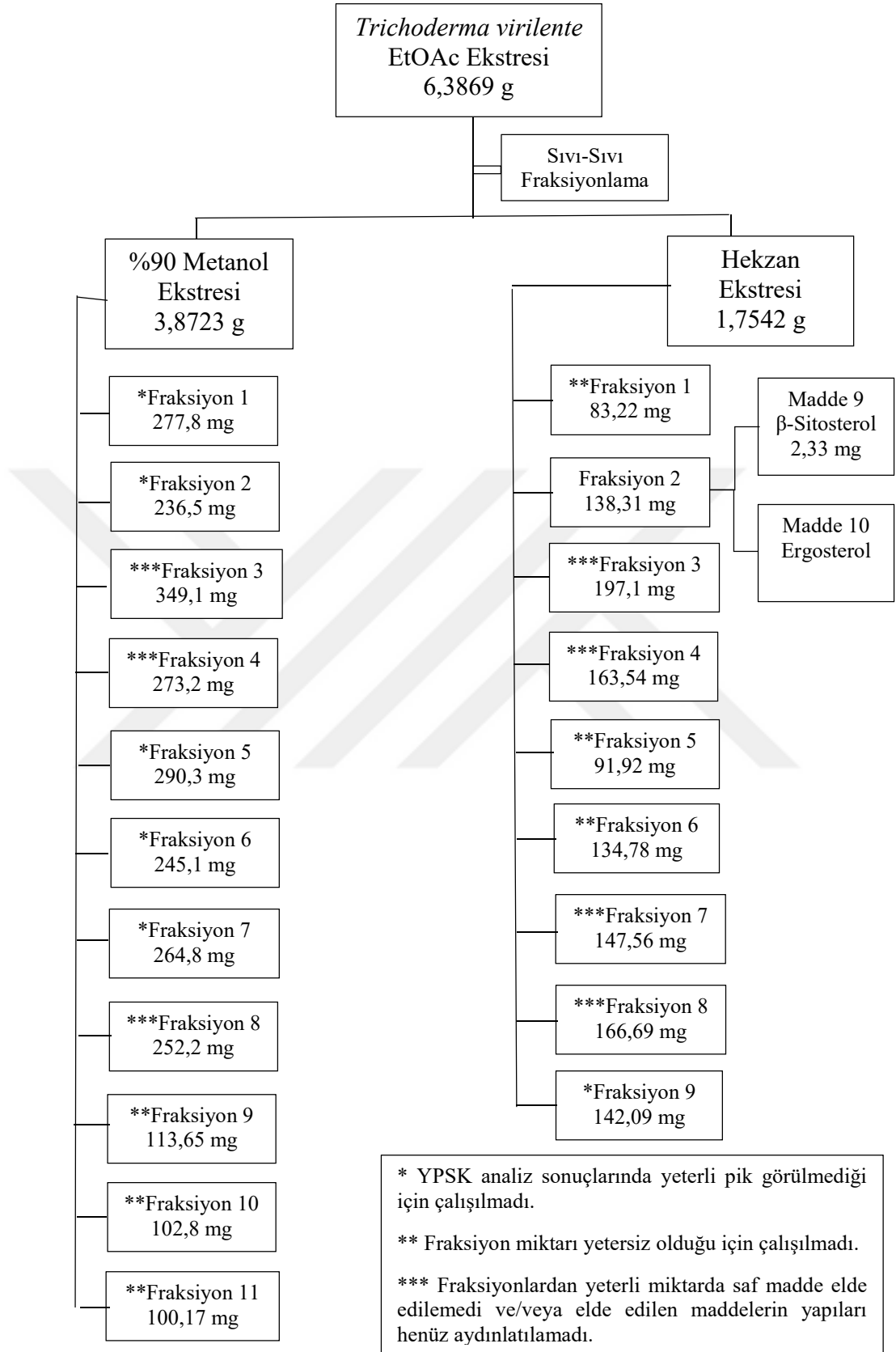
Şekil 3.2 *Trichoderma virilente* mantarının ham ekstre YPSK kromatogramı

3.2. Sekonder Metabolit İzolasyonu Bulguları

Mantar ekstraksiyon işlemi sonrasında kromatografik çalışmalarla sekonder metabolit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus niger* mantarından elde edilen fraksiyonlar ve izole edilen maddeler Şekil 3.3’de, *Trichoderma virilente* mantarından elde edilen fraksiyonlar ve izole edilen maddeler Şekil 3.4’te verilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilmiş olmasına rağmen teşhis analizi için yeterli miktarda olmayan, miktarı yeterli olup analizi yapılmış ancak teşhisi henüz gerçekleştirilmeyen maddelerimiz de mevcuttur.



Şekil 3.3. *Aspergillus niger* mantarı fraksiyon şeması ve izole edilen maddeler



Şekil 3.4. *Trichoderma virilente* mantarı fraksiyon şeması ve izole edilen maddeler

3.2.1 Vakum Sıvı Kromatografi Bulguları

Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de gösterildiği üzere, VSK uygulaması sonrasında *Aspergillus niger* mantarının %90 metanol fazı ekstresi 11 fraksiyona, hekzan fazı ekstresi ise 7 fraksiyona ayrılmış ve fraksiyonlar rotavapor kullanılarak solvanlarından kurtarılmıştır.

Çizelge 3.1. *Aspergillus niger* mantarının %90 metanollü fazının VSK fraksiyonları

Fraksiyon	Hekzan miktarı, ml	Etil asetat miktarı, ml	Fraksiyon miktarı, mg
1	800	200	263
2	700	300	527,3
3	600	400	376,8
4	400	600	328,7
5	200	800	2406,5
DCM miktarı, ml		Metanol miktarı, ml	
6	1000	0	222,6
7	800	200	58,2
8	500	500	1819,9
9	400	600	218,2
10	200	800	923,4
11	0	1000	187,8

Çizelge 3.2. *Aspergillus niger* mantarının hekzan fazının VSK fraksiyonları

Fraksiyon	Hekzan miktarı, ml	Etil asetat miktarı, ml	Fraksiyon miktarı, mg
1	700	300	530
2	500	500	144
3	300	700	153,58
4	0	1000	161,1

Çizelge 3.2. Devam

	Kloroform miktarı, ml	Metanol miktarı, ml	
5	800	200	100,8
6	500	500	125,5
7	0	1000	131,3

Çizelge 3.3’de gösterildiği üzere, VSK uygulaması sonrasında *Trichoderma virilente* mantarının %90 metanol fazı ekstresi 11 fraksiyona ayrılmış ve fraksiyonlar rotavapor kullanılarak solvanlarından kurtarılmıştır.

Çizelge 3.3. *Trichoderma virilente* mantarının %90 metanollü fazının VSK fraksiyonları

Fraksiyon	Hekzan miktarı, ml	Etil asetat miktarı, ml	Fraksiyon miktarı, mg
1	800	200	277,8
2	600	400	236,5
3	400	600	349,1
4	200	800	273,2
5	0	1000	290,3
DCM miktarı, ml		Metanol miktarı, ml	
6	1000	0	245,1
7	700	300	264,8
8	500	500	252,2
9	400	600	113,65
10	200	800	102,8
11	0	1000	100,17

3.2.2 Açık Kolon Kromatografisi Bulguları

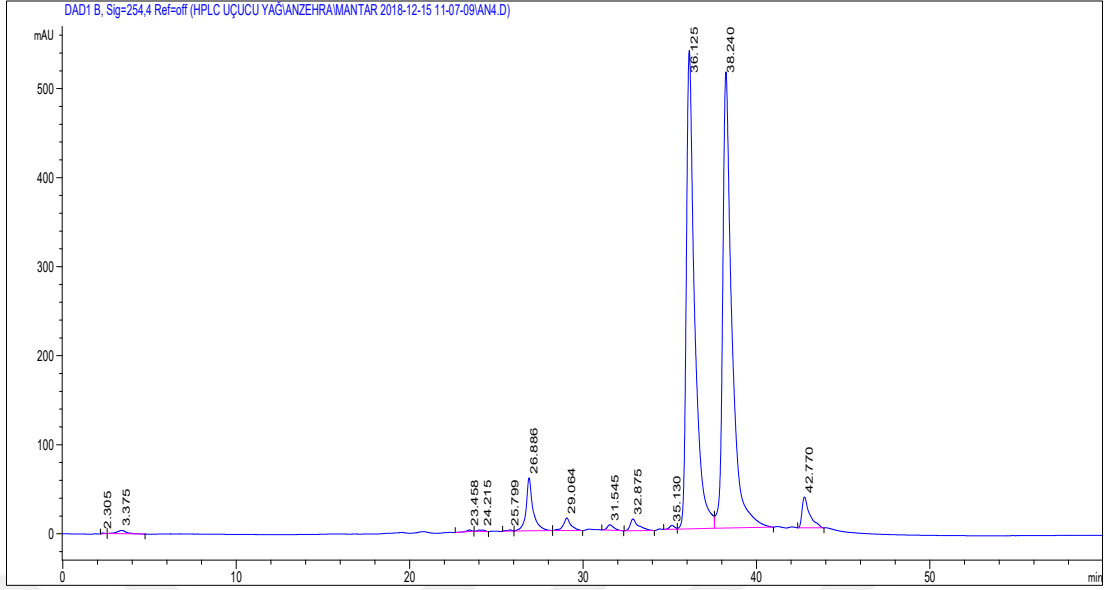
Çizelge 3.4’de gösterildiği üzere, absorbanı silikajel 60 olan açık kolon kromatografisi yönteminde Hekzan: Etil asetat: Metanol çözücülerini kullanarak, *Trichoderma virilente* mantarının hekzan fazı ekstresi, 9 fraksiyona ayrılmıştır.

Çizelge 3.4. *Trichoderma virilente* mantarının hekzan fazının açık kolon kromatografisi fraksiyonları

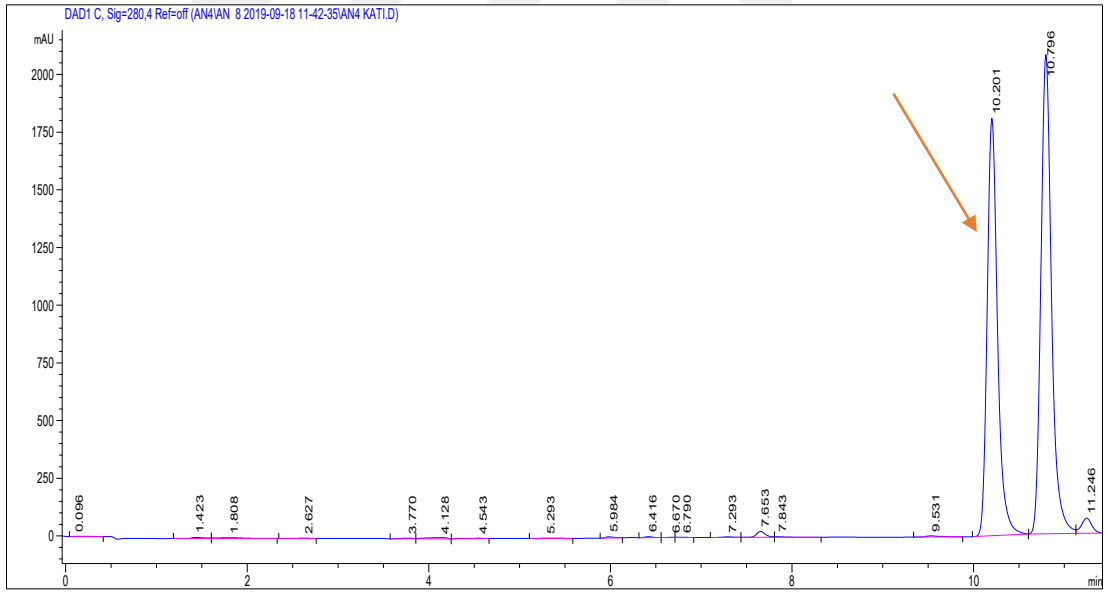
Fraksiyon	Fraksiyon miktarı, mg
1	83,22
2	138,31
3	197,1
4	163,54
5	91,92
6	134,78
7	147,56
8	166,69
9	142,09

3.2.3 Madde 1 İzolasyon Bulguları

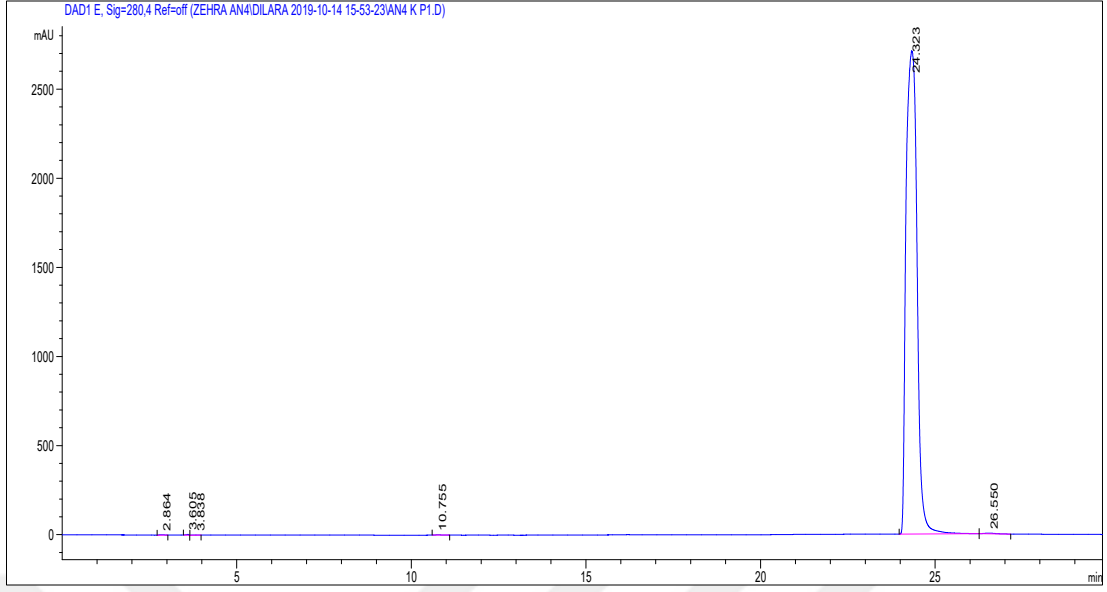
Madde 1, 6,22 mg miktarda toplanmıştır. Madde 1’i içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.5’te verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.6’da, saf olarak toplanan maddenin YPSK analizi kromatogramı Şekil 3.7’de, maksimum UV absorbanı Şekil 3.8’de verilmiştir.



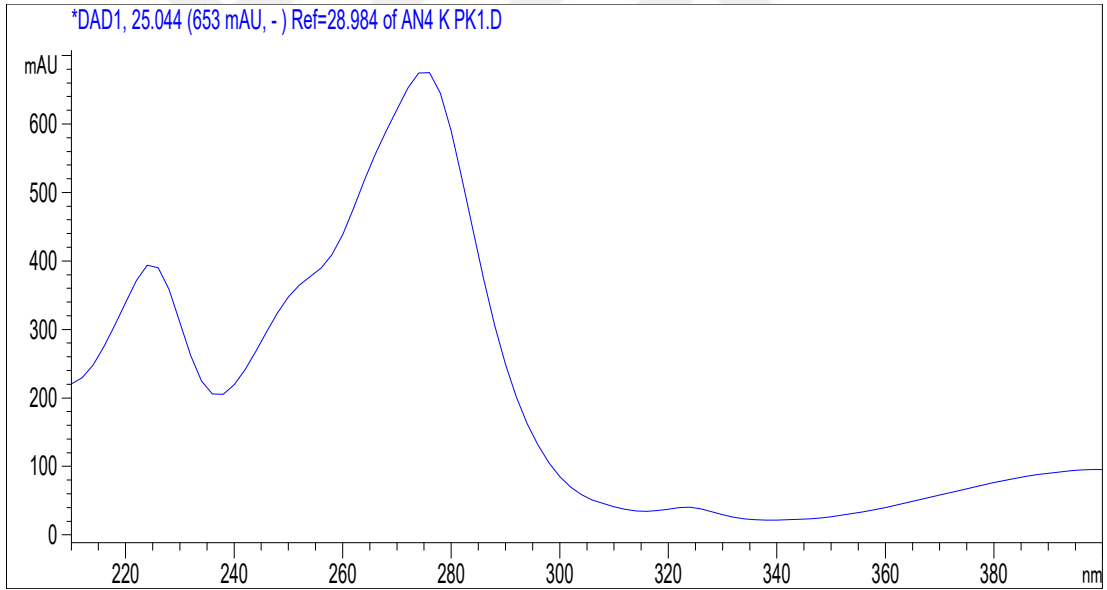
Şekil 3.5. Madde 1'i içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.6. Madde 1'i içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



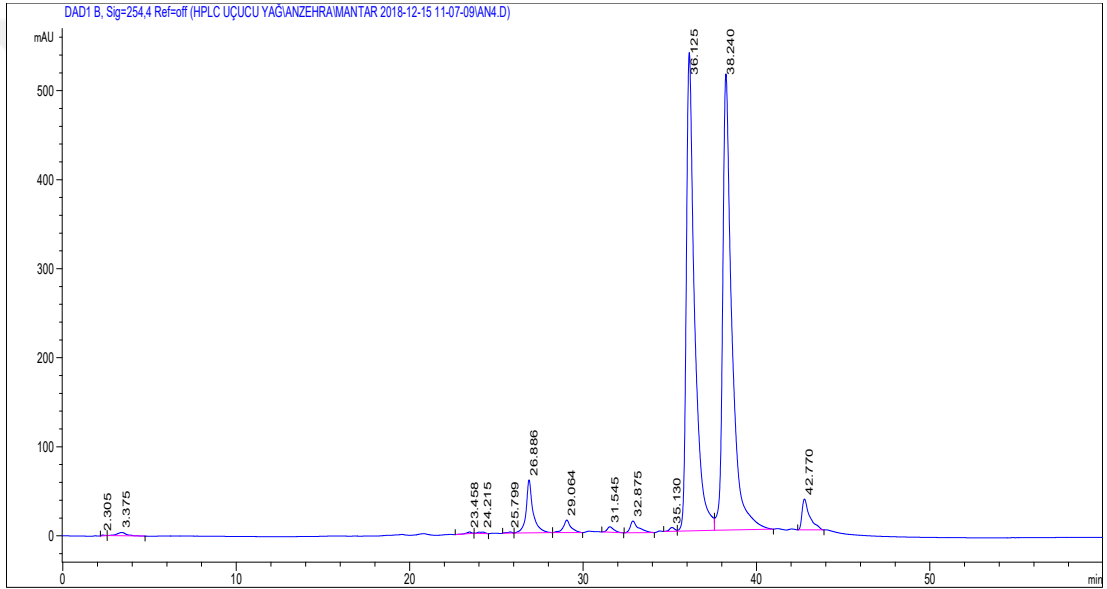
Şekil 3.7. İzole edilen saf Madde 1'in YPSK kromatogramı



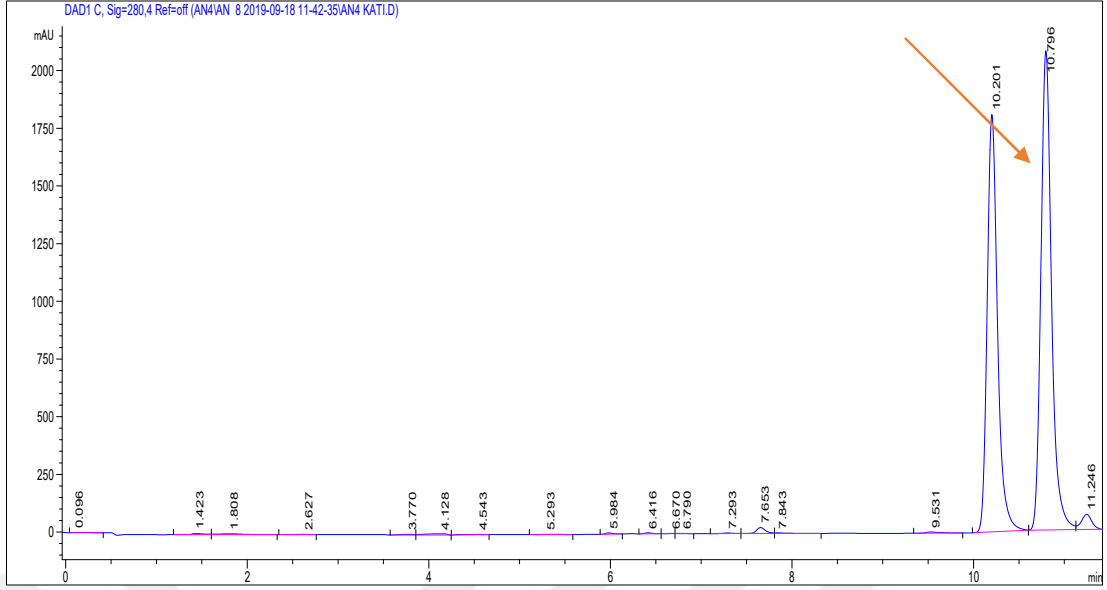
Şekil 3.8. Madde 1'in maksimum UV absorbansı

3.2.4 Madde 2 İzolasyon Bulguları

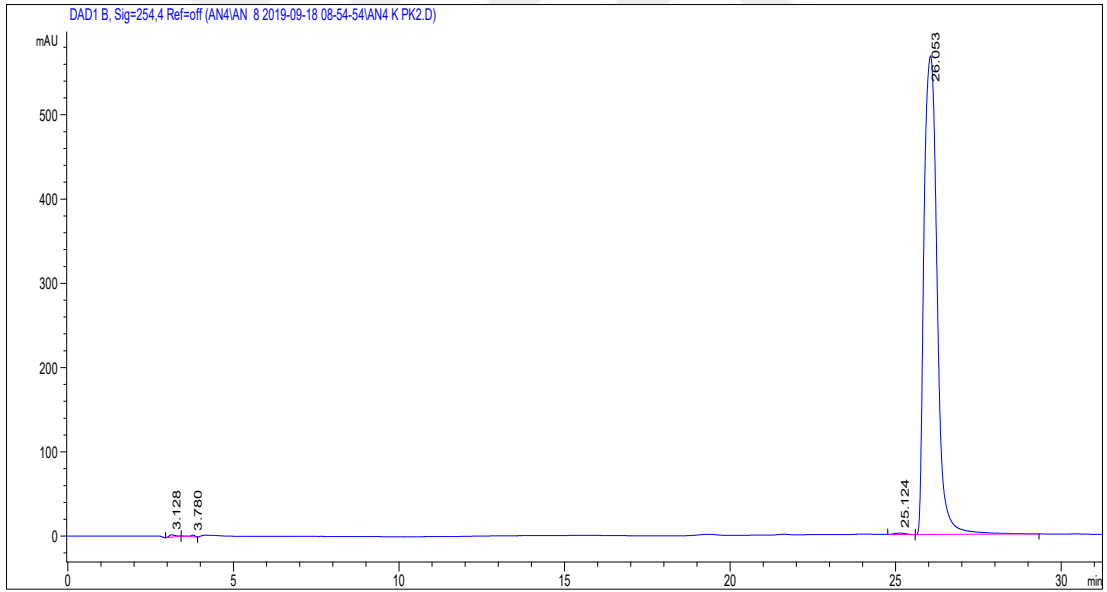
Madde 2, 6,25 mg miktarda toplanmıştır. Madde 2'yi içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.9'da verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.10'da, saf olarak toplanan maddenin YPSK analiz kromatogramı Şekil 3.11'de, maksimum UV absorbansı Şekil 3.12'de verilmiştir.



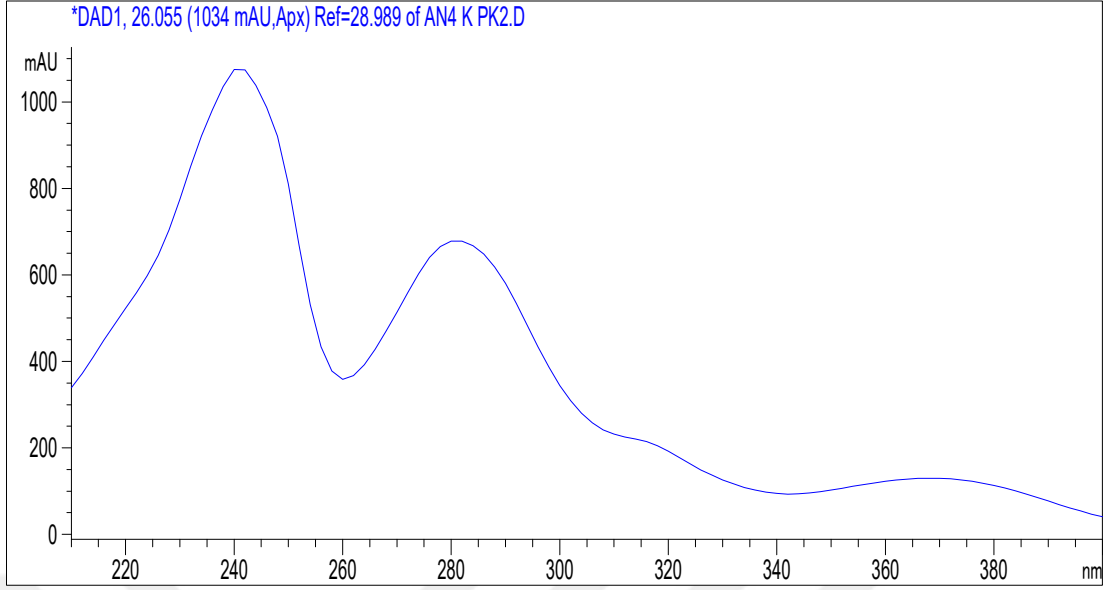
Şekil 3.9. Madde 2'yi içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.10. Madde 2'yi içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



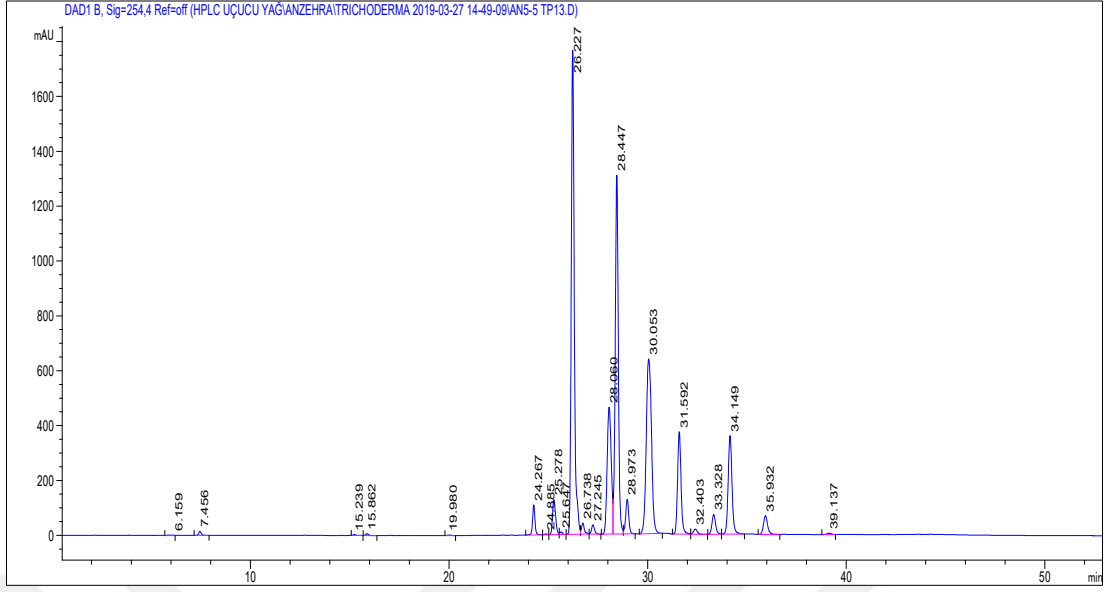
Şekil 3.11. İzole edilen saf Madde 2'nin YPSK kromatogramı



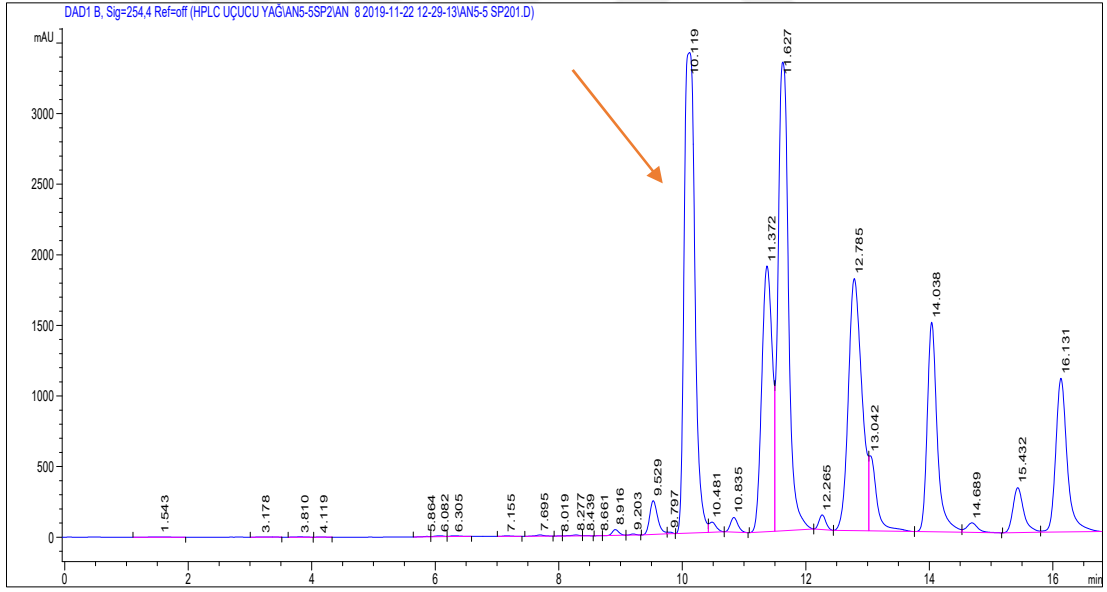
Şekil 3.12. Madde 2'nin maksimum UV absorbansı

3.2.5 Madde 3 İzolasyon Bulguları

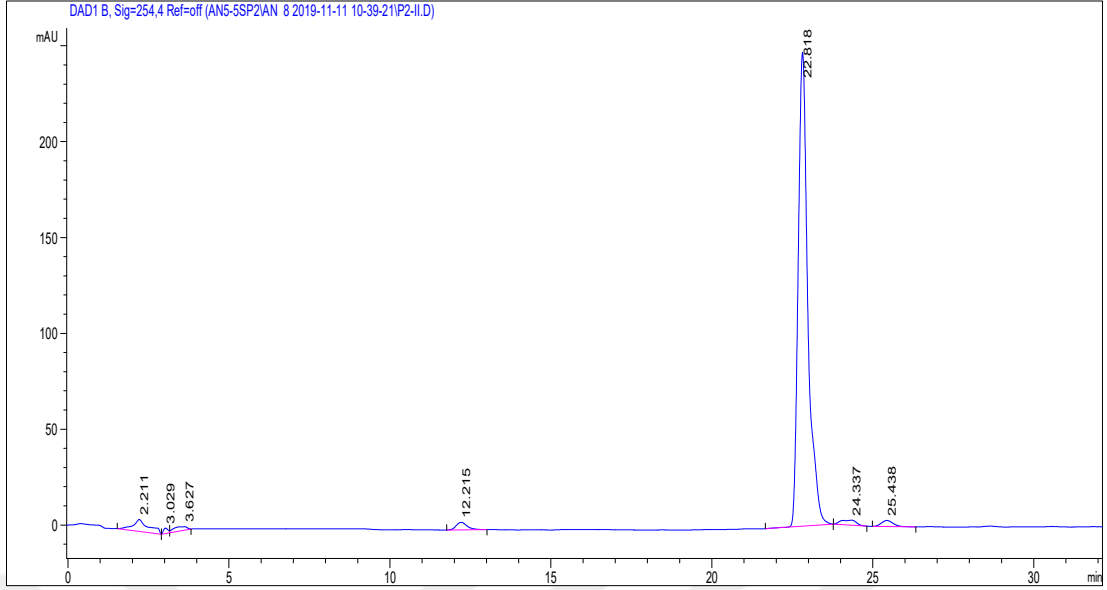
Madde 3, 6,92 mg miktarda toplanmıştır Madde 3'ü içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.13'de verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.14'de, saf olarak toplanan maddenin YPSK analizi kromatogramı Şekil 3.15'te, maksimum UV absorbansı Şekil 3.16'da verilmiştir.



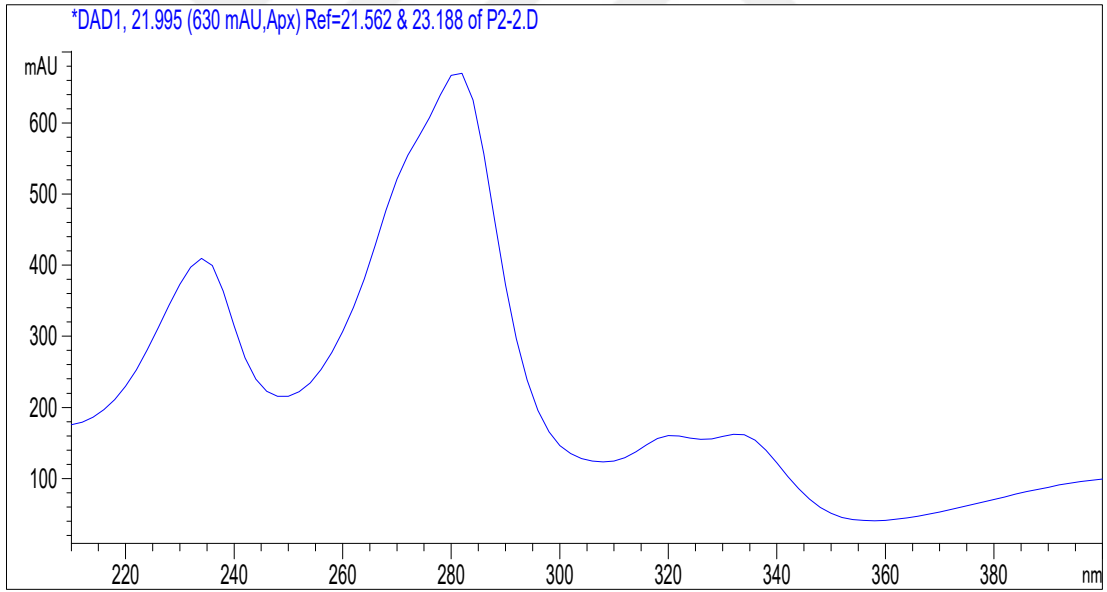
Şekil 3.13. Madde 3'ü içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.14. Madde 3'ü içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



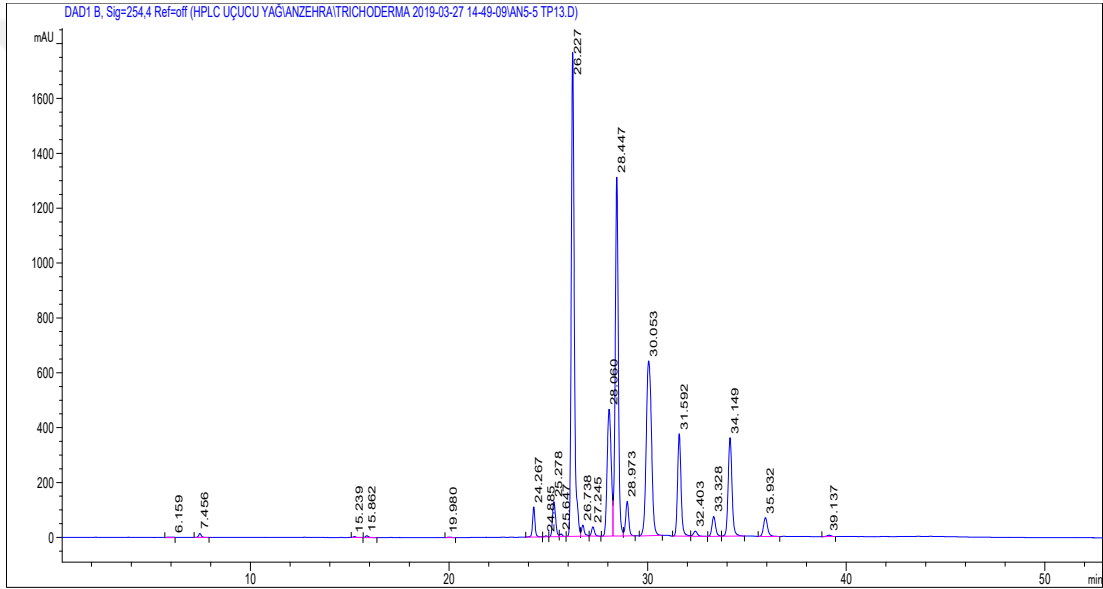
Şekil 3.15. İzole edilen saf Madde 3'ün YPSK kromatogramı



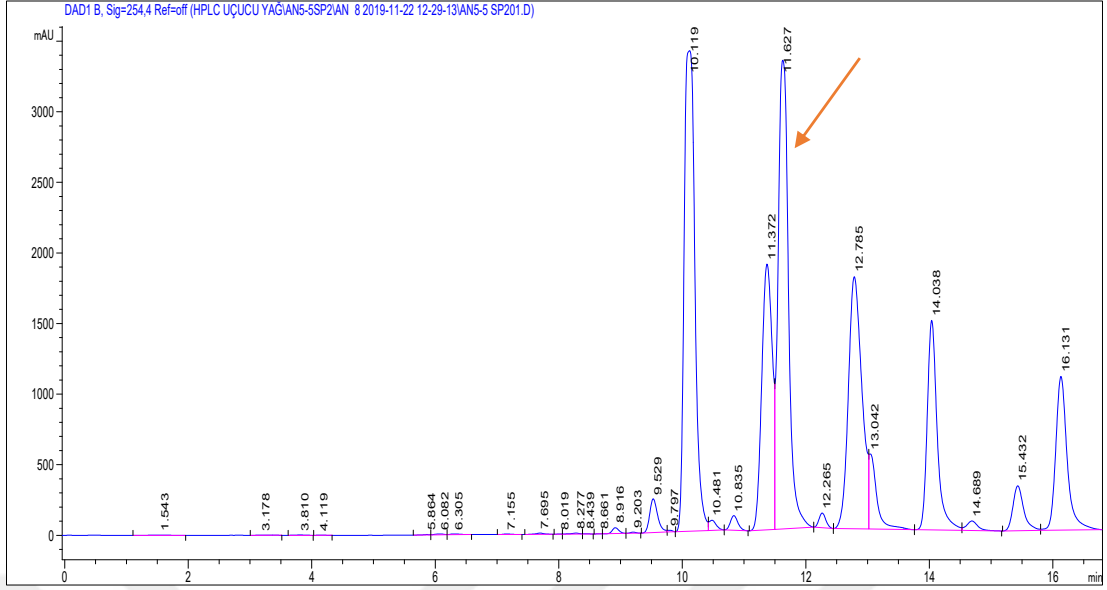
Şekil 3.16. Madde 3'ün maksimum UV absorbanası

3.2.6 Madde 4 İzolasyon Bulguları

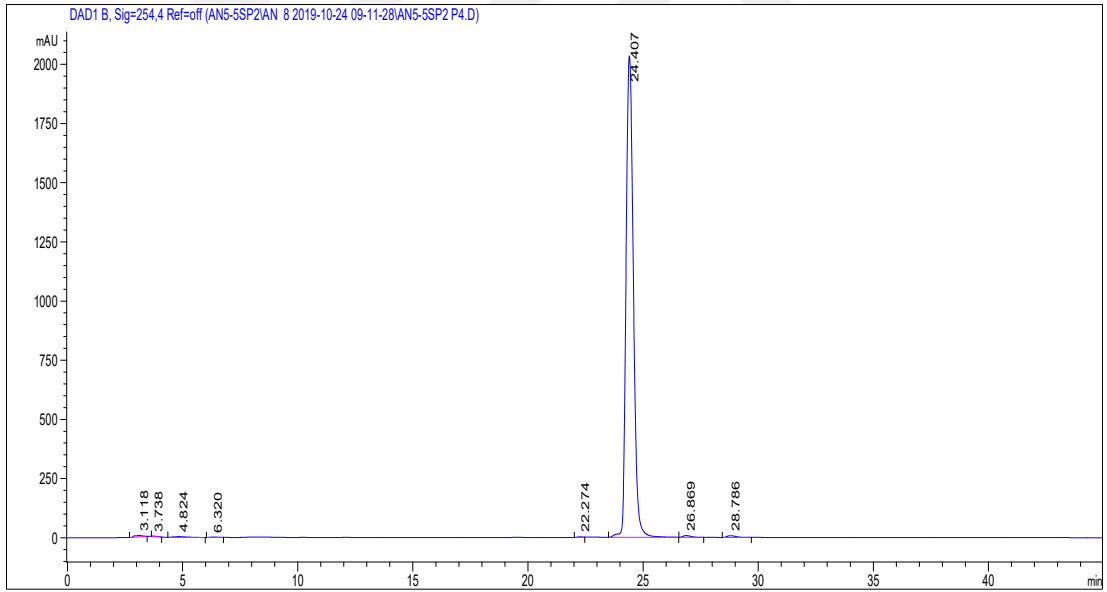
Madde 4, 6,31 mg miktarda toplanmıştır. Madde 4'ü içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.17'de verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.18'de, saf olarak toplanan maddenin YPSK analiz kromatogramı Şekil 3.19'da, maksimum UV absorbansı Şekil 3.20'de verilmiştir.



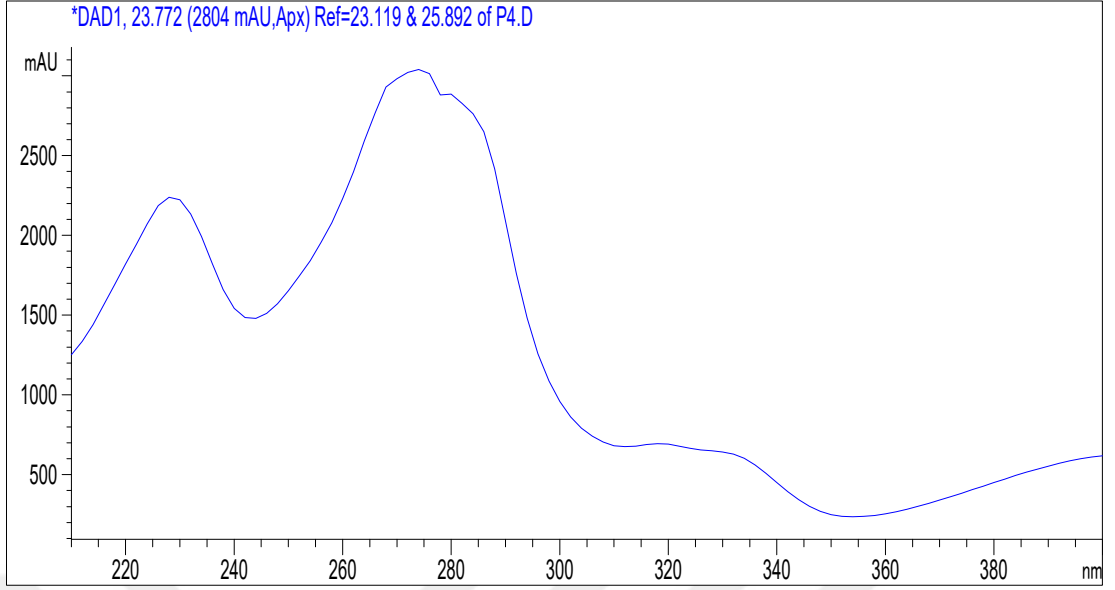
Şekil 3.17. Madde 4'ü içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.18. Madde 4'ü içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



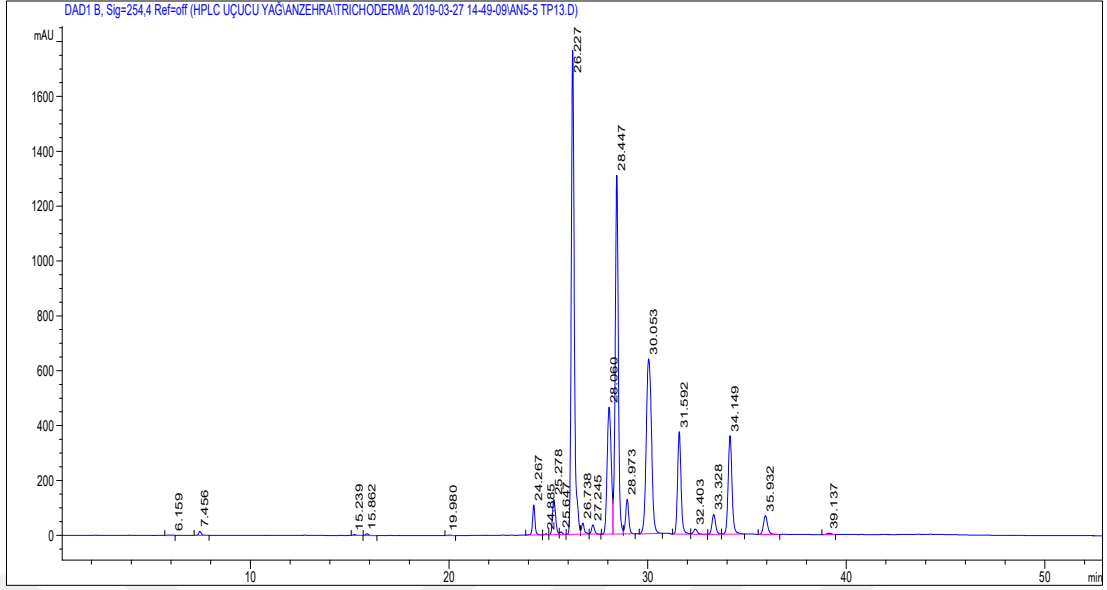
Şekil 3.19. İzole edilen saf Madde 4'ün YPSK kromatogramı



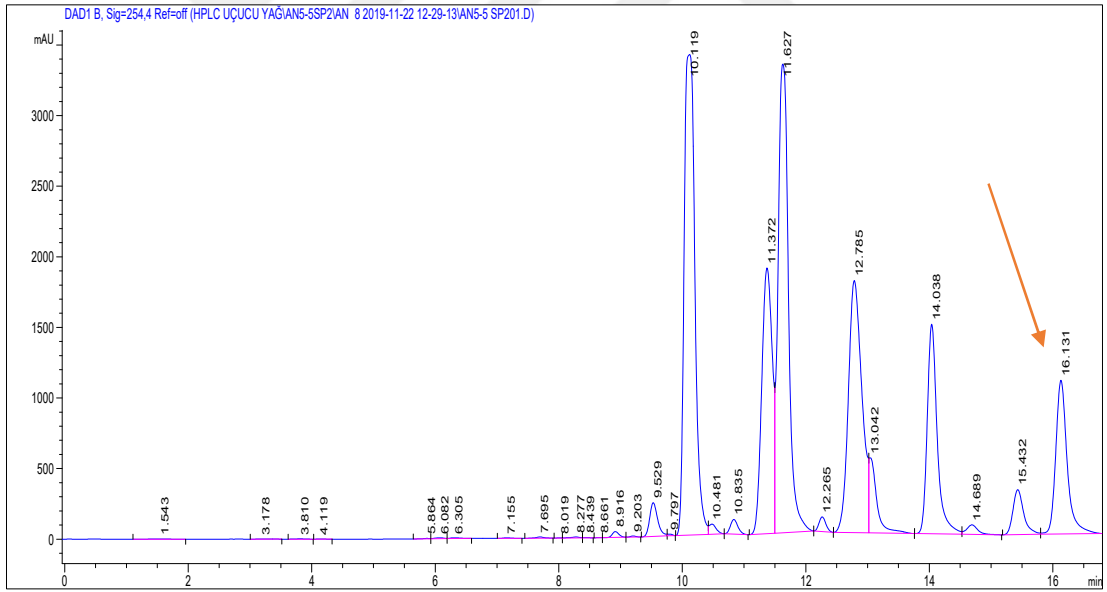
Şekil 3.20. Madde 4'ün maksimum UV absorbandsı

3.2.7 Madde 5 ve Madde 6 İzolasyon Bulguları

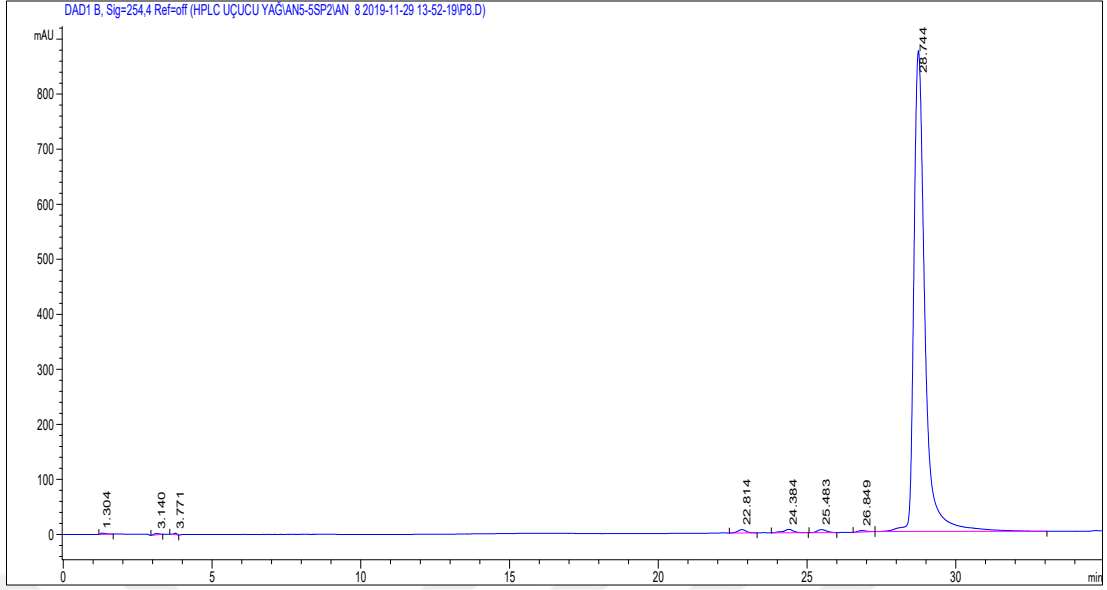
Madde 5 ve Madde 6, YPSK'da tek bir pik olarak 6,60 mg miktarda toplanmıştır. Madde 5 ve Madde 6'yı içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.21'de verilirken, maddelerin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.22'de, saf olarak toplanan maddelerin YPSK analiz kromatogramı Şekil 3.23'da, maksimum UV absorbandsı Şekil 3.24'de verilmiştir.



