



**KÜF SEKONDER METABOLİTLERİNİN İNSAN
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER
VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN BAZI HÜCRE
YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Gürkan AYKUTOĞLU

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**KÜF SEKONDER METABOLİTLERİNİN İNSAN KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN BAZI HÜCRE
YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Anti-Cancer and Apoptotic Effects of Mold Secondary Metabolites on
Human Cancer Cells Through Some Cell Pathways)

DOKTORA TEZİ

Gürkan AYKUTOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Erzurum

Eylül, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Gürkan AYKUTOĞLU tarafından hazırlanan “**Küf Sekonder Metabolitlerinin İnsan Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser ve Apoptotik Etkilerinin Bazı Hücre Yolakları Üzerinden Araştırılması**” başlıklı çalışması 06/09/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Özlem BARIŞ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Hakan ÖZKAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Nevzat ESİM <i>Bingöl Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../....
tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında sunulan “**Küf Sekonder Metabolitlerinin İnsan Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser ve Apoptotik Etkilerinin Bazı Hücre Yolakları Üzerinden Araştırılması**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	10	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Yöntem	13	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	8	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	12	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Gürkan Aykutoğlu	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN
6.9.2024	6.9.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

BaŐta doktora eğitimim boyunca zamanını, bilgisini ve desteğini hiğbir zaman esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan ęok değerli danıŐmanım Prof. Dr. Mesut TAŐKIN'a, Tezimin deney aŐamasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye ve Öğr. Gör. Meryem DOYMUŐ'a, Doktora eğitimim boyunca manevi desteğinden dolayı Prof. Dr. Nevzat ESİM'e, Bingöl Üniversitesi'ndeki tüm iŐ arkadaşlarıma ve hocalarıma, evlendiğimiz günden beri beni her konuda destekleyen, arkamda duran, tüm ęalıŐma hayatım boyunca desteğini esirgemeyen canım eŐim AyŐe AYKUTOĐLU'na, varlıkları ile beni hayata bağlayan ve yaŐama sevincim olan evimin neŐesi değerli kızlarım Sümeyra Ayšın ve Ahsen Bilge'ye ayrı ayrı ęok teŐekkür ederim.

Gürkan AYKUTOĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KÜF SEKONDER METABOLİTLERİNİN İNSAN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN BAZI HÜCRE YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI

Gürkan AYKUTOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Amaç: Filamentli mikrofunguslar çeşitli biyoaktif metabolitleri (polisakkarit, peptit, pigment, ergosterol, alkaloidler, fenolikler vb) üretme potansiyeline sahip olan ökaryotik organizmalardır. Bu biyoaktif metabolitler veya bu biyoaktif metabolitleri içeren ekstratlar antikanser, antimikrobiyal, antioksidant, antidiyabetik gibi çok farklı biyolojik aktiviteler sergileyebilmektedir. Mevcut çalışmada, topraktan izole edilen filamentli mikrofungusların kültür filtratlarının ve etil asetat ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Mikrofungusların izolasyonu patates dekstroz agar (PDA), metabolit üretimi ise patates dekstroz broth (PDB) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. En yüksek antikanser aktivite gösteren mikrofungus 18S rRNA sekans analizine göre tanımlanmıştır. Etil asetat ekstratın antikanser ve deri-yaşlanma karşıtı aktiviteleri *in vitro* da WST-1 hücre canlılık testine göre analiz edildi. Antikanser aktivite çalışmalarında gen ekspresyon analizi RT-PCR, protein seviyelerinin analizi ise ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstratın antimikrobiyal aktivitesi kuyucuk-difüzyon ve antioksidant aktivitesi ise ABTS, DPPH, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini giderme testlerine göre analiz edilmiştir. *In vitro* deri yaşlanma karşıtı aktivitesi ise insan deri fibroblastları (NHDF) üzerinde test edilmiştir.

Bulgular: İzole edilen mikrofunguslar arasında, kültür filtratı ve etil asetat ekstratı en yüksek antikanser aktivite gösteren izolat (GA7) *Alternaria tenuissima* (GenBank: PQ302315) olarak teşhis edildi. Bu izolatın etil asetat ekstratının A-549, SH-SY5Y, DU-145 ve HT-29 kanser hücre hatlarının hepsine karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği ancak normal sağlıklı hücre hatları üzerinde kayda değer bir toksik etki yapmadığı belirlendi. Gen ekspresyon analizlerine göre ekstraktın apoptoz ve otofaji yollarını etkileyerek antikanser aktivite gösterdiği tespit edildi. Ekstraktın ABTS, DPPH, nitrik oksit ve hidroksil radikallerine karşı orta seviyede scavenging potansiyeli gösterdi. Ekstrakt iki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*) ve iki Gram negatif (*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*) bakteriye karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergiledi. Ekstratın H₂O₂ ile indüklen yaşlanmaya karşı deri fibroblastlarını koruduğu tespit edildi. Ekstraktın antikanser, antioksidant, yaşlanma karşıtı ve antibakteriyel aktivitelerinin doza bağlı olarak arttığı belirlendi.

Sonuç: *Alternaria tenuissima* GA7 mikrofungusunun kültür süpernatantından hazırlanan etil asetat ekstraktının çok yüksek seviyede antioksidant ve antibakteriyel aktivitelere orta seviyede ise antioksidant aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ekstrakt ya da bu ekstraktan saflaştırılacak etken metabolitlerin sağlık alanında önemli potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Filamentli mikrofunguslar, ekstrakt, biyolojik aktivite, anti-kanser aktivite

Eylül 2024, 106 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

INVESTIGATION OF ANTI-CANCER AND APOPTOTIC EFFECTS OF MOLD SECONDARY METABOLITES ON HUMAN CANCER CELLS THROUGH SOME CELL PATHWAYS

Gürkan AYKUTOĞLU

Supervisor: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Aims: Filamentous microfungi are eukaryotic organisms that have the potential to produce various bioactive metabolites (polysaccharides, peptides, pigments, ergosterol, alkaloids, phenolics, etc.). These bioactive metabolites or extracts containing these bioactive metabolites can exhibit many different biological activities, such as anticancer, antimicrobial, antioxidant and antidiabetic. The current study aimed to reveal the biological activities of culture filtrates and ethyl acetate extracts of filamentous microfungi isolated from soil.

Method: Isolation of microfungi was carried out in potato dextrose agar (PDA), and metabolite production was carried out in potato dextrose broth (PDB) medium. The microfungus showing the highest anticancer activity was identified according to 18S rRNA sequence analysis. The anticancer and skin anti-aging activities of the ethyl acetate extract were analyzed according to WST-1 cell viability assay. In anticancer activity experiment, gene expression analysis was performed by RT-PCR and protein level analysis was performed by Elisa. The antimicrobial activity of extract was analyzed according to well-diffusion assay and its antioxidant activity according to ABTS, DPPH, nitric oxide and hydroxyl radical scavenging tests. *In vitro* skin anti-aging activity was tested on human skin fibroblasts (NHDF).