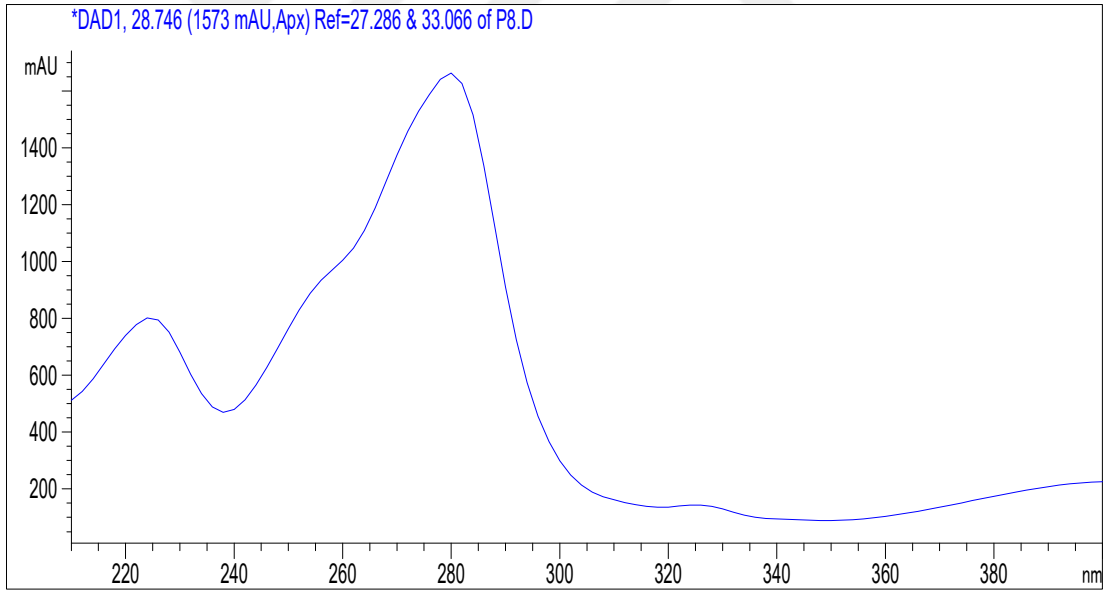
Şekil 3.21. Madde 5 ve Madde 6'yı içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.22. Madde 5 ve Madde 6'yı içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



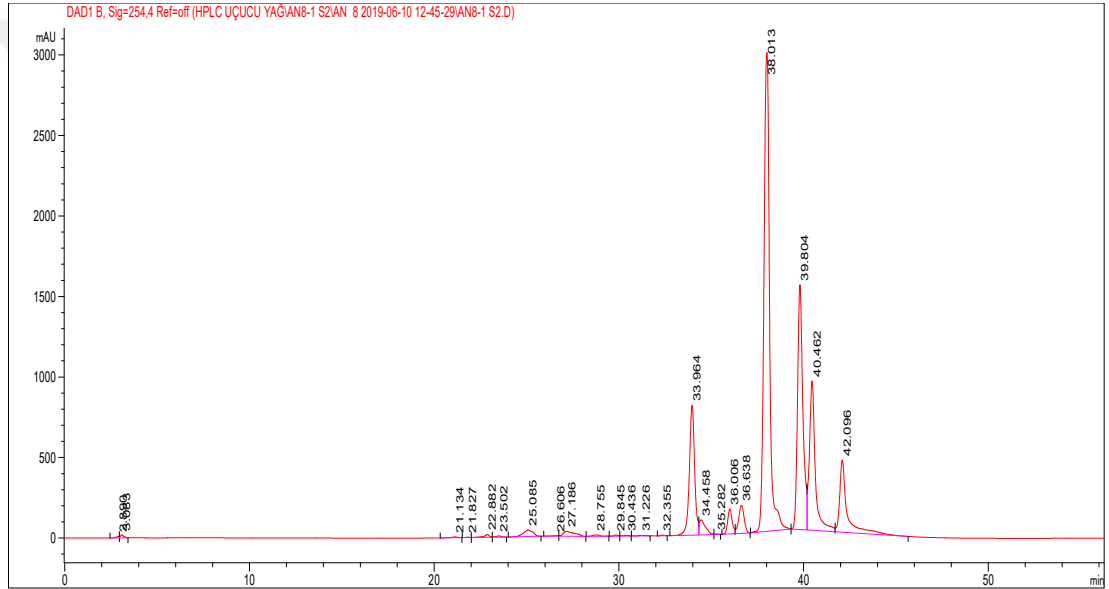
Şekil 3.23. İzole edilen Madde 5 ve Madde 6'nın YPSK kromatogramı



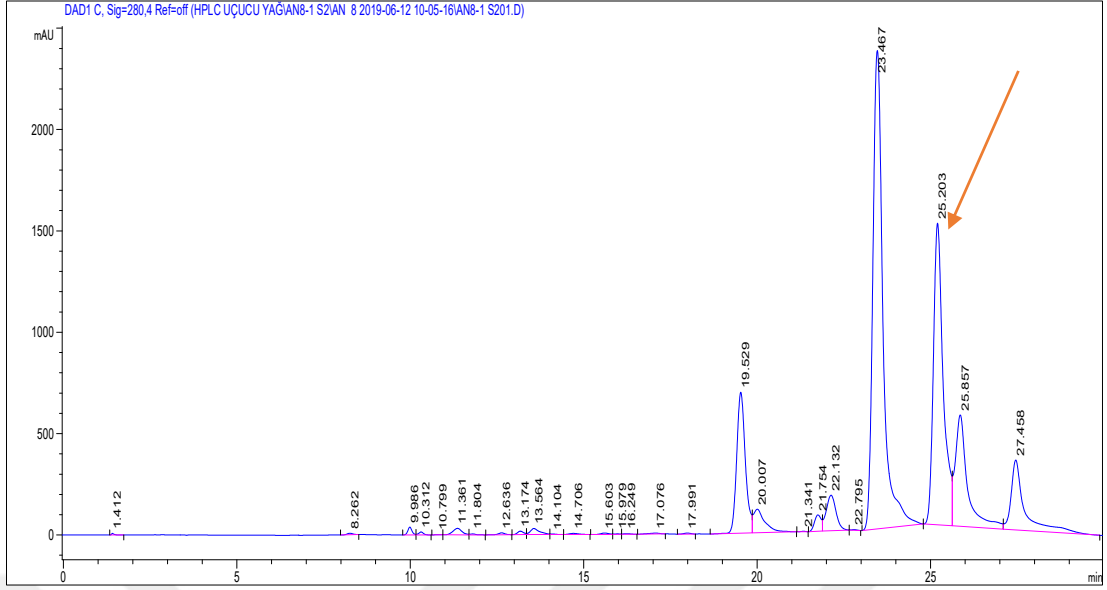
Şekil 3.24. Madde 5 ve Madde 6'nın maksimum UV absorbansı

3.2.8 Madde 7 İzolasyon Bulguları

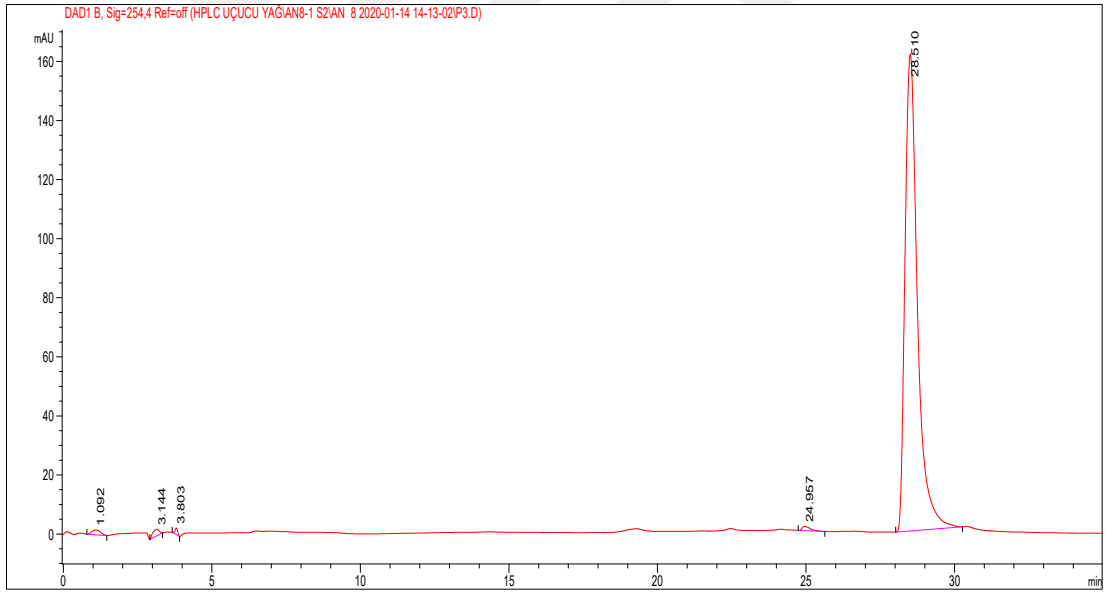
Madde 7, 2,3 mg miktarda toplanmıştır. Madde 7'yi içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.25'te verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.26'da, saf olarak toplanan maddenin YPSK analizi kromatogramı Şekil 3.27'de, maksimum UV absorbansı Şekil 3.28'de verilmiştir.



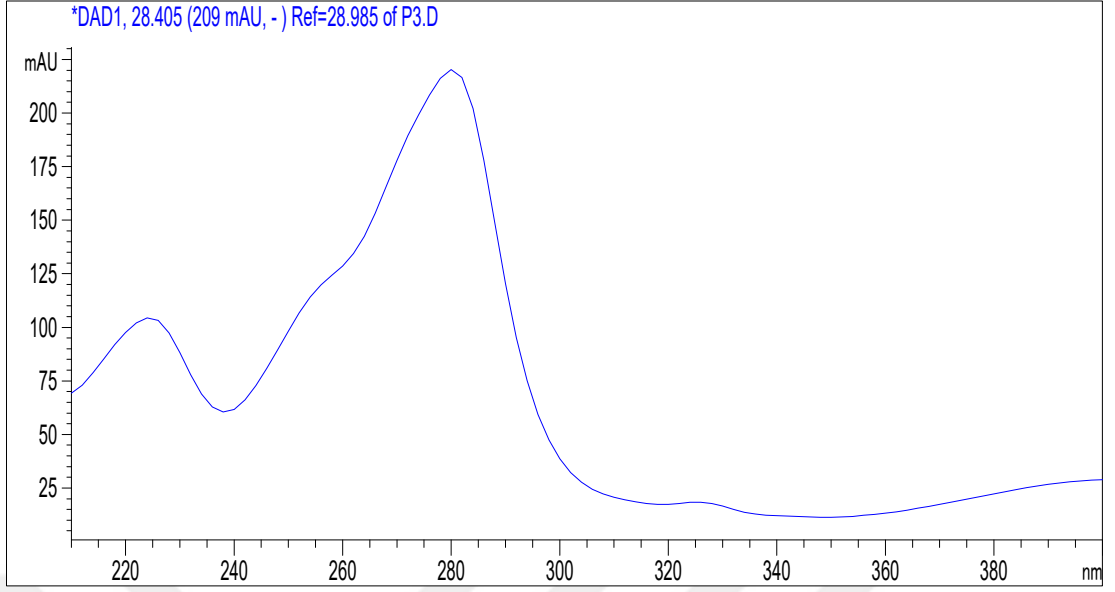
Şekil 3.25. Madde 7'yi içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.26. Madde 7’yi içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



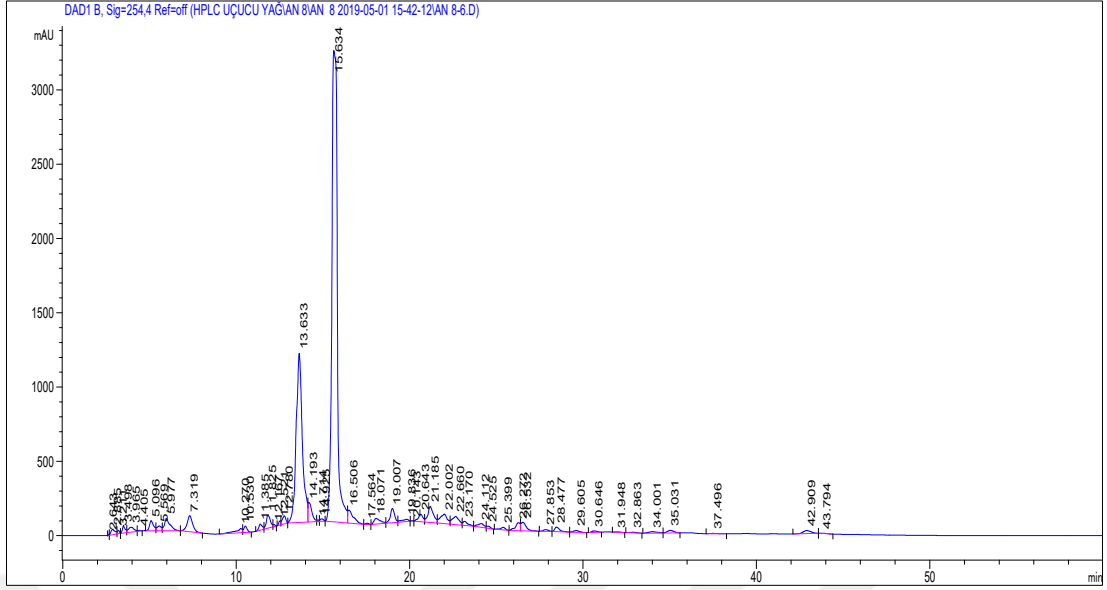
Şekil 3.27. İzole edilen saf Madde 7’nin YPSK kromatogramı



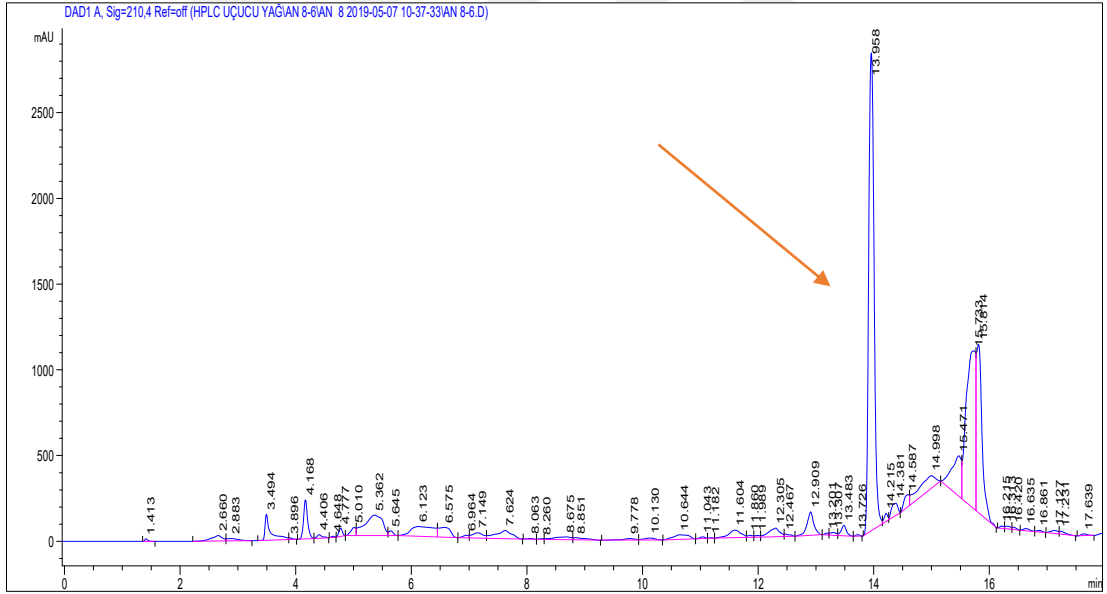
Şekil 3.28. Madde 7'nin maksimum UV absorbansı

3.2.9 Madde 8 İzolasyon Bulguları

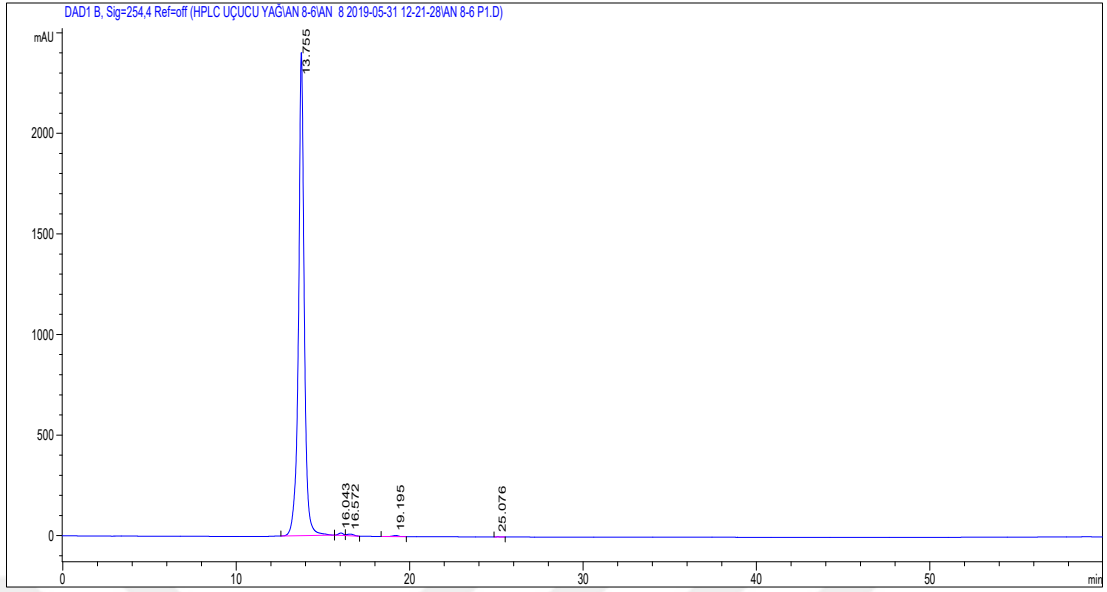
Madde 8, 1,78 mg miktarda toplanmıştır. Madde 8'i içeren fraksiyonun analitik kolon kullanılarak incelenen YPSK kromatogramı Şekil 3.29'te verilirken, maddenin semipreparatif kolon kullanılarak izolasyonunun gerçekleştirildiği fraksiyonun YPSK kromatogramı Şekil 3.30'da, saf olarak toplanan maddenin YPSK analizi kromatogramı Şekil 3.31'de, maksimum UV absorbansı Şekil 3.32'de verilmiştir.



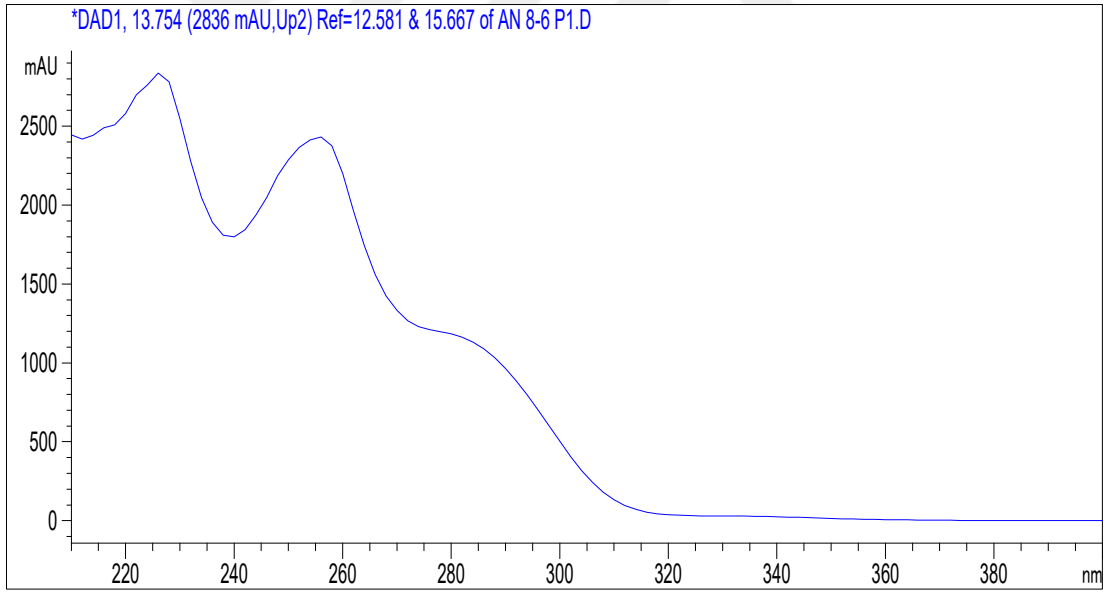
Şekil 3.29. Madde 8'i içeren fraksiyonun analiz aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.30. Madde 8'i içeren fraksiyonun izolasyon aşaması YPSK kromatogramı



Şekil 3.31. İzole edilen saf Madde 8'nin YPSK kromatogramı



Şekil 3.32. Madde 8'nin maksimum UV absorbanası

3.2.10 Madde 9 ve Madde 10 İzolasyon Bulguları

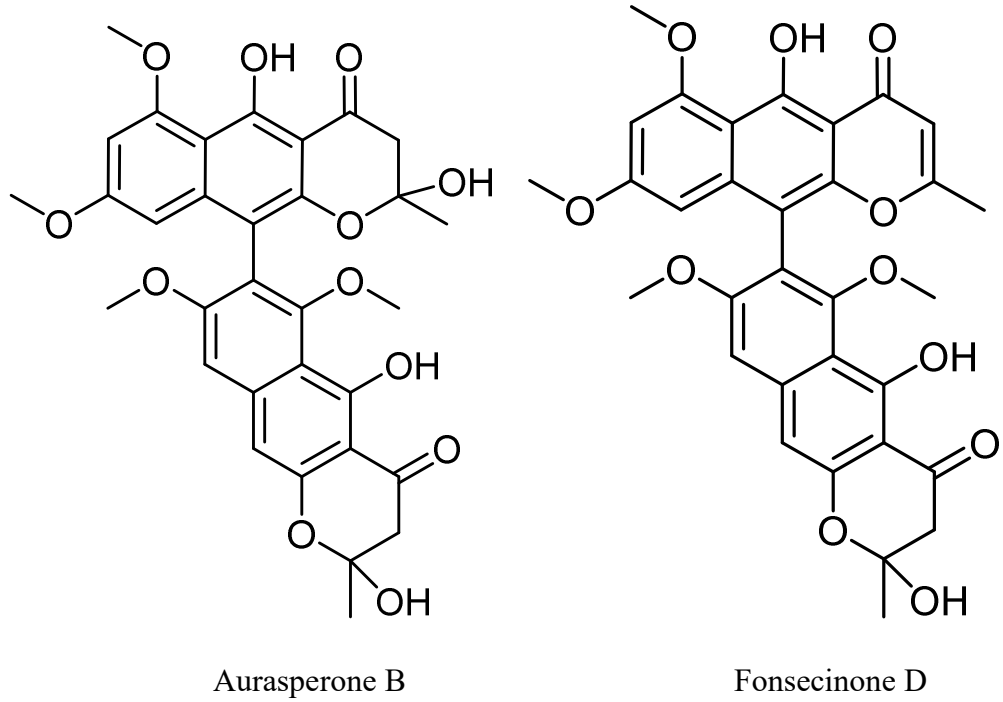
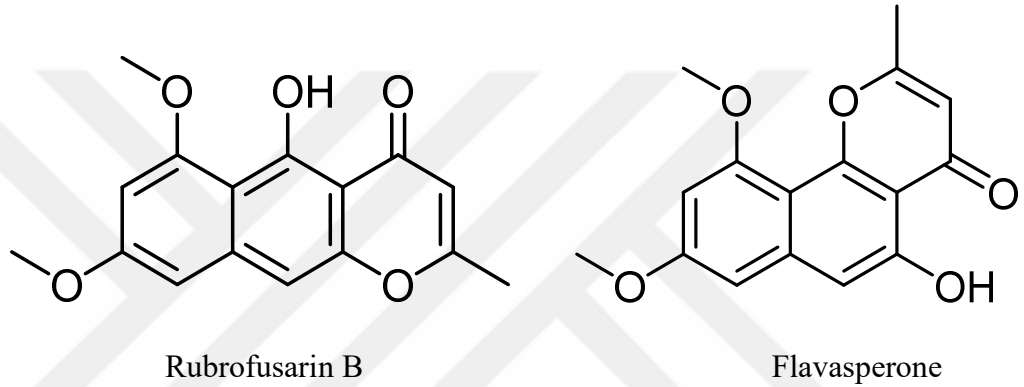
Madde 9 ve Madde 10 preparatif İTK yöntemi ile tek bir spot olarak izole edilmiştir. Elde edilen toplam madde miktarı 2,33 mg'dır. İTK plağına preparatif olarak uygulanan fraksiyonun İTK plağı Şekil 3.33'de verilmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda Rf değeri 9,5/17 cm'dir.

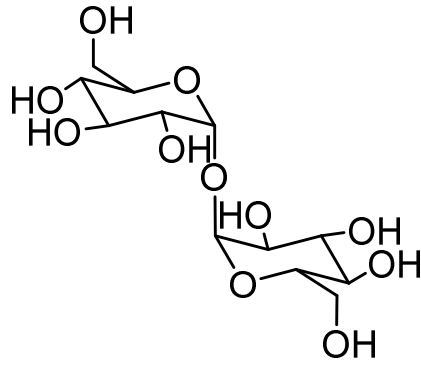


Şekil 3.33. Madde 9 ve Madde 10'u içeren fraksiyonun izolasyon aşaması İTK plağı görseli

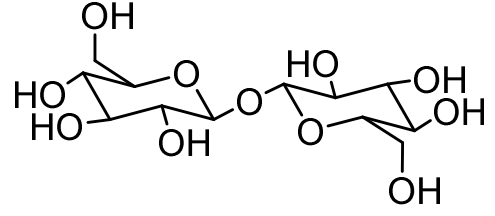
3.3. İzole Edilen Maddelerin Teşhis Bulguları

İzolasyon işlemi sonrasında kimyasal yapı tayini için miktarları yeterli olan maddelerden 7 tanesi NMR analizine ve 1 tanesi GC-MS analizine gönderilmişlerdir. *Aspergillus niger* mantarından izole edilen bileşikler Şekil 3.34’de ve *Trichoderma virilente* mantarından izole edilen bileşikler Şekil 3.35’de verilmiştir.

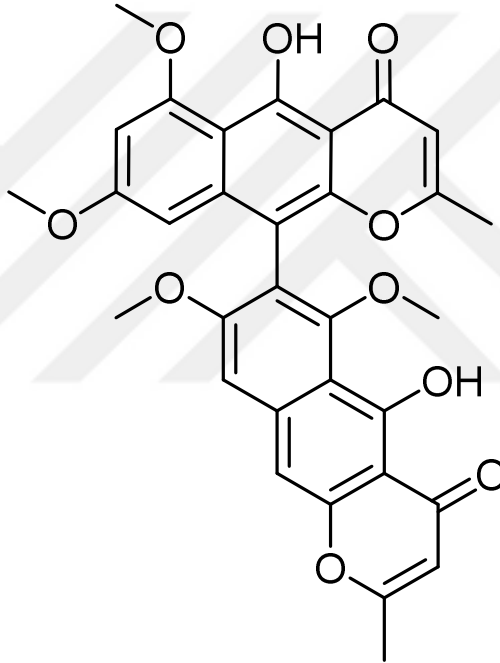




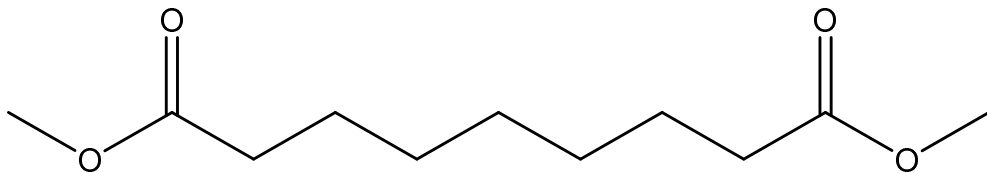
α,α -Trehalose



β,β -Trehalose

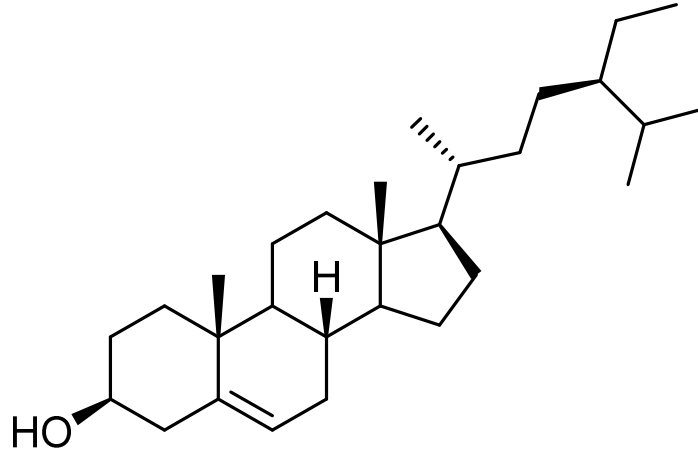


Aurasperone A

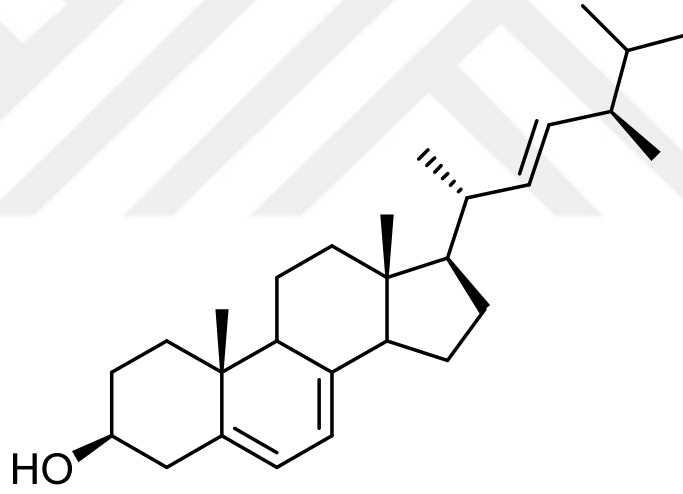


Nonanedioik Asit Dimetil Ester

Şekil 3.34. *Aspergillus niger* mantarından izole edilen bileşikler



β -Sitosterol



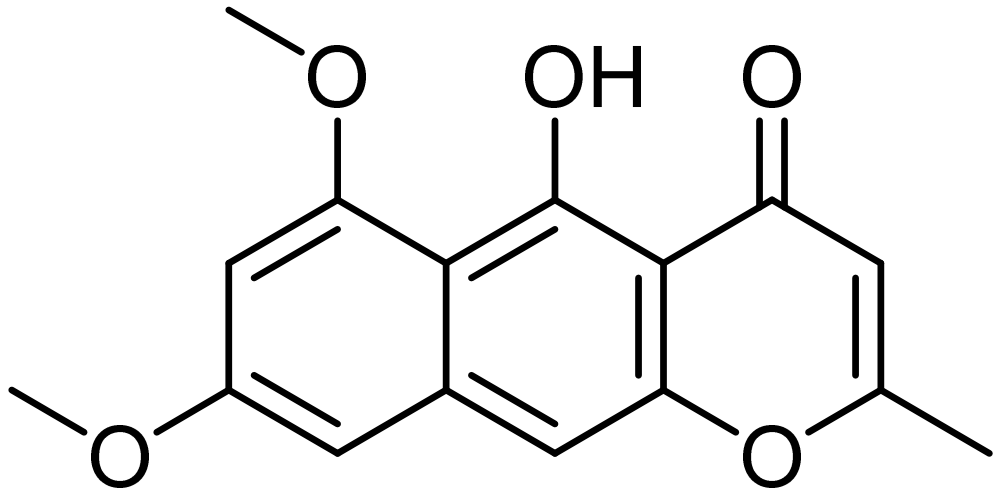
Ergosterol

Şekil 3.35. *Trichoderma virilente* mantarından izole edilen bileşikler

3.3.1 Madde 1 Teşhis Bulguları

Madde 1, koyu turuncu katı amorf yapıda izole edilmiştir. YPSK kromatogramı, 233, 271 nm'de maksimum absorpsiyon zirveleri (λ_{max}) göstermiştir. Madde 1'in ^{13}C NMR spektrumu, 2D NMR spektrumları, yani HMBC ve HMQC aracılığıyla dokuz adet kuaterner karbon, dört adet metin ve üç adet metil singlet olarak ayırt edilen on altı karbon rezonansının varlığını ortaya koymuştur. Dokuz adet kuaterner karbon, birlikte bir γ -piron parçasını oluşturan bir adet karbonil grubuna (185C 185.9), iki adet oksijenlenmiş olefinik karbona (δC 170.2 ve δC 154.6) farklılaşabilmektedir. Ek olarak, δC 163.4, δC 163.2 ve δC 161.8'de üç adet oksijenlenmiş aromatik karbon ve sırasıyla δC 142.9, δC 110.5 ve δC 106.3'te üç adet oksijenlenmemiş kuaterner karbon da fark edilmiştir. Diğer karbon rezonanslarının, iki adet oksijenlenmiş (δC 56.4 ve δC 56.0) ve bir adet aromatik metile (δC 20.5) bölünmüş üç adet metil singlet ile birlikte δC 107.7, δC 102.6, δC 99.0 ve δC 98.6'da dört adet metin olduğu açıklanmıştır. 1H NMR verileri, 1H - 1H COSY ve ROESY spektrumları, δH 6.77 ve δH 6.47'de, sırasıyla δH 3.92 ve δH 3.93 ppm'de iki adet metoksi protona yakın olduğu kanıtlanmış 2,3 Hz'lik bir eşleşme sabiti (J değeri) ile iki adet meta-bağlı protonun varlığını ortaya çıkarmıştır. Madde 1'in HMBC spektrumu, literatürde daha önce bildirildiği gibi Madde 1'in kimyasal yapısının γ -naftopiron iskeletine ait olduğunu gösteren birkaç anahtar korelasyon göstermiştir (Graham ve ark., 2004; Sakurai ve ark., 2002; Shaaban ve ark., 2012). Elde edilen spektral verilerin daha önce bildirilen literatürle karşılaştırılmasıyla, Madde 1'in Rubrofusarin B olduğu açık bir şekilde doğrulanmıştır (Graham ve ark., 2004; Sakurai ve ark., 2002; Shaaban ve ark., 2012).

Rubrofusarin B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.36'da, 1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.5'te, 1H -NMR spektrumu Şekil 3.37'de, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.38'de, 1H - 1H COSY spektrumu Şekil 3.39'da, gHMBC spektrumu Şekil 3.40'da, gHMQC spektrumu Şekil 3.41'de, ROESY spektrumu Şekil 3.42'de verilmiştir.



Rubrofusarin B

Kimyasal Formül: $C_{16}H_{14}O_5$

Nihai Kütle: 286.08

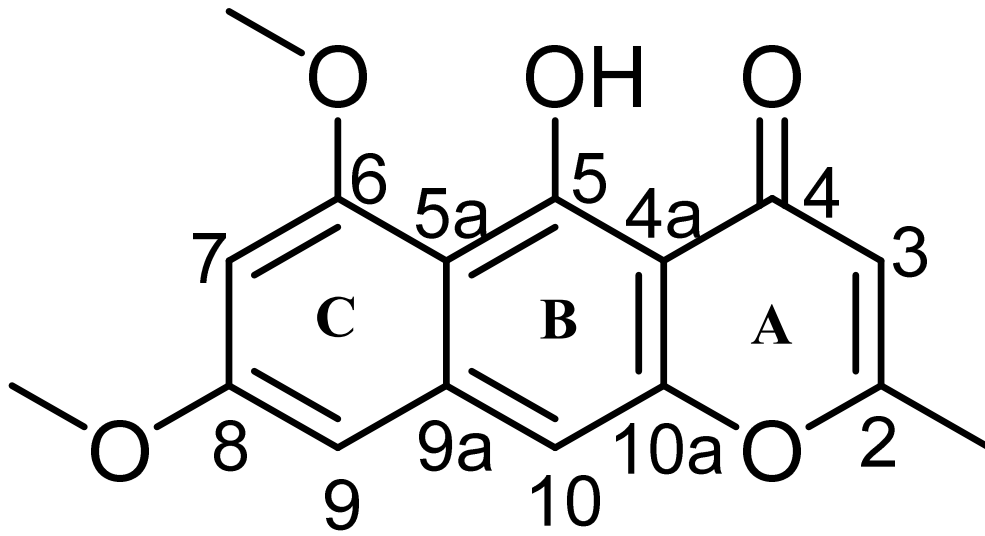
Moleküler Ağırlık: 286.28

m/z: 286.08 (100.0%), 287.09 (17.7%), 288.09 (2.5%)

Elementel Analiz: C, 67.13; H, 4.93; O, 27.94

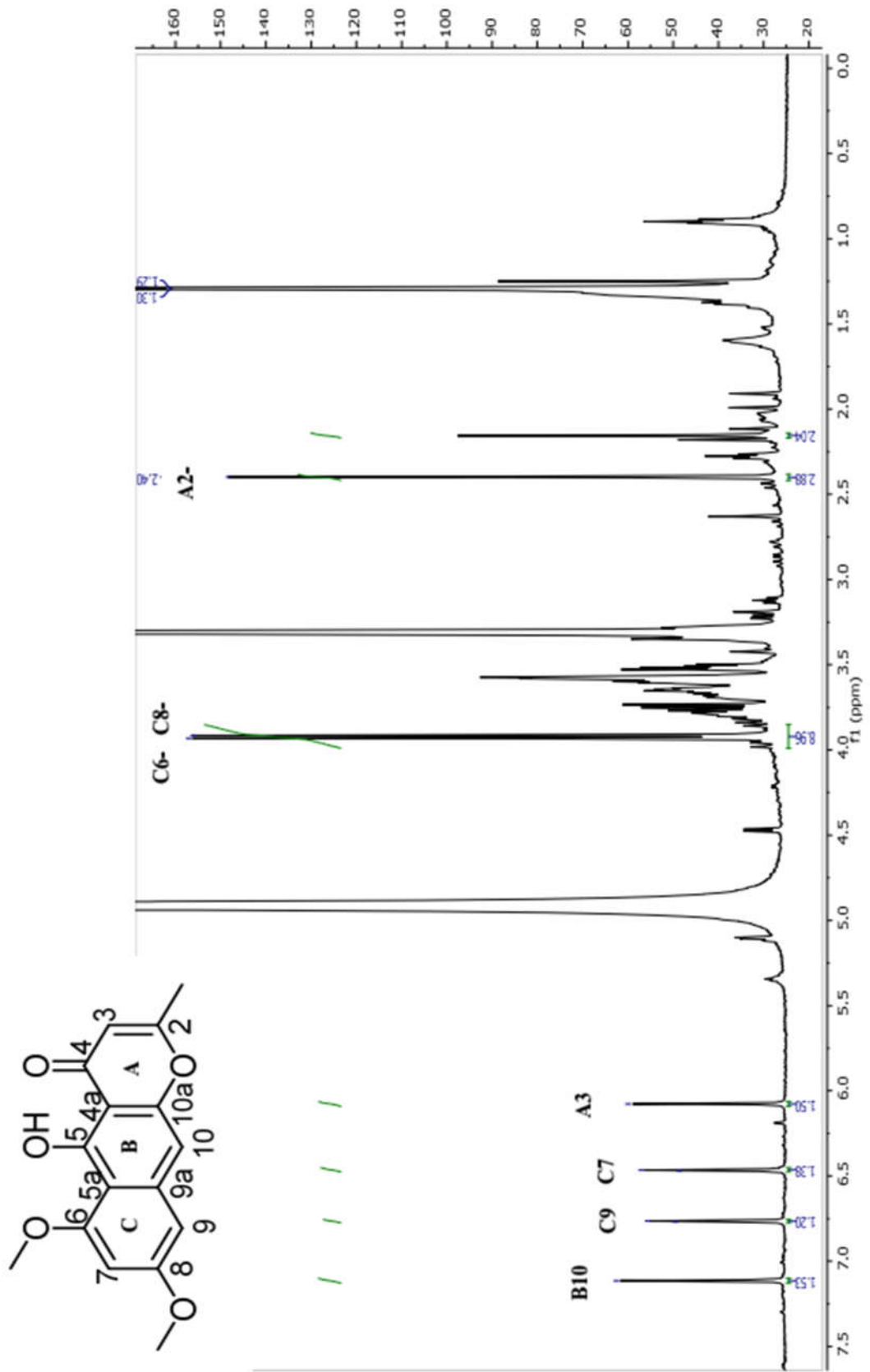
5-hidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil-4H-benzo[g]kromen-4-on

Şekil 3.36. Rubrofusarin B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

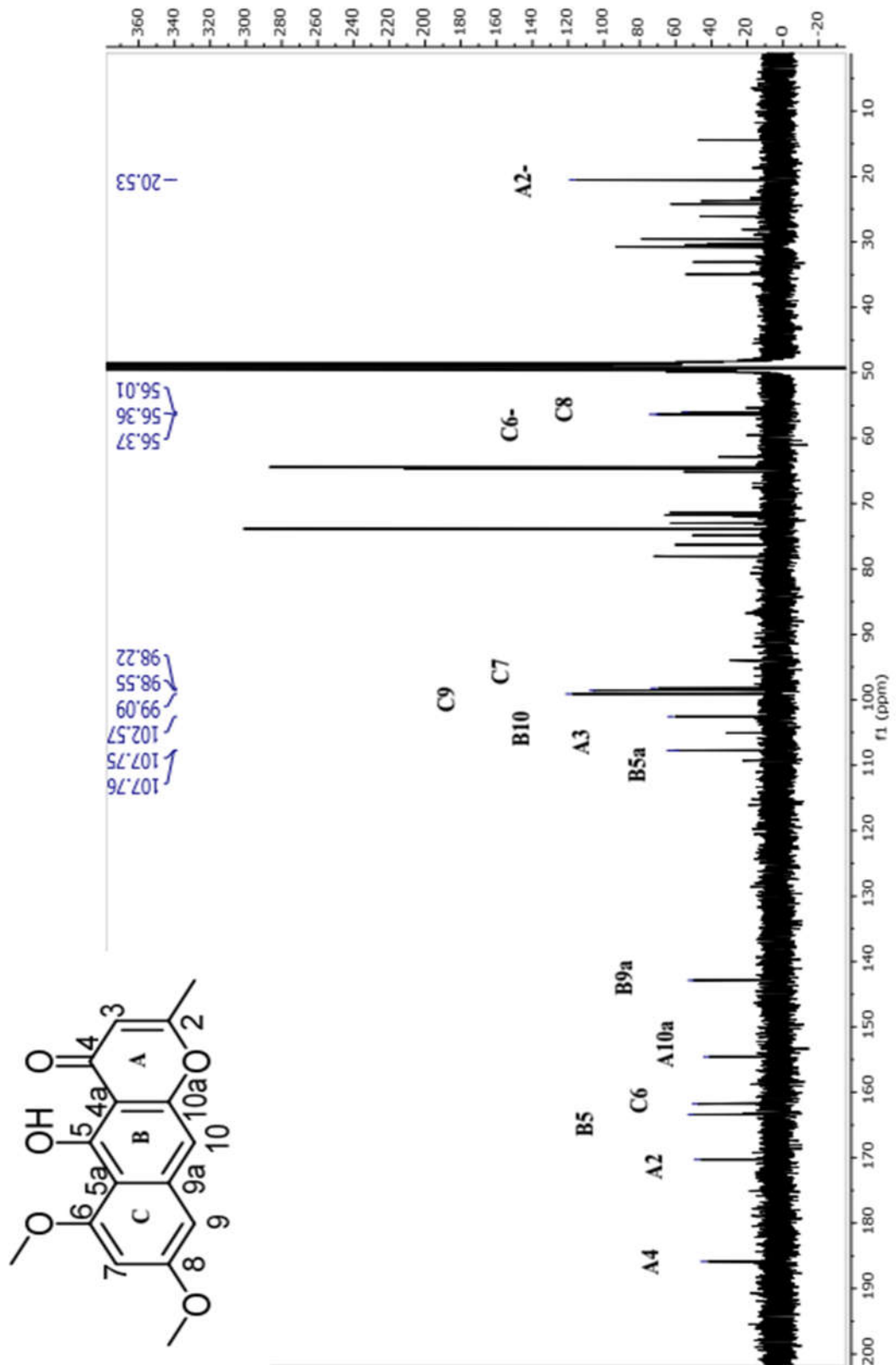


Çizelge 3.5. Rubrofusarin B bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