Results: Among the isolated microfungi, to isolate (GA7) with the highest anticancer activity in the culture filtrate and ethyl acetate extract was identified as *Alternaria tenuissima* (GenBank: PQ302315). It was determined that the ethyl acetate extract of this isolate showed strong cytotoxic activity against all A-549, SH-SY5Y, DU-145 and HT-29 cancer cell lines, but did not have a significant toxic effect on normal healthy cell line (MRC-5). According to gene expression analyzes, it was determined that the extract showed anticancer activity by affecting the apoptosis and autophagy pathways. The extract showed moderate scavenging potential against ABTS, DPPH, nitric oxide and hydroxyl radicals. The extract exhibited antibacterial activity against two gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and two gram-negative (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) bacteria. The extract was determined to protect skin fibroblasts against H₂O₂-induced aging. The anticancer, antioxidant, skin anti-aging and antibacterial activities of the extract were determined to increase in a dose-dependent manner.

Conclusion: It was determined that the ethyl acetate extract prepared from the culture supernatant of the microfungus *Alternaria tenuissima* GA7 had very high level antioxidant and antibacterial activities and moderate antioxidant activity. It is thought that the extract or the active metabolites to be purified from this extract may have an important potential to be used in the field of health.

Keywords: filamentous microfungi, extract, biological activity, anticancer activity

September 2024, 106 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Mikroorganizmaların Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Etkileri	2
Kanser	2
Programlı hücre ölümü: apoptoz	3
Otofaji	5
Funguslar ve Biyoaktif metabolitleri	6
Fungal Antikanser polisakkaritler	7
Fungal alkaloidler ve biyolojik aktiviteleri	9
Fungal pigmentler ve antikanser aktiviteleri	12
Fungal fenolikler ve biyolojik aktiviteleri	16
Fungal ergotionein ve biyolojik aktiviteleri	17
Fungal ergosterol ve biyolojik aktiviteleri	19
Fungal peptitler ve antikanser aktiviteleri	20
Amaç	23
KAYNAK ÖZETLERİ.....	24
MATERYALLER VE METOT	29
Materyaller	29
Metot	29
Besiyerlerinin hazırlanışı	29
Filamentli mikrofungusların izolasyonu	30
Filamentli mikrofunguslar ile sekonder metabolit üretimi.....	30
Antikanser aktivite gösteren en iyi izolatın moleküler teşhisi	31

Biyolojik aktivite denemeleri için kültür süpernatantlarının ve etil asetat ekstratlarının hazırlanması	31
Kültür süpernatantlarının ve etil asetat ekstratlarının antikanser etkinliğinin araştırılması	32
Eş Zamanlı Quantitatif Polimeraz zincir reaksiyonu ile gen ekspresyonlarının analizi	34
Etil asetat ekstratının <i>in vitro</i> antioksidant aktivite tayini.....	35
İstatiksel Analiz.....	38
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	39
İzolatların <i>in vitro</i> Antikanser Etkinliğinin Karşılaştırılması.....	39
GA7 kodlu izolatın moleküler identifikasyonu.....	40
Etil asetat ekstraktının doz-bağımlı antikanser etkinliğinin araştırılması	41
LDH Salınımı Analiz Sonuçları	44
ROS Analiz Sonuçları	44
Lipid Peroksidasyonu Sonuçları	45
Kantitatif Eş Zamanlı PZR Sonuçları	46
Kaspaz 3 Proteini ELISA Analiz Sonuçları	51
Kaspaz 8 Proteini ELISA Analiz Sonuçları	51
Beclin-1 Proteini ELISA Analiz Sonuçları	52
Etil Asetat Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	53
Etil asetat ekstraktının antioksidant aktivitesi	55
Ekstratın deri-yaşlanma karşıtı potansiyelinin deri-fibroblast hücrelerinde araştırılması.....	57
Ekstratın kimyasal içeriğinin belirlenmesi.....	59
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	92

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Üreten Gruba Göre Yaklaşık Biyoaktif Mikrobiyal Doğal Ürün Sayısı	2
Tablo 2. MCF-7 ve A-549 Hücre Hatları Üzerinde Etkili Olan Bileşikler ve Onları Üreten Suşlar	23
Tablo 3. Bazı Mikrobiyal Türevli Anti-Kanser Ajanlar)	23
Tablo 4. İnsan Gen Primer Dizileri	34
Tablo 5. Bakteri Suşları	35
Tablo 6. Fungal İzolatların Kültür Süpernatantlarının ve Etil Asetat Ekstratlarının Antikanser Etkinliği	40
Tablo 7. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fungal metabolitler ve biyoaktif özellikleri.....	7
Şekil 2. <i>Alternaria tenuissima</i> PDA besiyerindeki görüntüsü	41
Şekil 3. GA7 izolatının 16S rRNA gen sekans verilerine göre hazırlanan filogenetik ağacı.....	41
Şekil 4. Etil asetat ekstraktının doz-bağımlı antikanser etkinliğinin test edilmesi.....	42
Şekil 5. Yüksek doz ekstraktının (200 µg/ml) kanser hücreleri ve fibroblast hücrelerindeki etkilerinin mikroskop görüntüleri.....	43
Şekil 6. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerine 24 saat belirtilen dozda uygulanmasının LDH salınım miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler	44
Şekil 7. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının ROS miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler	45
Şekil 8. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerinde 24 saatlik etkisinin LPO miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler	46
Şekil 9. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı HT-29 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafikler	47
Şekil 10. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı DU-145 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir.....	48
Şekil 11. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı SH-SY5Y hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir.....	49
Şekil 12. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı A-549 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir.....	50