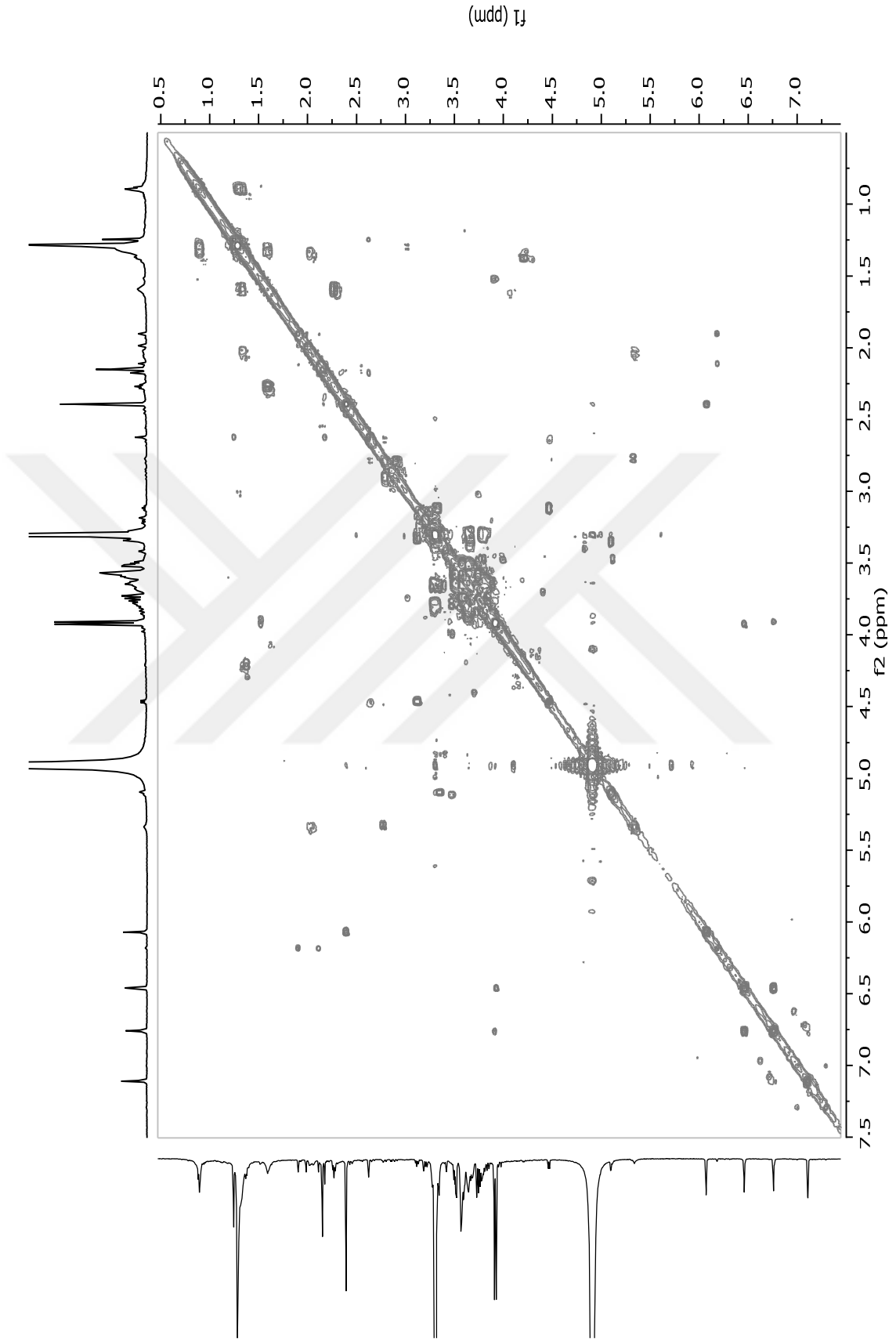
Rubrofusarin B, MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	<i>J</i> , Hz	^{13}C , ppm
A	2-	CH ₃	2.40	s	20.5
	2	C			170.2
	3	CH	6.08	s	107.7
	4	C			185.9
	4a	C			106.3
	10a	C			154.6
B	10	CH	7.12	s	102.6
	5	C			163.2
	5a	C			110.5
	9a	C			142.9
	6	C			161.8
	7	CH	6.47	d, 2.3	98.6
C	8	C			163.4
	9	CH	6.77	d, 2.3	99.0
	6-	OCH ₃	3.93	s	56.4
	8-	OCH ₃	3.92	s	56.0



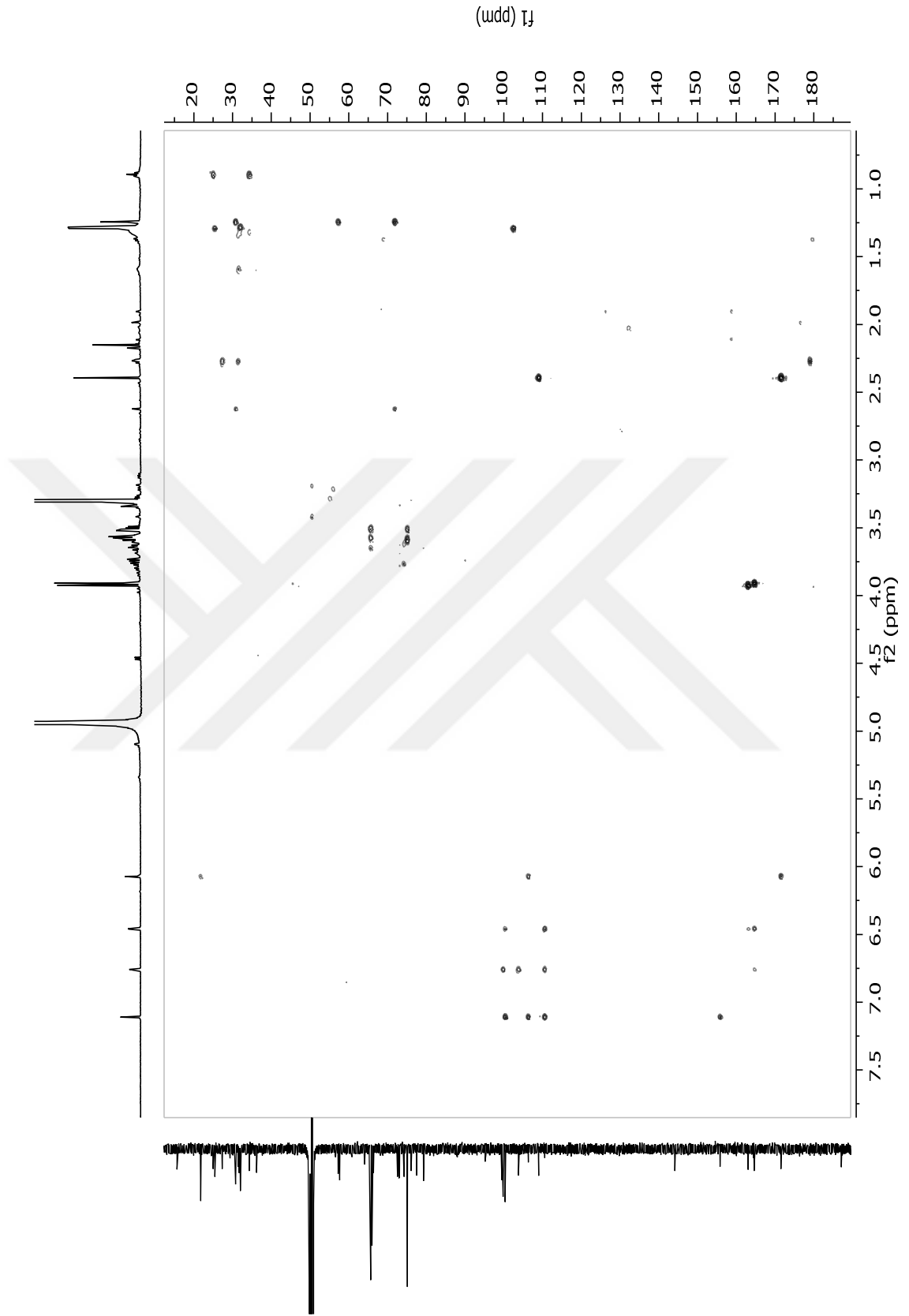
Şekil 3.37. Rubrofusarin B bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H -NMR spektrumu



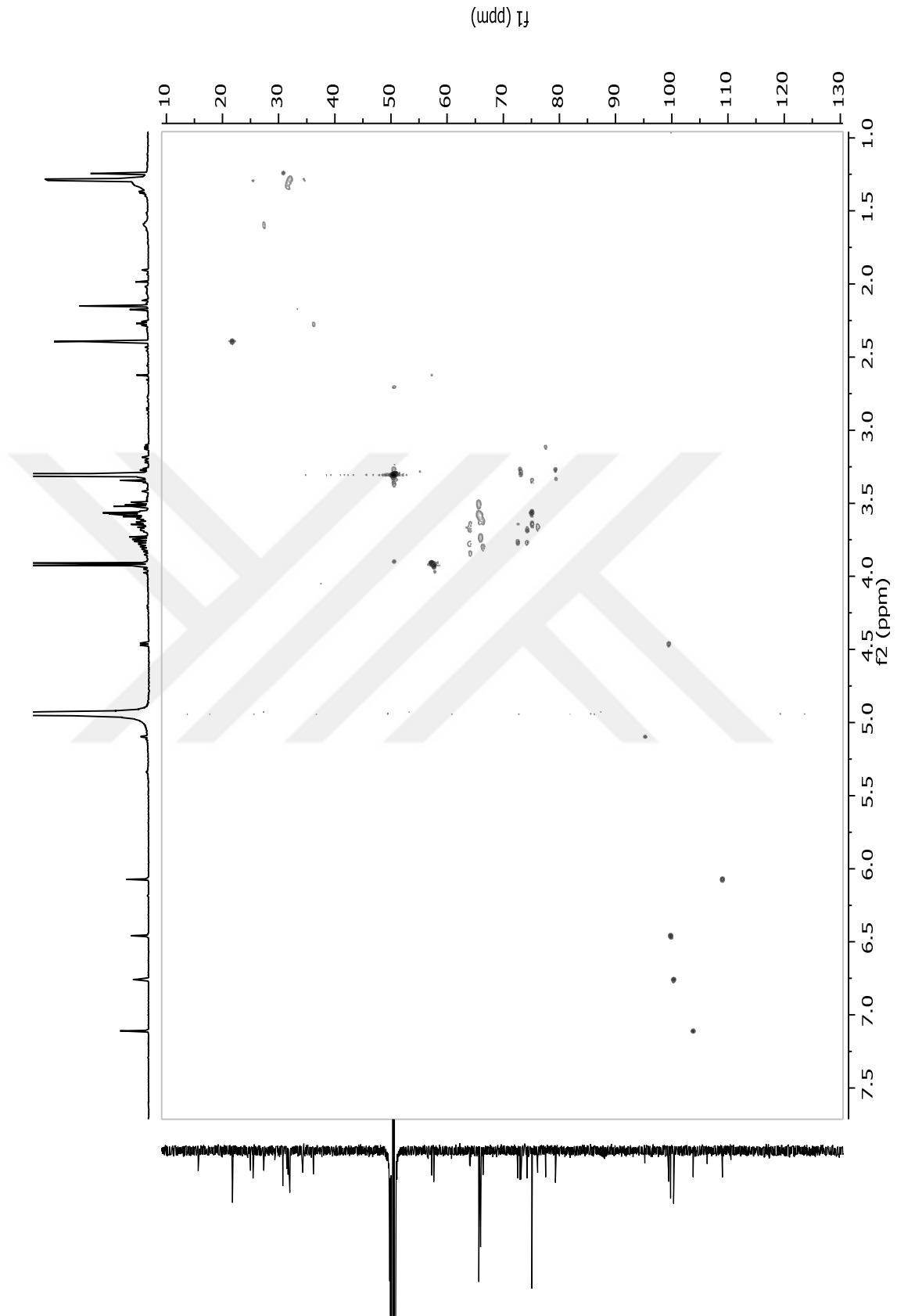
Şekil 3.38. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH-*d*₄'deki ¹³C-NMR spektrumu



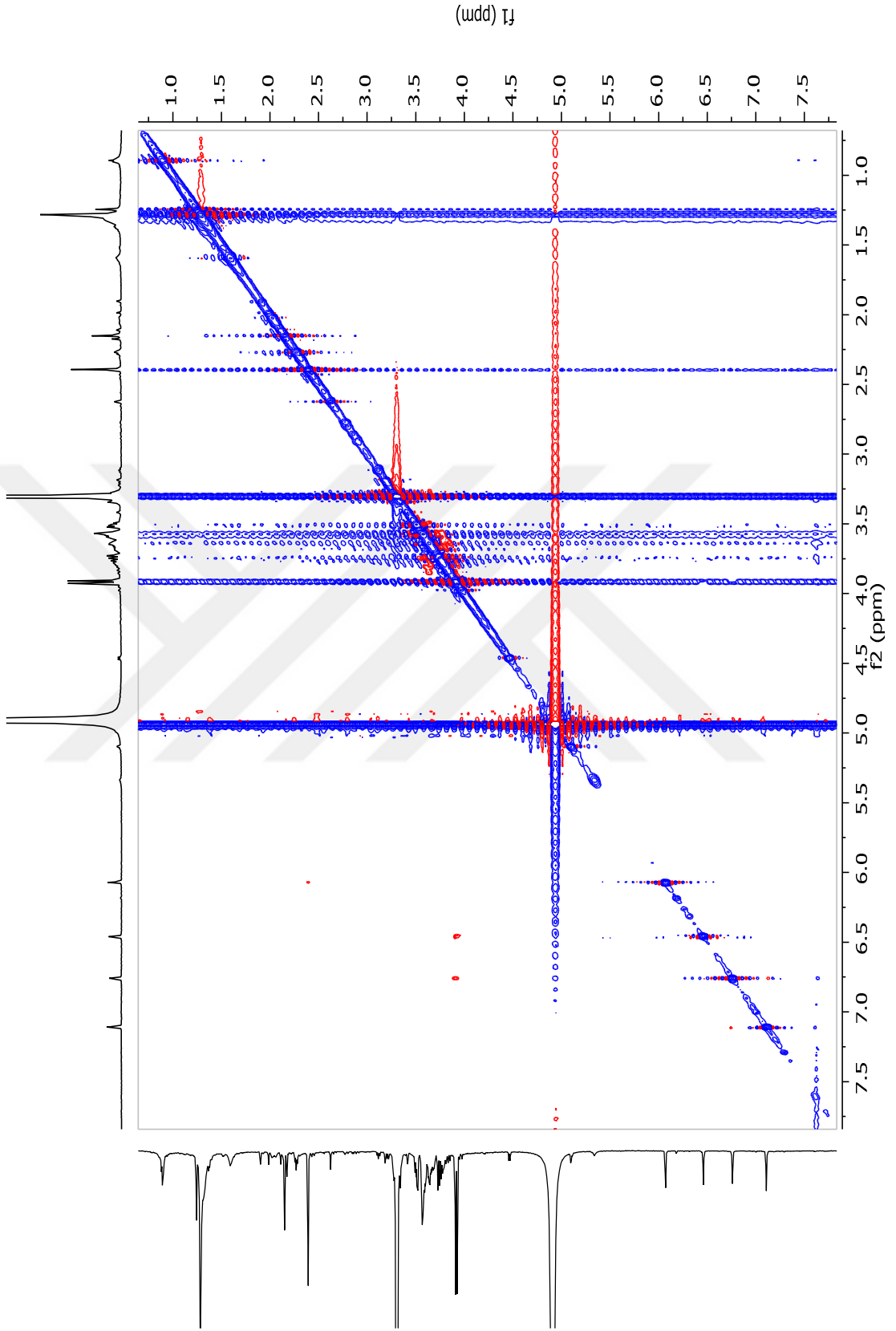
Şekil 3.39. Rubrofusarin B bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.40. Rubrofusarin B bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki gHMBC spektrumu



Şekil 3.41. Rubrofusarin B bileşiğinin MeOH-*d*₄'deki gHMQC spektrumu

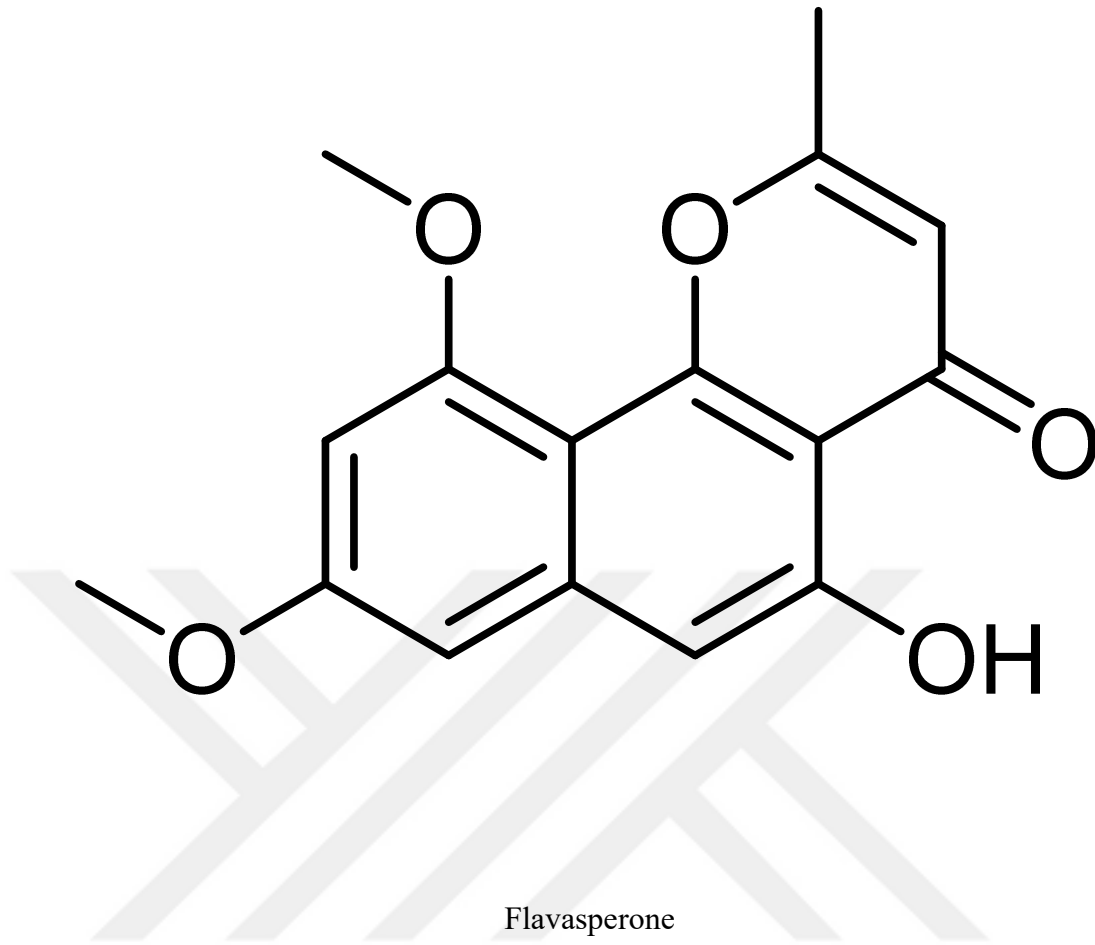


Şekil 3.42. Rubrofusarin B bileşiminin MeOH-*d*₄'deki ROESY spektrumu

3.3.2 Madde 2 Teşhis Bulguları

Madde 2, UV spektrumu 244, 283 nm'de üç absorpsiyon maksimumunu (λ_{max}) ortaya çıkaran koyu kahverengi amorf yapılı olarak izole edilmiştir. Madde 2'nin ^1H -NMR spektral verileri, δH 6.86 ve δH 6.35 ppm'de iki adet singlet proton ile birlikte 2.2 Hz bir eşleşme sabiti (J değeri) ile δH 6.72 ve δH 6.50'de iki adet meta-bağlı proton olarak tanınan dört adet farklı aromatik protonun varlığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, üç adet singlet metil piki fark edilmiştir ve δH 2.52 ppm'de bir adet aromatik metil grubuna ek olarak δH 3.98 ve δH 3.91'de iki adet oksijenlenmiş metile farklılaşmıştır. Elde edilen sonuçlar, daha önce raporlanan literatürle karşılaştırıldığında, Madde 2'nin başka bir γ -naftopiron türevi olduğu öne sürülmüştür. Madde 2'nin ^{13}C -NMR spektral verileri, Madde 2'nin γ -naftopiron türevi olması için öne sürülen benzerliğini doğrulamıştır. HMBC, HMQC ve ROESY dahil olmak üzere Madde 2'nin 2D NMR spektrumlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi, Madde 2'nin yapısının Flavasperone olduğunu açık bir şekilde doğrulamıştır, bu bileşik ilk olarak topraktan elde edilen *Aspergillus niger* mantarından bildirilmiştir (Sakurai ve ark., 2002).

Flavasperone bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.43'te, ^1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.6'da, ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.44'te, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.45'te, ^1H - ^1H COSY spektrumu Şekil 3.46'da, gHMBC spektrumu Şekil 3.47'de, gHMQC spektrumu Şekil 3.48'de, ROESY spektrumu Şekil 3.49'da verilmiştir.



Kimyasal Formül: $C_{16}H_{14}O_5$

Nihai Kütle: 286.08

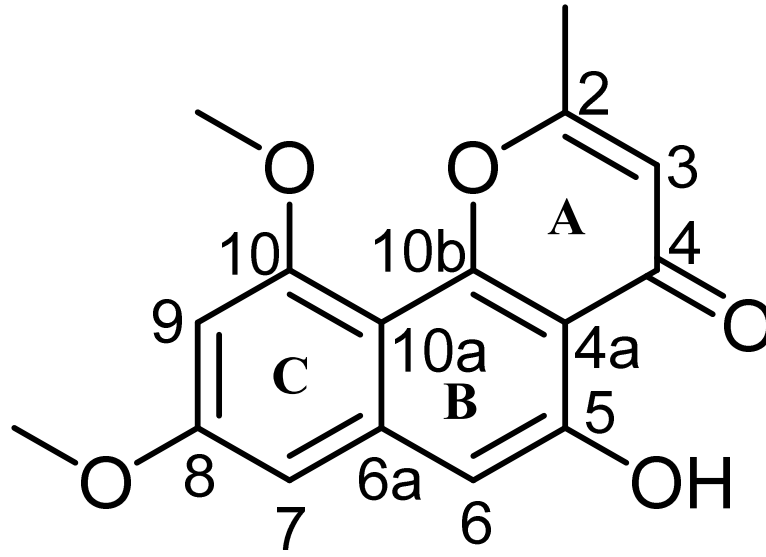
Moleküler Ağırlık: 286.28

m/z: 286.08 (100.0%), 287.09 (17.7%), 288.09 (2.5%)

Elementel Analiz: C, 67.13; H, 4.93; O, 27.94

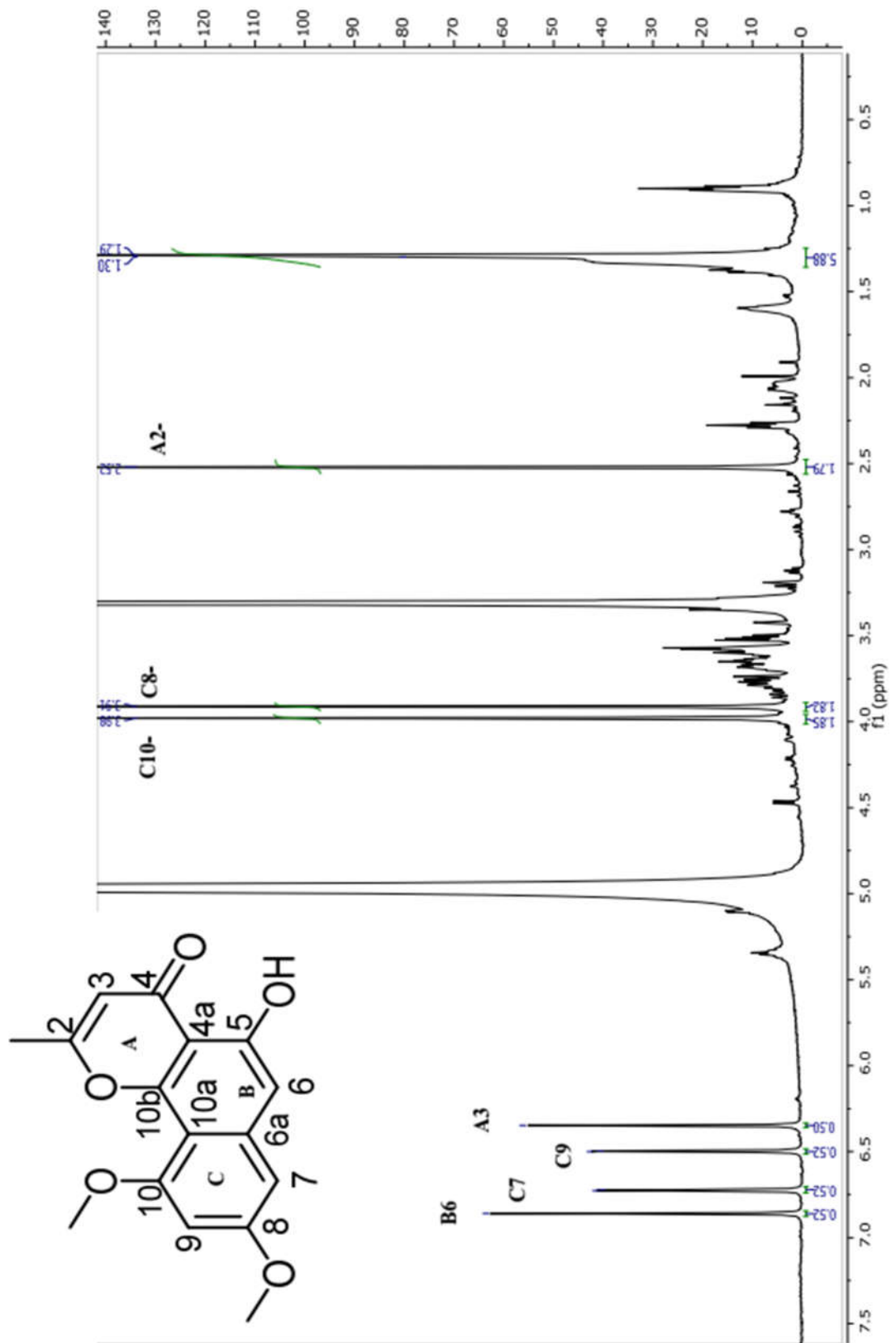
5-hidroksi-8,10-dimetoksi-2-metil-4H-benzo[h]kromen-4-on

Şekil 3.43. Flavasperone bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

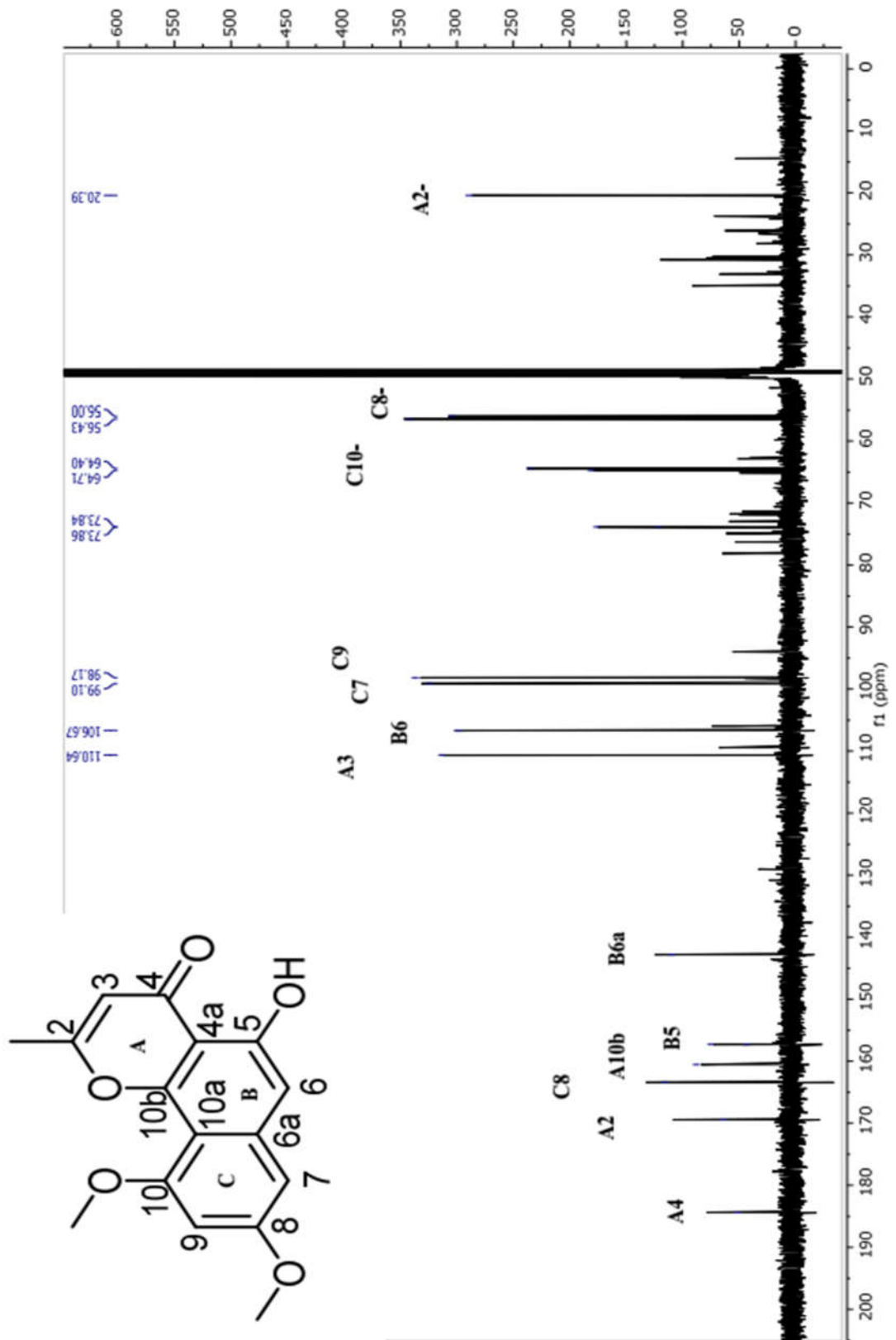


Çizelge 3.6. Flavasperone bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

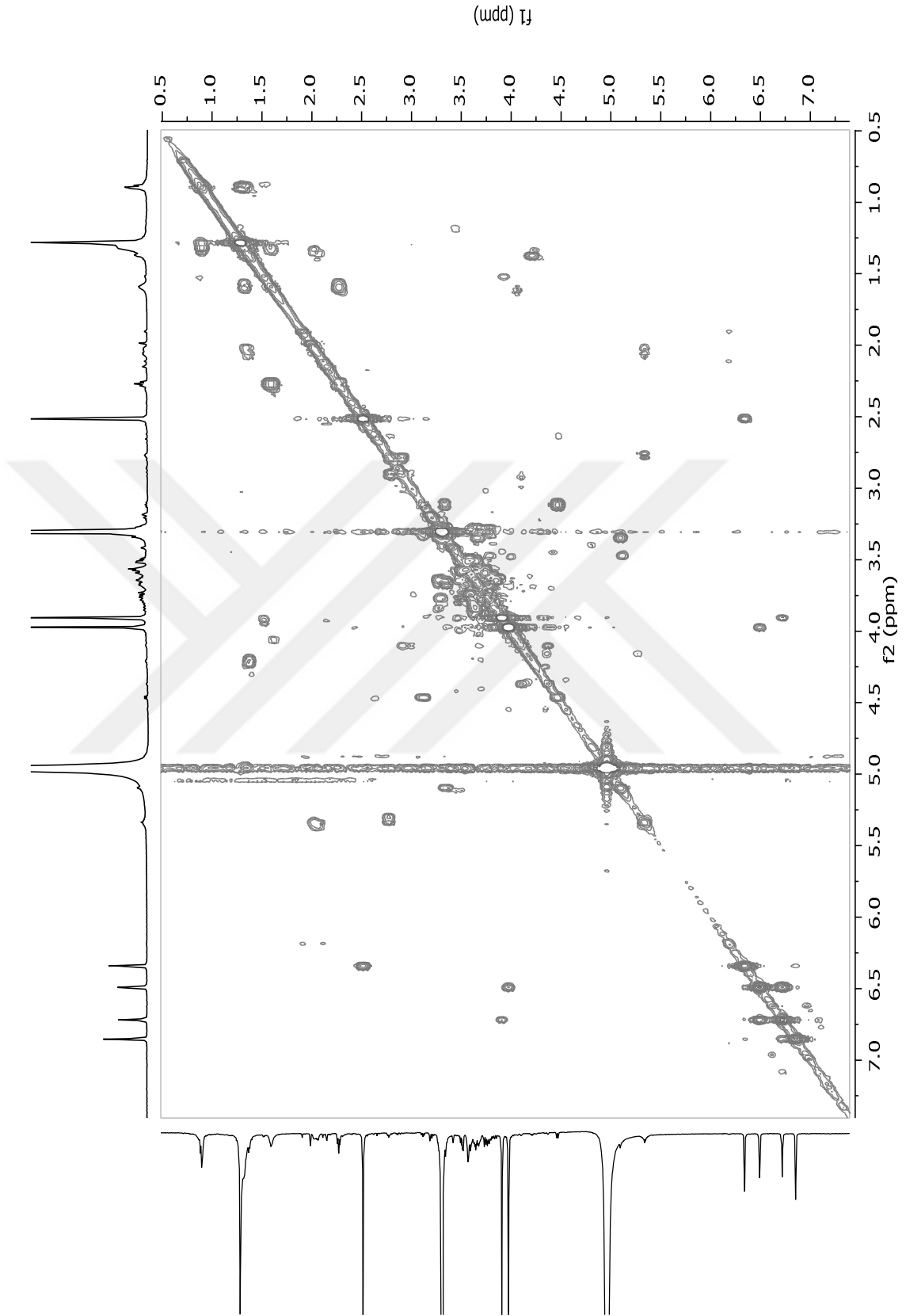
Flavasperone, MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	<i>J</i> , Hz	^{13}C , ppm
A	2-	CH ₃	2.52	s	20.4
	2	C			169.4
	3	CH	6.35	s	110.6
	4	C			184.4
	4a/12	C			109.4
	10b/11	C			157.3
B	10a/14	C			106.9
	5	C			157.3
	6	CH	6.86	s	106.7
	6a/13	C			142.8
C	7	CH	6.72	d, 2.2	99.1
	8	C			163.4
	9	CH	6.50	d, 2.2	98.2
	8-	OCH ₃	3.91	s	56.0
	10-	OCH ₃	3.98	s	56.4



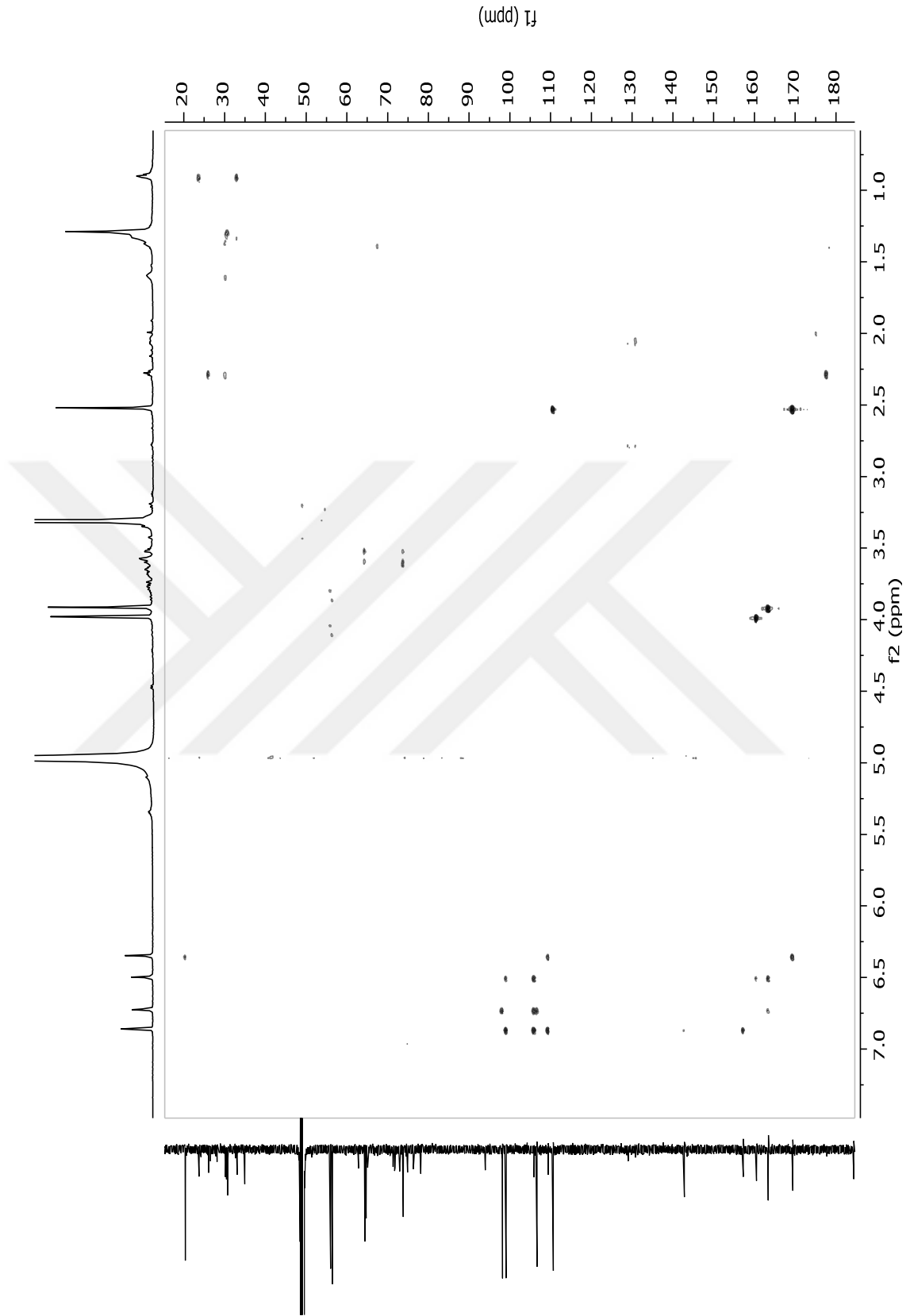
Şekil 3.44. Flavasperone bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H -NMR spektrumu



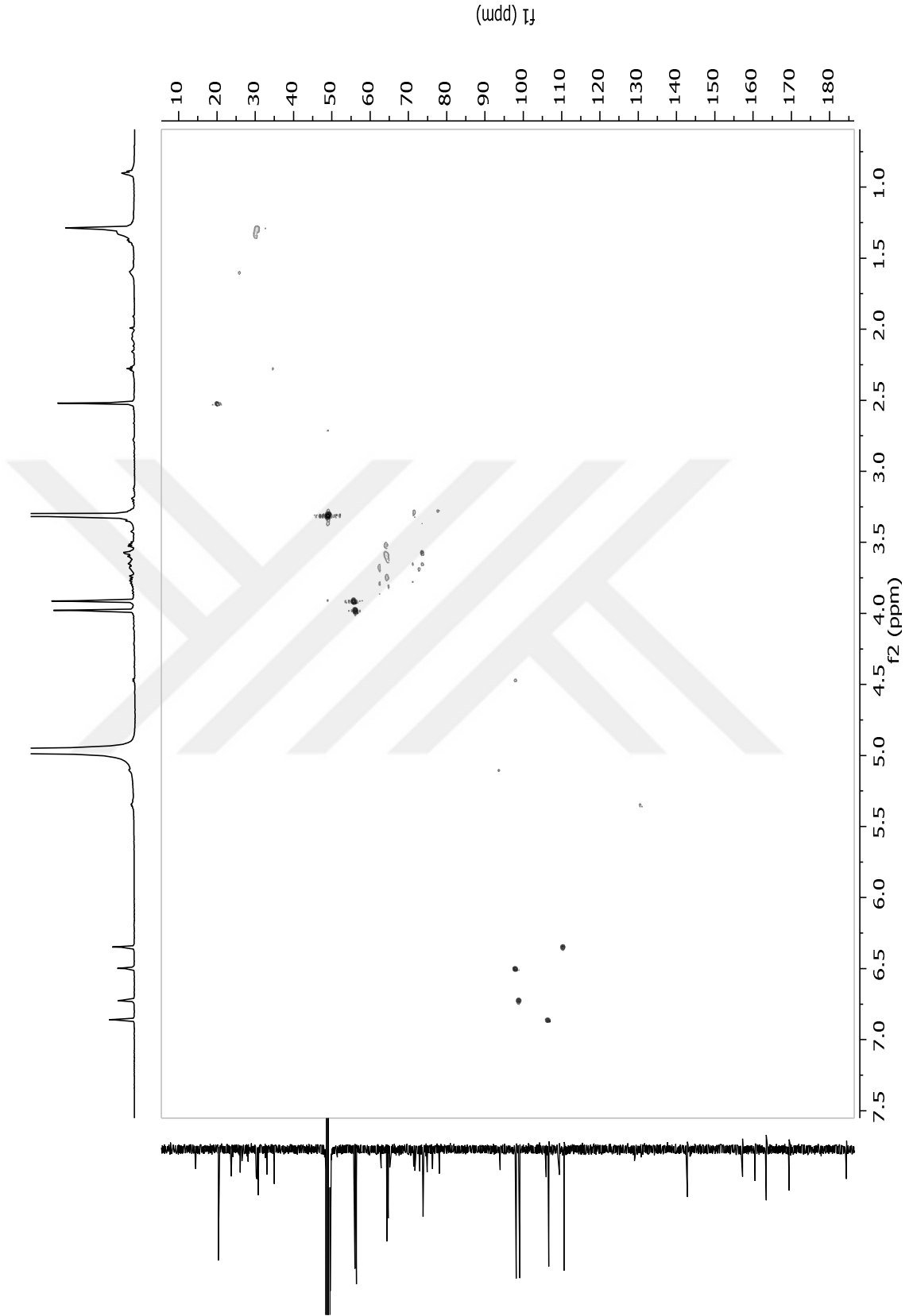
Şekil 3.45. Flavasperone bileşiğinin MeOH-*d*₄'deki ¹³C-NMR spektrumu



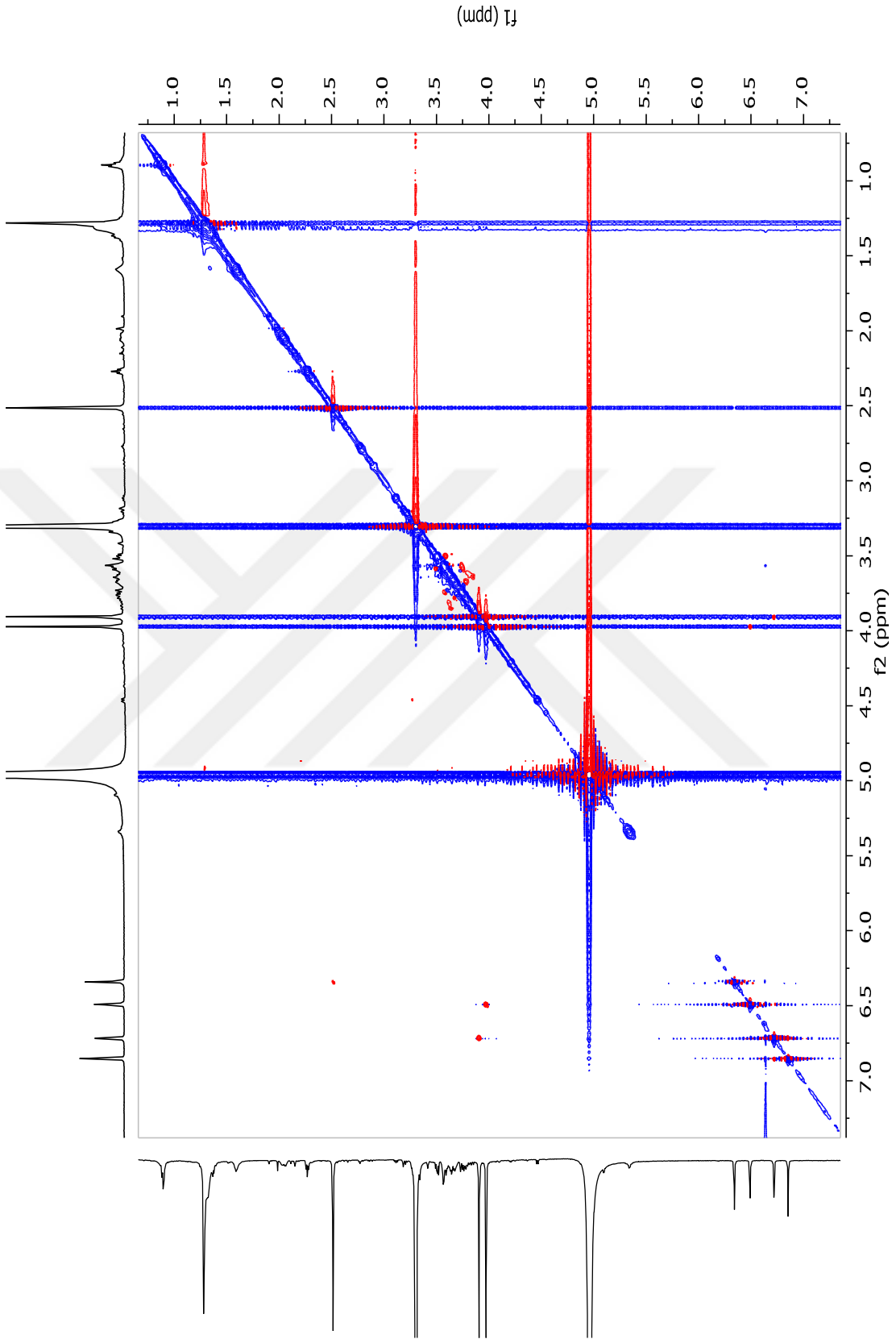
Şekil 3.46. Flavasperone bileşiğinin MeOH-d_4 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.47. Flavasperone bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki gHMBC spektrumu



Şekil 3.48. Flavasperone bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki gHMPC spektrumu

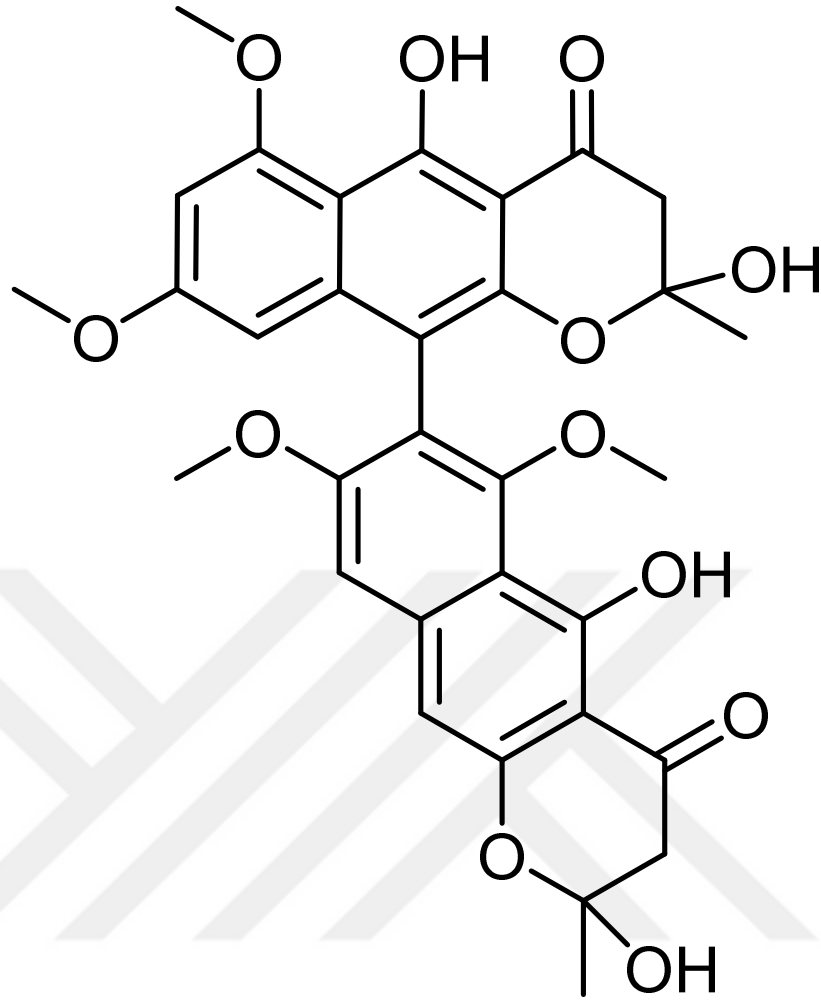


Şekil 3.49. Flavasperone bileşiğinin MeOH- d_4 'deki ROESY spektrumu

3.3.3 Madde 3 Teşhis Bulguları

Madde 3, turuncu katı amorf yapılı olarak saflaştırılmıştır. Madde 3'ün UV spektrumu 233, 280 nm'de üç absorpsiyon piki (λ_{max}) ortaya çıkarmıştır. Madde 3'ün 1H ve ^{13}C NMR spektral verileri, bir dimerik bileşiğin açık bir modelini göstermiştir. 1H - 1H COSY, HMBC, HMQC ve NOESY spektrumları dahil olmak üzere Madde 3 için 2D NMR spektrumlarının dikkatli bir şekilde araştırılmasıyla, Madde 3'ün fonsecin B'nin iki adet benzer monomerinden oluşan bir dimerik γ -naftopiron türevi olduğu açık bir şekilde belirlenmiştir (Sakurai ve ark., 2002). Dimerik γ -naftopiron türevleri için literatürde bildirilen ile Madde 3'ün elde edilen spektral verilerinin karşılaştırılmasıyla, Madde 3'ün daha önce *Aspergillus* cinsinin farklı mantar türlerinden bildirilen Aurasperone B olduğu doğrulanmıştır (Priestap, 1984; Shaaban ve ark., 2012; Siriwardane ve ark., 2015).