Şekil 13. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının belirtilen dozda A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının kaspaz 3 miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafiklerdir.	51
Şekil 14. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının belirtilen dozda A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının kaspaz 8 miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafiklerdir.	52
Şekil 15. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 hücrelerine belirtilen dozlarda 24 saat uygulanmasının beclin-1 protein ekspresyonu miktarındaki değişimi gösteren grafiklerdir.	53
Şekil 16. Etil asetat ekstraktının Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemi sonucu elde edilen antimikrobiyal aktivite bulguları;	54
Şekil 17. Ekstratın farklı radikallere karşı antioksidant potansiyeli. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikali, hidroksil radikali (OH [*]), nitrik oksit radikali (NO [*]) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali.....	56
Şekil 18. A) H ₂ O ₂ kaynaklı hücresel hasara karşı etil asetat ekstraktının farklı dozlarda insan normal deri fibroblast hücrelerindeki etkisi B) kontrol grubunun görüntüsü C) H ₂ O ₂ uygulanan hücrelerin görüntüsü D) H ₂ O ₂ ile beraber 600 µg/mL ekstrakt uygulanan hücrelerin görüntüsü.....	58
Şekil 19. Ekstratın kimyasal içeriği.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µM	Mikromolar
A-549	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit
Atg14	Otofaji Düzenleyici Beclin-1 Bağımlı Protein
Caco-2	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
cdk	Sikline Bağımlı Kinaz
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CHO-K1	Çin Hamster Yumurtalık Kanseri Hücreleri
CKI	Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
COX-2	Siklooksijenaz-2
Ct	Döngü Eşik Değeri
Da	Dalton
DLD-1	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
DMEM	Dubeko Değiştirilmiş Eagle Medyum Hücre Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DU-145	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
EDTA	2,2',2'',2'''-(Ethan-1,2-diyldinitrilo)tetraasetik Asit
EGT	Ergotionein
FBS	Fetal Bovin Serum
G1	Hücre Bölünme Evresi G1
HCT-116	İnsan Kolon Kanseri Hücreleri
HDFa	İnsan Normal Deri Fibroblast Hücreleri
Hep2c	İnsan Rahim Ağzı Kanseri Hücre Hattı
HepG2	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HOCl	Hipokloröz Asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HT-1080	İnsan Fibrosarkoma Kanseri Hücreleri
HT-29	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücre Hattı
LDH	Laktat Dehidrogenaz

LOX-1	Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-1
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MCF-7	İnsan Göğüs Kanseri Hücre Hattı
MDA	Malondialdehid
mg	Miligram
MIA PaCa-2	İnsan Pankreatik Kanser Hücreleri
mM	Milimolar
MRC-5	İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MyD88	Miyeloid farklılaşma birincil tepki 88 Proteini
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
nM	Nanomolar
NO	Nitrik Oksit
NRPS	Ribozomal Olmayan Peptid Sentazlar
p21	p21 Proteini
p27	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Proteini
PBS	Fosfat Tampon Solusyonu
PC-3	İnsan Prostat Kanser Hücreleri
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Broth
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QRT-PZR	Quantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFU	Relatif Floresan Şiddeti Birimi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastom Kanser Hücreleri
SM	Sekonder Metabolit
TBS	Triptik Soy Broth
TGF-β	Transforme Eden Büyüme Faktörü-β
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Wehi-231	Fare Lenfoma Kanseri Hücre Hattı
WST-1	Suda Çözünebilen Tetrazolyum Tuzu- 1

GİRİŞ

Doğal ürünler, organizmanın hayatta kalmasına katkıda bulunan küçük molekülü sekonder metabolitlerdir (Basmadjian *et al.* 2014). Sekonder metabolitler; primer metabolitleri oluşturan metabolizma yollarının yan ürünleridir. Birçoğunun oluşum ve düzenlenme mekanizmaları araştırılmaya devam etmektedir (Costa *et al.* 2012). Primer metabolitler, mikroorganizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurken, sekonder metabolitler, sıklıkla gelişme fazının sonuna doğru ya da durgun fazda ve sadece belli başlı organizmalar tarafından üretilmektedir. Belirli stres koşullarına ve besiyeri içeriğine bağlı olarak üretimleri artar (Lewis *et al.* 2010). Bazı sekonder metabolitlerin üreten canlıya sağladığı faydalar arasında; başka canlılara karşı savunma molekülü olarak, metal taşıyıcı ajanlar olarak ve daha yüksek canlılarla simbiyotik ilişki kurmada yardımcı olarak kullanım alanları mevcuttur (Pietra 1997).

Newman, Cragg ve arkadaşları doğal ürünlerin antikanser ajanlar olarak kritik rolünü vurgulayan kapsamlı incelemeler yapmışlardır (Cragg *et al.* 2009; Cragg and Newman 2013). Kanser alanında, klinik olarak kullanılan çok sayıda küçük molekülün yarıdan fazlasının doğal ürünler olduğu ya da doğrudan bunlardan türetildiği, sentetikten farklı olduğunu bildirilmiştir (Newman and Cragg 2012). İzole edilen ilk sekonder metabolit bir bitkiye aittir ona morfin ismi verilmiştir. Penisilin keşfi küf hücrelerinin ürettiği sekonder metabolitlerin önemini ortaya koymuştur (Atanasov *et al.* 2015).

Rasyonel ilaç tasarımı sürecine mikrobiyal sekonder metabolitler bitkilerden bir yüzyıl sonra dahil olsalar da tıpta pek çok hastalığa karşı kullanılan mikrobiyal ürünler mevcuttur. Örnek olarak antibiyotikler (streptomisin), enzim inhibitörleri (klavulanik asit- β laktamaz inhibitörü), immün süpresanları (Siklosporin A), hipokolesterolemikler (mevastatin), anti-fungallar (pnömokandin), anti-tümör (aktinomisin), anemi için (folik asit), obezite için (probiyotikler), irritabl bağırsak sendromu için (probiyotikler), atopik dermatit için (probiyotikler), Crohn's hastalığı için (probiyotikler), anti-oksidanlar (mikotrienin II), alerjiler için (probiyotikler), doğal renklendiriciler (monascue), diyabet için (GLP-1) vb. (Gupta *et al.* 2014).

Tablo 1. Üreten Gruba Göre Yaklaşık Biyoaktif Mikrobiyal Doğal Ürün Sayısı (Gupta *et al.* 2014)

Kaynak	Antibiyotikler	Diğer biyoaktif metabolitler	Total biyoaktif metabolitler	İnsanlarda tedavi için kullanılanlar	İnaktif metabolitler
Bakteri	2900	900	3800	10~12	3000 ile 5000
Aktinomiset	8700	1400	10100	100~120	5000 ile 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35	2000 ile 15000
Toplam	16500	6000	22500	140~160	20000 ile 25000

Mikroorganizmaların Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Etkileri

Mikroorganizmaların kendisi ve ürettikleri ürünler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Birkaç klinik çalışma, probiyotiklerin bağırsak kanseri tedavisi alan hastalarda semptomların ve komplikasyonların hafifletilmesi üzerindeki etkisini bildirmiştir (Liang *et al.* 2016; Yang *et al.* 2016). Probiyotiklerden kaynaklanan gelişmiş bağışıklık sistemi ve bağırsak mukozal bariyeri bu etkilerin nedenleri olabilmektedir (Liu *et al.* 2016). Rapamisinin (mTOR) / 4EBP1 sinyal yolağında, p27 proteinin regülasyonu yoluyla *Lactobacillus paracasei* X12 türü bakterileri tarafından kolon kanseri hücrelerinin hücre döngüsünün modülasyonunda yer aldığını göstermiştir (Huang *et al.* 2016). *Fusobacterium nucleatum* (Burns *et al.* 2015), *Streptococcus gallolyticus* ve *Providencia* insan kolorektal kanser tümörlerinde bulunmuştur (Abdulmir *et al.* 2010; Burns *et al.* 2015).

Kanser

Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar içindeki küresel ölümlerin büyük birçoğundan sebebidir. Kanser 21. yüzyılda dünyadaki tüm ülkelerde yaşam beklentisinin artmasının önündeki en büyük engel olarak görülmesi beklenmektedir (Bray *et al.* 2018).

İnsan gibi büyük, uzun ömürlü ve çok hücreli organizmalarda; bakım ve onarımın yanı sıra gelişim için hücresel proliferasyona önemli ve sürekli bir ihtiyaç vardır (Evan and Littlewood 1998; Evan and Vousden 2001). Tümörözenez, kontrolsüz bir hücresel proliferasyona yol açan hücre döngüsü düzensizliğinin sonucudur. Mitotik faz boyunca hücre döngüsünün kontrollü ilerlemesi ve kontrol noktası geçişini düzenleyen spesifik hücresel mekanizmalar düzensizdir. Normal olarak bu olaylar koruyucu mekanizmalar ile siklinler, sikline bağımlı kinazlar (cdk), cdk inhibitörleri (CKI), ekstra hücresel faktörler (yani büyüme faktörleri) gibi hücre döngüsü genleri ve bunların ürünleri olan moleküllerin varlığı nedeniyle büyük ölçüde korunur (Gohas *et al.* 2004). Hücre döngüsü boyunca doğru girişi ve ilerlemeyi kontrol eden birçok hücre döngüsü düzenleyicisi tümörlerde değişmektedir. İnsan kanserlerinin büyük bir bölümünde, hücrelerin ya proliferasyona başlamaya ya da sessiz kalmaya karar

verdiği süre boyunca, G1 faz ilerlemesinin kontrolünün düzensiz olduğu görülür (Malumbres and Carnero 2003).

İnsan tümörleri onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde, genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı birikimi sonucu oluşmaktadır (Corn and El-Deiry 2002). Hücre döngüsü kontrol noktalarını pozitif olarak kontrol eden bu tür genler, kanserde onkojenik aktivasyon için hedefler olabilirken, tümör baskılayıcı genler gibi negatif regülatörler inaktivasyon için hedeflenir (McDonald and El-Deiry 2001). Bazı durumlarda, protein ürünlerinin genlerindeki değişiklikler hücre dışı ortamla etkileşime izin vermektedir. Örneğin, büyüme faktörleri kanser hücresine bir büyüme avantajı kazandırır (Corn and El-Deiry 2002). Neoplazide ekspresyonu değişen genler, normal olarak hücre büyümesini ve doku homeostazisini düzenleyen hücre siklusu, apoptoz ve farklılaşma yollarını etkilemektedir. Her üçü de entegre bir moleküler ağ olarak işlev görür ve bir yoldaki bozulmalar diğerinde de olumsuz sonuçlara yol açabilir (Corn and El-Deiry 2002).

Hücre sel proliferasyona olan yaşam boyu ihtiyaç, normal hücre sel proliferasyonu kontrol eden aynı genlerdeki mutasyonların neden olduğu düzensiz büyüme sonucu ortaya çıkan sürekli kanser tehdidine karşı dengelenmelidir (Evan ve Littlewood, 1998; Evan ve Vousden, 2001). Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengesizlikler ve bozulmuş embriyogenez, nörodejeneratif hastalıklar veya kanser gelişimine yol açabilir. Bu nedenle, yaşam ve ölüm arasındaki denge sıkı bir şekilde kontrol edilir ve hatalı unsurlar "programlanmış hücre ölümü" olarak adlandırılan hücre ölümleri ile etkili bir şekilde elimine edilebilir (Danial and Korsmeyer 2004).

Programlı hücre ölümü: apoptoz

Apoptoz hücrenin büzülmesi, kromatinin yoğunlaşması ve hücrenin fagositoz ile giderilebilecek küçük parçalara ("apoptotik cisimler") ayrılması gibi morfolojik değişikliklerle karakterize olan bir ölüm sürecidir (Kerr *et al.* 1972). Apoptotik yolak, ya sitokrom c'nin mitokondriden (mitokondri yolu) salıverilmesini veya ligand bağlanmasına yanıt olarak ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu (ölüm reseptörü yolağı) içeren iki ana yoldan başlatılabilir (Hengartner 2000). Her iki yolun tetiklenmesi üzerine, belirli bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar, hücrenin ölümünü programlı bir şekilde sonuçlandırmak üzere tipik morfolojik değişikliklere yol açacak şekilde aktif edilir (Degterev *et al.* 2003).

Ekstrinsik veya sitoplazmik yol olarak adlandırılan ölüm reseptörü yolu, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesi olan Fas ölüm reseptörü ile tetiklenir. Ekstrinsik yolak Fas yolu ölüm reseptörleri, membrana bağlı Fas ligand, Fas kompleksleri, Fas ile ilişkili

ölüm domaini ve sonuçta apoptoza yol açan olayların geri kalanını aktive eden kaspaz 8 ve 10 içerir (Zapata *et al.* 2001). Bazı hematolojik malignitelere Fas geninin mutasyonları veya silinmesi gerçekleştiğinden malign transformasyona yol açabilir (Landowski *et al.* 2001). İntrinsik veya iç yolak ise bir ölüm sinyalinin ardından, proapoptotik proteinler, apoptoza neden olan mitokondriyel aktivasyonları ve translokasyonu ile sonuçlanan, fosforilasyon ve kesimi içeren posttranslasyonel modifikasyonlardan geçmektedir (Scorrano and Korsmeyer 2003). Apoptotik uyarılara cevap olarak, dış mitokondriyal zar geçirgen hale gelir ve sitokrom-c ve kaspazların ikinci mitokondri türevli aktivatörünün salınmasına neden olur. Bir kez sitosolde salınan sitokrom-c, Apaf-1 ile etkileşime girerek kaspaz-9 proenzimlerinin aktivasyonuna yol açarak prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9'a dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz kaskadının geri kalanını aktive eden ve apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder. Aktive kaspazlar nükleer laminin bölünmesine ve çekirdeğin kaspaz-3 ile parçalanmasına yol açar (Reed 1997).