Aurasperone B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.50'de, 1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.7'de, 1H -NMR spektrumu Şekil 3.51'de, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.52'de, 1H - 1H COSY spektrumu Şekil 3.53'te, gHMBC spektrumu Şekil 3.54'te, gHMQC spektrumu Şekil 3.55'te, NOESY spektrumu Şekil 3.56'da verilmiştir.



Aurasperone B

Kimyasal Formül: $C_{32}H_{30}O_{12}$

Nihai Kütle: 606.17

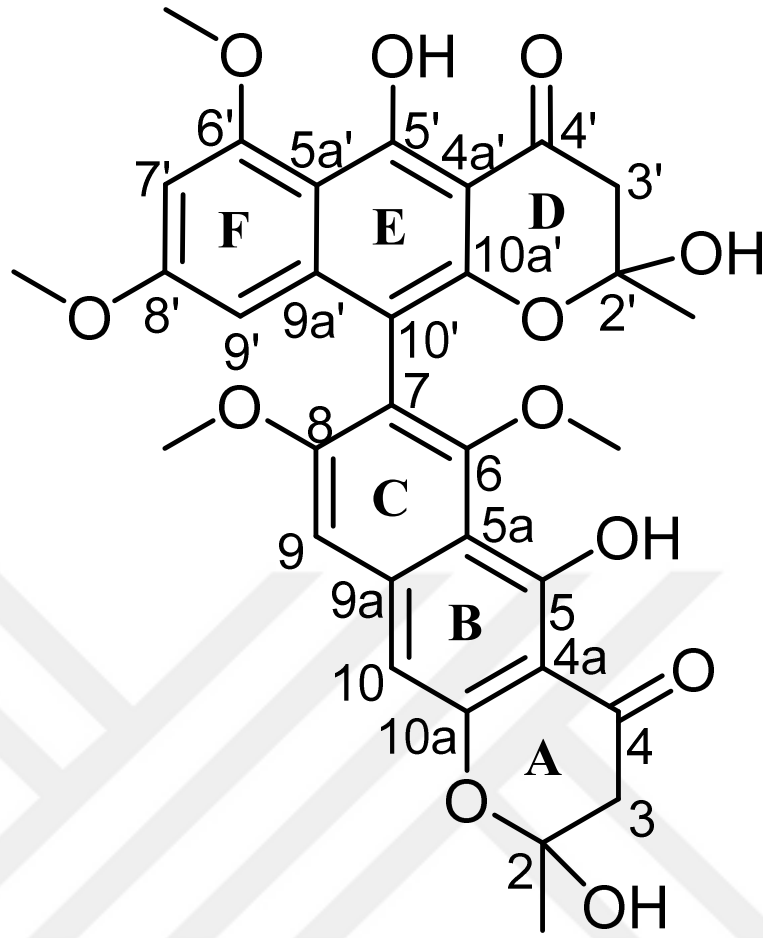
Moleküler Ağırlık: 606.58

m/z: 606.17 (100.0%), 607.18 (35.4%), 608.18 (8.5%), 609.18 (1.5%)

Elementel Analiz: C, 63.36; H, 4.99; O, 31.65

2,2',5,5'-tetrahidroksi-6,6',8,8'-tetrametoksi-2,2'-dimetil-2,2',3,3'-tetrahidro-4H,4'H-[7,10'-bibenzo[g]kromen]-4,4'-dion

Şekil 3.50. Aurasperone B bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

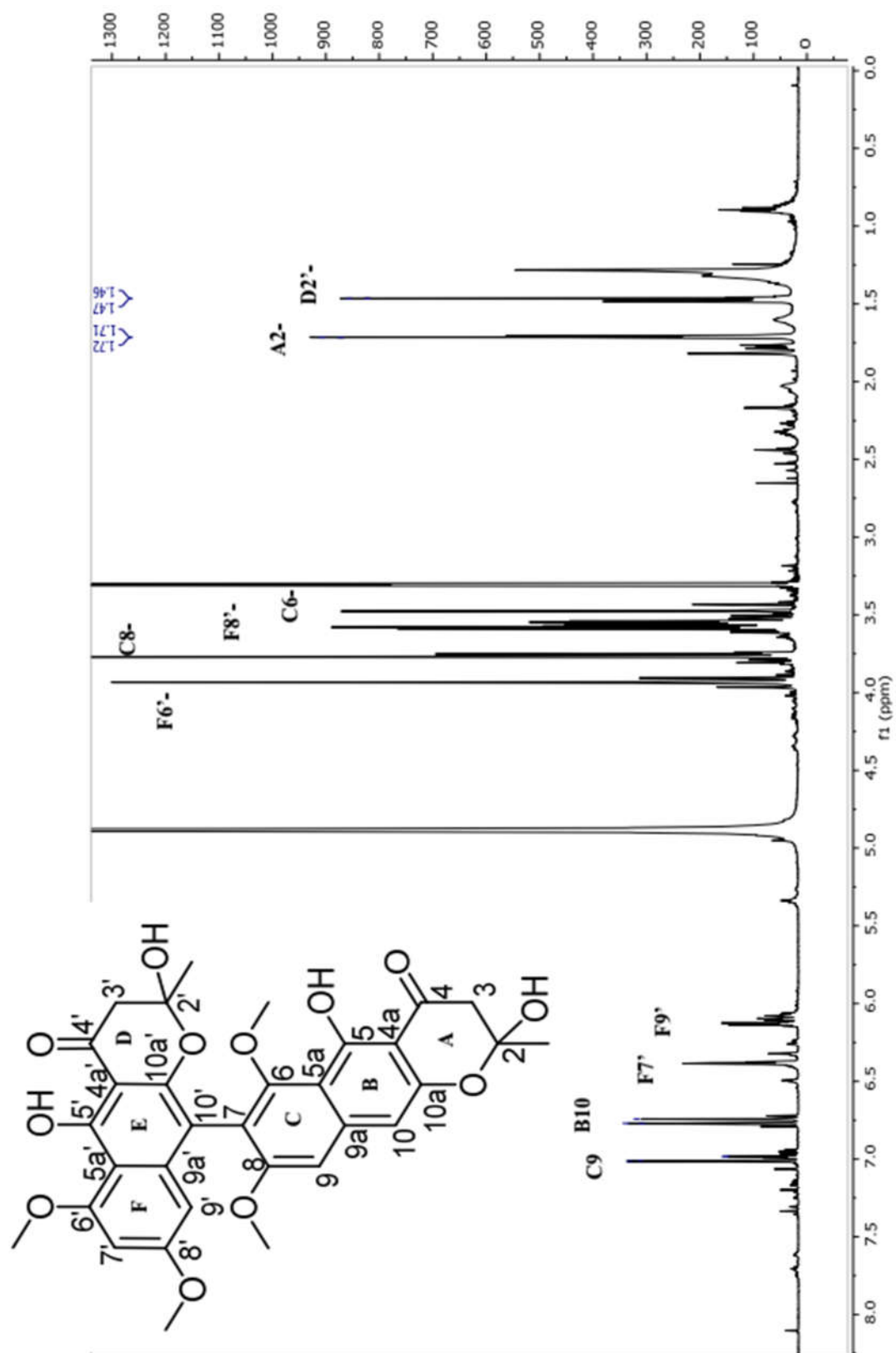


Çizelge 3.7. Aurasperone B bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

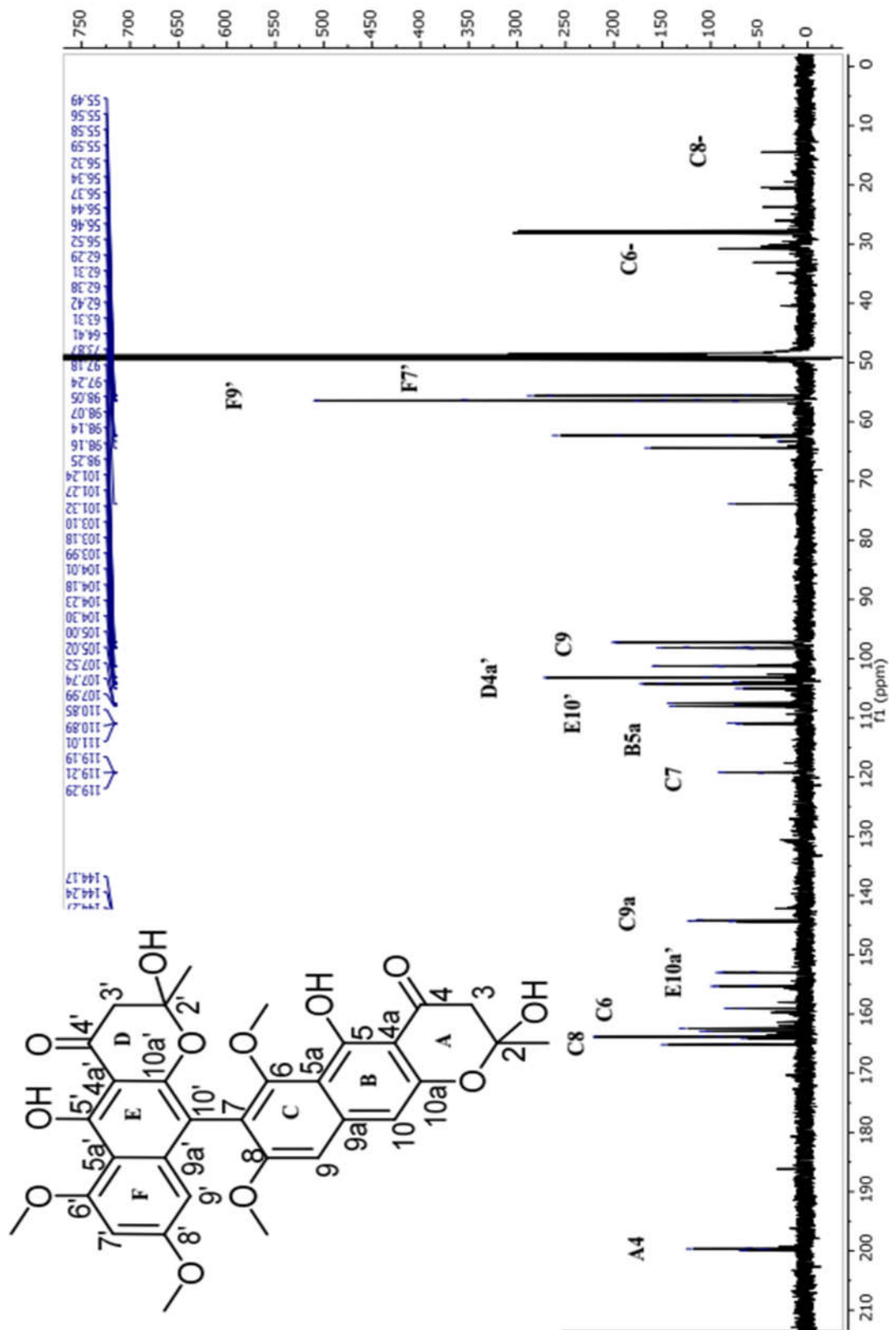
Aurasperone B, MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	J , Hz	^{13}C , ppm
Ünite I					
A	2-	CH_3	1.72	d, 1.0	27.8
	2	C			102.4
	3	CH_2	3.12	m	49.4
			2.84	m	
B	4	C			201.1
	4a	C			106.0
	10a	C			156.6
	5	C			156.6
C	10	CH	6.78	d, 1.0	103.8
	5a	C			112.0
	9a	C			145.3
	6	C			160.3
	7	C			120.4
	8	C			163.6

Çizelge 3.7. Devam

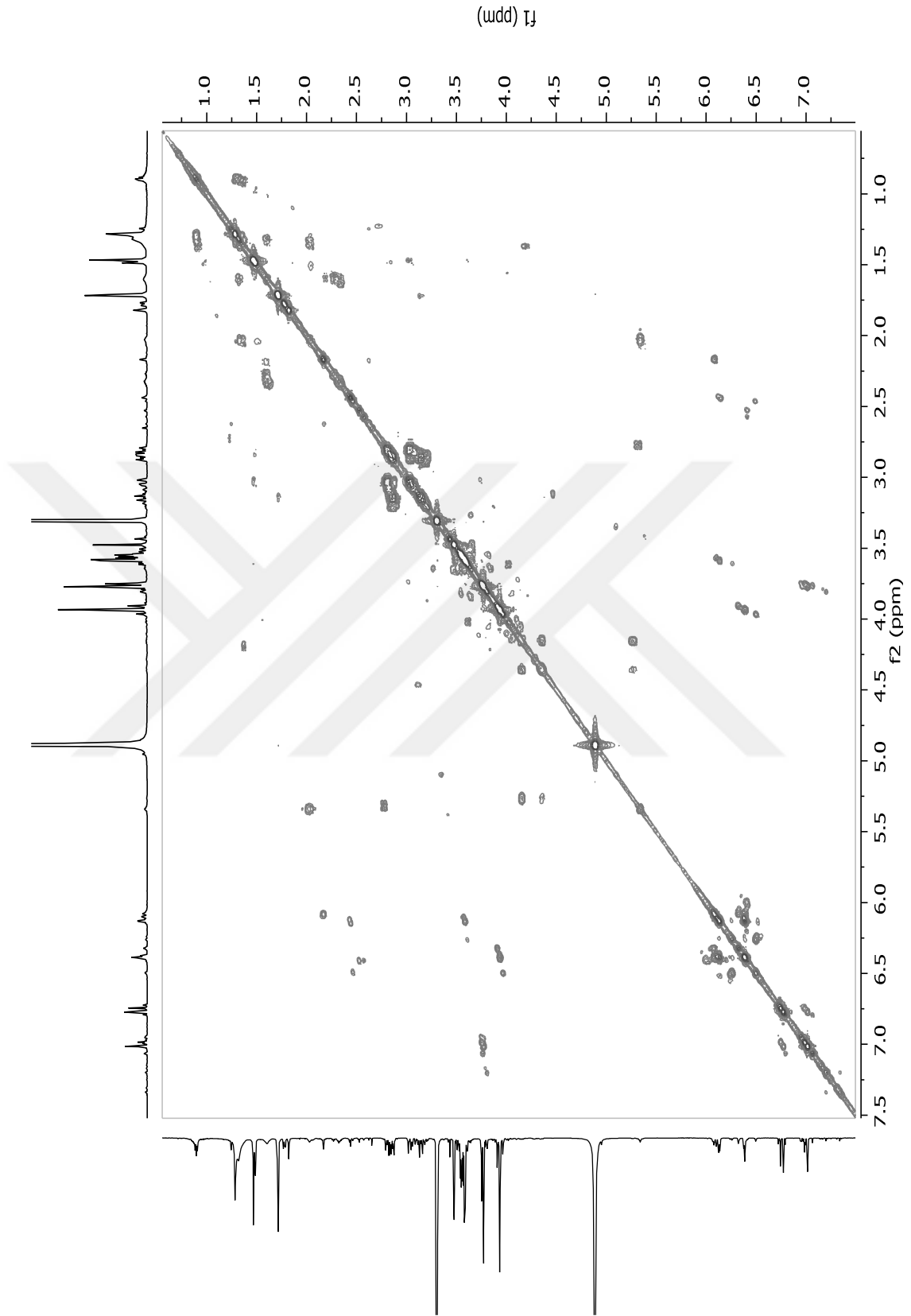
	9	CH	7.02	d, 1.0	102.8
	6-	OCH ₃	3.48	s	62.0
	8-	OCH ₃	3.78	s	56.0
Ünite II					
D	2'-	CH ₃	1.47	d, 1.0	27.5
	2'	C			102.5
	3'	CH ₂	3.12	m	49.5
			2.84	m	
	4'	C			200.8
E	4a'	C			106.2
	10a'	C			152.3
	5'	C			163.4
	10'	C			108.2
	5a'	C			110.5
F	9a'	C			140.3
	6'	C			164.1
	7'	CH	6.38	d, 2.5	96.9
	8'	C			165.0
	9'	CH	6.13	d, 2.5	97.8
	6'-	OCH ₃	3.94	s	56.2
	8'-	OCH ₃	3.58	s	55.2



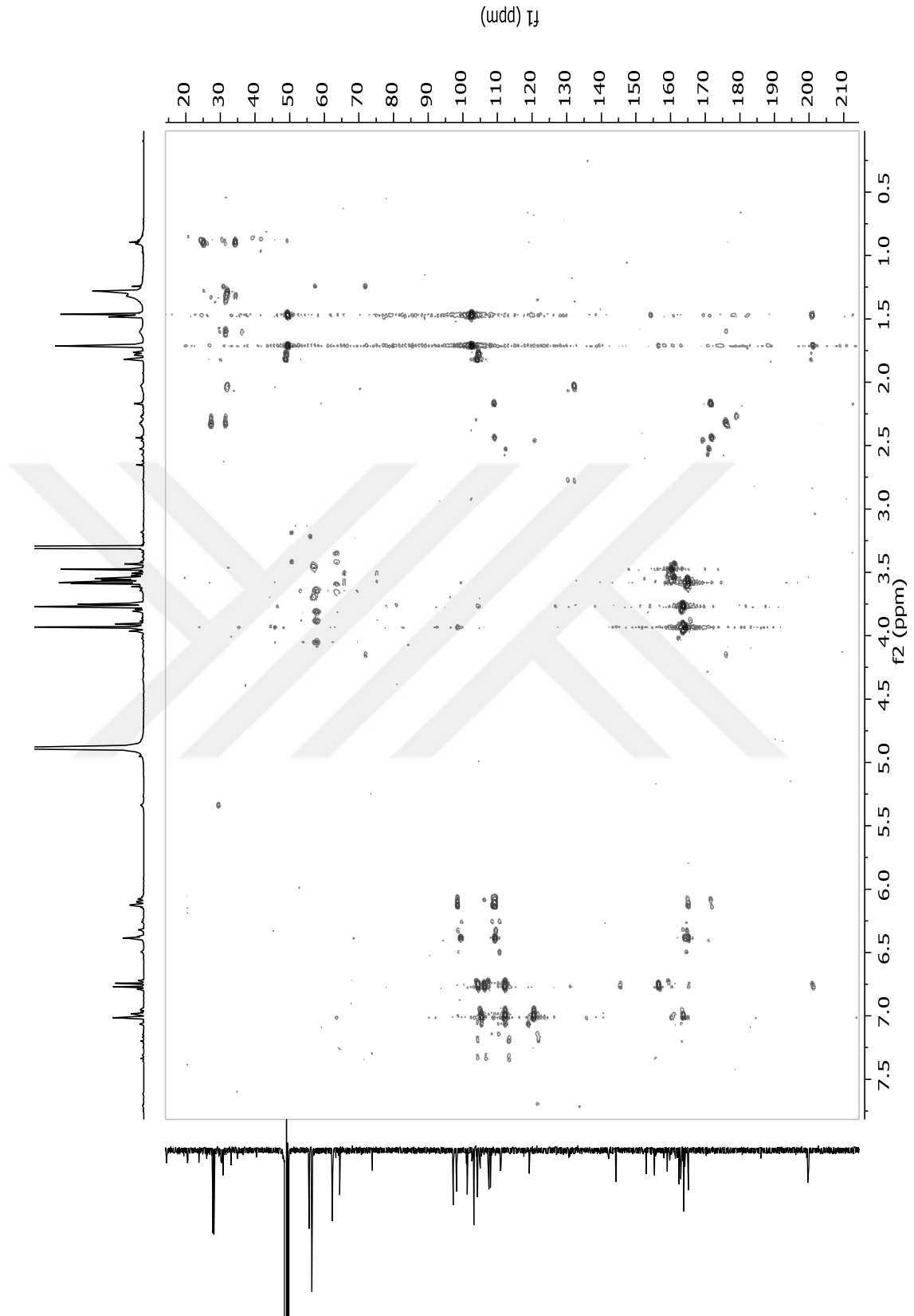
Şekil 3.51. Aurasperone B bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'teki ^1H -NMR spektrumu



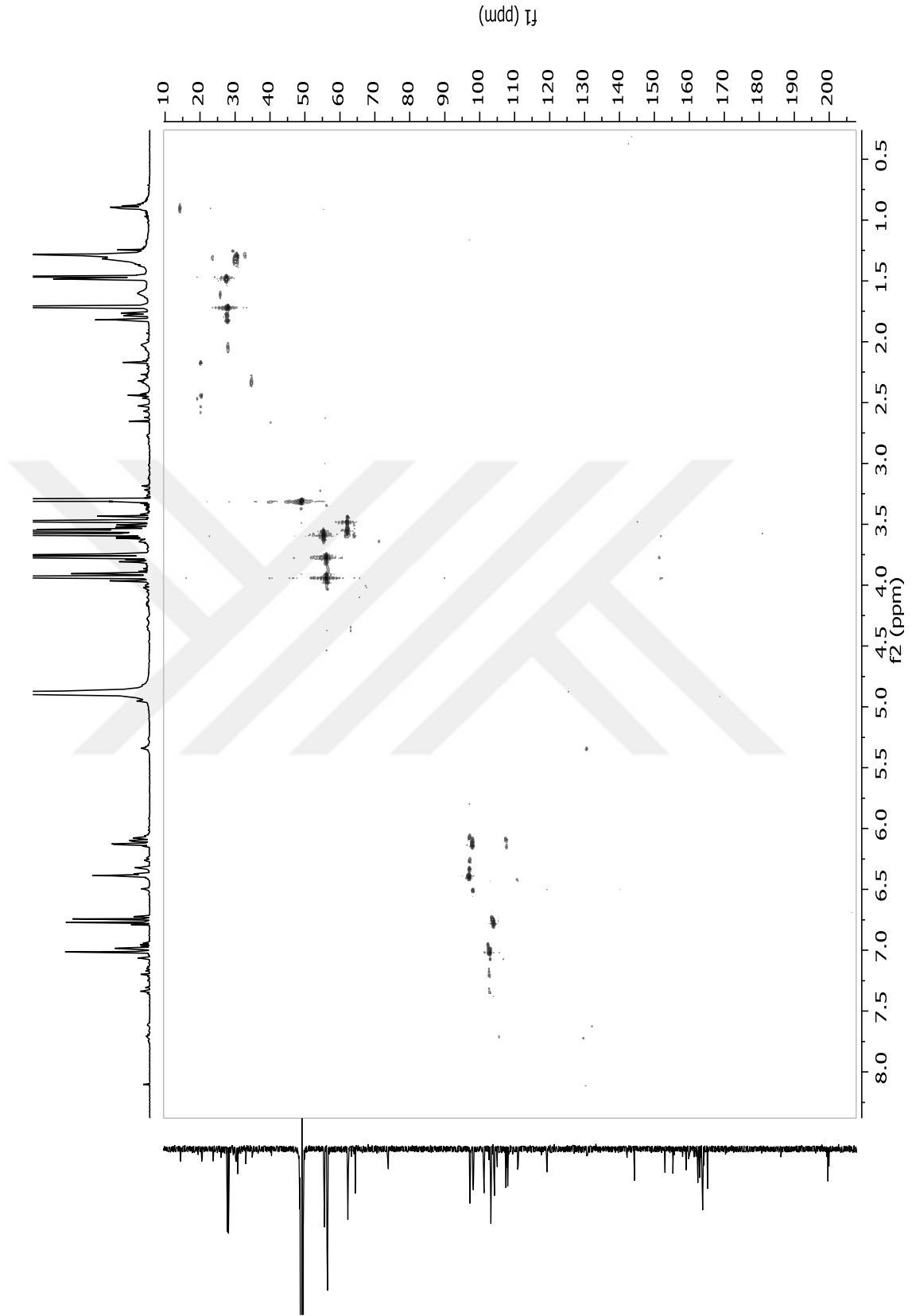
Şekil 3.52. Aurasperone B bileşiğinin MeOH-*d*₄'deki ¹³C-NMR spektrumu



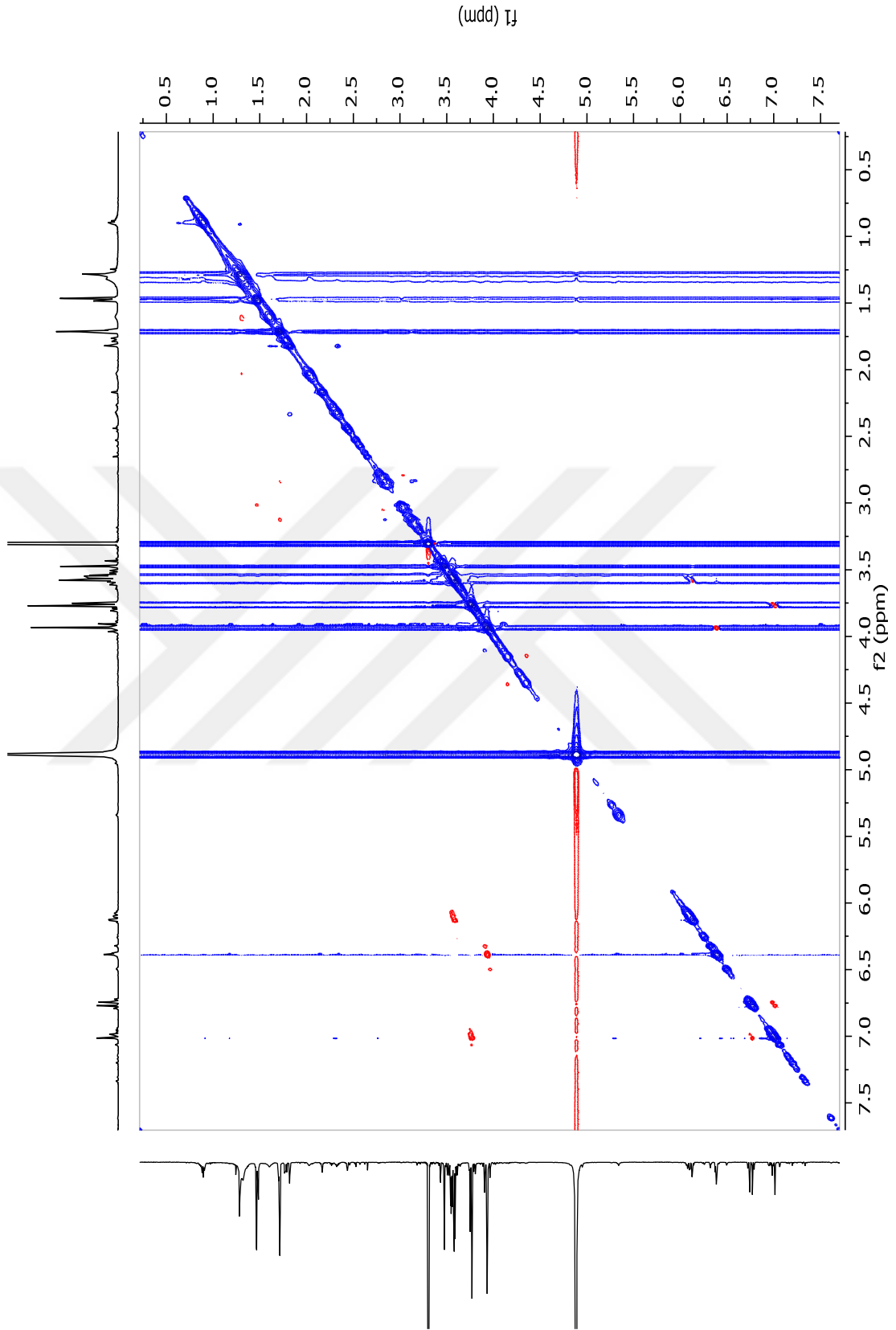
Şekil 3.53. Aurasperone B bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'teki ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.54. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- d_4 'teki gHMBC spektrumu



Şekil 3.55. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- d_4 'teki gHMPC spektrumu

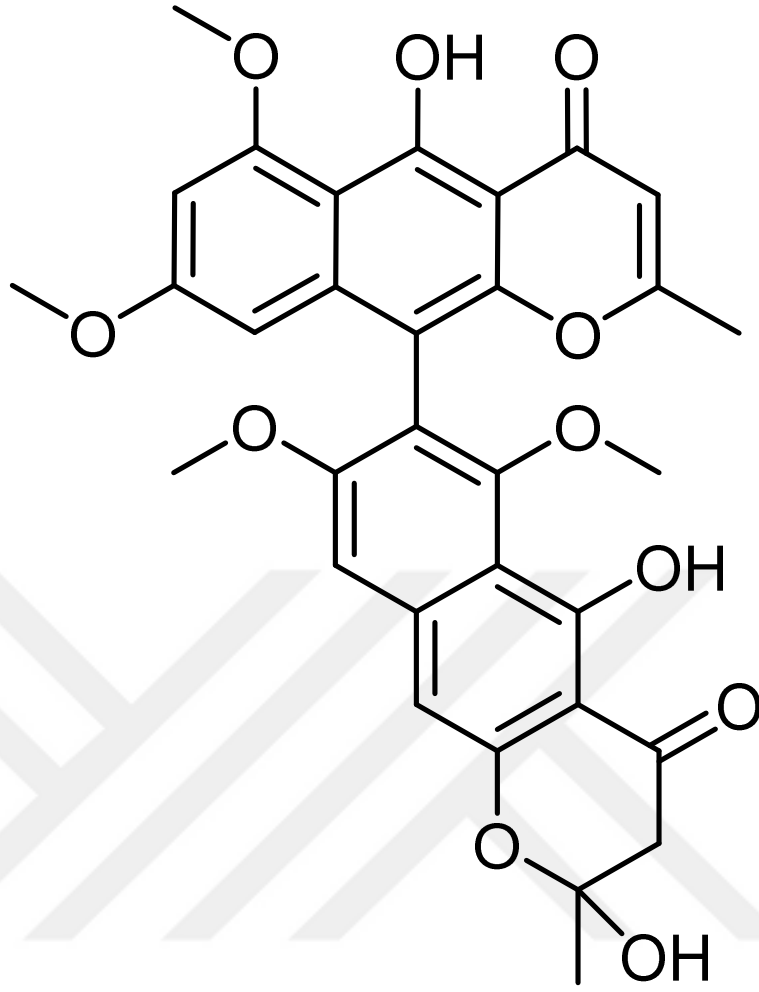


Şekil 3.56. Aurasperone B bileşiğinin MeOH- d_4 'teki NOESY spektrumu

3.3.4 Madde 4 Teşhis Bulguları

Madde 4, koyu turuncu amorf yapılı olarak izole edilmiştir. Madde 4'ün UV spektrumu 228, 278 nm'de üç adet maksimum absorpsiyon (λ_{max}) değeri ortaya çıkarmıştır. Madde 4'ün ^{13}C -NMR spektral verileri, δC 196.5 ve δC 184.6'da iki adet karbonil karbon, δC 171.6, δC 164.5, δC 163.6, δC 163.5, δC 163.4, δC 160.3, δC 156.6, δC 155.6 ve δC 152.3'te dokuz adet oksijenlenmiş aromatik karbon, δC 142.7, δC 140.7, δC 120.4, δC 112.0, δC 110.5, δC 108.6, δC 106.2 ve δC 106.0'da sekiz adet kuarterner aromatik karbon ve δC 102.4 ppm'de bir adet alifatik oksijenlenmiş kuarterner karbon dahil yirmi adet kuarterner karbona dağıtılmış 32 adet farklı karbon pikleri varlığını göstermiştir. Madde 4'ün ^1H -NMR spektral verileri, her biri bir proton için entegre edilmiş beş adet farklı aromatik proton piklerinin mevcudiyeti ortaya çıkarılmış, δH 5.98 (d, $J = 1.0$ Hz), δH 6.41 (d, $J = 2.3$ Hz) ve δH 6.21 (d, $J = 2.3$ Hz)'de üç adet dublet proton ile birlikte δH 6.84 ve δH 6.70 ppm'de iki adet singlete ayırt edilmiştir. Son iki proton, meta-eşleşme pozisyonlarında olmak için ^1H - ^1H COSY spektrumu aracılığıyla ilişkilendirilmiştir. Elde edilen sonuçların raporlanan literatürle karşılaştırılmasıyla, Madde 4'ün γ -naftopiron dimerlerinden biri olduğu öne sürülen Fonsecinone D olduğu açık bir şekilde doğrulanmıştır (Priestap, 1984; Siriwardane ve ark., 2015).

Fonsecinone D bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.57'de, ^1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.8'de, ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.58'de, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.59'da, ^1H - ^1H COSY spektrumu Şekil 3.60'da verilmiştir.



Fonsecinone D

Kimyasal Formül: $C_{32}H_{28}O_{11}$

Nihai Kütle: 588.16

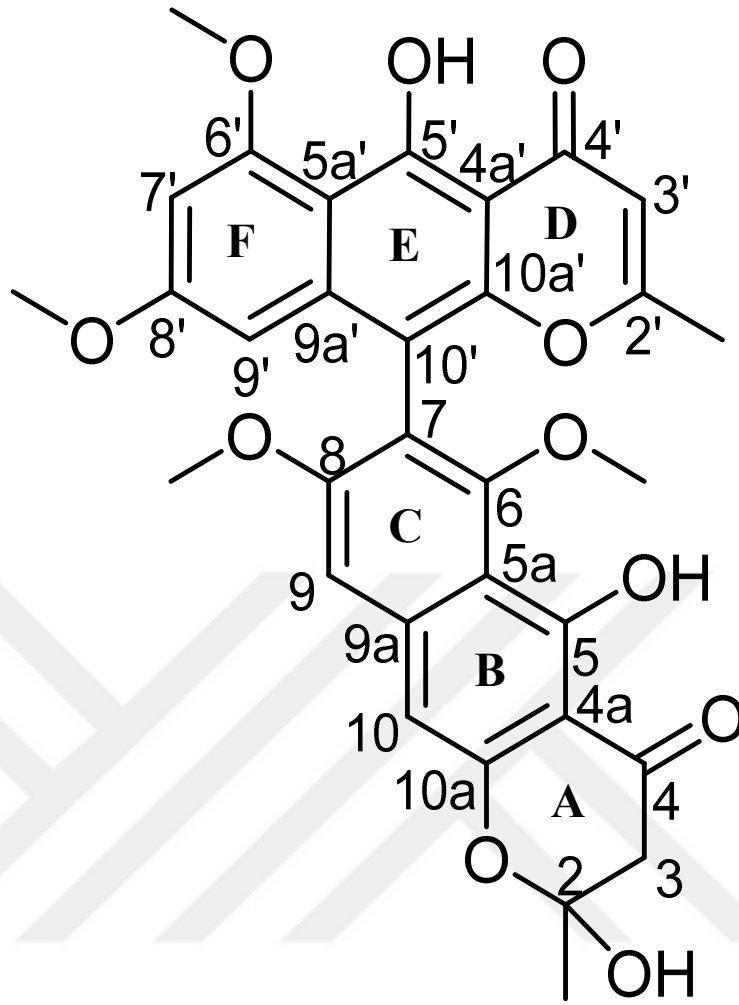
Moleküler Ağırlık: 588.57

m/z: 588.16 (100.0%), 589.17 (35.4%), 590.17 (8.3%), 591.17 (1.5%)

Elementel Analiz: C, 65.30; H, 4.80; O, 29.90

2,5,5'-trihidroksi-6,6',8,8'-tetrametoksi-2,2'-dimetil-2,3-dihidro-4H,4'H-[7,10'-
bibenzo[g]kromen]-4,4'-dion

Şekil 3.57. Fonsecinone D bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

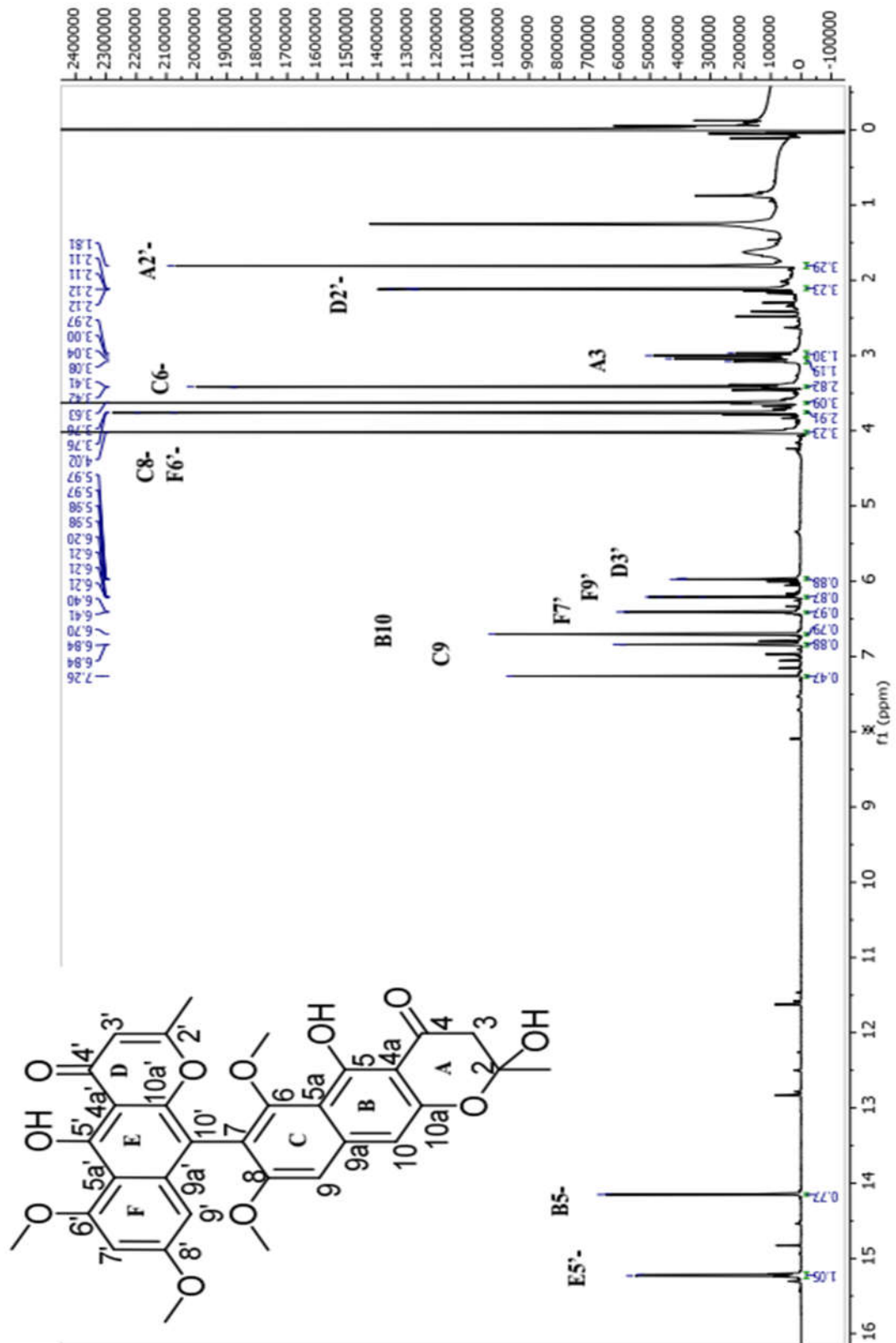


Çizelge 3.8. Fonsecinone D bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

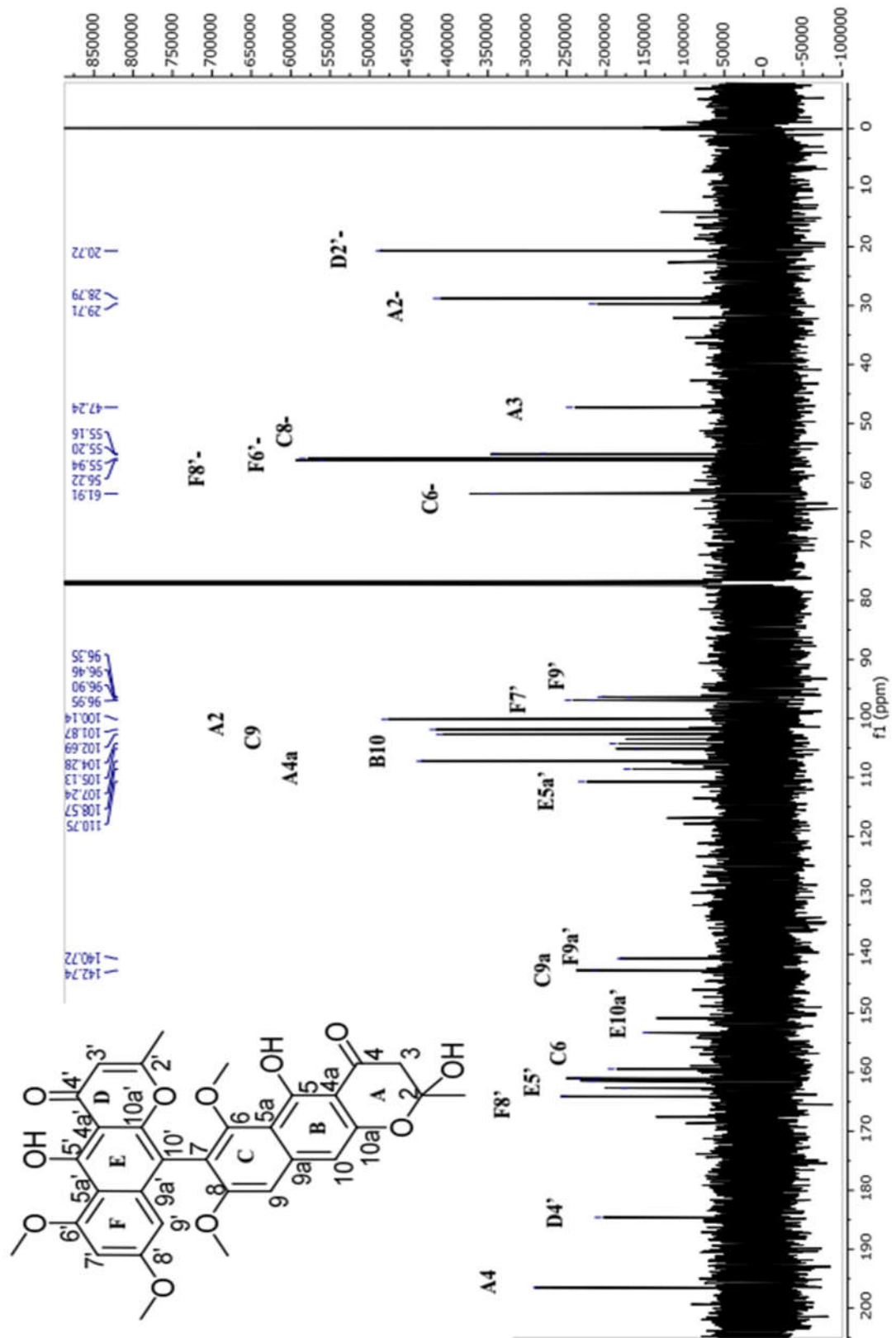
Fonsecinone D, CHCl_3-d , 400 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	J , Hz	^{13}C , ppm
Ünite I					
A	2-	CH_3	1.81	s	28.8
	2	C			102.4
	3	CH_2	2.98	d, 17.2	47.2
			3.06	d, 17.2	
B	4	C			196.5
	4a	C			106.0
	10a	C			156.6
	5	C			156.6
	5-	OH	14.15	br, s	
	10	CH	6.7	s,	103.8
	5a	C			112.0