Dış ve iç apoptotik yollar, p53, NF-κB, ubiquitin proteozom sistemi proteinleriyle ve PI3K yoluyla düzenlenir (Strasser *et al.* 2000). p53, hücre döngüsü durması, DNA onarımı ve apoptozis için önemli olan genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Birçok kanserde p53 proteininin azalması, genomik instabiliteye, bozulmuş hücre döngüsü düzenlemesine ve apoptozun inhibisyonuna yol açar. Bu durumda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına olanak sağlar. Bölünme sırasında hücrede DNA hasarı varsa p53, hasar onarılincaya kadar hücreyi bir kontrol noktasında tutar. DNA hasarı onarılamazsa, p53 proteini hücrenin kontrollü ölümü için apoptoz yolunu tetikler (Benchimol 2001).

NF-κB proteini, apoptoz, viral replikasyon, tümörjenez, inflamasyon ve birçok otoimmün hastalığın düzenlenmesinde rol oynayan çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. NF-κB, büyüme faktörlerini, sitokinleri, lenfokinleri, radyasyonu, farmakolojik ajanları ve stresi içeren çeşitli uyarılarla aktive edilir. (Maldonado 1997). NFκB aktivasyonu apoptozun indüklenmesine yol açabilir. Bu durum interferon tarafından düzenlenen faktör-1 (IF-1), p53 ve kaspaz gibi bazı proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile açıklanabilir (Kühnel *et al.* 2000).

Ubiquitin / proteozom sistemi, çoğu hücre içi proteinlerin parçalanmasından sorumlu olan ve dolayısıyla hücre büyümesini ve apoptozu düzenleyen büyük bir proteinaz kompleksinden oluşur (Myung *et al.* 2001). Birçok hücre döngüsü düzenleyicisi ve p53 gibi transkripsiyon faktörleri, siklinler ve sikline bağımlı kinaz inhibitörleri ve NFκB, ubiquitin / proteozom sistemi tarafından düzenlenir (Adams *et al.* 2000; Myung *et al.* 2001).

PI3K, hücrenin hayatta kalması, çoğalması, motilitesi ve doku neovaskülarizasyonu için önemli olan sinyal yollarında merkezi bir rol oynayan bir kinazdır. (Hidalgo and Rowinsky 2000; Cantley 2002). Hücre yüzeyi reseptörleri, hücre yüzeyinden sitoplazmaya sinyalleri ileten fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3 ve fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat gibi ikinci habercilerin üretilmesini sağlar. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3 sinyalleri, sırasıyla kinaz Akt'yi aktive eden kinaz 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz-1'i aktive eder. Akt aktivasyonu, hücrenin hayatta kalmasına yol açan bazı proteinlerin fosforilasyonuna yol açar (Cantley 2002).

Apoptoz, doğal ve kontrollü bir hücre ölüm programı olmasına rağmen nekroz, hücre dışındaki koşullardan kaynaklanan ve hücre ödemi ve plazma zarının bozulmasıyla karakterize, hücre bileşenlerinin salınmasına ve enflamatuar doku tepkisine yol açan, programlı olmayan bir hücre ölüm şeklidir (Hirsch *et al.* 1997).

Kaspazlar, tipik apoptotik morfolojisi için vazgeçilmez olsa da kaspaz aktivasyon süreci, programlanmış hücre ölümünde yaşam ve ölüm kararlarının tek belirleyicisi değildir (Lockshin *et al.* 2000; Wyllie *et al.* 2001). Kaspazdan bağımsız programlanmış hücre ölümlerinin ilk belirlenenlerinden biri insan T hücre lenfoması hücre hattı olan Jurkat hücreleridir. Jurkat hücrelerinde kaspaz aktivitelerinin inhibe edilmesinin, bax kaynaklı hücre ölümünü inhibe etmediği fakat sadece ölen hücrelerin apoptotik morfolojisini değiştirdiği gösterilmiştir (Xiang *et al.* 1996).

Çeşitli kaspazlardan bağımsız hücre ölümü biçimleri, kolaylıkla "apoptoz" olarak sınıflandırılmaz ve bunun için alternatif programlı hücre ölümü tipleri tanımlanmıştır. Programlı hücre ölüm şekilleri sadece fizyolojik koşullar altında ortaya çıkmazlar, farklı uyaran varlığında örneğin TNF- α veya kemoterapötik ilaçlar tarafından da tetiklenebilirler (Broker *et al.* 2005).

Otofaji

Otofaji, bir hücre ölüm sürecidir ve bu terim, hücrelerin kendilerini bozuk organel, proteinler ve diğer hücre bileşenlerinden arındırma yeteneğini ifade eder. Bu süreç, hücrelerin sağlığını ve işlevselliğini sürdürmelerine yardımcı olan bir tür temizleme mekanizmasıdır. (Mizushima 2007).

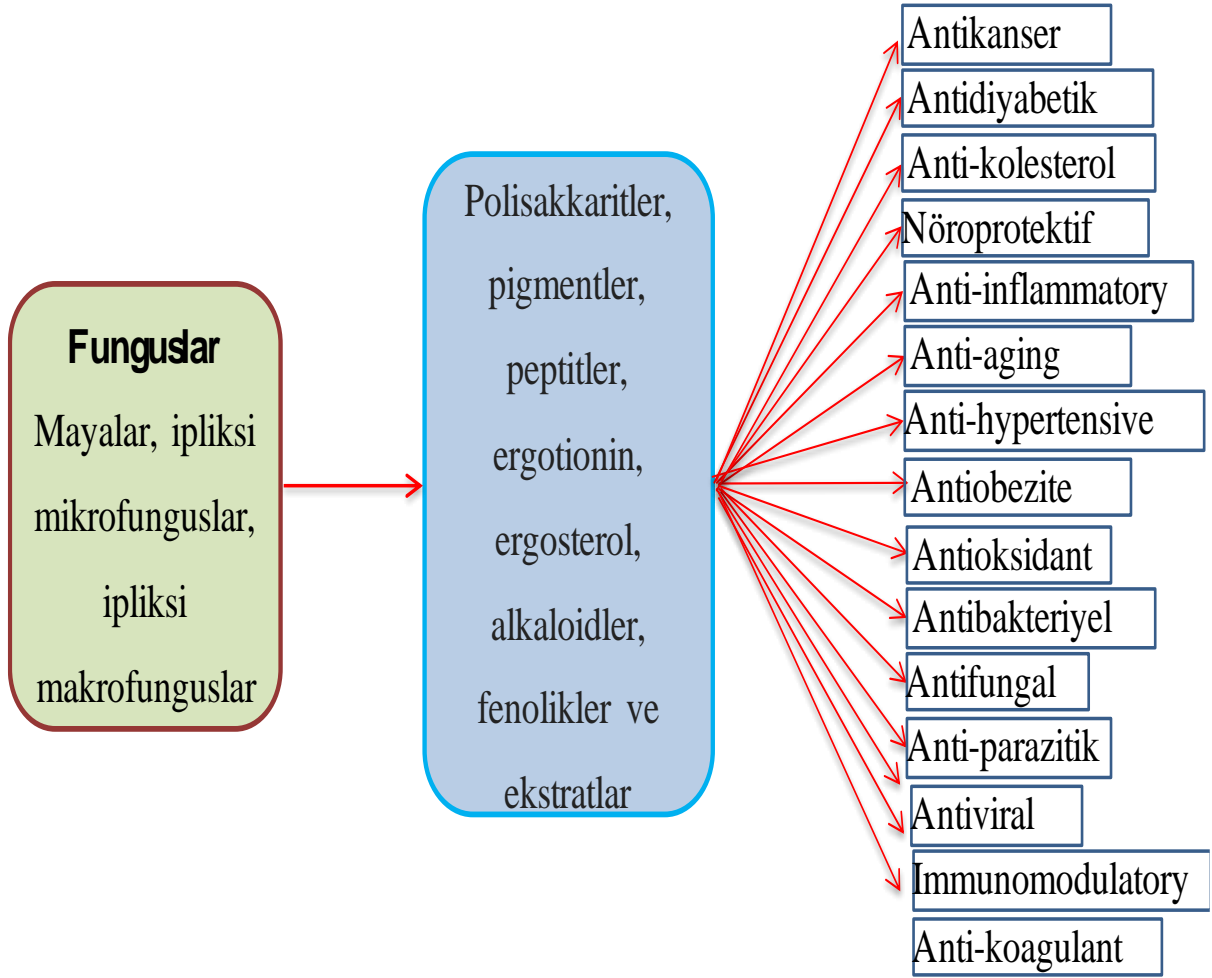
Otofaji, bir hücre içindeki zararlı veya gereksiz bileşenleri sindirme ve geri dönüştürme işlevine sahiptir. Bu süreç, hücrenin enerji ihtiyacını karşılamak ve hücre dengeyi korumak için önemlidir. Otofaji ayrıca stres durumlarında, örneğin açlık koşullarında, hücrelerin hayatta kalma yeteneklerini artırmak için devreye girebilir (Kelekar 2006).

Günümüzde çeşitli kanser türleriyle savaşta kullanılan stratejiler arasında, sitotoksik ajanlar güçlü silahlar olmaya devam etmektedir (Paci *et al.* 2004). Bunlara ilaveten yeni uygulamalar hedefli tedavileri (Dy and Adjei 2013), kanser epigenetiğine dayalı terapiyi (Taby and Issa 2010), fotodinamik terapiyi (Agostinis *et al.* 2011), immünoterapiyi (Kirkwood *et al.* 2012) ve antianjiyojenik ajanları (Cook and Figg 2010) içerir.

Funguslar ve Biyoaktif metabolitleri

Funguslar (mantarlar), doğada karbon (C), azot (N) ve fosfor (P) döngülerinde çok önemli rol oynayan ökaryotik heterotrof organizmalardır. Bu organizmalar doğada saprofit, hayvan ve bitkilerde parazit, alg ve siyanobakteri gibi fotosentetik organizmalarla liken formunda mutualist ve vaskular bitkilerler mikoriza olarak yaşam sürmektedir (Gadd 2006; Dix 2012). Dünyada yaklaşık 1,5 milyon mantar türünün mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, şimdiye kadar sadece 70.000 tanesi tanımlanmıştır (Blackwell 2011). Mantarlar çoğunlukla karasal ortamda dağılım gösterse de bazıları sucul ortamlarda yaşamaktadır (Bärlocher and Boddy 2016).

Mantarlar alemi, tek hücreli mayalar, çok hücreli filamentli (ipliksi) mikro-funguslar (küfler) ve çok hücreli makroskopik filamentli (ipliksi) mantarlar (mushroom) olmak üzere temel olarak üç gruba ayrılmaktadır (Arslan *et al.* 2023). Mantarların küçük bir kısmının patojen olduğu bildirilse de çoğunluğunun insanlar için faydalı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Yadav *et al.* 2019). Örneğin, mantarlar gıda biyoteknolojisinde, çevre biyoteknolojisinde, tarımsal biyoteknolojide, endüstriyel biyoteknolojide ve farmasötik biyoteknolojide önemli kullanım alanları bulmaktadır (Tkacz and Lange 2004; Chambergo and Valencia 2016, Mukherjee *et al.* 2018). Mantarlar gıda biyoteknolojisinde, ekmek ve alkollü içkilerin yanısıra enzim (invertaz, pektinaz, amilaz, galaktosidaz, laktaz vb), yağ asitleri, tatlandırıcı, organik asitler (sitrik asit, glukonik asit vb) ve doğal renklendirici (pigmentler) gibi gıda bileşenlerinin üretiminde kullanılmaktadır (Copetti 2019). Bu maddelerin yanısıra mantarlar polisakkaritler, pigmentler, peptitler, ergotionin, ergosterol, alkaloidler ve fenolikler (flavonoidler, tanenler, ftalanlar, ksantonlar, fenolik asitler vb.) gibi biyoaktif maddelerde üretmektedir. Mantarlar tarafından üretilen bu biyoaktif metabolitler veya bu aktif metabolitleri içeren ekstratlar ise antikanser, antioksidan, anti-aging, antiinflamatuvar, antifungal, antibakteriyel, antiparazitik, antiviral, immünomodülatör, kolesterol düşürücü, antidiyabetik, anti-obezite, antihipertansif, nöroprotektif, antikoagülant ve fibrinolitik aktiviteler sergilemektedir (Hareeri *et al.* 2022; Arslan *et al.* 2023). Biyoaktif özelliklerinden dolayı da mantarlar kökenli bu maddeler insan sağlığı açısından son derece ilgi çekmektedir.



Şekil 1. Fungal metabolitler ve biyoaktif özellikleri

Fungusların biyoaktif metabolitleri sıvı ve katı kültürlerde üretilmektedir. Sıvı kültürler laboratuvar ölçeğinde küçük fermentörlerde ya da erlenmeyer olarakta bilinen küçük flasklarda endüstriyel ölçekte ise büyük biyoreaktörlerde gerçekleştirilmektedir. Biyoaktif metabolitler ayrıca makrofungusların hücre biyomasından doğrudan ekstrakte edilebilmektedir. Fungal metabolitlerin ekstraksiyonunda metanol, etil asetat, etanol ve DMSO gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Elde edilen ekstrakt ise bir ya da birden fazla biyoaktif metabolit içerebilmektedir. Bu durumda, ekstraktlar ters farz HPLC ve TLC gibi uygulamalarla bileşenlerine ayrılabilmekte ve her etken bileşen ayrı ayrı saflaştırılmaktadır (Son *et al.* 2018; Rayhane *et al.* 2019; Afzal *et al.* 2022; Venkatachalam *et al.* 2023). Biyoaktivite çalışmalarında ise saf etken metabolitler ya da farklı metabolitlerin bulunduğu ekstraktlar kullanılmaktadır (Son *et al.* 2018).