Çizelge 3.8. Devam

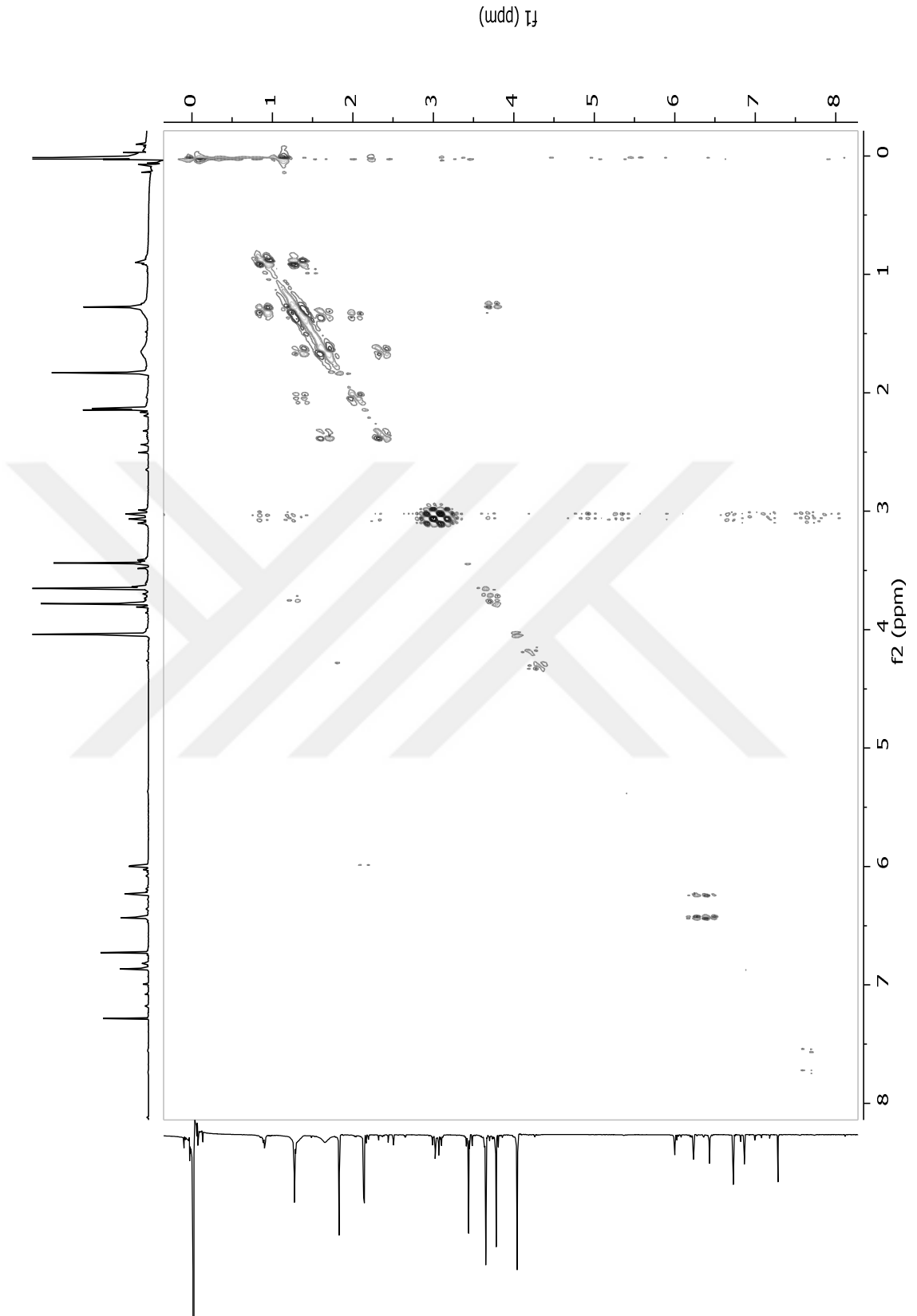
C	9a	C			142.7
	6	C			160.3
	7	C			120.4
	8	C			163.6
	9	CH	6.84	s,	102.8
	6-	OCH ₃	3.42	s	61.9
	8-	OCH ₃	3.76	s	55.9
Ünite II					
D	2'-	CH ₃	2.12	d, 1.0	20.7
	2'	C			171.6
	3'	CH	5.98	d, 1.0	107.6
	4'	C			184.6
	4a'	C			106.2
	10a'	C			152.3
E	5'	C			163.4
	5'-	OH	15.22	br, s	
	10'	C			108.6
	5a'	C			110.5
	9a'	C			140.7
	6'	C			163.5
F	7'	CH	6.41	d, 2.3	97.0
	8'	C			164.5
	9'	CH	6.21	d, 2.3	96.5
	6'-	OCH ₃	4.02	s	56.2
	8'-	OCH ₃	3.63	s	55.2



Şekil 3.58. Fonsecinone D bileşiğinin $\text{CHCl}_3\text{-}d'$ deki ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.59. Fonsecinone D bileşiğinin CHCl_3 - d 'deki ^{13}C -NMR spektrumu

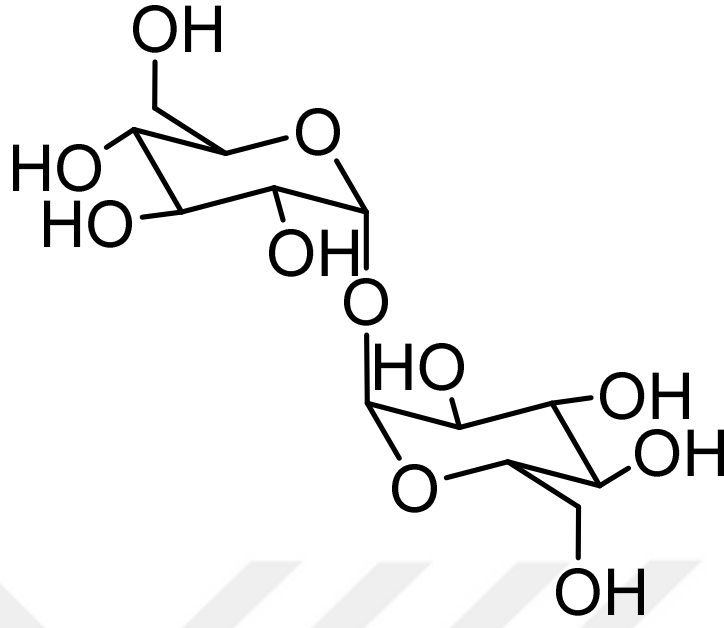


Şekil 3.60. Fonsecinone D bileşiğinin CHCl_3-d' 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu

3.3.5 Madde 5 ve Madde 6 Teşhis Bulguları

Madde 5 ve Madde 6, katı koyu sarı toz formunda ayrılmaz bir karışım olarak saflaştırılmıştır. ^1H ve ^{13}C NMR spektral verileri, simetrik fungal disakkaritlerin karakteristik bir modelini sergilemiştir. Elde edilen sonuçların, önceden izole edilmiş fungal disakkaritleri bildiren literatürle karşılaştırılması ile birlikte, ^1H - ^1H COSY, HMBC ve HMQC dahil Madde 5 ve Madde 6'nın 1D ve 2D NMR spektrumlarının dikkatli incelemesi (Roslund ve ark., 2008), bunların açık bir şekilde α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose olduklarını doğrulamıştır.

α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin kimyasal yapıları, kimyasal özellikleri ve adlandırılmaları Şekil 3.61 ve Şekil 3.62'de, ^1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da, ^1H -NMR spektrumları Şekil 3.63 ve Şekil 3.64'te, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.65 ve Şekil 3.66'da, ^1H - ^1H COSY spektrumu Şekil 3.67'de, gHMBC spektrumu Şekil 3.68'de, gHMQC spektrumu Şekil 3.69'da verilmiştir.



α,α -Trehalose

Kimyasal Formül: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Nihai Kütle: 342.12

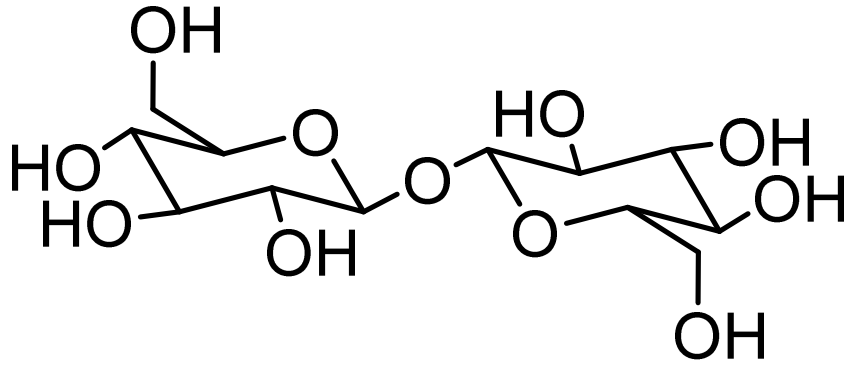
Moleküler Ağırlık: 342.30

m/z: 342.12 (100.0%), 343.12 (13.7%), 344.12 (3.1%)

Elementel Analiz: C, 42.11; H, 6.48; O, 51.41

(2S,3R,5S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol

Şekil 3.61. α,α -Trehalose bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması



β,β -Trehalose

Kimyasal Formül: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Nihai Kütle: 342.12

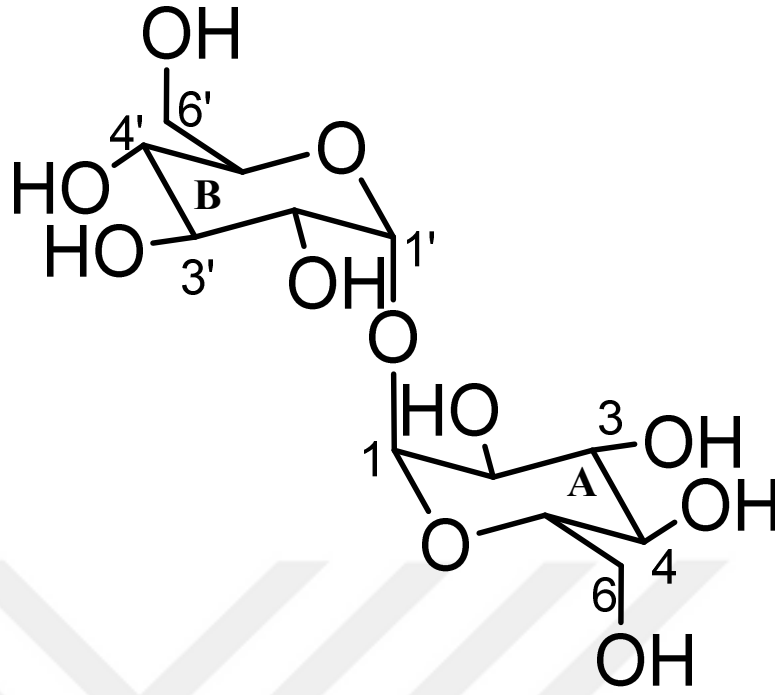
Moleküler Ağırlık: 342.30

m/z: 342.12 (100.0%), 343.12 (13.7%), 344.12 (3.1%)

Elementel Analiz: C, 42.11; H, 6.48; O, 51.41

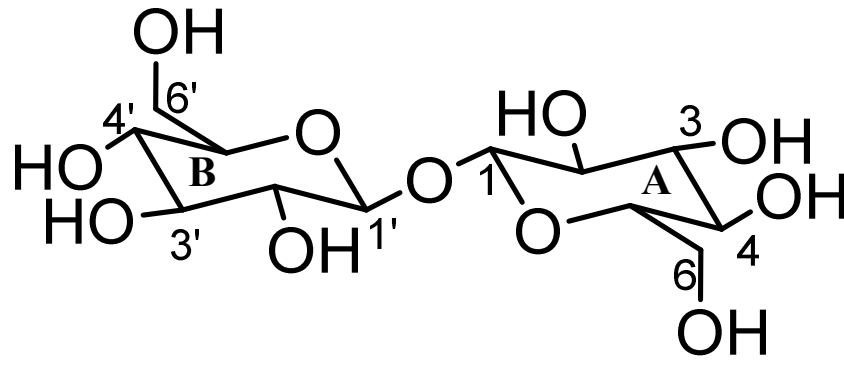
(2R,3S,5R,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(((2R,3S,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol

Şekil 3.62. β,β -Trehalose bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması



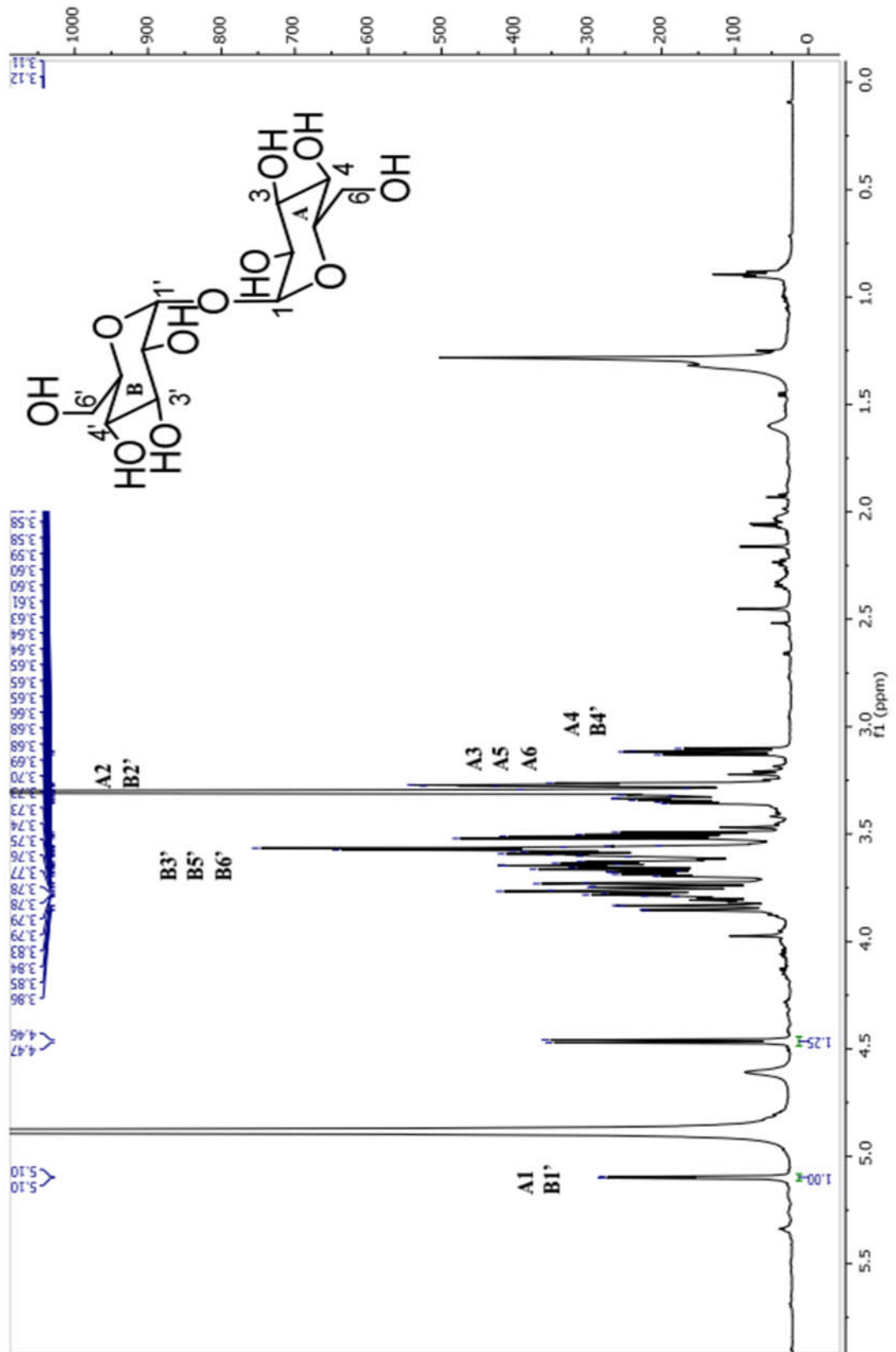
Çizelge 3.9. α,α -Trehalose bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

α,α -Trehalose,in MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz					
Halka	C/H Atom		¹ H, ppm	<i>J</i> , Hz	¹³ C, ppm
Ünite I					
A	1	CH	5.10	d, 3.7	93.93
	2	CH	3.61	m	71.87
	3	CH	3.57	m	71.98
	4	CH	3.51	d, 11.2	78.0
	5	CH	3.57	m	70.75
	6	CH ₂	3.57	m	60.60
Ünite II					
B	1'	CH	5.10	d, 3.7	156.6
	2'	CH	3.61	m	71.87
	3'	CH	3.88	m	71.98
	4'	CH	3.51	d, 6.0	78.0
	5'	CH	3.88	m	70.75
	6'	CH ₂	3.88	m	60.60

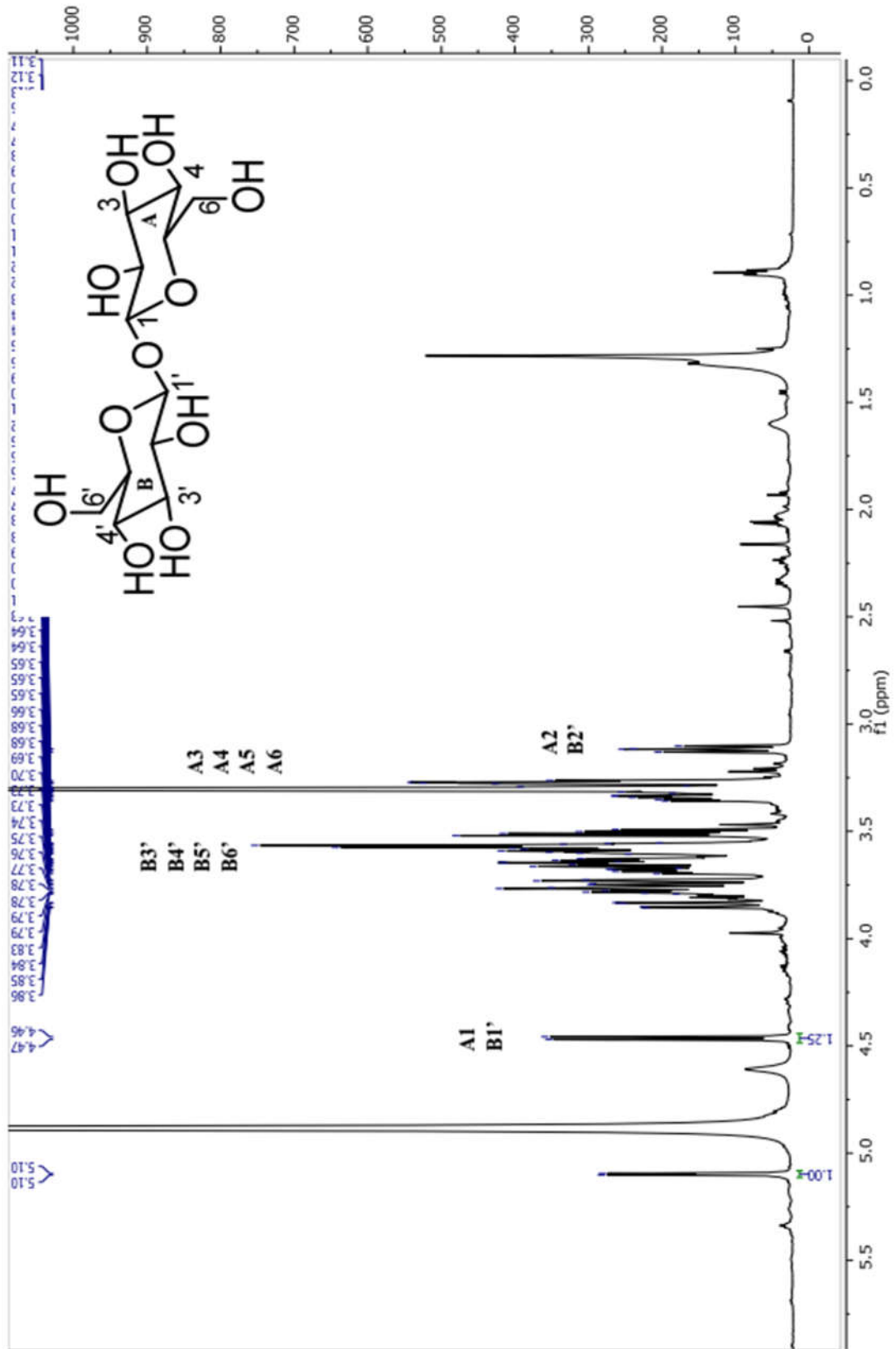


Çizelge 3.10. β,β -Trehalose bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

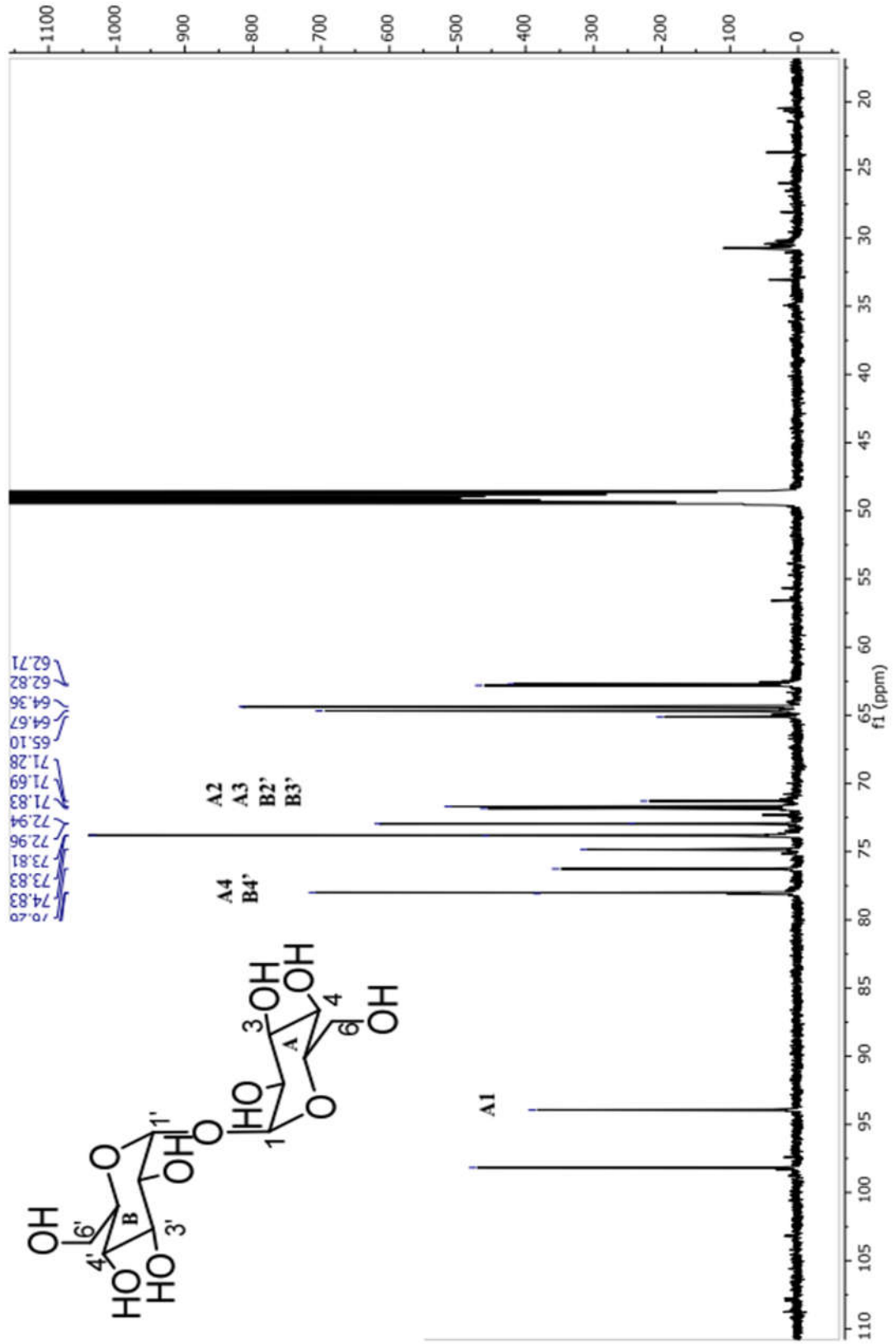
β,β -Trehalose, MeOH-d4, 600 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	J , Hz	^{13}C , ppm
Ünite I					
A	1	CH	4.46	d, 7.8	98.16
	2	CH	3.12	d, 9.2	73.82
	3	CH	3.57	m	78.06
	4	CH	3.57	m	70.12
	5	CH	3.57	m	76.63
	6	CH ₂	3.57	m	61.25
Ünite II					
B	1'	CH	4.46	d, 7.8	98.16
	2'	CH	3.12	d, 7.8	73.82
	3'	CH	3.88	m	78.06
	4'	CH	3.88	m	70.12
	5'	CH	3.88	m	76.63
	6'	CH ₂	3.88	m	61.25



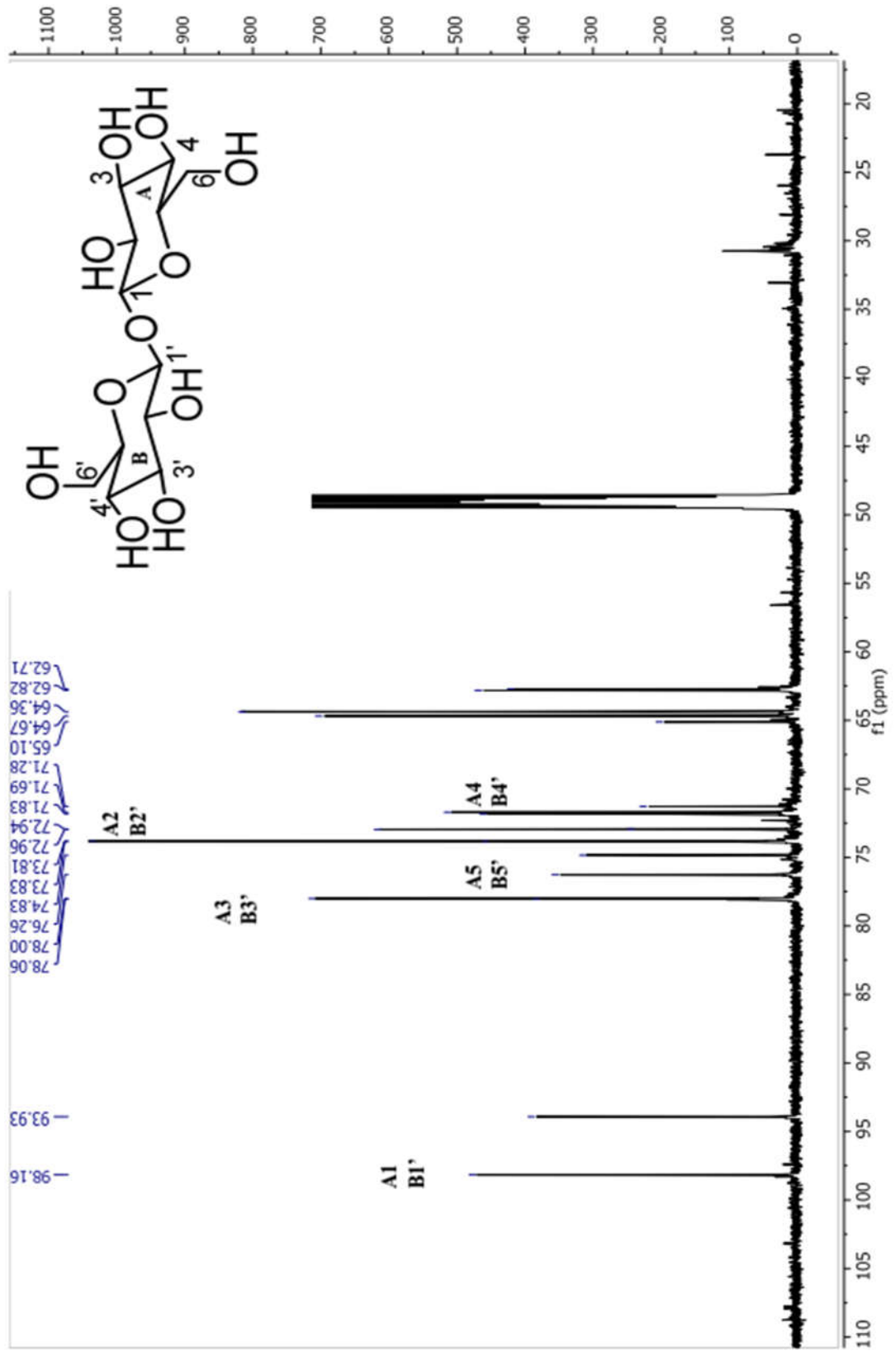
Şekil 3.63. α,α -Trehalose bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H -NMR spektrumu



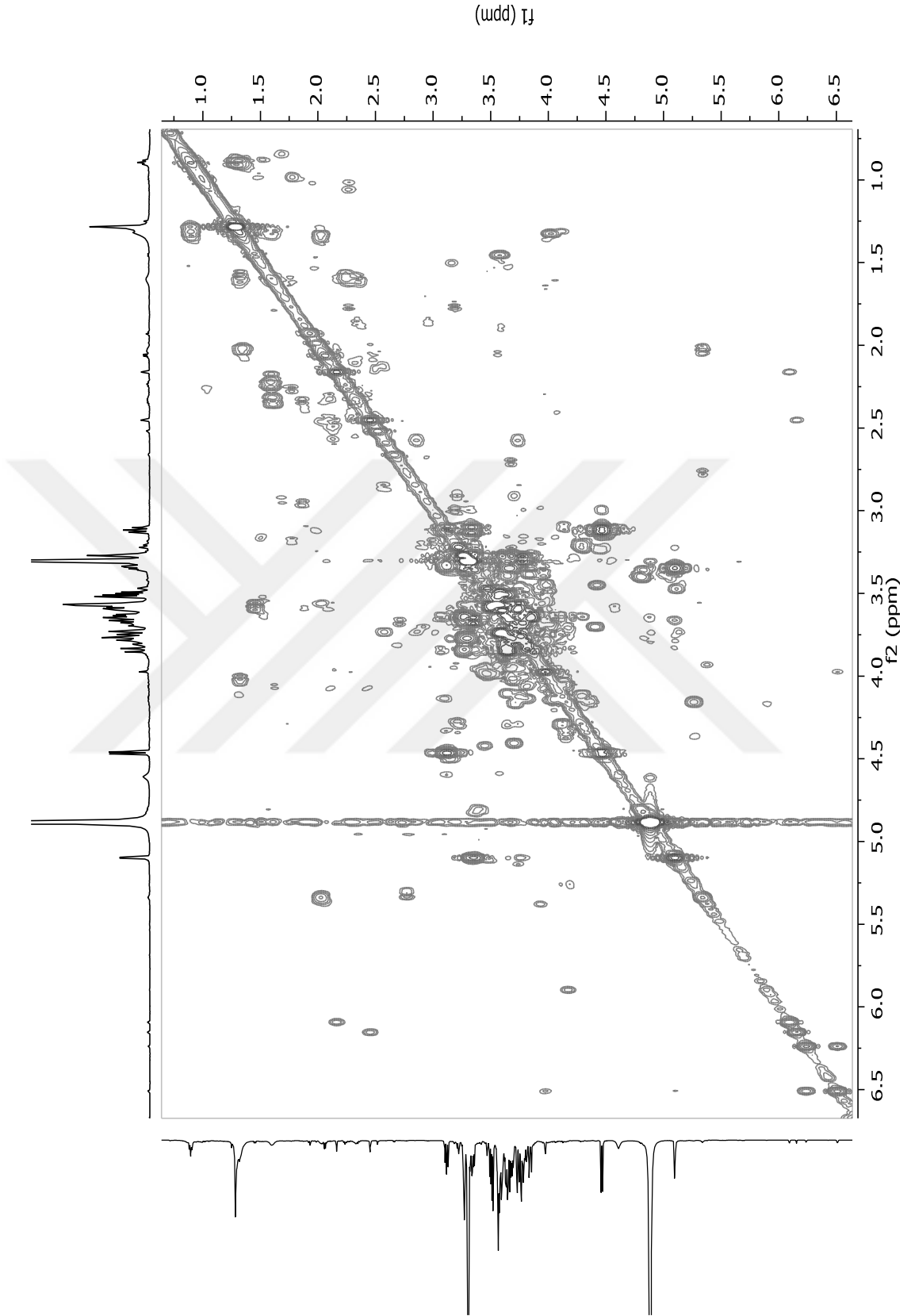
Şekil 3.64. β,β -Trehalose bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'teki $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



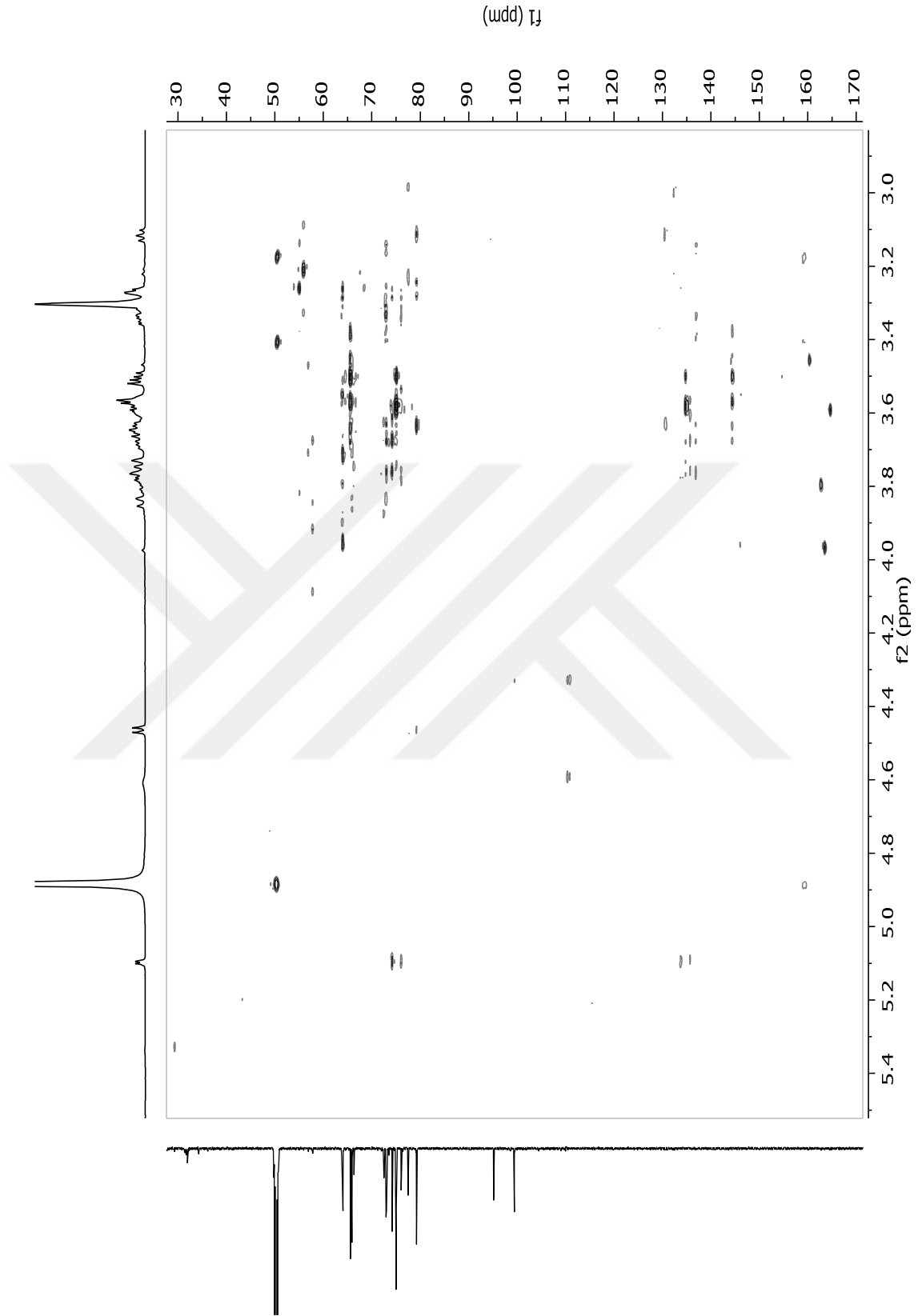
Şekil 3.65. α,α -Trehalose bileşiğinin MeOH- d_4 'deki ^{13}C -NMR spektrumu



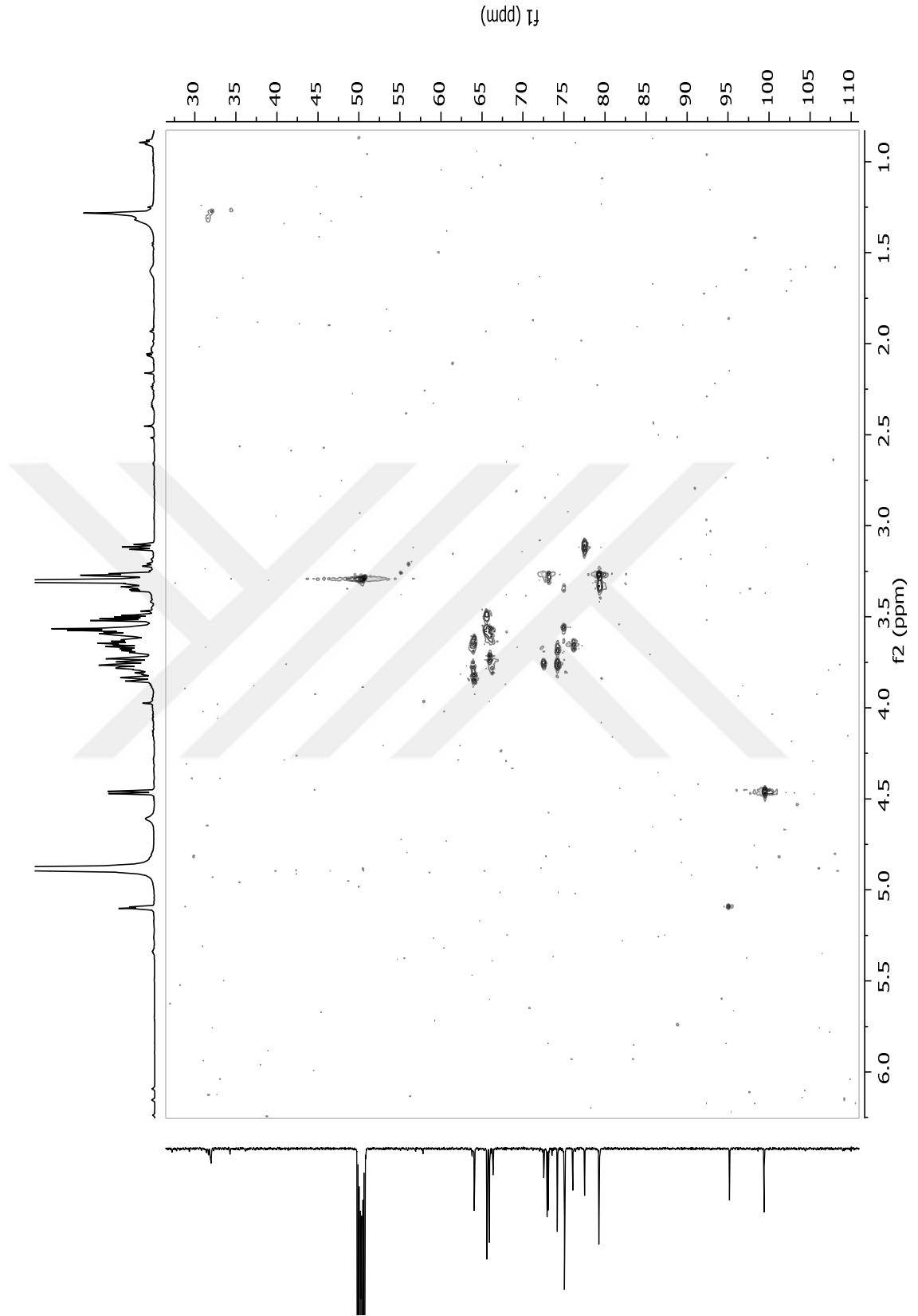
Şekil 3.66. β,β -Trehalose bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.67. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin MeOH- d_4 'teki ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.68. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin $\text{MeOH-}d_4$ 'teki gHMBC spektrumu

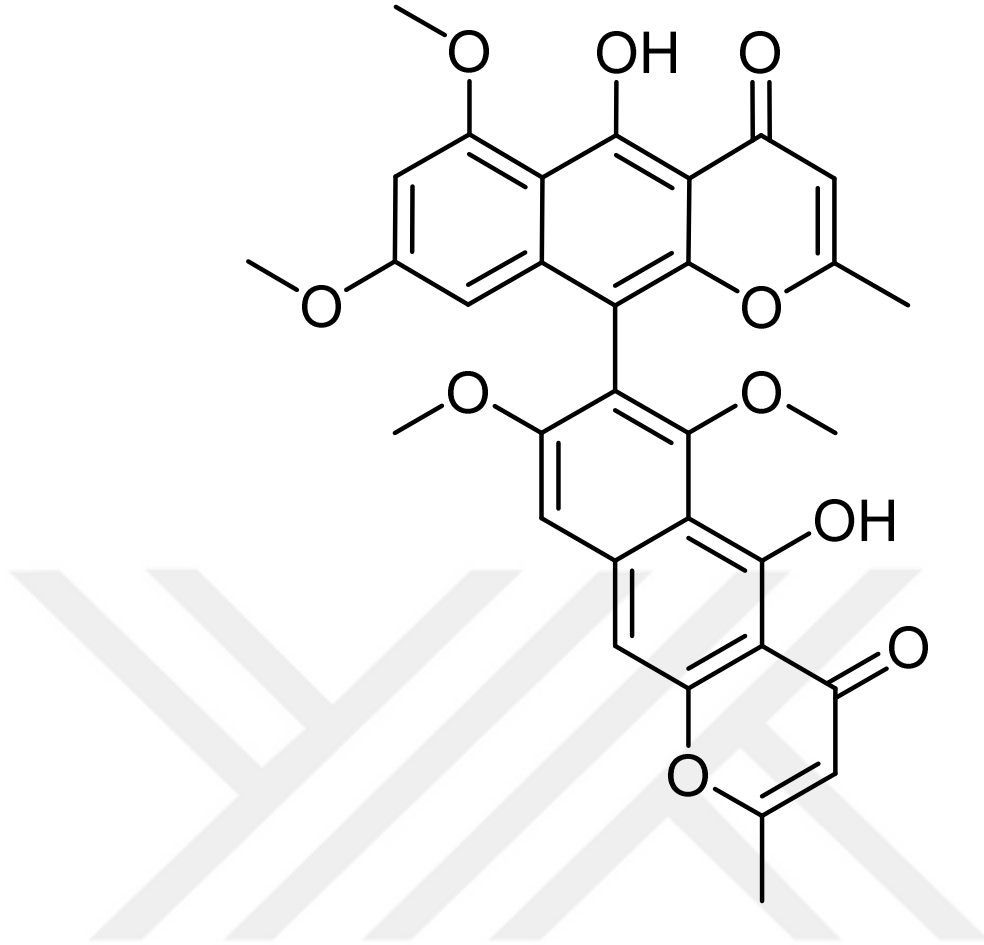


Şekil 3.69. α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşiklerinin $\text{MeOH-}d_4$ 'teki gHMQC spektrumu

3.3.6 Madde 7 Teşhis Bulguları

Madde 7, katı açık sarı bir toz olarak elde edilmiştir. UV spektrumu 225, 280 nm'de maksimum absorpsiyon ($\lambda_{\max}$) piklerini ortaya çıkarmıştır. Madde 7'nin ^1H -NMR spektral verileri, her biri 2.2 Hz'lik bir eşleşme sabitine (J değeri) sahip, δH 6.52 ve δH 6.25'te iki adet meta-bağlı aromatik proton ile birlikte δH 7.38, δH 7.27, δH 6.16 ve δH 6.10 ppm'de dört adet singlete bölünmüş altı adet farklı aromatik protonun teşhisiyle bir dimerik bileşiğin karakteristik bir modelini ortaya koymuştur ve ^1H - ^1H COSY spektrumunda açık korelasyonlar sergilemiştir. Madde 7'nin ^1H NMR spektrumu ayrıca δH 2.46 ve δH 2.17 ppm'de iki adet aromatik metil pikleri ile birlikte δH 3.98, δH 3.81, δH 3.59 ve δH 3.48 ppm'de dört adet oksijenlenmiş metil gruplarına farklılaşan altı adet metil singletin varlığını ortaya çıkarmıştır. Elde edilen sonuçların rapor edilen literatürle karşılaştırılmasıyla, Madde 7'nin, daha önce *Aspergillus* cinsine ait farklı mantar türlerinden bildirilen, dimerik bir-naftopiron türevi olan Aurasperone A olduğu şüphesiz olarak doğrulanmıştır (Campos ve ark., 2005; Priestap, 1984; Shaaban ve ark., 2012).