Fungal Antikanser polisakkaritler

Polisakkaritler, glikosidik bağlarla birbirine bağlanan monosakkarit birimlerinden oluşan makromoleküllerdir. Molekül ağırlığı yüksek olan bu makromoleküller, bitkiler,

hayvanlar, mantarlar, bakteriler, makro ve mikroalgler dahil olmak üzere tüm canlı organizmalar tarafından sentezlenmektedir (Arslan *et al.* 2023).

Polisakkaritler elektrik yüklerine göre katyonik, anyonik, iyonik olmayan ve hidrofobik olarak sınıflandırılabilir. Monosakkaritler bileşen tipleri, zincir uzunlukları ve dallanma modellerine de göre sınıflandırılabilirler (Murphy *et al.* 2023; Tudou and Samanta 2023). Polisakkaritlerde bulunan en yaygın monomer D-glikozdur. Bununla birlikte D-fruktoz, D-galaktoz, L-galaktoz, D-mannoz, L-arabinoz ve D-ksiloz polisakkaritlerde sıklıkla görülmektedir. Hatta bazı polisakkaritlerde amino şekerler (D-glukozamin ve D-galaktozamin) ve basit şeker asitleride (glukuronik ve iduronik asitler) monomer olarak bulunabilmektedir (N-asetilnöraminik asit ve N-asetilmuramik asit) ve (Mohammed *et al.* 2021). Monosakkarit birimine göre polisakkaritler iki ana gruba ayrılır: homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler. İlk grup sadece bir tip monosakkaritin tekrar eden birimlerinden oluşurken sonraki grup iki veya daha fazla tipte monosakkaritten oluşmaktadır (Arslan *et al.* 2023).

Hücredeki konumlarına göre mantar polisakkaritleri üç ana kategoriye ayrılabilir: Hücre dışı polisakkaritler (EPS'ler), hücre duvarı polisakkaritleri (CWP'ler) ve hücre içi polisakkaritler (IPS'ler) (Osińska-Jaroszuk *et al.* 2015). Kitin, kitosan, mannan ve glukon mantar CWP'lerine örnektir (Huq *et al.* 2022; Hamidi *et al.* 2022). Polisakkaritler, mantarlarda enerji depolama, yapısal organizasyon, yüzeye yapışma, biyofilm oluşumu, konak kolonizasyonu, virülans ve su tutmanın yanı sıra hücreleri kurumaya, patojenlere, konak immünesine, oksitleyici ajanlara, antibiyotiklere, UV ışınlarına, ağır metallere ve tuzluluk stresine karşı korumaktadır (Henriques and Love 2007; Nocelli *et al.* 2016; Jiang *et al.* 2019; Ruiz-Herrera *et al.* 2019). Mantarlar polisakkaritleri kendi hücresel yapılarındaki rollerinin yanı sıra insanlar içinde son derece önemlidir. Örneğin, fungal kökenli polisakkaritler; antikanser, antibakteriyel, antifungal, antiparazitik, antiviral, yara iyileştirme, antioksidan, kolesterol düşürme, yaşlanma karşıtı, anti-inflamatuar, immünomodülatör, antilipidemik, hepatoprotektif ve antidiyabetik gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergiledikleri için farmasötik, nutrasötik, tıbbi ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli uygulamaları bulunmaktadır (Yan *et al.* 2014; Khan *et al.* 2014; Wang *et al.* 2022; Yang *et al.* 2022; Song *et al.* 2023; Arslan *et al.* 2023). Özellikle, *Lentinus* (or *Lentinula*) *edodes* (the shiitake mushroom), *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa* *Coriolus versicolor* (*Trametes versicolor*) ve *Tremella* cinsi (*T. mesenterica*, *T. fuciformis*, *T. Aurantia* ve *T. cinnabarina*) makrofunguslarının biyolojik aktiviteye sahip polisakkaritlerin en önemli kaynakları olarak kabul edilmektedir (Khan *et al.* 2014). Literatürde, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium radiatolobatum*, *Sclerotium*

rolfsii, *Pestalotiopsis chamaeropsis* gibi filamentli mikrofungusların yanısıra *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium babjevae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Weissella confusa* ve *Debaryomyces hansenii* gibi mayalarında antikanser aktivite dahil farklı biyolojik aktivitelere sahip polisakkaritler ürettiği bildirilmektedir (Bluhm *et al.* 1982; Pielken *et al.* 1990; Fontaine *et al.* 2011; Wang *et al.* 2019; Arslan *et al.* 2023). Örneğin, yapılan bir çalışmada endofitik *Penicillium radiatolobatum*'dan elde edilen iki hücre içi polisakkaritin (IPS-1 ve IPS-2) antioksidan ve antikanser özelliklerini araştırılmış ve çalışmada IPS-2'nin antioksidant aktivitenin yanısıra prostat kanseri hücre hattına (PC-3) karşı sitotoksik aktivite gösterdiği ancak kanserli olmayan sağlıklı hücre hatlarına karşı [insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH3T3)] üzerinde sitotoksik etkiye neden olmadığı gösterilmiştir (Naveen *et al.* 2023). Yang ve arkadaşları (2022), *Debaryomyces hansenii* DH-1 mayasından izole edilen iki yeni ekzopolisakkaritin (S1 ve S2) antioksidan ve antikanser potansiyelini araştırmış, bu S1 için ana monomerlerin mannoz ve glikoz, S2 için ise mannoz ve galaktoz olarak belirlemiş ve her iki EPS' nin de insan rahim ağzı kanseri (HeLa) insan karaciğer kanseri (HepG2) ve akciğer adenokarsinomu (PC-9) hücre hatlarına karşı antikanser etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır (Yang *et al.* 2022).

Antitümör polisakkaritlerinin çoğu, doğrusal bir β -(1 \rightarrow 3)-glukan omurgasına ve bağlı β -(1 \rightarrow 6) dalına sahip, β -glukan grubunda yer almaktadır. β -glukanlar farklı yapısal özelliklere sahip olduğundan reseptörlere karşıda farklı afiniteler göstermekte ve dolayısıyla belirgin şekilde farklı konak tepkileri oluşturmaktadır. Bununla birlikte antitümör aktiviteleri temel olarak polisakkaritlerin moleküler kütesinden, dallanma derecesinden, konformasyonundan ve yapı modifikasyonundan etkilendiği bilinmektedir. β -Glukanlar, Dectin-1, kompleman reseptörü (CR3) ve TLR-2/6 dahil olmak üzere çeşitli immün reseptörler üzerinde etki gösterir, daha sonra hem doğal hem de adaptif yanıtı tetikler ve opsonik ve opsonik olmayan fagositozu artırmaktadır (Xiao *et al.* 2020).