Aurasperone A bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.70'de, ^1H -NMR analizleri Çizelge 3.11'de, ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.71'de, ^1H - ^1H COSY spektrumu Şekil 3.72'de verilmiştir.



Aurasperone A

Kimyasal Formül: C₃₂H₂₆O₁₀

Nihai Kütle: 570.15

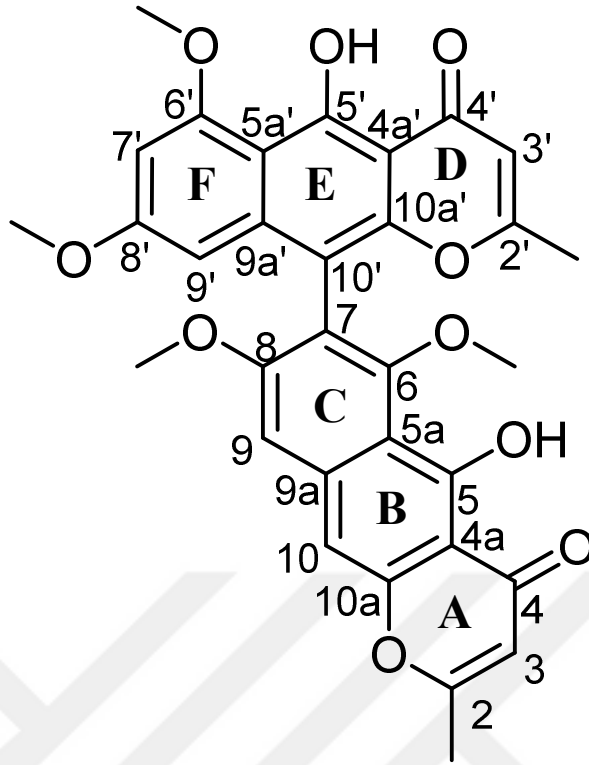
Moleküler Ağırlık: 570.55

m/z: 570.15 (100.0%), 571.16 (35.3%), 572.16 (8.1%), 573.16 (1.4%)

Elementel Analiz: C, 67.37; H, 4.59; O, 28.04

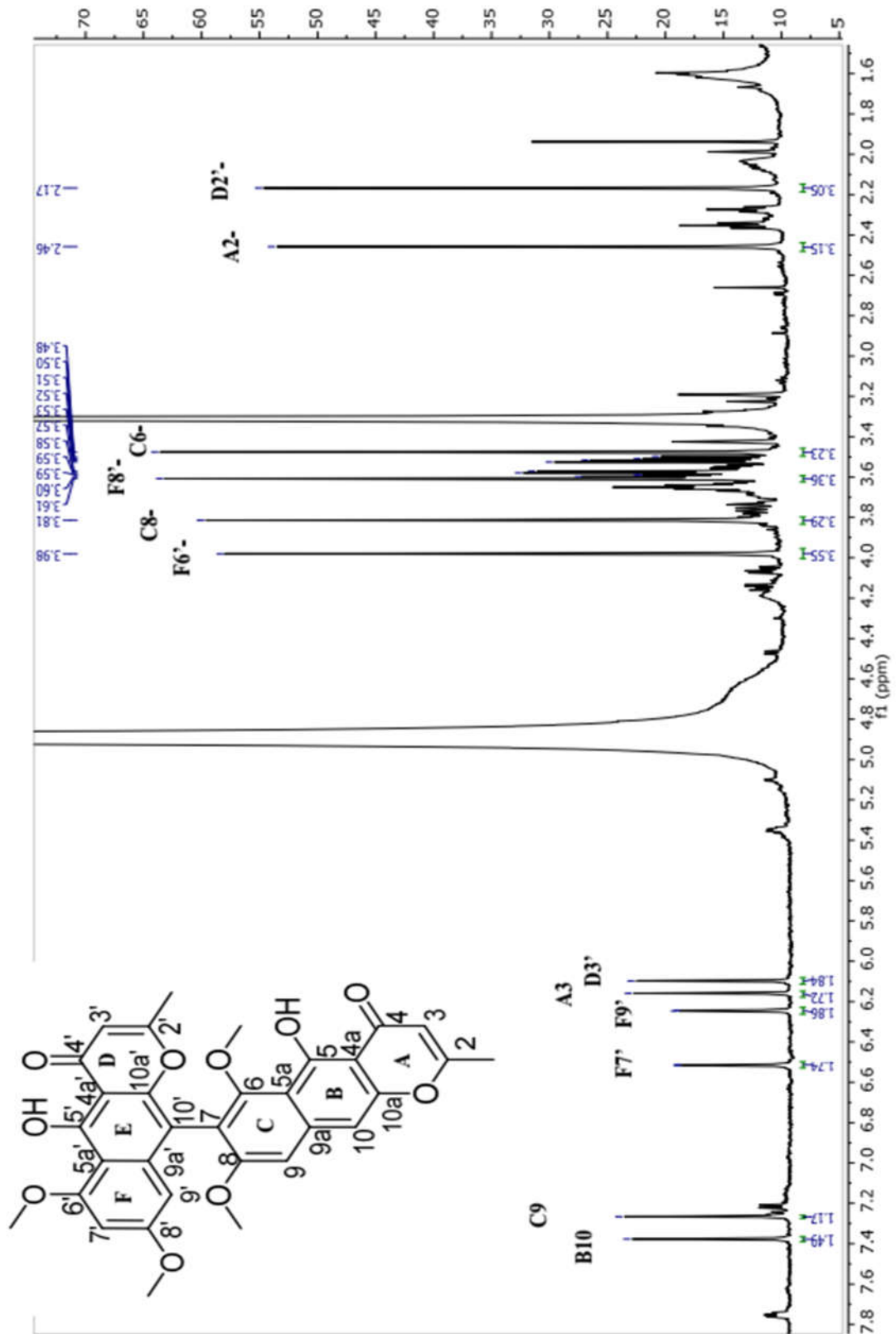
5,5'-dihidroksi-6,6',8,8'-tetrametoksi-2,2'-dimetil-4H,4'H-[7,10'-bibenzo[g]kromen]-
4,4'-dion

Şekil 3.70. Aurasperone A bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

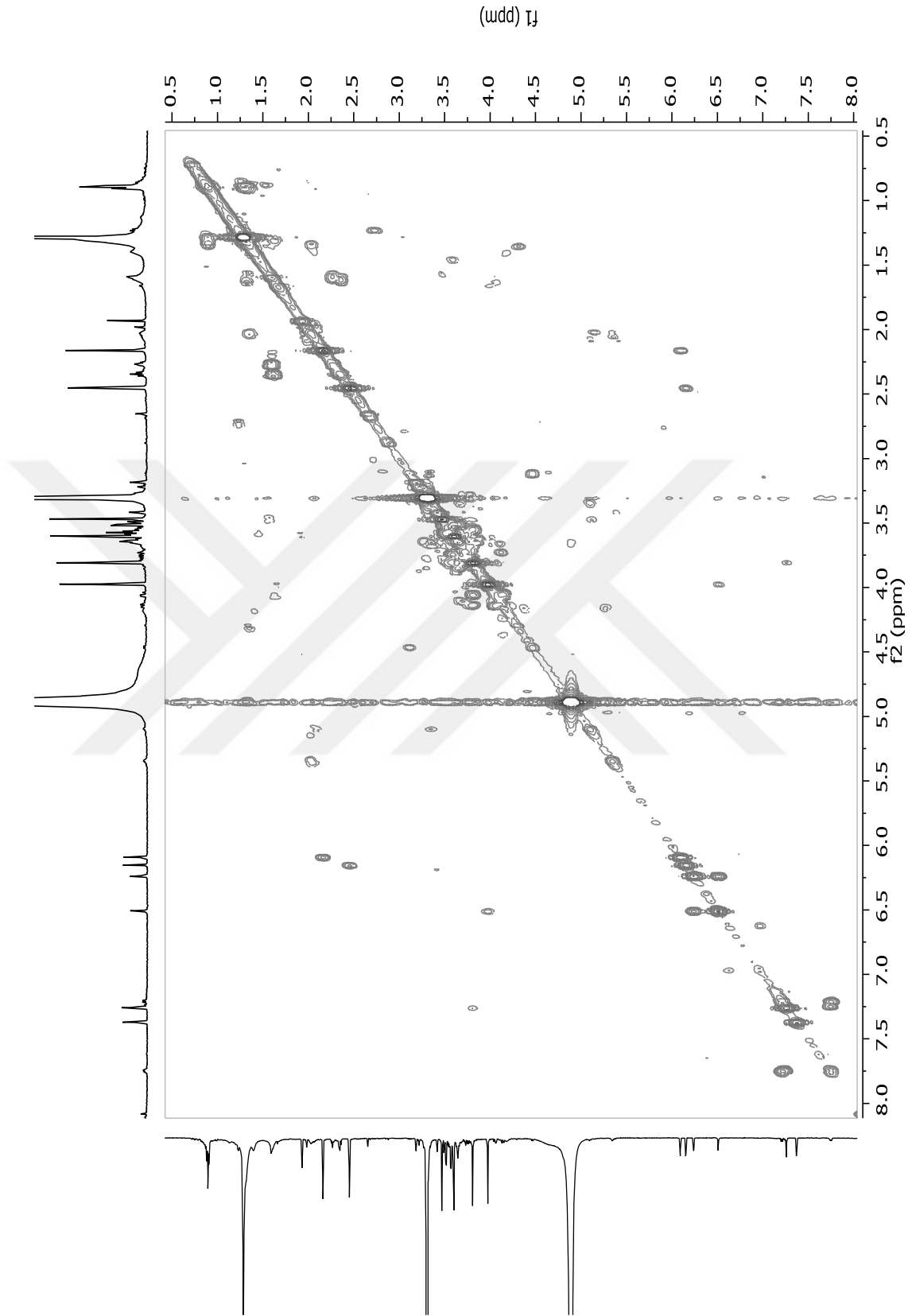


Çizelge 3.11. Aurasperone A bileşiğine ait ^1H NMR analizleri

Aurasperone A, MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz				
Halka	H Atom		^1H , ppm	<i>J</i> , Hz
Ünite I				
A	2-	H ₃	2.46	s
	3	H	6.16	s
B	10	H	7.38	s
C	9	H	7.27	s
	6-	H ₃	3.48	s
	8-	H ₃	3.81	s
Ünite II				
D	2'-	H ₃	2.17	s
	3'	H	6.10	s
F	7'	H	6.52	d, 2.2
	9'	H	6.25	d, 2.2
	6'-	H ₃	3.98	s
	8'-	H ₃	3.59	s



Şekil 3.71. Aurasperone A bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.72. Aurasperone A bileşiğinin $\text{MeOH-}d_4$ 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu

3.3.7 Madde 8 Teşhis Bulguları

Madde 8, YPSK'da koyu turuncu yağ formunda bir madde olarak izole edilmiştir. GK-KS analizinden elde edilen kromatogramın Wiley GK/KS kütüphanesinin taraması sonucunda Madde 8'in Nonanedioik asit dimetil ester (Dimetil azelat) olduğu bulunmuştur.

Nonanedioik asit dimetil ester bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması Şekil 3.73'de ve GK-KS kromatogramı Şekil 3.74'da verilmiştir.



Nonanedioik Asit Dimetil Ester

Kimyasal Formül: $C_{11}H_{20}O_4$

Nihai Kütle: 216.14

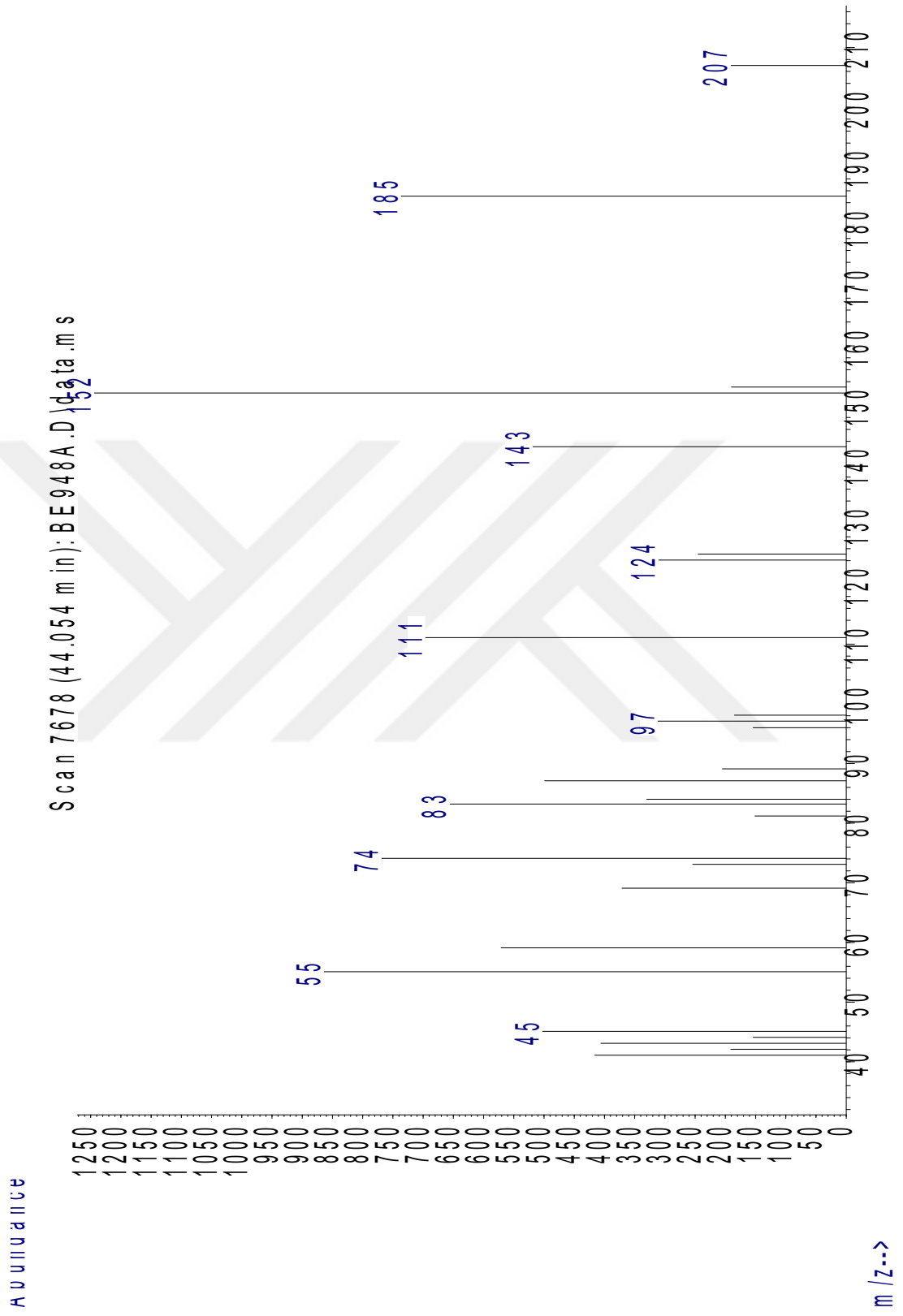
Moleküler Ağırlık: 216.28

m/z: 216.14 (100.0%), 217.14 (12.3%), 218.14 (1.5%)

Elementel Analiz: C, 61.09; H, 9.32; O, 29.59

Dimetil Nonanedioat

Şekil 3.73. Nonanedioik asit dimetil ester bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

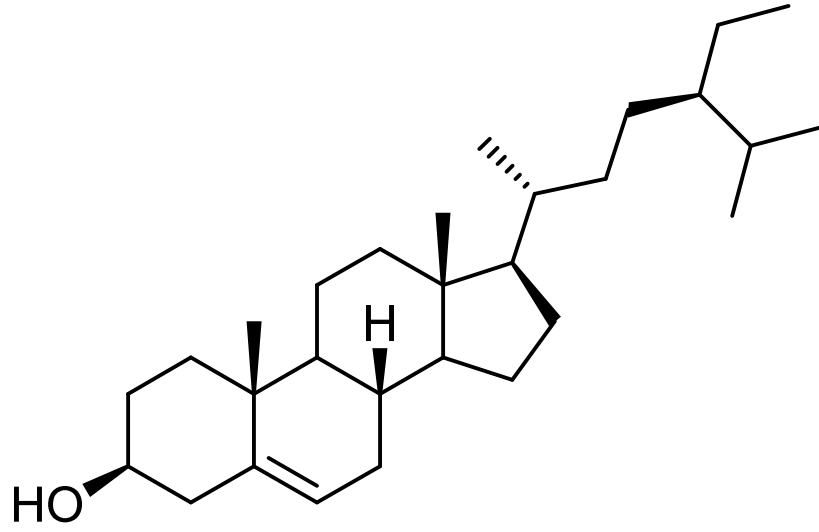


Şekil 3.74. Nonanedioik asit dimetil ester bileşiğinin GK-KS kromatogramı

3.3.8 Madde 9 ve Madde 10 Teşhis Bulguları

Madde 9 ve Madde 10, koyu sarı amorf formunda ayrılmaz bir karışım olarak izole edilmiştir. Madde 9 ve 10'un ^1H ve ^{13}C NMR spektral verileri, iki bileşenin tetrasiklik triterpenler olduğunu belirten karakteristik pikleri göstermiştir. ^1H NMR spektral verileri, beş adet farklı olefinik protonun varlığını sergilerken, burada bunlardan iki tanesi, δH 5.56 (dd, $J = 5.7, 2.5$ Hz), δH 5.37 (dt, $J = 5.7, 2.8$ Hz)'de, $1\text{H}-1\text{H}$ COSY spektrumu ile doğrudan korelasyonlu (Şekil 36) ve δH 5.22 (dd, $J = 15.3, 7.8$ Hz) ve δH 5.17'deki (dd, $J = 15.3, 7.1$ Hz) iki adet proton, δH 5.33'te (dd, $J = 5.1, 2.2$ Hz) bir adet olefinik proton ile birlikte cis konfigürasyonunda olduğunu göstermiştir. Madde 9 ve 10'un ^{13}C NMR spektral verileri, HMQC spektrumuyla δC 141.5, δC 140.9 ve δC 139.9 ppm'de üç adet kuaterner karbon ile birlikte δC 135.7, δC 132.1, δC 121.9, δC 119.7 ve δC 116.4'te beş adet tersiyer karbona ayrılan olefinik karbonların karakteristik setini göstermiştir. $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMBC ve HMQC dahil olmak üzere 2D NMR spektrumları ile elde edilen Madde 9 ve 10'un spektral verilerinin önceden bildirilen literatürle (Campos ve ark., 2005; Carvalho ve ark., 2016; Nagia ve ark., 2012) karşılaştırılmasıyla Madde 9 ve 10'un, açık bir şekilde sırasıyla β -Sitosterol ve Ergosterol olarak tanımlanmıştır.

β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin kimyasal yapıları, kimyasal özellikleri ve adlandırılmaları Şekil 3.75 ve Şekil 3.76'da, ^1H ve ^{13}C NMR analizleri Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'de, ^1H -NMR spektrumları Şekil 3.77 ve Şekil 3.78'de, ^{13}C -NMR spektrumları Şekil 3.79 ve Şekil 3.80'de, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spektrumu Şekil 3.81'de, gHMBC spektrumu Şekil 3.82'de, gHMQC spektrumu Şekil 3.83'de verilmiştir.



β-Sitosterol

Kimyasal Formül: C₂₉H₅₀O

Nihai Kütle: 414.39

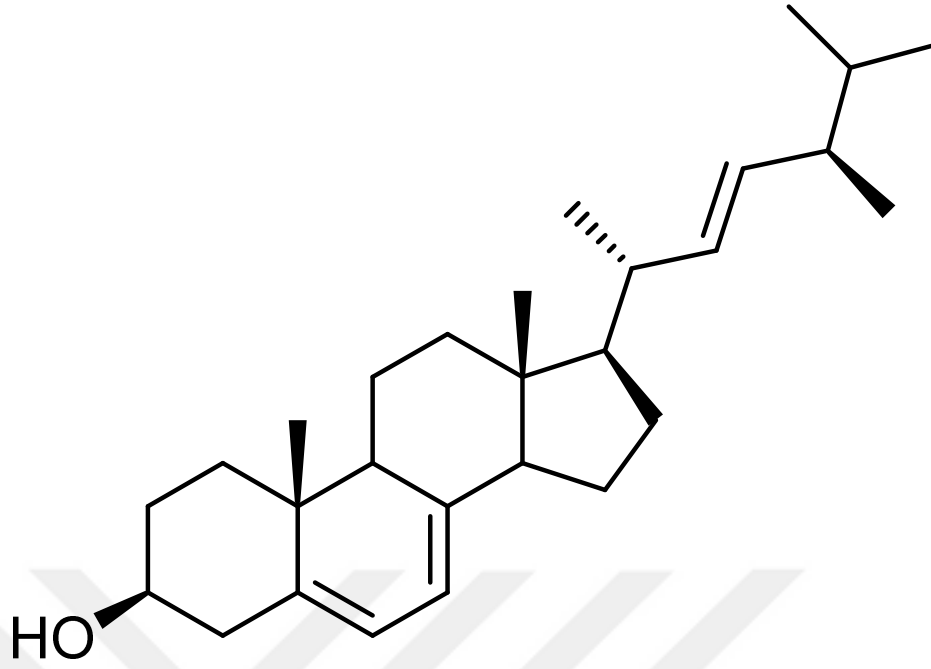
Moleküler Ağırlık: 414.72

m/z: 414.39 (100.0%), 415.39 (32.0%), 416.39 (5.0%)

Elementel Analiz: C, 83.99; H, 12.15; O, 3.86

(3S,8S,10R,13R,17R)-17-((2R,5R)-5-etil-6-metilheptan-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1H-siklopenta[*a*]fenantren-3-ol

Şekil 3.75. *β*-Sitosterol bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması



Ergosterol

Kimyasal Formül: $C_{28}H_{44}O$

Nihai Kütle: 396.34

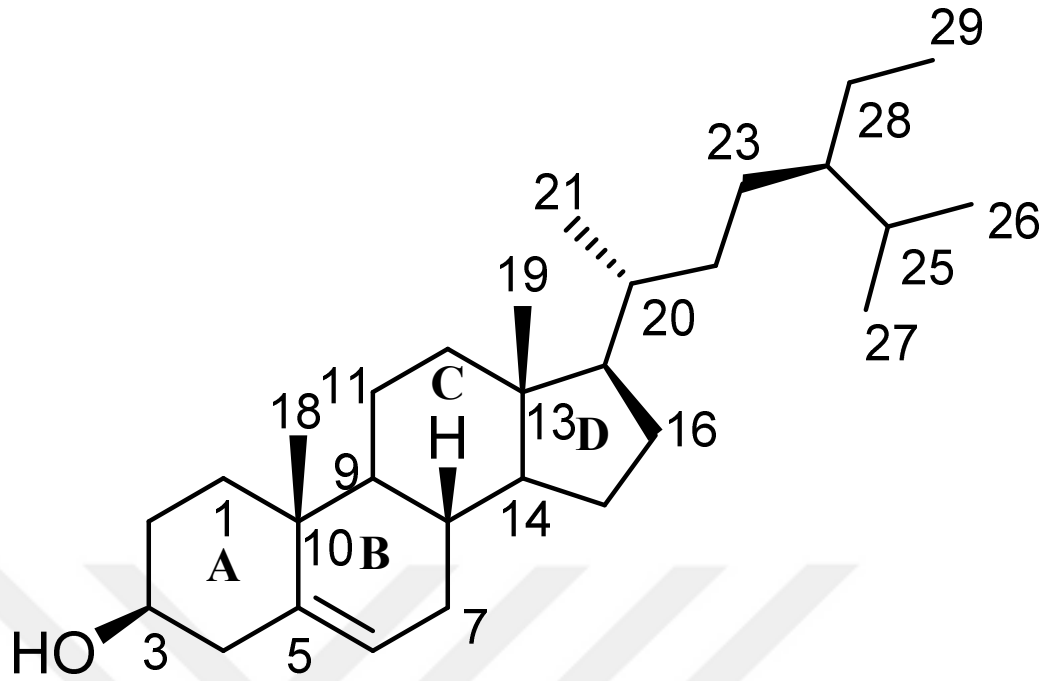
Moleküler Ağırlık: 396.66

m/z: 396.34 (100.0%), 397.34 (30.3%), 398.35 (4.6%)

Elementel Analiz: C, 84.79; H, 11.18; O, 4.03

(3S,10R,13R,17R)-17-((2R,5R,E)-5,6-dimetilhept-3-en-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodekahidro-1H-siklopenta[*a*]fenantren-3-ol

Şekil 3.76. Ergosterol bileşiğinin kimyasal yapısı, kimyasal özellikleri ve adlandırılması

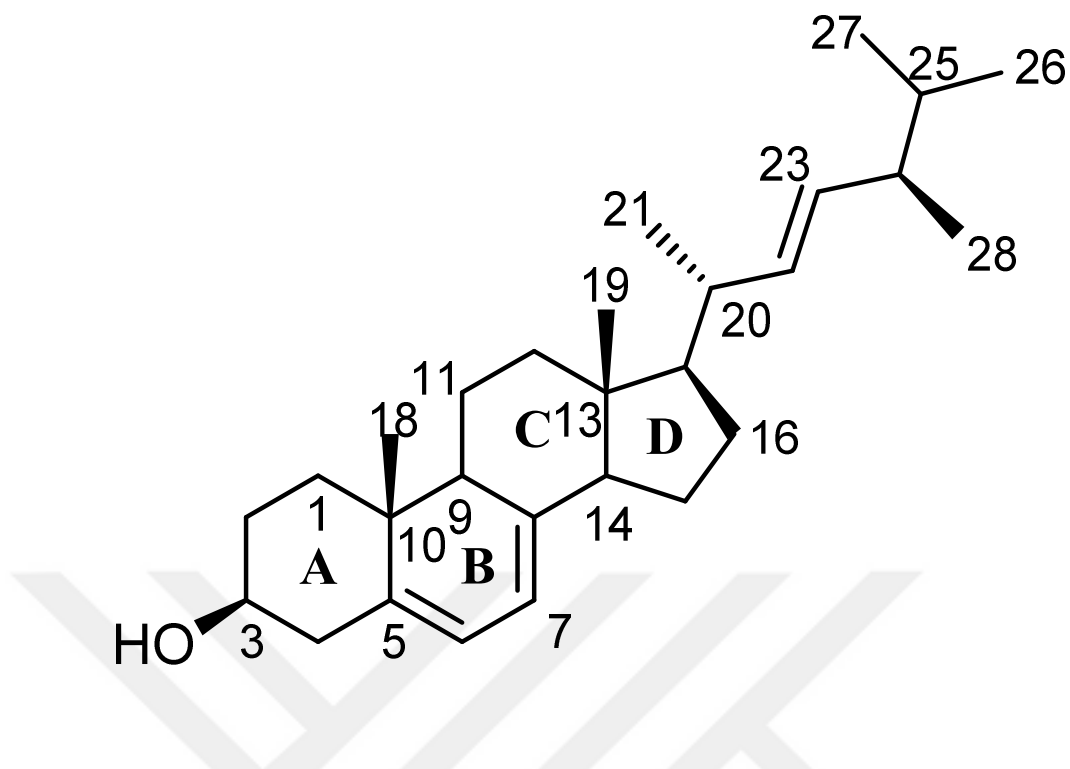


Çizelge 3.12. β -Sitosterol bileşimine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

β -Sitosterol, CHCl_3 - <i>d</i> , 600 MHz					
Halka	C/H Atom		^1H , ppm	J , Hz	^{13}C , ppm
Ünite I					
A	1	CH_2	1.46	m	37.4
	2	CH_2	1.56	m	31.9
	3	CH	3.51	t, 11.2 t, 4.6	72.0
	4	CH_2	2.32	m	42.1
	5	C			140.9
	10	C			36.6
B	18	CH_3	0.93	s	16.4
	6	CH	5.33	d, 5.1 d, 2.2	121.9
	7	CH	2.04	m	32.3
	8	CH	1.69	m	32.2
C	9	CH	1.55	m	50.2
	17	CH	1.45	m	56.3
	11	CH_2	1.52	m	21.1
	12	CH_2	1.51	m	39.8
	13	C			42.5

Çizelge 3.12. Devam

D	14	CH	1.50	m	57.0
	15	CH ₂	1.75	m	24.5
	16	CH ₂	1.85	m	28.4
	19	CH ₃	0.66	s	16.4
Ünite II					
	20	CH	1.60	m	36.4
	21	CH ₃	0.94	d, 6.8	20.9
	22	CH ₂	0.95	m	34.1
	23	CH ₂	1.20	m	26.3
	24	CH	1.38	m	46.0
	25	CH	1.77	m	29.4
	26	CH ₃	0.83	d, 6.6	22.5
	27	CH ₃	0.82	d, 6.6	22.2
	28	CH ₂	1.10	m	23.1
	29	CH ₃	0.80	t, 6.8	12.0

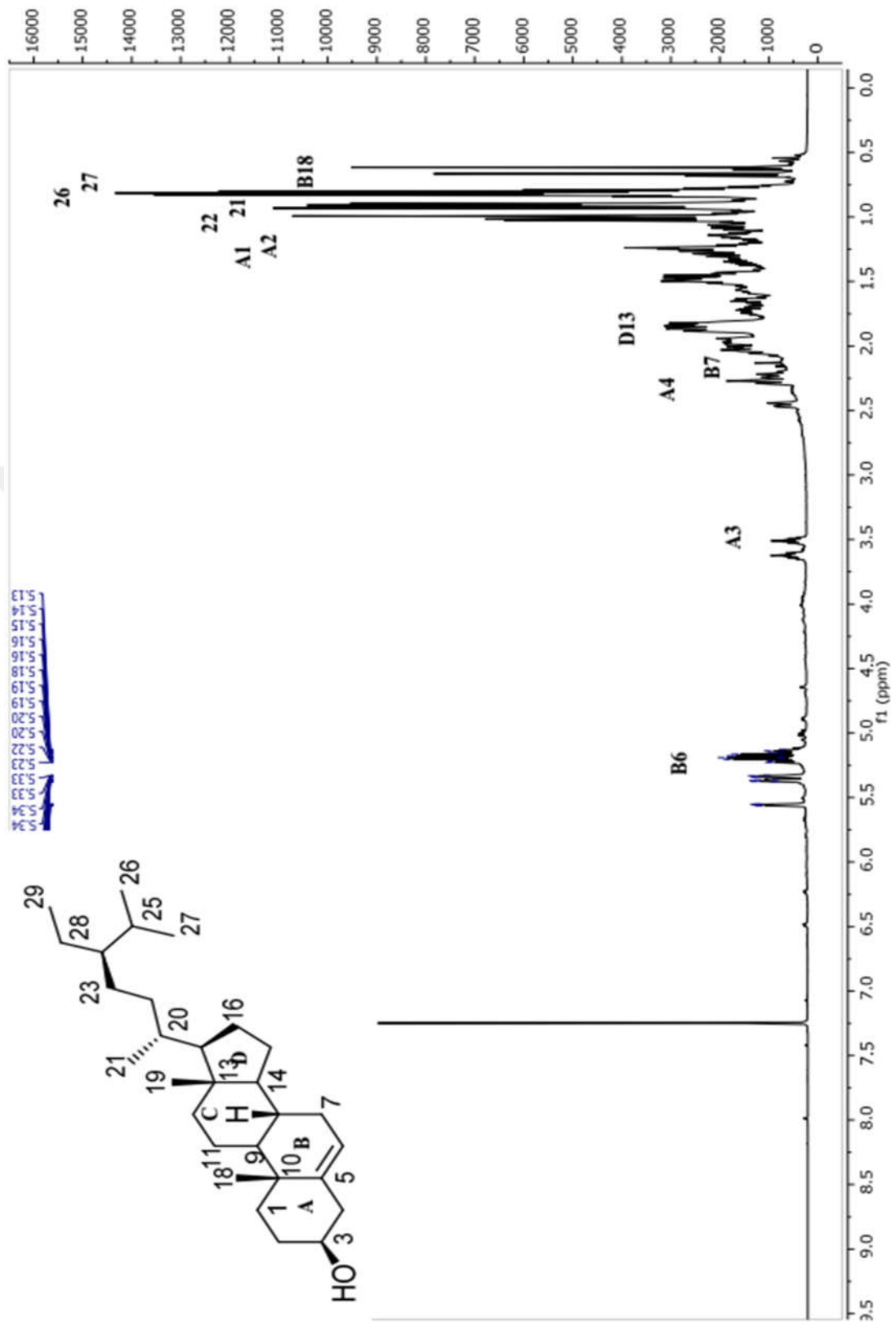


Çizelge 3.13. Ergosterol bileşiğine ait ^1H ve ^{13}C NMR analizleri

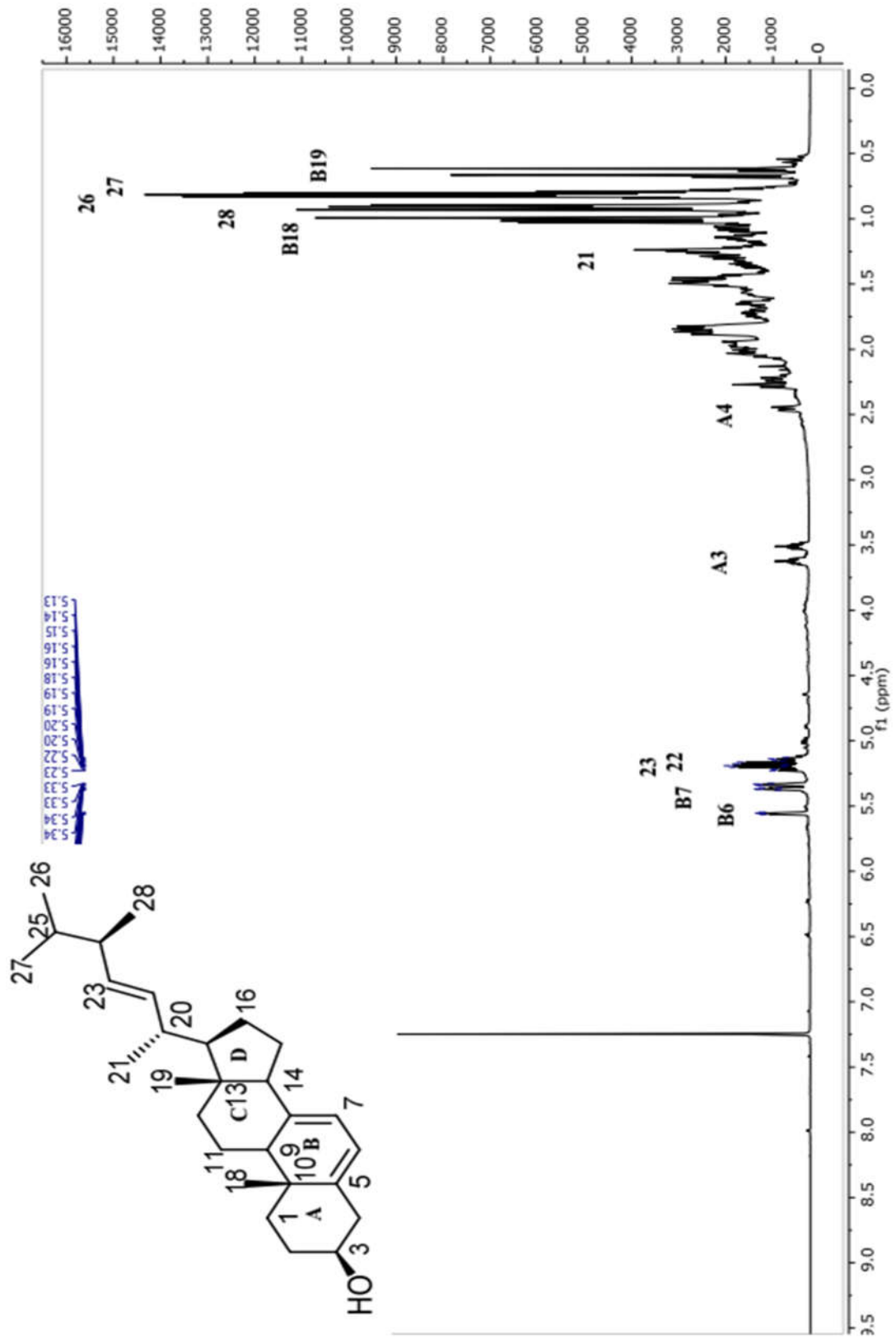
Ergosterol, CHCl_3 -d, 600 MHz				
Halka	C/H Atom	^1H , ppm	J , Hz	^{13}C , ppm
Ünite I				
A	1	CH_2		38.5
	2	CH_2		32.1
	3	CH	3.62	70.6
	4	CH_2	2.46	40.9
			2.29	
B	5	C		139.9
	10	C		37.2
	18	CH_3	0.94	16.4
	6	CH	5.56	119.7
	7	CH	5.37	116.4
C	8	C		141.5
	9	CH		46.4
	17	CH		55.9

Çizelge 3.13. Devam

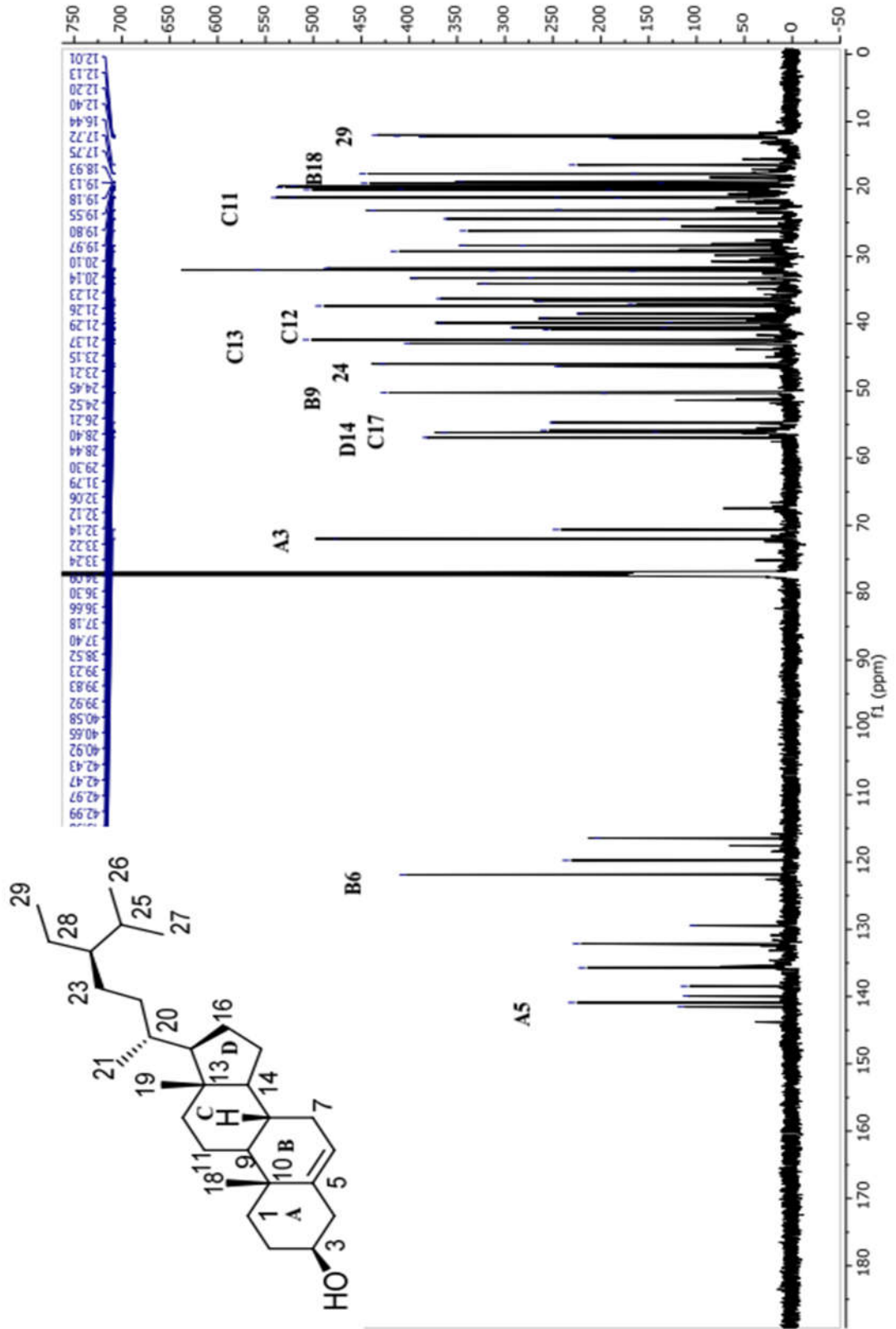
D	11	CH ₂			21.2
	12	CH ₂			39.2
	13	C			43.0
	14	CH			54.7
	15	CH ₂			23.1
	16	CH ₂			28.4
	19	CH ₃	0.62	s	12.2
Ünite II					
	20	CH			40.6
	21	CH ₃	1.02	d, 6.6	21.2
	22	CH	5.17	d, 15.3	135.7
				d, 7.8	
	23	CH	5.22	d, 15.3	132.1
				d, 7.1	
	24	CH			43.0
	25	CH			33.2
	26	CH ₃	0.83	d, 7.2	20.1
	27	CH ₃	0.82	d, 7.2	19.8
	28	CH ₃	0.91	d, 6.8	17.8



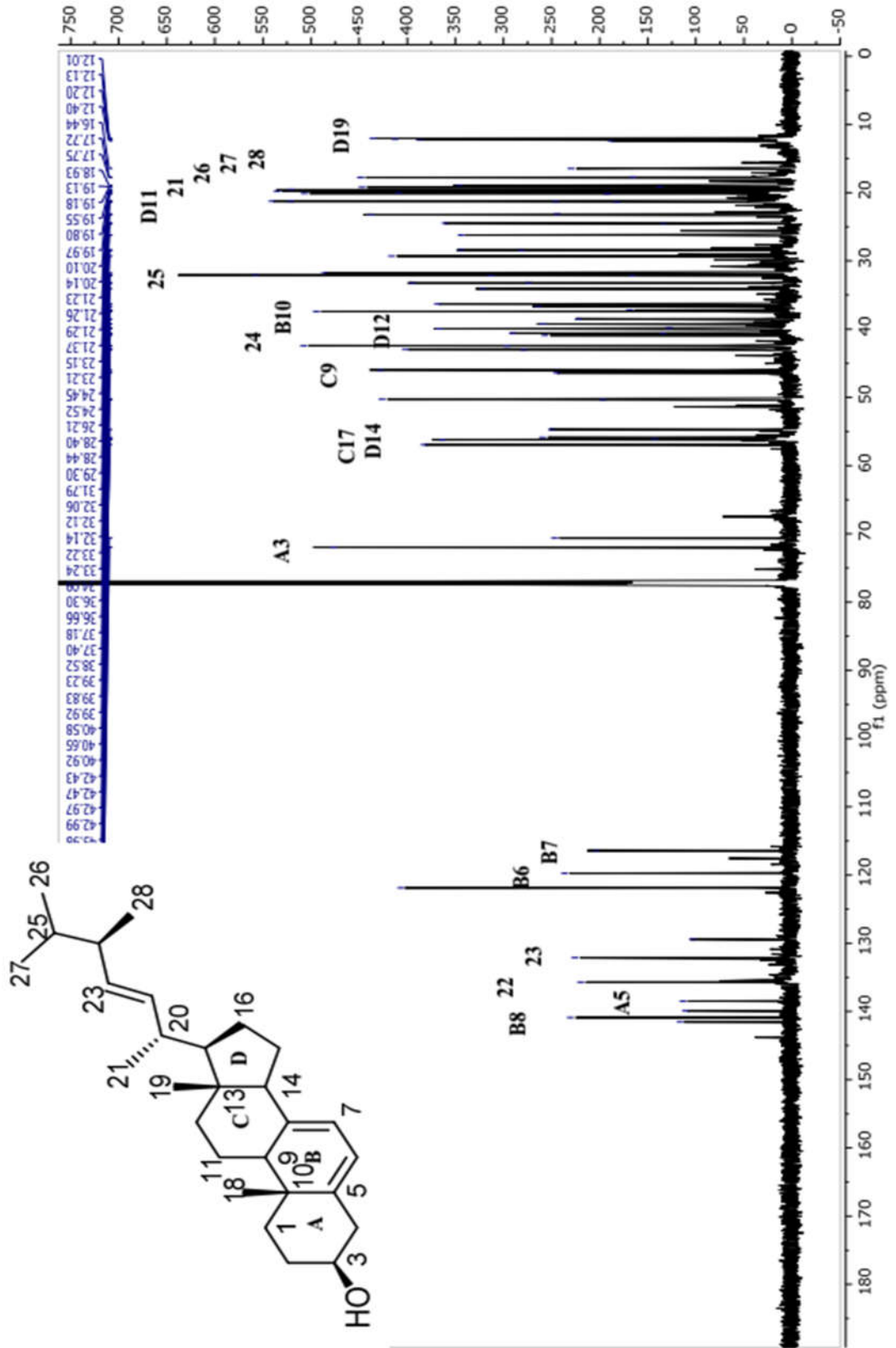
Şekil 3.77. β -Sitosterol bileşiğinin CHCl_3-d_4 'deki ^1H -NMR spektrumu



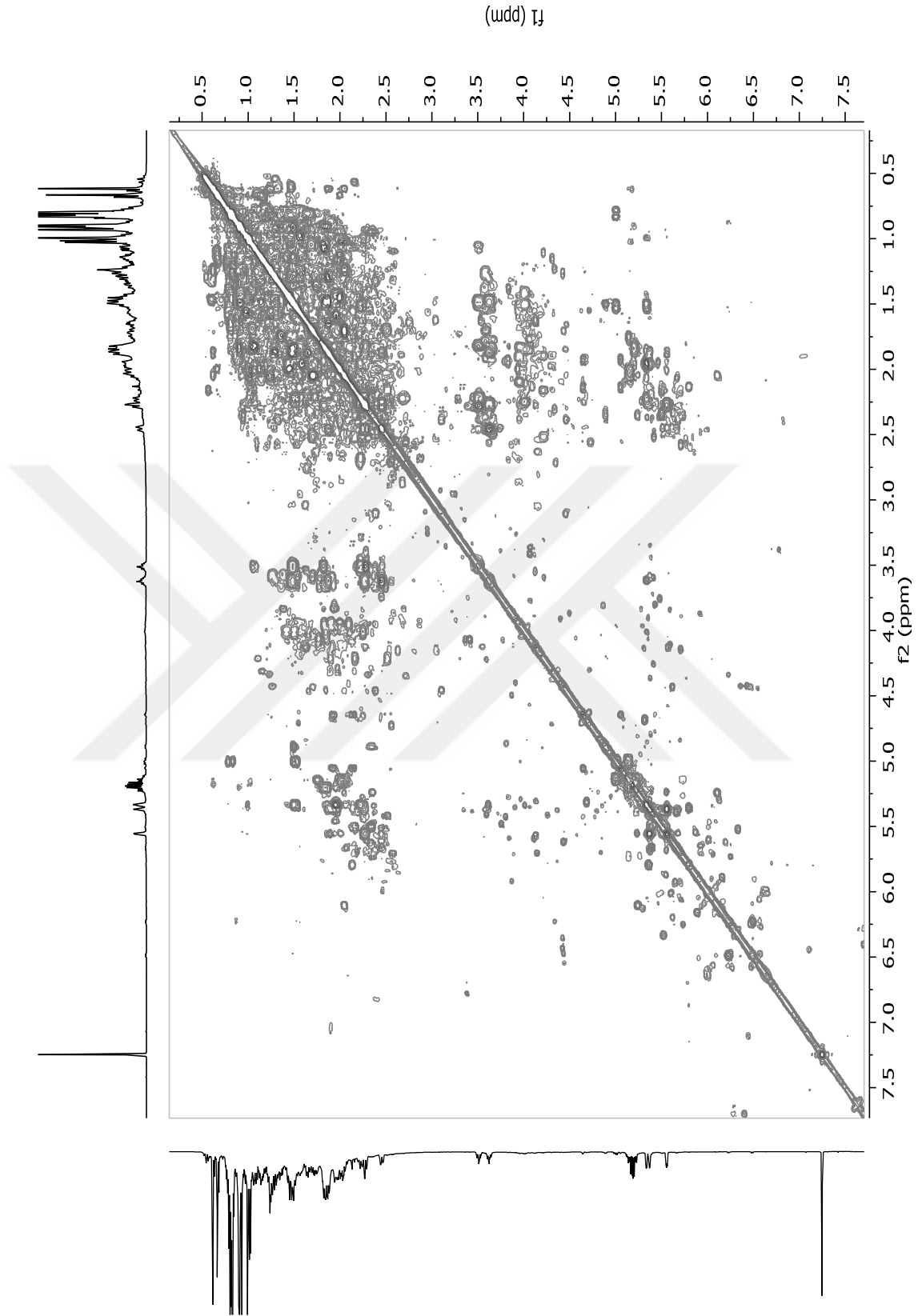
Şekil 3.78. Ergosterol bileşiğinin CHCl_3-d_4 'deki $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



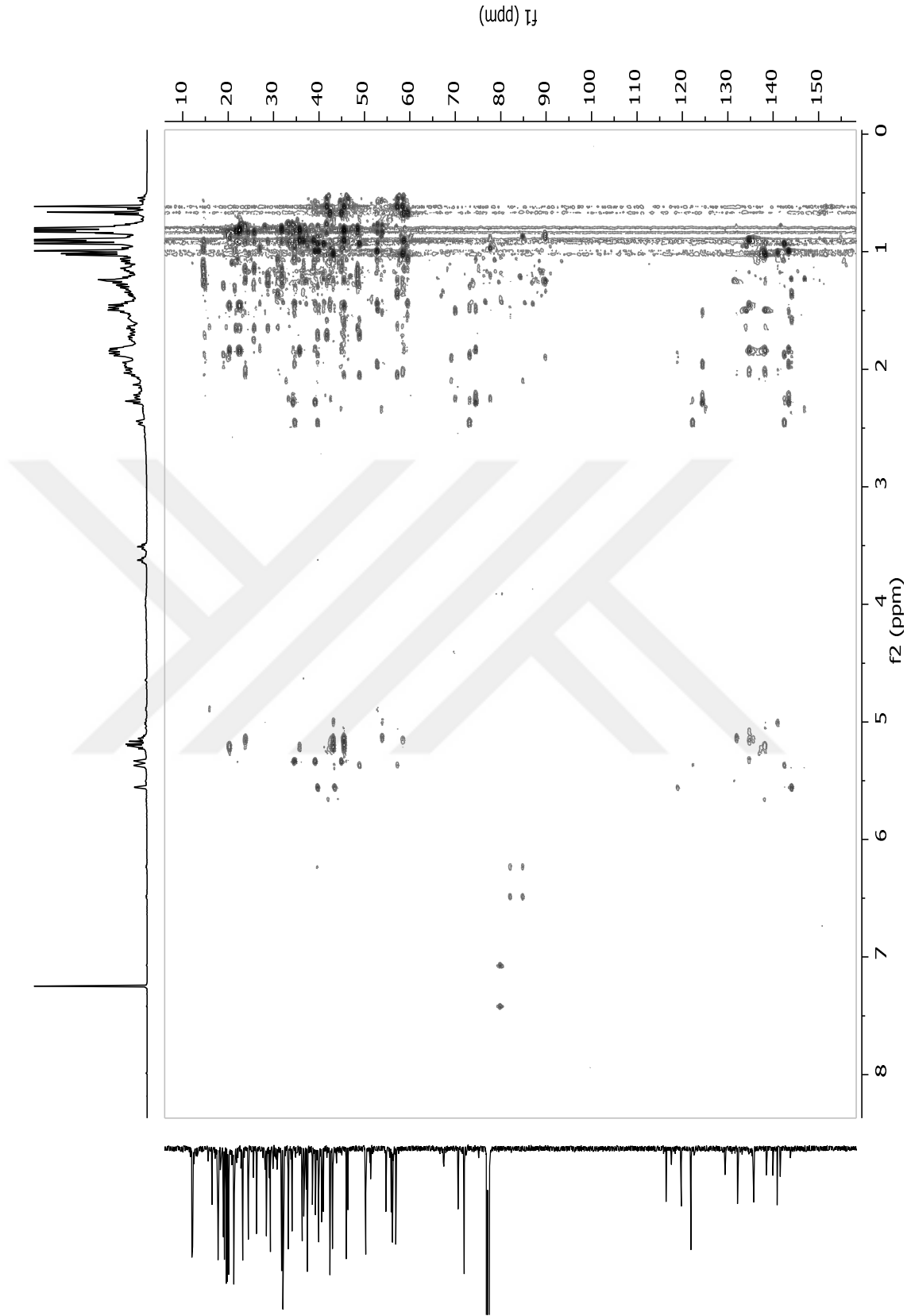
Şekil 3.79. β -Sitosterol bileşiğinin CHCl_3-d_4 'deki ^{13}C -NMR spektrumu



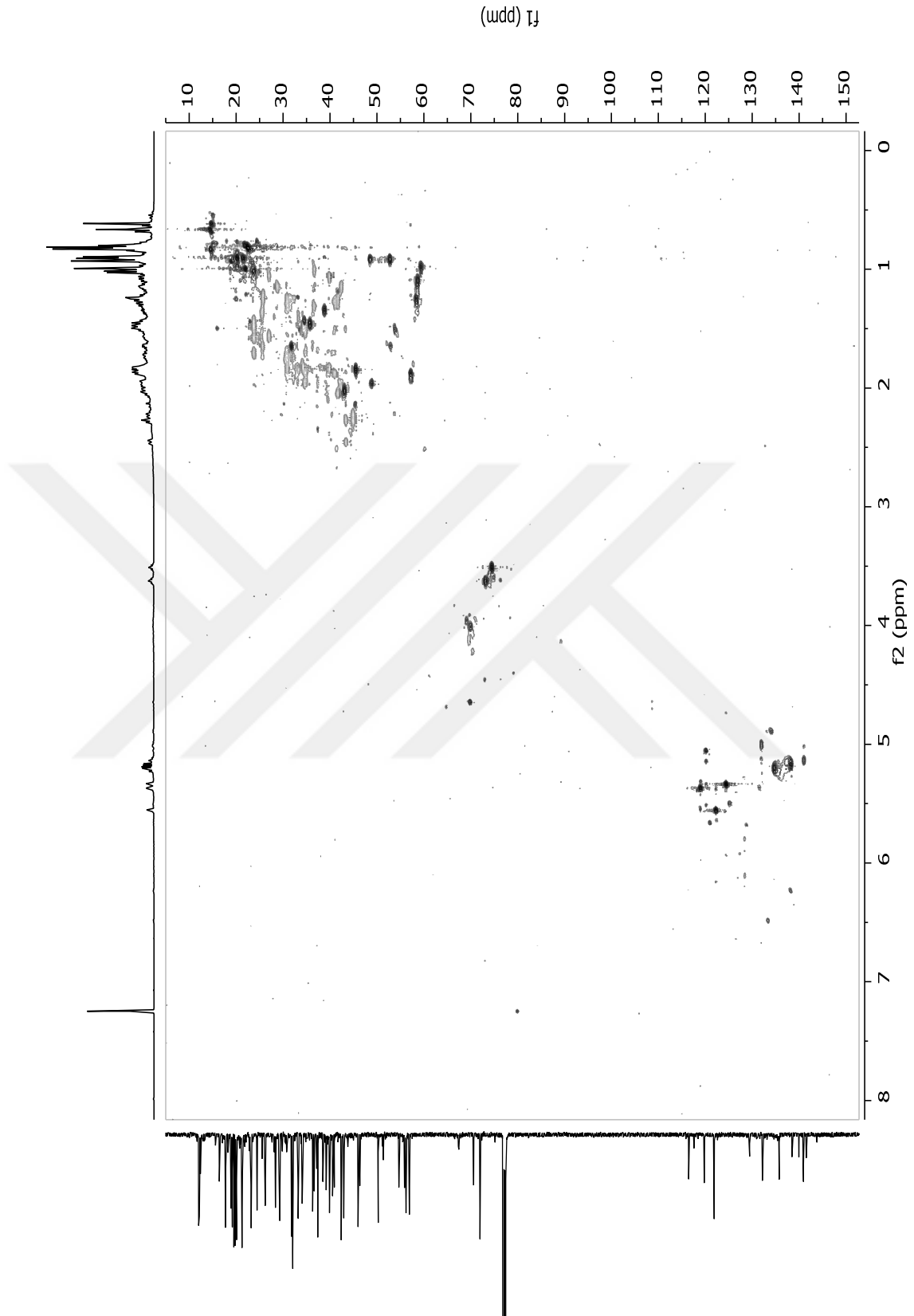
Şekil 3.80. Ergosterol bileşiğinin CHCl₃-d₄'deki ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.81. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3-d_4 'deki ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.82. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3-d_4 'deki gHMBC spektrumu



Şekil 3.83. β -Sitosterol ve Ergosterol bileşiklerinin CHCl_3-d_4 'deki gHMQC spektrumu

3.4. Aktivite Çalışma Bulguları

Aspergillus niger ve *Trichoderma virilente* mantarlarının küçük ölçekli ekim sonrası ham ekstrelerine DPPH, SO, NO ve ABTS yöntemlerini içeren antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite çalışmaları yapılmıştır. İzole edilen ve miktarı yeterli olan Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşiklerine ise antienflamatuar ve antialerjik aktivite çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1. Antioksidan Aktivite Bulguları

Antioksidan aktivite testlerinin sonuçları Çizelge 3.14'te incelendiğinde kullanılan DPPH, SO ve NO yöntemlerde *Aspergillus niger* mantarına ait ham ekstrenin *Trichoderma virilente* mantarına ait olan ham ekstreden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *Trichoderma virilente* ham ekstresi diğer yöntemlere göre bir miktar farkla ABTS yönteminde daha antioksidan aktivite göstermiştir. Referans alınan maddelerden Kersetin'e daha yakın bir aktivite sergilemişlerdir.

Çizelge 3.14. Mantar ekstralarının antioksidan aktiviteleri

KOD	Mantar (EtOAc ekstresi)	IC50 (µg/mL) ±SD				
		DPPH	SO	NO	ABTS	TEAC (mM _{Troloks} /mg _{Ekstre})
KL6i	<i>Aspergillus niger</i>	84,7 ± 1,56	309,29 ± 0,99	323,93 ± 0,79	676,08 ± 1,36	0.1804 ± 1.36
Ay123 dış	<i>Trichoderma virilente</i>	891,25 ± 1,38	925,02 ± 0,35	989,45 ± 1,34	418,9 ± 0,44	0.42 ± 0,44
Kersetin	-	7,04 ± 0,94	10,11 ± 0,28	13,18±0,15	11,1±0,23	-
Askorbik asit	-	5,72 ± 0,89	8,52 ± 0,78	10,12±0,19	8,21± 0,91	-

3.4.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 574, *Candida albicans* 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite testi gerçekleştirilmiş ancak Çizelge 3.15’te bulunan verilere göre her iki mantar ekstresinde antimikrobiyal aktiviteye rastlanılmamıştır. *Aspergillus niger* mantarının ham ekstresi diğer bakteri türleri ile karşılaştırıldığında *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakteri suşuna karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Çizelge 3.15. Mantar ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri

KOD	Mantar (EtOAc ekstresi)	MİK sonuçları (seri dilüsyon ile) µg/µl								
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RSKK 574	<i>Candida albicans</i> 10231	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
KL6i	<i>Aspergillus niger</i>	250	500	500	62,5	1000	500	1000	500	500
Ay123 dış	<i>Trichoderma virilente</i>	500	250	500	500	500	500	500	500	500
Siprofloksasin		1.25	0.625	0.078	0.078	0.009	0.625	0.039	*	
Mikonazol		*	*	*	*	*	*	*	1.56	0,78

3.4.3. Sitotoksik Aktivite Bulguları

Çizelge 3.16’da gösterilen sitotoksik aktivite verileri incelendiğinde *Aspergillus niger* mantarının ham ekstresi, referans kabul edilen Kampotesin’in sahip olduğu IC₅₀ değerine yakın bir değer ile *Trichoderma virilente* mantarından daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ulusal Kanser Enstitüsünden (NCI) ve Geran Protokolünden alınan referans değerine dayanarak, IC₅₀ < 21 µg/ml değerindekiler güçlü sitotoksik etki, IC₅₀ 21-200 µg/ml arasındaki değerler orta düzeyde sitotoksik etki ve IC₅₀ 201–500 µg/ml arasındaki değerler zayıf sitotoksik etki ile karakterize edilirken, IC₅₀> 501 µg/ml değerleri sitotoksik olmayan olarak kabul edilmektedir (Amaani ve Dwira, 2018). Bu değer aralıklarına göre *Aspergillus niger* mantarının etilasetat ekstresi güçlü sitotoksik etkiye sahipken *Trichoderma virilente* mantarının etilasetat ekstresi orta düzeyde sitotoksik etki göstermiştir.

Çizelge 3.16. Mantar ekstralarının sitotoksik aktivitesi (HCT116 hücre serisi)

KOD	Mantar (EtOAc ekstresi)	IC ₅₀ (µg/ml) ±SD
K16i	<i>Aspergillus niger</i>	4.428 ± 0.60
Ay123 dış	<i>Trichoderma virilente</i>	>40
	Kampotesin	0.305± 0.078

3.4.4. Antienflamatuar Aktivite Bulguları

Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikleri antienflamatuar aktivite için iki farklı metod kullanılarak incelenmiştir. Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikleri elastaz salınım inhibisyonu yönünden herhangi etkinlik gözlenmemişken, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikleri için süperoksit anyon jenerasyonu yönünden kontrol bileşiği

Genistein'e oranla üç katı konsantrasyonda antienflamatuar etkinlik gözlenmiştir. Çizelge 3.17'de verilen sonuçlara göre Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşiklerinin düşük antienflamatuar etkinlik gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 3.17. İzole edilen seçilmiş bileşiklerin antienflamatuar aktiviteleri

Bileşik	Süperoksit anyon jenerasyonu	
	% İnhibisyon ^a	IC ₅₀ (μM) ^b
Rubrofusarin B	39.09±2.50	-
Flavasperone	25.97±6.40	-
Aurasperone B	86.22±3.67	2.37±0.88
Fonsecinone D	74.83±3.07	2.28±0.33
Genistein	^c	1.52 ± 0.17

Bileşik	Elastaz salımı	
	% İnhibisyon ^a	IC ₅₀ (μM) ^b
Rubrofusarin B	11.50±1.31	-
Flavasperone	9.18±4.06	-
Aurasperone B	20.33±4.47	-
Fonsecinone D	11.83±3.00	-
Genistein	31.57 ± 7.29	16.34 ± 4.26

^a 10 μM konsantrasyonda inhibisyon yüzdesi. ^b Yüzde 50 inhibisyon için gereken konsantrasyon (IC₅₀). Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. (n = 3~6). ^c Genistein süperoksit anyon jenerasyonunu 3 μM konsantrasyonda 67.01 ± 2.38 % inhibe etmiştir.

3.4.5. Antialerjik Aktivite Bulguları

Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşiklerinin Çizelge 3.18’de görülen verilere göre herhangi bir antialerjik aktivite göstermediği görülmektedir.

Çizelge 3.18. İzole edilen seçili bileşiklerin antialerjik aktiviteleri

Bileşik	% canlılık, RBL-2H3 ^a	A23187 nedenli degranülasyonun % inhibisyonu			Antijen nedenli degranülasyonun % inhibisyonu		
		100 µM	10 µM	100 µM IC ₅₀ (µM) ^c	10 µM	100 µM	IC ₅₀ (µM) ^c
Rubrofusarin B	> %90	-	-	-	-	-	-
Flavasperone	> %90	-	-	-	-	-	-
Aurasperone B	> %90	-	-	-	-	-	-
Fonsecinone D	> %90	-	-	-	-	-	-
Azelastin^b	>90 % (20 µM)	-	-	10.9	-	-	15.4

^a Örneklerin RBL-2H3 hücrelerine sitotoksitesi MTT canlılık taramasıyla ölçülmüştür. Sonuçlar kontrole (DMSO) karşı ortalama (n = 3) cinsinden ifade edilmiştir. Tüm örnekler RBL-2H3 hücrelerine non toksiktir.

^b Azelastin (20 µM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve 20 µM konsantrasyonda A23187 indüklü degranülasyonu % 78.4 ± 1.4, antijen indüklü degranülasyonu % 66.8 ± 9.8 inhibe etmiştir. ^c Yüzde 50 inhibisyon için gereken konsantrasyon (IC₅₀).

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda incelediğimiz *Aspergillus niger* mantarının, hem karasal hem de deniz kaynaklarından elde edilen türleri birçok kez araştırılmıştır. Deniz kaynaklı *Aspergillus niger* mantarından izole edilen bileşikler üzerinde sitotoksiste, insektisit, antimikrobiyal, antioksidan gibi birçok aktivite çalışması yapılmış olmasına rağmen herhangi bir antialerjik veya antienflamatuvar çalışmaya rastlanmamıştır. İncelediğimiz diğer mantar *Trichoderma virilente*, teşhisinden bu yana herhangi bir çalışmada yer almamıştır. İlk kez bu mantar üzerine yapılan çalışma olarak kayda geçecek olan bu doktora çalışması ayrıca bu mantardan ilk kez sekonder metabolit izolasyonunu da içermektedir.

Rubrofusarin B bileşiğine ait mevcut literatür kayıtları incelendiğinde ilk kez (Galmarini ve ark., 1974) *Aspergillus fonsecaeus* mantarından nafto- γ -piron (Priestap, 1986) yapısında bir bileşik olarak izole edilmiştir. Bir *Aspergillus* suşu M39'dan izole edilen Rubrofusarin B, insan KB hücrelerinde çoklu ilaç direncini tersine çevirme açısından araştırıldığında, KB - C2 hücrelerinin Adriamisin ve Daunomisin'e direncini sadece hafifçe tersine çevirdiği, Kromomisin A3 direncini kısmen tersine çevirdiği ve Vinkristin ve Mitomisin C direncini neredeyse tamamen tersine çevirdiği bulunmuştur (Ikeda ve ark., 1990). *Cynodon dactylon* (Bermuda çimi) bitkisinde bir endofit mantar *Aspergillus niger* IFB-E003'den izole edilen Rubrofusarin B'nin kolorektal kanseri hücre hattı SW1116 (IC50: 4,5 μ g/ml) üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Song ve ark., 2004). *Cynodon dactylon* ile ilişkili endofitik mantar *Cladosporium herbarum* IFB-E002 (Ye ve ark., 2005) gibi karasal endofitik mantar türlerinden izole edilmesinin yanı sıra Rubrofusarin B bileşiği, deniz kaynaklı, Çin'in Güney Denizi'ndeki deniz mangrovlarından edinilen endofitik bir mantar (No. ZZF79)'dan (Huang ve ark., 2007), deniz kaynaklı *Aspergillus carbonarius* mantar suşu WZ - 4-11'dan (Zhang ve ark., 2008), *Pongamia pinnata* mangrovundan izole edilmiş endofitik mantar *Aspergillus tubingensis*'ten (Huang ve ark., 2010), deniz yumuşak

mercanı *Denderonephthya hemprichi*'den izole edilen *Alternaria alternata* suşu D2006 kültüründen (Shaaban ve ark., 2012), deniz kaynaklı mantar *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30'dan (Zhou ve ark., 2016), deniz kaynaklı bir mantar türü olan *Aspergillus* sp SF-5929'dan (Kim ve ark., 2020) izole edilmiştir. Deniz sedimenti türevi *Aspergillus foetidus* KMM 4694 mantarından izole edilen bileşiğin ilaca dirençli insan prostat kanseri 22Rv1 hücrelerinin canlılığı ve koloni oluşumu üzerindeki etkisinin incelenmesiyle, bileşiğin 10 µM konsantrasyonda kanser hücrelerinin koloni oluşumu üzerinde % 68,55 önemli inhibe edici aktivite sergilediği görülmüştür (Antonov ve ark., 2021). Hem karasal hem de deniz kaynaklarından elde edilen *Aspergillus niger* mantarından izole edilen Rubrofusarin B bileşiği, çalışmamızda da izole edilmiştir.

Flavasperone bileşiği ilk kez 1962 yılında *Aspergillus niger* mantarından izole edilmiş nafto-γ-piron yapısında bir bileşiktir (Bycroft ve ark., 1962). 2008 yılında yapılan bir çalışmada *Aspergillus* türlerinin kültür besi ortamından açıl-CoA: kolesterol açiltransferaz (ACAT) inhibitörü olarak izole edilen bileşik, ACAT2 izozimine karşı seçici inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Sakai ve ark., 2008). Deniz kaynaklarından ilk izolasyonu *Aspergillus carbonarius*'un WZ - 4-11 mantar suşundan olmuştur (Zhang ve ark., 2008). Deniz kaynaklarından izolasyonu sonraki yıllarda da devam etmiştir. Mangrov endofitik mantarı *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E)'ten (Huang ve ark., 2011), Çin'in Liaoning Eyaleti, Huludao kıyı şeridinde gelgit bölgesinde toplanan çamur örneğinden elde edilen deniz kaynaklı mantar *Aspergillus niger* 2HL-M-8 mantarından (Li ve ark., 2016), deniz kaynaklı *Aspergillus niger* 102 mantarından (Zhang ve ark., 2018), *Leathesia nana* deniz alginden elde edilen *Aspergillus* sp XNM-4 türünden (Xu ve ark., 2019) izolasyonu örnek olarak verilebilmektedir. Özellikle *Aspergillus* türlerinden izole edilen Flavasperone bileşiği, çalışmamızdaki *Aspergillus niger* mantarından da izole edilmiştir.

Aurasperone A ve Aurasperone B bileşikler ilk kez karasal *Aspergillus niger* ve *Aspergillus awamori* misellerinden izole edilmişlerdir (Tanaka ve ark., 1966). Ayrıca

Aspergillus fonsecaeus mantarından da birlikte izole edilmişlerdir (Priestap, 1984). *Cyndon dactylon* (Bermuda çimi) bitkisinde bir endofit mantar *Aspergillus niger* IFB-E003'den izole edilen Aurasperone A'nın XO (ksantin oksidaz) (IC50: 10,9 µmol/l) üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Song ve ark., 2004). Deniz kaynaklarından ilk izolasyonları deniz yumuşak mercanı *Denderonephthya hemprichi*'den izole edilen *Alternaria alternata* D2006 mantar suşu kültüründen gerçekleştirilmiştir (Shaaban ve ark., 2012). Deniz algi *Sargassum* sp'den izole edilen *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30 mantar suşu her iki bileşik için de bir diğer deniz kaynağı örneğidir (Fang ve ark., 2016). Deniz sünger *Taedia* sp'den elde edilen *Aspergillus welwitschiae* FMPV 28 mantarından sadece Aurasperone B izole edilmiştir (Loges ve ark., 2020). Son olarak deniz sedimenti türevi *Aspergillus foetidus* KMM 4694 mantarından izole edilen Aurasperone A ve Aurasperone B bileşiklerinin, ilaca dirençli insan prostat kanseri 22Rv1 hücrelerinin canlılığı ve koloni oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiş ve Aurasperone A bileşiğinin 10 µM konsantrasyonda kanser hücrelerinin koloni oluşumu üzerinde % 85,48 önemli inhibe edici aktivite sergilediği görülmüştür (Antonov ve ark., 2021). Mevcut literatürlerin incelendiğinde birçok kez *Aspergillus niger* mantarından izole edilen bis-nafto-γ-piron yapılı Aurasperone A ve Aurasperone B bileşikleri, çalışmamızda *Aspergillus niger* mantarından elde edilmiştir. Ayrıca Aurasperone B bileşiğinin antienflamatuar aktivite incelemesi sonucunda 10 µM konsantrasyonda süperoksit anyon jenerasyonu üzerinde % 86,22'lik bir değer ile önemli bir antienflamatuar etkinlik gösterdiği bulunmuştur.

Fonsecinone D, bis-nafto-γ-piron yapısındaki bileşiğin ilk izolasyonu *Aspergillus fonsecaeus* mantarından gerçekleştirilmiştir (Priestap, 1984). Deniz kaynağından ilk izolasyonu kahverengi alg *Colpomenia sinuosa*'dan izole edilen endofitik mantar *Aspergillus niger* EN-13'den olmuştur ve DPPH radikal süpürücü etki testinde % 37,5 süpürme oranı ile orta düzeyde aktivite göstermiştir (Zhang ve ark., 2007). Çin'in Liaoning Eyaleti, Huludao kıyı şeridinde gelgit bölgesinde toplanan çamur örneğinden elde edilen deniz kaynaklı mantar *Aspergillus niger* 2HL-M-8'den izolasyonu bir diğer deniz kaynağı örneğidir (Li ve ark., 2016). Deniz algi *Sargassum* sp'den elde edilen *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30 mantar suşundan izole

edilmiştir. İnsan kanser hücre hattına (K562, A549, Du145, H1975, MCF-7, Huh-7, HL7702, HL60, HeLa ve Molt-4) karşı çok zayıf sitotoksikite ($IC_{50} > 30 \mu M$) gösterirken, COX-2 inhibitör etkinlik göstermemiştir (Fang ve ark., 2016). Deniz algi *Leathesia nana*'dan elde edilen *Aspergillus* sp XNM-4 mantar suşundan izole edilen Fonsecinone D, beş insan kanser hücre hattı (PANC-1, A549, MDA-MB-231, Caco-2 ve SK-OV-3) ve bir insan normal hücre hattı (HL-7702) üzerindeki inhibitör etkisine bakıldığında kayda değer bir sitotoksik aktivite gözlenmemiştir (Xu ve ark., 2019). Deniz kaynağı mantarlardan elde edilen Fonsecinone D bileşiği çalışmamızda *Aspergillus niger* mantarından izole edilmiştir. Ayrıca yapılan antienflamatuar aktivite testinde $10 \mu M$ 'lık bir konsantrasyon ile süperoksit anyon jenerasyonu üzerinde %74.83'lük bir değer ile kayda değer bir antienflamatuar aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Trehalose, hücrelerin bütünlüğünü çeşitli çevresel streslere karşı korumak için bakteriler, mantarlar, böcekler ve bitkiler tarafından üretilen uyumlu bir osmolittir (Ni ve Yu, 2007). Ayrıca orta ila şiddetli kuru göz sendromunun tedavisi için etkili ve güvenli bir bileşik olması sebebiyle, ilaç piyasasında Thea firması tarafından üretilen Hyaluronik asit ile kombine haldeki 'Thealoz Duo Göz Damlası' ve 'Thealose Duo Jel' formları bulunmaktadır (Matsuo ve ark., 2002). Şeker kısımlarının piranoz formlarını içeren üç izomerinin bulunduğu D-glukozil D-glukozitler için kullanılan genel isimdir. Mantarların üreme, hayatta kalma ve enfeksiyon gövdeleri olan sporlar, uzun süreli hayatta kalmak için yüksek miktarlarda trehalose ihtiyaç duymaktadır (Ni ve Yu, 2007). Genel olarak α, α -Trehalose (α -D-glikopiranosil- α -D-glikopiranosid), doğada yaygın olarak oluşan izomerdir (Elbein, 1974). Corn Steep Liquor besiyerinde büyüyen *Penicillium notatum* B21 mantarının kuru misellerinin metanol ekstresinden ilk kez izole edilmiştir (Abe, 1948). *Umbilicaria pustulata* likeni (Lindberg ve Wickberg, 1953), makromantar *Dermatocarpon miniatum* (Lindberg ve ark., 1955) gibi karasal türlerden izole edilen α, α -Trehalose, ayrıca böceklerin ana kan şekeri olarak tanımlanmış ve *Antheraea polyphemus* (*Polyphemus* Güve Tırtılı) böceğinin kanından saf halde izole edilmiştir (Wyatt ve Kalf, 1957). Birçok karasal liken, mantar, bitki özleri ve böcek türlerinden izole edilen bu bileşik ayrıca mikro mantarlar,

mayalar ve bakterilerden de izole edilmektedir. Kalkerli kırmızı bir alg olan *Serraticardia maxima*'nın yapraklarından izolasyonu ilk deniz kaynağı örneğidir (Nagashima ve ark., 1969). Sentetik isotrehalose (Schlubach ve Maurer, 1925) olarak anılan β,β -Trehalose bileşiği, β -D-glukopiranosil- β -D-glukopiranosid yapısındaki bir trehalose izomeridir. Çalışmamızda da elde ettiğimiz α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose bileşikleri saf bir formda deniz kaynaklı *Aspergillus niger* mantardan ilk kez izole edilmişlerdir.

β -Sitosterol ve Ergosterol bileşikleri ökaryotik hücre plazma membranlarında önemli yapısal ve sinyal verme işlevlerini sağlayan bileşiklerdir. β -Sitosterol bileşiği bitki fitosterolleri arasında bulunurken, Ergosterol bileşiği mantarlar için özelleşmiştir (Dupont ve ark., 2012). β -Sitosterol bileşiği, ilk kez Sitosterol'ün izomerik bir sterolü olarak mısır yağı ve buğday tohumu yağından izole edilen steroller üzerinde yapılan çalışmada karşımıza çıkmaktadır (Anderson ve Shriner, 1927). 1955 yılında tatlı su yeşil alg *Elodea densa planchon*'dan izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Matsumoto ve Hirai, 1955). Karasal *Trichoderma harzianum* T4 (Ahluwalia ve ark., 2015) ve deniz kaynaklı *Trichoderma longibrachiatum* (Tarus ve ark., 2003) ve *Trichoderma asperellum* dl-34 türlerinden de izole edilmiştir (Li ve ark., 2019). β -Sitosterol, dünya çapında popüler bir Kolesterol düşürücü fonksiyonel gıda ürünü olması sebebi ile büyük bir önem teşkil etmektedir (Yang ve ark., 2012). Ergosterol bileşiği ilk kez *Penicillium notatum* mantarının miselyumlarından elde edilmiştir (Savard ve Grant, 1946). Birçok mantar türünden hem saf bileşik halinde hem de türevleri şeklinde izole edilebilmektedir (Li ve ark., 2019). Karasal *T. hamantum* (Hussain ve ark., 1975), *Trichoderma* sp. YM 311505 (Xuan ve ark., 2014), *Trichoderma harzianum* T5 (Ahluwalia ve ark., 2015), *Trichoderma* sp. Jing-8 (Zhang ve ark., 2017) ve deniz kaynaklı *Trichoderma longibrachiatum* (Tarus ve ark., 2003), *Trichoderma asperellum* cf44-2 (Song ve ark., 2018), *Trichoderma* sp. Xy24 (Li ve ark., 2019) gibi birçok *Trichoderma* türünden hem bileşik olarak hem de türevleri halinde izole edilmiştir. Ergosterol bileşiği birçok biyoaktivitesinin yanı sıra D vitaminlerinin bileşimine girmesi ile önem arz etmektedir (Margalith, 1989). Çalışmamızda bu önemli bileşikler *Trichoderma virilente* mantarından ilk kez izole edilmişlerdir.

Nonanedioik asit dimetil ester bileşigi, Azelaik asit olarak da bilinen 1,7-heptan karboksilik asit bileşiginin dimetil esteridir (Garelnabi ve ark., 2010). Azelaik asit, doğal olarak oluşan genellikle tam tahıllarda ve bazı et ürünlerinde bulunan, anti-enflamatuar, antibakteriyel ve antikeratinizan etkileri gibi birçok faydalı özelliklere sahip doymuş bir dikarboksilik asittir. Rozase, akne, melazma, lentigo maligna, malign melanoma ve hatta perioral dermatiti tedavi etmek için çeşitli formülasyonlarda kullanılmıştır (Alzweiri ve ark., 2013; Garelnabi ve ark., 2010). Dimetil azelat (Nonanedioik asit dimetil ester) bileşigi, *Fucus* cinsi bir algin humus fraksiyonunun oksidasyon ürünü olan humik bileşiklerden biri olarak gösterilirken (Mendez ve Ogner, 1979), *Astragalus membranaceus* (Miyazawa ve Kameoka, 1987) ve *Pueraria lobata* (Miyazawa ve Kameoka, 1988) bitkilerinin kuru köklerinden elde edilen uçucu yağda bulunmuştur. Bu bileşik *Aspergillus niger* mantarından ilk kez izole edilmiştir.

Aspergillus niger ve *Trichoderma virilente* mantarlarından teşhis edilen maddelerin yanı sıra hem hekzan hem de metanol fazı ekstrelerinden madde izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Miktarlarının yetersiz olması sebebi ile teşhis analizleri gerçekleştirilemeyen maddeler olduğu kadar analiz sonuçlarına göre teşhisi henüz yapılamamış maddelerimiz de mevcuttur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye denizlerinden toplanan canlılardan elde edilen iki farklı mantar türü üzerine doktora çalışması gerçekleştirilmiştir. Farmakognozik açıdan değerlendirilen *Aspergillus niger* mantarından 8 adet, *Trichoderma virilente* mantarından 2 adet sekonder metabolit izole edilmiştir. Her bir mantarın etilasetat ekstresi üzerinde antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite çalışması gerçekleştirilirken, elde edilen Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikleri antialerjik ve antienflamatuar aktiviteleri yönünden değerlendirilmiştir.

Çanakkale kömür limanından toplanan *Microcosmus vulgaris* tunikatından elde edilen *Aspergillus niger* mantarının etilasetat ekstresi biyoaktivite testlerince değerlendirildiğinde *Trichoderma virilente* mantarına göre DPPH testinde daha yüksek antioksidan etkinlik gösterirken, diğer bakteri türleri ile karşılaştırıldığında *Bacillus subtilis* ATCC 6633 üzerinde daha fazla antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Ayrıca NCI sitotoksikite değer aralıkları ele alındığında *Aspergillus niger* mantarının etilasetat ekstresi, HCT116 hücre serisi üzerinde 4.428 µg/ml IC₅₀(<21 µg/ml) değeri ile güçlü sitotoksik etkinlik sergilediği görülmüştür. Ayvalık'tan toplanan *Axinella verrucosa* süngerinden izole edilen *Trichoderma virilente* mantarının etilasetat ekstresi *Aspergillus niger* mantarının ekstresine göre tüm biyoaktivite testlerinde daha düşük etkinlik gösterirken >40 µg/ml IC₅₀(<21 µg/ml) değeri ile orta düzeyde sitotoksik etki ile dikkat çekmektedir.

Mevcut literatür çalışmaları incelendiğinde *Aspergillus niger* mantarının hem karasal hem denizden elde edilen türleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Bizim elde etmiş olduğumuz bileşiklerden nafto-γ-piron yapısındaki Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone A, Aurasperone B bileşikleri ve bis-nafto-γ-piron

yapısındaki Fonsecinone D bileşiği, daha önceki deniz kaynaklı *Aspergillus niger* türü üzerine yapılan çalışmalarda da izole edilmişlerdir. Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikler ilk kez antialerjik ve antienflamatuvar aktivite testlerince değerlendirilirken Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikler süperoksit anyon jenerasyonu üzerinde sırasıyla gösterdikleri %86,22 ve %74,83 inhibisyon değerleri ile kayda değer antienflamatuvar bileşikler olarak belirlenmişlerdir Diğer izole edilen izomer bileşikler α,α -Trehalose, β,β -Trehalose bileşikler ve bir uçucu yağ bileşiği olan Nonanedioik asit dimetil ester, bu çalışmada ilk kez deniz kaynaklı *Aspergillus niger* türünden bildirilmektedirler. *Aspergillus niger* mantarının karasal türlerinin yanı sıra deniz kaynaklı türlerinin de önemi çalışmamızca desteklenmektedir.

Mevcut literatür çalışmaları sonucunda Rubrofusarin B bileşiğinin güçlü sitotoksik etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada *Aspergillus niger* matarının etilasetat ekstresinde gözlemlenen sitotoksik etkinliğin bu bileşikten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Sonraki aşamalarda elde ettiğimiz Rubrofusarin B bileşiği sitotoksisite testlerine tabi tutulması gerekmektedir.

Günümüze kadar *Trichoderma virilente* mantarı üzerine herhangi bir araştırma çalışması bulunmamaktadır. Hem karasal türlerine öncü olabilecek hem de deniz türleri için bir ilki teşkil eden bu çalışmada, biyoaktivite yönünden değerlendirilen *Trichoderma virilente* mantarından iki önemli sterol yapıda bileşik izole edilmiştir. Ergosterol ve β -Sitosterol bileşiklerin önemi mevcut çalışmalarla desteklenirken yeni bir sekonder metabolit doğal kaynağı olarak *Trichoderma virilente* mantarı değerlendirilmelidir. Çalışmamız, bu mantarın farmakognozik açıdan önemini ve üzerine daha fazla çalışmanın gerekliliğini kanıtlamaktadır.

Deniz kaynaklı mantarlar, hem ilk kez bulunabilecek sekonder metabolit için hem de mevcut çalışmalarca izole edilmiş olan bileşikler için yeni doğal kaynak özelliği taşımaktadır. Simbiyotik yaşam özellikleri sebebi ile üzerinde bulundukları canlı ile arasında sekonder metabolit alışverişi olabileceği düşünülmektedir. Bu yönde hem canlı hem mantar üzerine ortak çalışmaların yürütülmesi, bu karışıklığa bilimsel bir açıklama getirecektir. Çevresel şartların değişmesi ile aynı canlıdan aynı mantar elde edilmesine rağmen aynı sekonder metabolit üretilmeyebilir. Aynı zamanda farklı canlılardan izole edilen aynı mantar türünden aynı bileşikler de izole edilebilir. Mevcut çalışmalar da belirli bir standartın oluşması için henüz yetersizdir. Deniz kaynaklı mantarlar üzerine çalışmaların artması bu standartların belirlenmesinde önem teşkil etmektedir.

Son yıllarda deniz kaynaklarından elde edilen etken madde bileşiklerinin artması, FDA onayı alarak insan sağlığı üzerine ilaç olarak kullanılması deniz kaynakları üzerine yapılan çalışmaların önemini kanıtlamaktadır. Bu yönde ülkemiz denizlerinde çalışmaların artması gerekmektedir.

Elde ettiğimiz tüm sonuçlar ışığında, Türkiye denizlerinde bulunan canlılar, bilimsel çalışmalarda daha fazla değerlendirilmeyi hak etmektedir. Deniz kaynaklarımızı, buradaki tür çeşitliliğini en iyi şekilde korumalı, bu kaynaklar üzerine bilimsel çalışmaların mevcut bilim dünyasına kazandırılması aciliyet teşkil etmektedir.

Yaptığımız bu çalışma, deniz canlılarından elde edilen mantarlar üzerine yapılmış üçüncü doktora çalışmasıdır. Buradan elde ettiğimiz sonuçlar, ülkemiz denizlerinin bilimsel alanda yer almasına katkı sağlayacaktır.

ÖZET

***Aspergillus niger* ve *Trichoderma virilente* Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar**

Dünya yüzeyinin %70'inden fazlasını kaplayan deniz ekosistemi, muazzam bir yaşam çeşitliliğine ev sahipliği yapmaktadır. Son 20 yılda, araştırmacıların ilgileri deniz mikroorganizmalarının benzersiz ve ekstrem bir habitatta büyümesine ve dolayısıyla olağandışı sekonder metabolitler üretmesine yönelmiştir. Özellikle deniz mantarlarının, yeni ve özgün biyoaktif doğal ürünler ve potansiyel farmasötik önemi açısından zengin ve umut verici bir kaynak olduğu kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışması, Türkiye denizlerinden *Microcosmus vulgaris* (tunikat) türevi *Aspergillus niger* mantarı ve ayrıca *Axinella verrucosa* (sünger) türevi *Trichoderma virilente* mantarı üzerinde yapılmıştır. Her iki mantarın etilasetat ekstreleri üzerinde DPPH, SO, NO, ABTS yöntemleri ile antioksidan aktivite, MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite ve modifiye mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus niger* mantarlarının ekstresi 4,428 µg/mL IC50 değeri ile önemli sitotoksik aktivite gösterirken, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 üzerinde selektif antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Bilinen sekiz bileşik (Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone A, Aurasperone B, Fonsecinone D, Nonanedioik asit dimetil ester, α,α -Trehalose ve β,β -Trehalose) tunikat endofitik mantarı *Aspergillus niger* kültüründen ve sünger endofitik mantarı *Trichoderma virilente* kültüründen β -Sitosterol ve Ergosterol semi-preparatif YPSK ve preparatif İTK yöntemleri ile izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları, kütle spektrometrisinin yanı sıra bir ve iki boyutlu nükleer manyetik rezonans (NMR) ve GK-KS uygulanarak aydınlatılmıştır. *Aspergillus niger* mantarının etil asetat ekstresi NCI değerlerine göre güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir. İzole edilen Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşiklerinin antienflamatuar ve antialerjik aktiviteleri ilk kez incelenmiştir. Aurasperone B ve Fonsecinone D bileşikleri süperoksit anyon jenerasyonunun inhibisyonu açısından önemli antienflamatuar aktivite göstermişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışma literatür taramasına göre *Trichoderma virilente* üzerine yapılan ilk çalışmadır. Bu doktora tezi, ülkemizde deniz kaynaklı mantarlar üzerine yapılan üçüncü çalışmadır. Elde edilen tüm sonuçlar, ülkemizin yaklaşık 8400 km'lik bir kıyı şeridine sahip olması nedeniyle ilaç, kozmetik ve diğer endüstrilerde deniz mantarlarının değerlendirilmesi için büyük bir kaynak oluşturmaktadır. Bu tezden elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalara kaynak olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Antienflamatuar aktivite, *Aspergillus niger*, Deniz mantarları, Sekonder metabolit izolasyonu, *Trichoderma virilente*

SUMMARY

Pharmacognosic Studies on *Aspergillus niger* and *Trichoderma virilente* Fungi

Covering more than 70% of the Planet's surface, the marine ecosystem is home to an enormous diversity of life. Over the past 20 years, as researchers' interests have turned to marine microorganisms grow in a unique and extreme habitat and therefore, to produce unusual secondary metabolites. Especially marine fungi have proven to be a rich and promising source of new and novel bioactive natural products and potential pharmaceutical significance.

This thesis study was carried out on *Aspergillus niger* fungus derived from *Microcosmus vulgaris* (tunicate) and *Trichoderma virilente* fungus derived from *Axinella verrucosa* (sponge) which are from Turkey seas. Antioxidant activity by DPPH, SO, NO, ABTS methods, cytotoxic activity by MTT method and antimicrobial activity by modified microdilution method were performed on the ethylacetate extracts of both fungi. While the extract of *Aspergillus niger* fungi showed significant cytotoxic activity with 4.428 $\mu\text{g} / \text{mL}$ IC_{50} value, it showed selective antimicrobial activity on *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Eight known compounds (are Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone A, Aurasperone B, Fonsecinone D, Nonanedioic acid dimethyl ester, α,α -Trehalose and β,β -Trehalose) were isolated from the culture of the tunicate endophytic fungus *Aspergillus niger* and β -Sitosterol and Ergosterol from the culture of sponge endophytic fungus *Trichoderma virilente* were isolated by semi-preparative HPLC and preparative TLC methods. The structures of the compounds were elucidated by performing mass spectrometry as well as one and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) and GC-MS. *Aspergillus niger* ethyl acetate extract showed strong cytotoxic activity according to NCI values. Anti-inflammatory and antiallergic activities of isolated Rubrofusarin B, Flavasperone, Aurasperone B and Fonsecinone D compounds were investigated for the first time. Aurasperone B and Fonsecinone D compounds showed significant anti-inflammatory activity in terms of inhibition of superoxide anion generation.

In conclusion, it is the first study on *Trichoderma virilente* according to the literature review. This doctoral dissertation is the third study on marine derived fungi in our country. All the results obtained are a great resource for the evaluation of marine fungi in the pharmaceutical, cosmetics and other industries, because our country has a coastline of approximately 8400 km. The results obtained from this thesis will be a source for future studies.

Keywords: Anti-inflammatory activity, *Aspergillus niger*, Marin fungi, Secondary metabolite isolation, *Trichoderma virilente*

KAYNAKLAR

- ABE Y (1948). Aokabi no kintai seibun no kenkyu (dailpo) : eteru chushutsubutsu to tansuikabutsu ni tsuite. 慶應義塾大学藤原記念工学部研究報告, **1(3)**: 128(142)-133(147).
- ABRAHAM EP, NEWTON GG (1956). Experiments on the degradation of cephalosporin C. *The Biochemical journal*, **62(4)**: 658-665. doi:10.1042/bj0620658
- ABSALON MJ, SMITH FO (2009). Treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, **10(1)**: 57-79.
- AGARWAL S, RAO A (2000). Carotenoids and chronic diseases. *Drug metabolism and drug interactions*, **17(1-4)**: 189-210.
- AHLUWALIA V, KUMAR J, RANA VS, SATI OP, WALIA S (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural product research*, **29(10)**: 914-920.
- AINSWORTH GC. (1976). Introduction to the History of Mycology. (Ed.): Cambridge University Press.
- ALAMGIR ANM. (2017). Drugs: Their Natural, Synthetic, and Biosynthetic Sources. In: *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume I* Ed. 105-123.
- ALZWEIRI M, TARAWNEH R, KHANFAR MA (2013). Gas chromatography/trace analysis of derivatized azelaic acid as a stability marker. *Journal of separation science*, **36(19)**: 3200-3205.
- AMAGATA T, DOI M, OHTA T, MINOURA K, NUMATA A (1998). Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, gymnastatins A–E, from a *Gymnascella* species separated from a *Halichondria* sponge. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*(**21**): 3585-3600.

AMAANI, R., DWIRA, S. (2018, August). Phytochemical content an in vitro toxicity of Glycine soja ethanol extract on the A549 Lung cancer line cell. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1073, No. 3, p. 032042). IOP Publishing.

ANDERSON R, SHRINER R (1927). THE REDUCTION PRODUCTS OF CERTAIN PLANT STEROLS. *Journal of Biological Chemistry*, **71(2)**: 401-406.

ANTONOV AS, LESHCHENKO EV, ZHURAVLEVA OI, DYSHLOVOY SA, VON AMSBERG G, POPOV RS, DENISENKO VA, KIRICHUK NN, AFIYATULLOV SS (2021). Naphto- Γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus foetidus*. *Natural product research*, **35(1)**: 131-134.

BAI M, WANG Y, LIU T, LIAN Y-X, BAI Q-Q, SONG X-P, HAN C-R, ZHENG C-J, CHEN G-Y (2020). One new piperazinedione isolated from a mangrove-derived fungus *Aspergillus niger* JX-5. *Natural product research*: 1-7.

BARGHOORN ES, LINDER DH (1944). Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia*, **1(3)**: 395-467.

BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC, CODON AC (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, **7(4)**: 249-260.

BENNETT J (2009). *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical mycology*, **47(sup1)**: S5-S12.

BENNETT JW (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: molecular biology and genomics*: 1-17.

BÉRDY J (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, **58(1)**: 1-26. doi:10.1038/ja.2005.1

BERGMANN W, STEMPIEN MF (1957). Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosine1. *The Journal of Organic Chemistry*, **22(12)**: 1575-1577. doi:10.1021/jo01363a009

BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, MUNRO MH, PRINSEP MR (2013). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **30(2)**: 237-323. doi:10.1039/c2np20112g

BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, MUNRO MH, PRINSEP MR (2015). Marine natural products. *Natural product reports*, **32(2)**: 116-211.

BOOT CM, TENNEY K, VALERIOTE FA, CREWS P (2006). Highly N-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp. *J Nat Prod*, **69(1)**: 83-92. doi:10.1021/np0503653

BOUFRIDI A, QUINN RJ (2018). Harnessing the Properties of Natural Products. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **58**: 451-470. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010716-105029

BRINGMANN G, GULDER TA, LANG G, SCHMITT S, STÖHR R, WIESE J, NAGEL K, IMHOFF JF (2007). Large-scale biotechnological production of the antileukemic marine natural product sorbicillactone A. *Marine drugs*, **5(2)**: 23-30.

BRÖNSTRUP M, SASSE F (2020). Natural products targeting the elongation phase of eukaryotic protein biosynthesis. *Natural product reports*, **37(6)**: 752-762.

BROTZU G (1948). Ricerche su di un nuovo antibiotico. *Lav Inst Igiene Cagliari*, **1948**: 1-11.

BRÜCKNER H, GRAF H (1983). Paracelsin, a peptide antibiotic containing α -aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons Part A. *Experientia*, **39(5)**: 528-530.

BRÜCKNER H, GRAF H, BOKEL M (1984). Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. Part B. *Experientia*, **40(11)**: 1189-1197.

BUGNI TS, ABBANAT D, BERNAN VS, MAIESE WM, GREENSTEIN M, VAN WAGONER RM, IRELAND CM (2000). Yanuthones: Novel Metabolites from a Marine Isolate of *Aspergillus niger*. *The Journal of Organic Chemistry*, **65(21)**: 7195-7200.

- BUTLER MS (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, **67(12)**: 2141-2153.
- BYCROFT B, DOBSON T, ROBERTS JC (1962). 8. Studies in mycological chemistry. Part VIII. The structure of flavasperone (“asperxanthone”), a metabolite of *Aspergillus niger*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 40-44.
- CAMPOS FR, BARISON A, DAOLIO C, FERREIRA AG, RODRIGUES-FO E (2005). Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **43(11)**: 962-965.
- CANNELL RJ. (1998). How to approach the isolation of a natural product. In: *Natural products isolation* Ed.: Springer. 1-51.
- CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR (2020). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **37(2)**: 175-223. doi:10.1039/c9np00069k
- CARVALHO JM, PAIXÃO LKOD, DOLABELA MF, MARINHO PSB, MARINHO AMDR (2016). Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). *Acta Amazonica*, **46(1)**: 69-72.
- CHEN L, FU C, WANG G (2017). Microbial diversity associated with ascidians: a review of research methods and application. *Symbiosis*, **71(1)**: 19-26.
- CHEN L, HU J-S, XU J-L, SHAO C-L, WANG G-Y (2018). Biological and chemical diversity of ascidian-associated microorganisms. *Marine drugs*, **16(10)**: 362.
- CHEN Z, SONG Y, CHEN Y, HUANG H, ZHANG W, JU J (2012). Cyclic heptapeptides, cordyheptapeptides C-E, from the marine-derived fungus *Acremonium persicinum* SCSIO 115 and their cytotoxic activities. *J Nat Prod*, **75(6)**: 1215-1219. doi:10.1021/np300152d
- COSTA-NETO EM (2005). Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, **77(1)**: 33-43.

- COSTA L, FIDELIS G, CORDEIRO SL, OLIVEIRA R, SABRY DDA, CÂMARA R, NOBRE L, COSTA M, ALMEIDA-LIMA J, FARIAS E (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **64**(1): 21-28.
- COSTELLO MJ, BOUCHET P, BOXSHALL G, FAUCHALD K, GORDON D, HOEKSEMA BW, POORE GCB, VAN SOEST RWM, STÖHR S, WALTER TC, VANHOORNE B, DECOCK W, APPELTANS W (2013). Global Coordination and Standardisation in Marine Biodiversity through the World Register of Marine Species (WoRMS) and Related Databases. *PLOS ONE*, **8**(1): e51629. doi:10.1371/journal.pone.0051629
- CRAGG GM, GROTHAUS PG, NEWMAN DJ (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev*, **109**(7): 3012-3043. doi:10.1021/cr900019j
- CRAGG GM, NEWMAN DJ (2001). Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharm Biol*, **39 Suppl 1**: 8-17. doi:10.1076/phbi.39.sl.8.0009
- CRAGG GM, NEWMAN DJ (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, **77**(1): 7-24. doi:10.1351/pac200577010007
- CURRIE JN (1917). The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*, **31**(1): 15-37.
- DEBBAB A, ALY AH, LIN WH, PROKSCH P (2010). Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microb Biotechnol*, **3**(5): 544-563. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x
- DEEKS ED (2019). Polatuzumab vedotin: first global approval. *Drugs*, **79**(13): 1467-1475.
- DEGENKOLB T, VON DOEHREN H, FOG NIELSEN K, SAMUELS GJ, BRÜCKNER H (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & biodiversity*, **5**(5): 671-680.

- DELSUC F, BRINKMANN H, CHOURROUT D, PHILIPPE H (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, **439(7079)**: 965-968.
- DEMIRCI F, GUVEN K, DEMIRCI B, DADANDI M, BASER K (2008). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food control*, **19(12)**: 1159-1164.
- DEWICK PM. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. (Ed. second). John Wiley & Sons Ltd: West Sussex,UK.
- DIAS DA, URBAN S, ROESSNER U (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2(2)**: 303-336. doi:10.3390/metabo2020303
- DING L, LI T, LIAO X, HE S, XU S (2018). Asperitaconic acids A–C, antibacterial itaconic acid derivatives produced by a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *The Journal of Antibiotics*, **71(10)**: 902-904.
- DING L, REN L, LI S, SONG J, HAN Z, HE S, XU S (2019). Production of new antibacterial 4-hydroxy- α -pyrones by a marine fungus *Aspergillus niger* cultivated in solid medium. *Marine drugs*, **17(6)**: 344.
- DONIA M, HAMANN MT (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, **3(6)**: 338-348. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00655-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00655-8)
- DOU X, DONG B (2019). Origins and Bioactivities of Natural Compounds Derived from Marine Ascidians and Their Symbionts. *Mar Drugs*, **17(12)**. doi:10.3390/md17120670
- DUMOLLARD R, GAZO I, DL GOMES I, BESNARDEAU L, MCDOUGALL A (2017). Ascidians: An emerging marine model for drug discovery and screening. *Current topics in medicinal chemistry*, **17(18)**: 2056-2066.
- DUMONTET C, JORDAN MA (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, **9(10)**: 790-803.

- DUPONT S, LEMETAIS G, FERREIRA T, CAYOT P, GERVAIS P, BENEY L (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, **66(9)**: 2961-2968.
- DURAN R, ZUBIA E, ORTEGA MJ, NARANJO S, SALVÁ J (1998). Phallusides, new glucosphingolipids from the ascidian *Phallusia fumigata*. *Tetrahedron*, **54(48)**: 14597-14602.
- DYSHLOVOY SA, HONECKER F (2020). Marine Compounds and Cancer: Updates 2020. *Mar Drugs*, **18(12)**. doi:10.3390/md18120643
- EBADA SS, AL-JAWABRI NA, YOUSSEF FS, EL-KASHEF DH, KNEDEL T-O, ALBOHY A, KORINEK M, HWANG T-L, CHEN B-H, LIN G-H (2020). Anti-inflammatory, antiallergic and COVID-19 protease inhibitory activities of phytochemicals from the Jordanian hawksbeard: identification, structure–activity relationships, molecular modeling and impact on its folk medicinal uses. *RSC advances*, **10(62)**: 38128-38141.
- EBADA SS, PROKSCH P (2012). Bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi. *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*: 27-51.
- EL-SAYED M, VERPOORTE R (2007). Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochemistry Reviews*, **6(2)**: 277-305.
- EL SAYED KA. (2000). Natural Products as Antiviral Agents. In: *Studies in Natural Products Chemistry* Ed.: Atta ur, R.: Elsevier. Vol. 24, 473-572.
- EL SAYED KA, BARTYZEL P, SHEN X, PERRY TL, ZJAWIONY JK, HAMANN MT (2000). Marine Natural Products as Antituberculosis Agents. *Tetrahedron*, **56(7)**: 949-953. doi:[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)01093-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)01093-5)
- ELBEIN AD (1974). The metabolism of α , α -trehalose. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, **30**: 227-256.
- ERDMANN K, CHEUNG BW, SCHRÖDER H (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, **19(10)**: 643-654.

FABBRETTI A, GUALERZI CO, BRANDI L (2011). How to cope with the quest for new antibiotics. *FEBS Letters*, **585(11)**: 1673-1681. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.029>

FALA L (2013). Vascepa: First EPA-Only Omega-3 Therapy Approved by the FDA for Severe Hypertriglyceridemia.

FALLARINO M (1994). Tibetan medical paintings. *Herbalgram*, **31**: 38/34.

FANG W, LIN X, WANG J, LIU Y, TAO H, ZHOU X (2016). Asperpyrone-type bis-naphtho- γ -pyrones with COX-2-inhibitory activities from marine-derived fungus *Aspergillus niger*. *Molecules*, **21(7)**: 941.

FAULKNER DJ (2000). Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Natural product reports*, **17(1)**: 1-6. doi:10.1039/A909113K

FENICAL W (1976). Chemical variation in a new bromochamigrene derivative from the red seaweed *Laurencia pacifica*. *Phytochemistry*, **15(4)**: 511-512.

FIRSOVA D, MAHAJAN N, SOLANKI H, MORROW C, THOMAS OP. (2017). Current Status and Perspectives in Marine Biodiscovery. In: *Bioprospecting* Ed.: Springer. 29-50.

FRÖHLICH-NOWOISKY J, BURROWS SM, XIE Z, ENGLING G, SOLOMON PA, FRASER MP, MAYOL-BRACERO OL, ARTAXO P, BEGEROW D, CONRAD R, ANDREA MO, DESPRÉS VR, PÖSCHL U (2012). Biogeography in the air: fungal diversity over land and oceans. *Biogeosciences*, **9(3)**: 1125-1136. doi:10.5194/bg-9-1125-2012

GAL-HEMED I, ATANASOVA L, KOMON-ZELAZOWSKA M, DRUZHININA IS, VITERBO A, YARDEN O (2011). Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol*, **77(15)**: 5100-5109. doi:10.1128/AEM.00541-11

GALMARINI O, MASTRONARDI IO, PRIESTAP H (1974). Two novel metabolites of *Aspergillus fonsecaeus*. *Experientia*, **30(6)**: 586-586.

- GAMAL-ELDEEN AM, ABDEL-LATEFF A, OKINO T (2009). Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp. *Environ Toxicol Pharmacol*, **28(3)**: 317-322. doi:10.1016/j.etap.2009.05.010
- GARELNABI M, LITVINOV D, PARTHASARATHY S (2010). Evaluation of a gas chromatography method for azelaic acid determination in selected biological samples. *North American journal of medical sciences*, **2(9)**: 397.
- GAUTAM AK, SHARMA S, AVASTHI S, BHADAURIA R (2011). Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: an important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology*, **6(3)**: 270-280.
- GIANFRS. (2016). *Microcosmus vulgaris*. <https://www.inaturalist.org/photos/28552455>: iNaturalist.
- GIDDINGS L-A, NEWMAN DJ. (2019). Bioactive Compounds from Extremophilic Marine Fungi. In: *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* Ed. 349-382.
- GONZÁLEZ-MEDINA M, PRIETO-MARTÍNEZ FD, NAVEJA JJ, MÉNDEZ-LUCIO O, EL-ELIMAT T, PEARCE CJ, OBERLIES NH, FIGUEROA M, MEDINA-FRANCO JL (2016). Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. *Future Med Chem*, **8(12)**: 1399-1412. doi:10.4155/fmc-2016-0079
- GRAHAM JG, ZHANG H, PENDLAND SL, SANTARSIERO BD, MESECAR AD, CABIESES F, FARNSWORTH NR (2004). Antimycobacterial naphthopyrones from *Senna obliqua*. *Journal of Natural Products*, **67(2)**: 225-227.
- HANCOCK J. (2007). Pilocarpine. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* Ed.: Enna, S. J. Bylund, D. B., New York: Elsevier. 1-7.
- HANNA KS (2020). Enfortumab vedotin to treat urothelial carcinoma. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, **56(5)**: 329-335.
- HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M (2004). Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, **2(1)**: 43-56.

HARPUT ÜŞ, GENÇ Y, KHAN N, SARAÇOĞLU İ (2011). Radical scavenging effects of different Veronica species.

HIORT J, MAKSIMENKA K, REICHERT M, PEROVIĆ-OTTSTADT S, LIN W, WRAY V, STEUBE K, SCHAUMANN K, WEBER H, PROKSCH P (2004). New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, **67**(9): 1532-1543.

HONG W-H, CHANG T, DALY RE. (1986). Vidarabine. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* Ed.: Elsevier. Vol. 15, 647-672.

HORTON T, GOFAS S, KROH A, POORE GCB, READ G, ROSENBERG G, STÖHR S, BAILLY N, BOURY-ESNAULT N, BRANDÃO SN, COSTELLO MJ, DECOCK W, DEKEYZER S, HERNANDEZ F, MEES J, PAULAY G, VANDEPITTE L, VANHOORNE B, VRANKEN S (2017). Improving nomenclatural consistency: a decade of experience in the World Register of Marine Species. *European Journal of Taxonomy*(**389**). doi:10.5852/ejt.2017.389

HU GP, YUAN J, SUN L, SHE Z-G, WU J-H, LAN X-J, ZHU X, LIN Y-C, CHEN S-P (2011). Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*, **9**(4): 514-525. doi:10.3390/md9040514

HU Y, CHEN J, HU G, YU J, ZHU X, LIN Y, CHEN S, YUAN J (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar Drugs*, **13**(1): 202-221. doi:10.3390/md13010202

HUANG H-B, FENG X-J, LIU L, CHEN B, LU Y-J, MA L, SHE Z-G, LIN Y-C (2010). Three dimeric naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Medica*, **76**(16): 1888-1891.

HUANG HB, XIAO ZE, FENG XJ, HUANG CH, ZHU X, JU JH, LI MF, LIN YC, LIU L, SHE ZG (2011). Cytotoxic Naphtho- γ -pyrones from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E). *Helvetica Chimica Acta*, **94**(9): 1732-1740.

HUANG M-H, HUANG S-S, WANG B-S, WU C-H, SHEU M-J, HOU W-C, LIN S-S, HUANG G-J (2011). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, **133**(2): 743-750.

HUANG Z, SHAO C, CHEN Y, SHE Z, LIN Y (2007). Pyrones in metabolites of marine mangrove endophytic fungus (No. ZZ79) from the South China Sea. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*, **46**: 113-115.

HUSSAIN S, NOORANI R, QURESHI I (1975). Microbiological chemistry. Part I. Isolation and characterization of gliotoxin, ergosterol, palmitic acid and mannitolmetabolites of *Trichoderma hamatum* Bainier. *Pak. J. Sci. Ind. Res*, **18**: 221-243.

HUYCK TK, GRADISHAR W, MANUGUID F, KIRKPATRICK P. (2011). Eribulin mesylate: Nature Publishing Group.

IKEDA SI, SUGITA M, YOSHIMURA A, SUMIZAWA T, DOUZONO H, NAGATA Y, AKIYAMA SI (1990). *Aspergillus* species strain m39 produces two naphtho- γ -pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *International journal of cancer*, **45(3)**: 508-513.

IMHOFF JF, LABES A, WIESE J (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnology advances*, **29(5)**: 468-482.

JAKLITSCH WM (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, **63**: 1-91. doi:<https://doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>

JAKLITSCH WM, SAMUELS GJ, ISMAIEL A, VOGLMAYR H (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia*, **31**: 112-146. doi:10.3767/003158513X672234

JANG JH, KANO H, ADACHI K, SHIZURI Y (2006). Awajanomycin, a Cytotoxic γ -Lactone- δ -lactam Metabolite from Marine-Derived *Acremonium* sp. AWA16-1. *Journal of Natural Products*, **69(9)**: 1358-1360. doi:10.1021/np060170a

JAT J, AGALAVE H (2013). Antagonistic properties of *Trichoderma* species against oilseed-borne fungi. *Science Research Reporter*, **3(2)**: 171-174.

JENSEN PR, FENICAL W (2000). Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. *Drugs from the Sea*: 6-29.

JIN L, QUAN C, HOU X, FAN S (2016). Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. *Mar Drugs*, **14(4)**. doi:10.3390/md14040076

JOHNSON TWJ, SPARROW FK. (1961). Fungi in oceans and estuaries. (Ed.): J. Cramer, Weinheim.

KAMALA T, DEVI SI (2012). Biocontrol properties of indigenous Trichoderma isolates from North-east India against Fusarium oxysporum and Rhizoctonia solani. *African Journal of Biotechnology*, **11(34)**: 8491-8499.

KATAOKA Y, UNO K, PURI R, NICHOLLS SJ (2013). Epanova® and hypertriglyceridemia: pharmacological mechanisms and clinical efficacy. *Future Cardiol*, **9(2)**: 177-186. doi:10.2217/fca.13.4

KATZ L, BALTZ RH (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **43(2-3)**: 155-176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5

KAYSER O, KIDERLEN AF, CROFT SL. (2002). Natural products as potential antiparasitic drugs. In: *Studies in Natural Products Chemistry* Ed.: Atta ur, R.: Elsevier. Vol. 26, 779-848.

KIJJOA A, SAWANGWONG P (2004). Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine drugs*, **2(2)**: 73-82.

KIM D-C, MINH HA T, SOHN JH, YIM JH, OH H (2020). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from a marine-derived fungal strain aspergillus sp. SF-5929. *Natural product research*, **34(5)**: 675-682.

KIM S-K. (2012a). Marine Pharmacognosy: Trends and Applications. (Ed.): CRC press.

KIM S-K. (2012b). Past, Present and Future of Marine Pharmacognosy. In: *Marine Pharmacognosy Trends and Applications* Ed.: Kim, S.-K. 1-6.

KIM S-K, MENDIS E (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts—a review. *Food Research International*, **39(4)**: 383-393.

KIM S-K, RAJAPAKSE N (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate polymers*, **62(4)**: 357-368.

KIM S-K, WIJESEKARA I (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional foods*, **2(1)**: 1-9.

KIM SK, DAI NGHIEP N, RAJAPAKSE N (2006). Therapeutic perspectives of chitin, chitosan and their derivatives. *Journal of Chitin Chitosan*, **11(1)**: 1-10.

KOBAYASHI M, UEHARA H, MATSUNAMI K, AOKI S, KITAGAWA I (1993). Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*. *Tetrahedron letters*, **34(49)**: 7925-7928.

KOHLMEYER J, KOHLMEYER E. (1979). *Marine Mycology: The higher fungi*. (Ed.): Academic Press, New York.

KONU KLUGIL B, GOZCELIOGLU B. (2020). Fungal Isolates from Turkey. from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT273953>

KORINEK M, TSAI Y-H, EL-SHAZLY M, LAI K-H, BACKLUND A, WU S-F, LAI W-C, WU T-Y, CHEN S-L, WU Y-C (2017). Anti-allergic hydroxy fatty acids from *Typhonium blumei* explored through ChemGPS-NP. *Frontiers in pharmacology*, **8**: 356.

KORINEK M, WAGH VD, LO I-W, HSU Y-M, HSU H-Y, HWANG T-L, WU Y-C, CHENG Y-B, CHEN B-H, CHANG F-R (2016). Antiallergic phorbol ester from the seeds of *Aquilaria malaccensis*. *International journal of molecular sciences*, **17(3)**: 398.

KUSARI S, ZÜHLKE S, SPITELLER M (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*, **72(1)**: 2-7.

- LAHLOU M (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, **04(03)**: 17-31. doi:10.4236/pp.2013.43A003
- LEE YM, KIM MJ, LI H, ZHANG P, BAO B, LEE KJ, JUNG JH (2013). Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. *Mar Biotechnol (NY)*, **15(5)**: 499-519. doi:10.1007/s10126-013-9506-3
- LEUTOU AS, YUN K, SON BW (2016). Induced production of 6, 9-dibromoflavasperone, a new radical scavenging naphthopyranone in the marine-mudflat-derived fungus *Aspergillus niger*. *Archives of pharmacal research*, **39(6)**: 806-810.
- LI D-H, HAN T, GUAN L-P, BAI J, ZHAO N, LI Z-L, WU X, HUA H-M (2016). New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their in vitro antiproliferative activity. *Natural product research*, **30(10)**: 1116-1122.
- LI M-F, LI G-H, ZHANG K-Q (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, **9(3)**: 58.
- LIMA MA, DE OLIVEIRA MDC, PIMENTA A, UCHÔA P (2019). *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. doi:10.21577/0103-5053.20190080
- LINDBERG B, MISIORNY A, WACHTMEISTER C (1955). Studies on the chemistry of lichens. *Acta Chemica Scandinavica*, **9**: 917-919.
- LINDBERG B, WICKBERG B (1953). STUDIES ON THE CHEMISTRY OF LICHENS. 3. DISACCHARIDES FROM UMBILICARIA-PUSTULATA (L) HOFFM. *Acta Chemica Scandinavica*, **7(1)**: 140-142.
- LIU D, LI X-M, MENG L, LI C-S, GAO S-S, SHANG Z, PROKSCH P, HUANG C-G, WANG B-G (2011). Nigerapyrones A–H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Journal of Natural Products*, **74(8)**: 1787-1791.
- LIU D, LI XM, LI CS, WANG BG (2013). Nigerasterols A and B, Antiproliferative Sterols from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Helvetica Chimica Acta*, **96(6)**: 1055-1061.

LIU J-X, ZHANG J-H, LI H-H, LAI F-J, CHEN K-J, CHEN H, LUO J, GUO H-C, WANG Z-H, LIN S-Z (2012). Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential. *Oncol Rep*, **28(6)**: 1991-1996. doi:10.3892/or.2012.2042

LOGES LA, SILVA DB, PAULINO GV, LANDELL MF, MACEDO AJ (2020). Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo. *Microbial pathogenesis*, **143**: 104066.

LÓPEZ-LEGENTIL S, ERWIN PM, TURON M, YARDEN O (2015). Diversity of fungi isolated from three temperate ascidians. *Symbiosis*, **66(2)**: 99-106.

MALVE H (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, **8(2)**: 83.

MARGALITH P. (1989). Vitamin D: the biotechnology of ergosterol. In: *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors* Ed.: Springer. 81-93.

MARKHAM A (2020a). Belantamab Mafodotin: First Approval. *Drugs*: 1-7.

MARKHAM A (2020b). Lurbinectedin: first approval. *Drugs*: 1-9.

MATSUMOTO T, HIRAI C (1955). On the Sterols of fresh Water Green Algae "Elodea densa planchon" & "Elodea densa planchon". *Nippon kagaku zasshi*, **76(7)**: 830-831. doi:10.1246/nikkashi1948.76.830

MATSUO, T., TSUCHIDA, Y., & MORIMOTO, N. (2002). Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology*, **109(11)**, 2024-2029.

MAYER AM, RODRIGUEZ AD, BERLINCK RG, FUSETANI N (2011). Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **153(2)**: 191-222. doi:10.1016/j.cbpc.2010.08.008

- MAYER AMS. (2021). Marine Pharmaceutical: The Clinical Pipeline. <https://www.midwestern.edu/departments/marinepharmacology/clinical-pipeline.xml>. Erişim Tarihi: [26 January 2021]
- MAYER AMS, GLASER KB, CUEVAS C, JACOBS RS, KEM W, LITTLE RD, MCINTOSH JM, NEWMAN DJ, POTTS BC, SHUSTER DE (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in pharmacological sciences*, **31(6)**: 255-265.
- MENDEZ J, OGNER G (1979). Permanganate oxidation products of algal humic-like substances. *Chemical Geology*, **27(3)**: 265-270.
- MISHRA BB, TIWARI VK (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem*, **46(10)**: 4769-4807. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.057
- MIYAZAWA M, KAMEOKA H (1987). Volatile flavor components of astragali radix (Astragalus membranaceus Bunge). *Agricultural and Biological Chemistry*, **51(11)**: 3153-3154.
- MIYAZAWA M, KAMEOKA H (1988). Volatile flavor components of Puerariae radix (Pueraria lobata Ohwi). *Agricultural and Biological Chemistry*, **52(4)**: 1053-1055.
- MOLINSKI TF, DALISAY DS, LIEVENS SL, SALUDES JP (2009). Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, **8(1)**: 69-85. doi:10.1038/nrd2487
- MONTAGNE JFC. (1879). Sylloge generum specierumque cryptogamarum quas in variis operibus descriptas iconibusque illustratas, nunc ad diagnosim reductas, nonnullasque novas interjectas, ordine systematico disposuit JFCM. (Ed.).
- MOSDAM T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*, **65**: 55-63.
- MUKHERJEE PK. (2019). Chapter 2 - Ethnopharmacology and Ethnomedicine-Inspired Drug Development. In: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs* Ed.: Mukherjee, P. K.: Elsevier. 29-51.

- MURTI Y, AGRAWAL T (2010). Marine derived pharmaceuticals-development of natural health products from marine biodiversity. *International Journal of Chem Tech Research*, **2(4)**: 2198-2217.
- NAGASHIMA H, NAKAMURA S, NISIZAWA K (1969). Isolation and identification of low molecular weight carbohydrates from a red alga, *Serraticardia maxima*. *Shokubutsugaku Zasshi*, **82(976)**: 379-386.
- NAGIA MM, EL-METWALLY MM, SHAABAN M, EL-ZALABANI SM, HANNA AG (2012). Four butyrolactones and diverse bioactive secondary metabolites from terrestrial *Aspergillus flavipes* MM2: isolation and structure determination. *Organic and medicinal chemistry letters*, **2(1)**: 1-8.
- NASTRUCCI C, CESARIO A, RUSSO P (2012). Anticancer drug discovery from the marine environment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **7(2)**: 218-232. doi:10.2174/157489212799972963
- NEUMANN K. (2009). Marine-derived fungi: a source for structurally new and bioactive secondary metabolites. (Ed.): Citeseer.
- NEWMAN DJ, CRAGG GM (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, **75(3)**: 311-335. doi:10.1021/np200906s
- NEWMAN DJ, CRAGG GM (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, **83(3)**: 770-803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
- NEWTON GG, ABRAHAM EP (1955). Cephalosporin C, a New Antibiotic containing Sulphur and D- α -Aminoadipic Acid. *Nature*, **175(4456)**: 548-548. doi:10.1038/175548a0
- NEWTON GG, ABRAHAM EP (1956). Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -aminoadipic acid. *The Biochemical journal*, **62(4)**: 651-658. doi:10.1042/bj0620651
- PALANISAMY SK, RAJENDRAN N, MARINO A (2017). Natural products diversity of marine ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and successful drugs in clinical development. *Natural products and bioprospecting*, **7(1)**: 1-111.

PERDICARIS S, VLACHOGIANNI T, VALAVANIDIS A (2013). Bioactive natural substances from marine sponges: new developments and prospects for future pharmaceuticals. *Nat. Prod. Chem. Res*, **1(3)**: 2329-6836.

PERSOON CH (1794). Disposita methodical fungorum. *Romers Neues Mag Bot*, **1**: 81-128.

PETTIT GR, KAMANO Y, HERALD CL, TUINMAN AA, BOETTNER FE, KIZU H, SCHMIDT JM, BACZYNSKYI L, TOMER KB, BONTEMS RJ (1987). The Isolation and Structure of a Remarkable Marine Animal Antineoplastic Constituent: Dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, **109(22)**: 6883-6885. doi:10.1021/ja00256a070

PRIESTAP H (1984). New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*. *Tetrahedron*, **40(19)**: 3617-3624.

PRIESTAP HA (1986). ¹³C NMR spectroscopy of naphtho- γ -pyrones. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **24(10)**: 875-878.

QU X-B, SU Z-M, HU D-H, BAO Y-L, MENG X-Y, WU Y, LI Y-X (2009). Studies on molecular structure of hypericin and its interactions with HIV-1 protease. By molecular modeling. *Chem. J. Chin. Univ*, **30**: 1402-1405.

RADJASA OK, VASKE YM, NAVARRO G, VERVOORT HC, TENNEY K, LININGTON RG, CREWS P (2011). Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associants. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **19(22)**: 6658-6674. doi:10.1016/j.bmc.2011.07.017

RATEB ME, EBEL R (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat Prod Rep*, **28(2)**: 290-344. doi:10.1039/c0np00061b

RAUCK RL, WALLACE MS, BURTON AW, KAPURAL L, NORTH JM (2009). Intrathecal ziconotide for neuropathic pain: a review. *Pain Practice*, **9(5)**: 327-337.

RINEHART KL (2008). Secondary metabolites from marine organisms. *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, **752**: 236.

- RIVERA-CHÁVEZ J, RAJA HA, GRAF TN, GALLAGHER JM, METRI P, XUE D, PEARCE CJ, OBERLIES NH (2017). Prealamethicin F50 and related peptaibols from *Trichoderma arundinaceum*: validation of their authenticity via in situ chemical analysis. *RSC advances*, **7(72)**: 45733-45741.
- ROSLUND MU, TÄHTINEN P, NIEMITZ M, SJÖHOLM R (2008). Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and JH, H coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydrate research*, **343(1)**: 101-112.
- RUDALI G, MENETRIER L (1967). Action of geranyl-hydroquinone on different spontaneous and induced cancers in the mouse. *Therapie*, **22(4)**: 895-904.
- SAKAI K, OHTE S, OHSHIRO T, MATSUDA D, MASUMA R, RUDEL LL, TOMODA H (2008). Selective inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 2 isozyme by flavasperone and sterigmatocystin from *Aspergillus* species. *The Journal of Antibiotics*, **61(9)**: 568-572.
- SAKURAI M, KOHNO J, YAMAMOTO K, OKUDA T, NISHIO M, KAWANO K, OHNUKI T (2002). TMC-256A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by *Aspergillus niger* var *niger* TC 1629. *The Journal of Antibiotics*, **55(8)**: 685-692.
- SALOMON CE, MAGARVEY NA, SHERMAN DH (2004). Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep*, **21(1)**: 105-121. doi:10.1039/b301384g
- SAMUEL P, PRINCE L, PRABAKARAN P (2011). Antibacterial Activity of Marine derived Fungi Collected from South East Coast of Tamilnadu, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **1(4)**: 86-94.
- SAMUELSSON G, BOHLIN L. (1999). Drugs of natural origin. A textbook of pharmacognosy, 4 Eds: Swedish Pharmaceutical Press, Sweden.
- SAN-MARTIN A, NEGRETE R, ROVIROSA J (1991). Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from chilean *Plocamium cartilagineum*.

Phytochemistry, **30(7)**: 2165-2169. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83607-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83607-M)

SANTHANAM R, RAMESH S. (2019). Biology and Ecology of Pharmaceutical Marine Tunicates. (Ed.): CRC Press.

SARKER SD, LATIF Z, GRAY AI. (2006). Natural Product Isolation. In: *Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology* Ed.: Sarker S.D., L. Z., Gray A.I. : Humana Press. Vol. 20.

SAVARD K, GRANT GA (1946). Ergosterol from the mycelium of *Penicillium notatum* (submerged culture). *Science (Washington)*, **104**: 459-460.

SCHLINGMANN G, TANIGUCHI T, HE H, BIGELIS R, YANG HY, KOEHN FE, CARTER GT, BEROVA N (2007). Reassessing the structure of pyranonigrin. *Journal of Natural Products*, **70(7)**: 1180-1187.

SCHLUBACH HH, MAURER K (1925). Synthesen von Polysacchariden, I.: Synthese einer Iso-trehalose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **58(6)**: 1178-1184.

SCHMIDT EW (2015). The secret to a successful relationship: lasting chemistry between ascidians and their symbiotic bacteria. *Invertebrate Biology*, **134(1)**: 88-102.

SCHREIBER L, KJELDSSEN KU, FUNCH P, JENSEN J, OBST M, LÓPEZ-LEGENTIL S, SCHRAMM A (2016). Endozoicomonas are specific, facultative symbionts of sea squirts. *Frontiers in microbiology*, **7**: 1042.

SCHUEFFLER A, ANKE T (2014). Fungal natural products in research and development. *Natural product reports*, **31(10)**: 1425-1448.

SCHUSTER A, SCHMOLL M (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. *Applied microbiology and biotechnology*, **87(3)**: 787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1

- SHAABAN M, SHAABAN KA, ABDEL-AZIZ MS (2012). Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties. *Organic and medicinal chemistry letters*, **2(1)**: 1-8.
- SHAHIDI F, ZHONG Y (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*, **91(4)**: 914-931.
- SHENKAR N, SWALLA BJ (2011). Global diversity of Ascidiacea. *PLOS ONE*, **6(6)**: e20657.
- SHIRWAIKAR A, SHIRWAIKAR A, RAJENDRAN K, PUNITHA ISR (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29(9)**: 1906-1910.
- SINGH P, RAGHUKUMAR C, MEENA R, VERMA P, SHOUCHE Y (2012). Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology*, **5**: 543-553.
- SIRIWARDANE A, KUMAR NS, JAYASINGHE L, FUJIMOTO Y (2015). Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*. *Natural product research*, **29(14)**: 1384-1387.
- SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1 (Harman GE & Kubicek CP, eds): Taylor and Francis Ltd, London.
- SONG Y-P, SHI Z-Z, MIAO F-P, FANG S-T, YIN X-L, JI N-Y (2018). Tricholumin A, a highly transformed ergosterol derivative from the alga-endophytic fungus *Trichoderma asperellum*. *Organic Letters*, **20(19)**: 6306-6309.
- SONG Y, LI H, YE Y, SHAN C, YANG Y, TAN R (2004). Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*, **241(1)**: 67-72.
- STAATS PS, YEARWOOD T, CHARAPATA SG, PRESLEY RW, WALLACE MS, BYAS-SMITH M, FISHER R, BRYCE DA, MANGIERIEA, LUTHER RR (2004). Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *Jama*, **291(1)**: 63-70.

STROBEL G, STIERLE A, STIERLE D, HESS W (1993). *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon*, **47**: 71-80.

SU D, DING L, HE S (2018). Marine-derived *Trichoderma* species as a promising source of bioactive secondary metabolites. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **18(20)**: 1702-1713.

SUDEK S, LOPANIK NB, WAGGONER LE, HILDEBRAND M, ANDERSON C, LIU H, PATEL A, SHERMAN DH, HAYGOOD MG (2007). Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod*, **70(1)**: 67-74. doi:10.1021/np060361d

SUN Y, CAI Y, HUSE SM, KNIGHT R, FARMERIE WG, WANG X, MAI V (2012). A large-scale benchmark study of existing algorithms for taxonomy-independent microbial community analysis. *Briefings in bioinformatics*, **13(1)**: 107-121.

TAN RX, ZOU WX (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, **18(4)**: 448-459. doi:10.1039/b100918o

TANAKA H, WANG P-L, YAMADA O (1966). Yellow Pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori* Part I Isolation of Aurasperone A and Related Pigments. *Agricultural and Biological Chemistry*, **30(2)**: 107-113.

TARUS P, LANG'AT-THORUWA C, WANYONYI A, CHHABRA S (2003). Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **17(2)**.

THAKUR NL, THAKUR AN (2006). Marine biotechnology: an overview.

THOM C, CHURCH MB (1926). The aspergilli. *The Aspergilli*.

THOMAS X (2009). Chemotherapy of acute leukemia in adults. *Expert opinion on pharmacotherapy*, **10(2)**: 221-237.

TIEGHEM PV. (1867). *Description d'une nouvelle espèce d'Aspergillus: A. niger*. Paper presented at the Annales des Sciences Naturelles Botanique.

TIQUIA-ARASHIRO SM. (2012). Molecular biological technologies for ocean sensing. In: *Springer Protocol Handbooks* Ed.: Tiquia-Arashiro, S. M., Totowa, NJ: Humana Press. 295.

TSAI P-J, TSAI T-H, YU C-H, HO S-C (2007). Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chemistry*, **103(1)**: 181-187.

UCHOA PKS, PIMENTA AT, BRAZ-FILHO R, DE OLIVEIRA MDCF, SARAIVA NN, RODRIGUES BS, PFENNING LH, ABREU LM, WILKE DV, FLORÊNCIO KG (2017). New cytotoxic furan from the marine sediment-derived fungi *Aspergillus niger*. *Natural product research*, **31(22)**: 2599-2603.

UI H, SHIOMI K, YAMAGUCHI Y, MASUMA R, NAGAMITSU T, TAKANO D, SUNAZUKA T, NAMIKOSHI M, OMURA S (2001). Nafuredin, a novel inhibitor of NADH-fumarate reductase, produced by *Aspergillus niger* FT-0554. *The Journal of Antibiotics*, **54(3)**: 234-238.

VARGA J, FRISVAD JC, KOCSUBÉ S, BRANKOVICS B, TÓTH B, SZIGETI G, SAMSON R (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, **69**: 1-17.

VAROGLU M, CORBETT TH, VALERIOTE FA, CREWS P (1997). Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*. *The Journal of Organic Chemistry*, **62(21)**: 7078-7079.

VAROGLU M, CREWS P (2000). Biosynthetically diverse compounds from a saltwater culture of sponge-derived *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, **63(1)**: 41-43.

VERWEIJ J (2009). Soft tissue sarcoma trials: one size no longer fits all. *J Clin Oncol*, **27(19)**: 3085-3087. doi:10.1200/jco.2009.21.8180

WAGNER L, KENREIGH C. (2007). Digitoxin. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* Ed.: Enna, S. J. Bylund, D. B., New York: Elsevier. 1-5.

- WANG KW, DING P (2018). New Bioactive Metabolites from the Marine-derived Fungi *Aspergillus*. *Mini Rev Med Chem*, **18(13)**: 1072-1094. doi:10.2174/1389557518666180305160856
- WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGON P, MCPHAIL AT (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, **93(9)**: 2325-2327.
- WATERS AL, HILL RT, PLACE AR, HAMANN MT (2010). The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Current opinion in biotechnology*, **21(6)**: 780-786.
- WATTERS DJ (2018). Ascidian toxins with potential for drug development. *Marine drugs*, **16(5)**: 162.
- WILLIAMS JD (1999). Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*, **12 Suppl 1**: S3-7; discussion S26-27. doi:10.1016/s0924-8579(99)00085-0
- WOOD EJ (1993). Murder, magic and medicine, by John Mann. pp 232. Oxford university press. 1992. £16.95 ISBN 0-19-855561-X. *Biochemical Education*, **21(2)**: 112-112. doi:10.1016/0307-4412(93)90074-a
- WOODWARD RB, DOERING WE (1944). THE TOTAL SYNTHESIS OF QUININE1. *Journal of the American Chemical Society*, **66(5)**: 849-849. doi:10.1021/ja01233a516
- WU ZJ, OUYANG MA, SU RK, GUO YX (2008). Two new cerebrosides and anthraquinone derivatives from the marine fungus *Aspergillus niger*. *Chinese Journal of Chemistry*, **26(4)**: 759-764.
- WYATT G, KALF G (1957). The chemistry of insect hemolymph II. Trehalose and other carbohydrates. *Journal of General Physiology*, **40(6)**: 833-847.
- XU K, GUO C, MENG J, TIAN H, GUO S, SHI D (2019). Discovery of natural dimeric naphthopyrones as potential cytotoxic agents through ROS-mediated apoptotic pathway. *Marine drugs*, **17(4)**: 207.

- XUAN Q-C, HUANG R, MIAO C-P, CHEN Y-W, ZHAI Y-Z, SONG F, WANG T, WU S-H (2014). Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. ym 311505 of *Azadirachta indica*. *Chemistry of Natural Compounds*, **50(1)**: 139-141.
- YANG C, CHEN ZY, WONG SL, LIU J, LIANG YT, LAU CW, LEE HK, HUANG Y, TSANG SY (2012). β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovascular Research*, **97(3)**: 520-532. doi:10.1093/cvr/cvs370
- YAP TA, CARDEN CP, KAYE SB (2009). Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*, **9(3)**: 167-181. doi:10.1038/nrc2583
- YE YH, ZHU HL, SONG YC, LIU JY, TAN RX (2005). Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002. *Journal of Natural Products*, **68(7)**: 1106-1108.
- ZAIN UL ARIFEEN M, MA YN, XUE YR, LIU CH (2019). Deep-Sea Fungi Could Be the New Arsenal for Bioactive Molecules. *Mar Drugs*, **18(1)**. doi:10.3390/md18010009
- ZANSKAR. (2018). *Axinella verrucosa*. <https://www.inaturalist.org/photos/19867479>: iNaturalist.
- ZEILINGER S, GRUBER S, BANSAL R, MUKHERJEE PK (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, **30(2)**: 74-90. doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001
- ZHANG J-C, CHEN G-Y, LI X-Z, HU M, WANG B-Y, RUAN B-H, ZHOU H, ZHAO L-X, ZHOU J, DING Z-T (2017). Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Natural product research*, **31(23)**: 2745-2752.
- ZHANG P-P, SONG S, LANG J-J, JIA C-X, YAN S-J, LIU L, CHEN S-H, LI J (2018). A new diphenolic metabolite isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus niger* 102. *Journal of Asian natural products research*.
- ZHANG Y, LI X-M, FENG Y, WANG B-G (2010). Phenethyl- α -pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Natural product research*, **24(11)**: 1036-1043.

ZHANG Y, LI X-M, PROKSCH P, WANG B-G (2007). Ergosterimide, a new natural Diels–Alder adduct of a steroid and maleimide in the fungus *Aspergillus niger*. *Steroids*, **72(9-10)**: 723-727.

ZHANG Y, LI X-M, WANG B-G (2007). Nigerasperones A~ C, new monomeric and dimeric naphtho- γ -pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *The Journal of Antibiotics*, **60(3)**: 204-210.

ZHANG Y, LI XM, WANG CY, WANG BG (2007). A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Chinese Chemical Letters*, **18(8)**: 951-953.

ZHANG Y, LING S, FANG Y, ZHU T, GU Q, ZHU WM (2008). Isolation, Structure Elucidation, and Antimycobacterial Properties of Dimeric Naphtho- γ -pyrones from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus carbonarius*. *Chemistry & biodiversity*, **5(1)**: 93-100.

ZHOU X, FANG W, TAN S, LIN X, XUN T, YANG B, LIU S, LIU Y (2016). Aspernigrins with anti-HIV-1 activities from the marine-derived fungus *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26(2)**: 361-365.

ZIN WWM. (2018). *Bioactive Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungi*. (Doctor Doctor), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, ProQuest (10820758)

ZJAWIONY JK (2004). Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *J Nat Prod*, **67(2)**: 300-310. doi:10.1021/np030372w

ÖZGEÇMİŞ

I- Kişisel Bilgiler

Ad: Zehra

Soyad: TORUN

Uyruğu: T.C

II- Eğitimi

Doktora: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü/Farmakognozi Anabilim Dalı (2017-2021)

Lisans: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2011 - 2016)

Yabancı Dil: İngilizce (YÖKDİL:73.75)

III- Bilimsel Yayınları:

Torun, Z, Konuklugil, B. (2020). Makroalglerin Prebiyotik Etkileri. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37 (1), 1-1. Retrieved from <http://www.egejfas.org/tr/issue/46987/591146>

IV- Katıldığı Bilimsel Etkinlikler

Uras, İ, **Torun, Z**, Konuklugil, B. Detection and Quantitative Analysis of Sesamin in Various Selected Cultivated Turkish Sesames, Sözlü Sunum, International Congress of Engineering and Natural Sciences 7 Mayıs 2021, 9 Mayıs 2021

Torun, Z, Konuklugil, B, Ebada, SS. Secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus niger*, Sözlü Sunum, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 19 Mart 2020, 20 Mart 2020.

Torun, Z, Heydari, H, Konuklugil, B, Secondary metabolites and bioactivity screening of marine-derived fungi *Trichoderma virilente* from Turkey's coast, Sözlü Sunum, 2nd International Conference on "Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry: Advances and Challenges in Understanding the Mechanism of Diseases" 24 Ekim 2019, 26 Ekim 2019.

Uras, İ, **Torun, Z**, Pilevneli AD, Konuklugil, B. Essential Oil Quantity And Composition From 4 Cultivars Of Organically Grown Lavender And Lavandin, Poster Sunumu, 12th International Symposium On Pharmaceutical Sciences, 26 Haziran 2018, 29 Haziran 2018.

V- Katıldığı Seminerler

Zehra TORUN, 'Shimadzu'dan İleri Analitik Teknolojiler ve Kolon Semineri', Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Katılım Belgesi, 19 Ekim 2017

VI- Burslar

Zehra TORUN, YÖK 100/2000 Doktora Bursları, Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları (2018-2021)

VII- Bağlı Olduğu Kuruluşlar

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği- Mezun üye (2016-)

Tema Vakfı (Türkiye Erozyonla Mücadele Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı)- Gönüllü üye (2021-)

Ucim Derneği-(Saadet Öğretmen Çocuk İstismarı İle Mücadele Derneği)- Gönüllü üye (2021-)