Fungal alkaloidler ve biyolojik aktiviteleri

Alkaloidler, doğal kaynaklardan elde edilen, çok düşük dozlarda kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik etki gösterebilen, aminoasitlerden türeyen, genellikle halka içinde bir veya daha fazla azot atomu taşıyan, az veya çok bazik özellikteki maddeler olarak tanımlanmaktadır. Doğada genellikle tuz halinde bulunan bu maddelere gerçek alkaloidler olarak adlandırılırken, aminoasit türevi olmayanlara psödoalkaloit, yapısında bulunan azot atomu heterosiklik halkanın parçası olmayanlara ise protoalkaloit olarak isimlendirilir (Sullivan *et al.* 2006; Wachtel-Galor 2011). Alkaloidler heterosiklik halka sistemlerine ve biyosentetik öncülerine

göre birkaç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar tropanlar, pirolidinler, izokinolin purinler, imidazoller, kinolizidinler, indoller, piperidinler ve pirolizidinler dahildir. Biyolojik aktiviteleri ve tıbbi kullanımları nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmışlardır. Bunlara ek olarak farmakolojik aktiviteleri nedeniyle en çok araştırılan üyeler arasında yer alan vinblastin, striknin, ajmalin, vinkamin, vinkristin ve ajmalisin dahil edilmektedir. Azot içeren sekonder metabolitlerin en büyük sınıflarından biri olan ve yapısında bir veya daha fazla indol/indolin kısmı içeren alkaloidlere indol alkaloidler denilmektedir. Bitkilerde, bakterilerde, mantarlarda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. İndol alkaloidleri, çeşitli antiproliferatif mekanizmalar yoluyla antikanser aktivite göstermektedir. Bunlara örnek olarak vinblastin ve vinkristinem, kanserlerin tedavisi için kliniklerde veya akademik alanda yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu nedenle, indol alkaloidler yeni antikanser ajanlarının keşfinde önemli bir konuma sahiptir. (Xu *et al.* 2014; Thawabteh *et al.* 2019; Xu and Xu 2020; Lee and Sperry 2022).

Alkaloitler, esas olarak angiospermlerde bulunurken mantarlar, pteridophytalar ve bakterilerde de nadir olarak bulunmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen alkaloitler, diğer metabolitlerle birlikte, farmasötik ve endüstriyel açıdan en önemli mantar metabolitleridir (Mahmood *et al.* 2010). Mantarların literatüre kazandırdığı alkaloidler; Pirolokinolin Alkaloitleri *Mycena rosea* (Mycenaceae), *M. Sanguinolenta*, *M. haematopus*, *M. pelianthina* olmak üzere değişik *Mycena* türlerinden elde edilmiştir (Peters *et al.* 2008; Pulte *et al.* 2016). *Hericium erinaceus*'dan izole edilen erinaserin 1-8, hipoglisemik, antikanser, antienflamatuvar ve antidepresan gibi bir takım aktivitelere sahiptir (Khan *et al.* 2013). Piriferin A-C, psilosibin ve psilosin halüsinojenik mantar olan *Psilocybe mexicana*'dan elde edilen ve alanında en çok çalışmanın yapıldığı alkaloidler olarak bilinmektedir (Carod-Artal 2015). Azoksistrobin, *Strobilurus tenacellus* (*Physalacriaceae*) ve diğer birçok mantar türünden izole edilen fungusidal aktivite gösteren bileşik olarak tanımlanmıştır. Tıbbi bir mantar olan *Lentinus strigellus* (*Polyporaceae*)'den ekinulin elde edilmiştir ve aynı zamanda diketopiperazin yapısında bir alkaloit olarak tanımlanmaktadır (Barros-Filho *et al.* 2012). Valnemulin ve Retapamulin *Pleurotus mutilus* (*Pleurotaceae*) ve *Clitopilus passeckerianus* (*Entolomataceae*) mantarlarından izole edilmiş, güçlü antibiyotik etki göstermesi,; ayrıca insanlarda topikal olarak kullanılan retapamulinin geliştirilmesine öncülük etmiştir (Novak 2011). Bunlara ek olarak, *Dictyophora indusiata*'dan elde edilen diktiyokinazol A-C, *Ganoderma sinense*'nin meyve gövdelerinden izole edilen sinensin, *Pycnoporus cinnabarinus*'dan izole edilen fenoksazon alkaloidi olan pycnoporin, *Ganoderma lucidum*'un meyve gövdelerinden izole edilen lucidimin A, lucidimin D ve lucidimin C, *Mycena rosella*'nın meyve gövdelerinden yeni glikozlanmış diketopiperazin, *Penicillium* mantarları tarafından üretilen rokfor

alkaloidleri gibi alkaloidler literatüre kazandırılmıştır (Sullivan *et al.* 2006; Wachtel-Galor 2011; Thawabteh *et al.* 2019; Zorrilla and Evidente 2022). Mantar ve mantar endofitleri birçok farklı biyolojik olarak aktif amid üretir. Örneğin, ergot alkaloidleri *Claviceps*, *Penicilium*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* gibi mantar cinslerinin ve ayrıca yüksek bitkilerin ve deniz hayvanlarının metabolik ürünleridir. Ek olarak, bitkilerdeki endofitik mantarlarda antimikrobiyal, antikanser aktiviteleri antiviral, antiinflamatuvar, böcek öldürücü, sitotoksik etki gösteren gibi mükemmel biyolojik özellikler gösteren alkaloidler keşfedilmiştir. (Dembitsky 2014; Thawabteh *et al.* 2019; He *et al.* 2023).

Günümüzde yapılan çalışmalara bakıldığında Lee ve arkadaşları (2002) tarafından Diktiyokinazol alkaloidi *Dictyophora indusiata*'dan izole etmişlerdir. Elde ettikleri alkaloid Diktiyokinazol A–C, kültürlenmiş fare korteks nöronlarında eksitotoksositeye karşı nöroprotektif bir potansiyel göstermiş ve nöronları glutamat kaynaklı nörotoksiteden (5–10 μ M'de) ve N -metil-D-aspartat kaynaklı toksisiteden (10–30 μ M'de) önemli ölçüde koruduğunu gözlemlemişlerdir (Lee *et al.* 2002; Zorrilla and Evidente 2022). Başka bir çalışmada ise Youssef ve arkadaşları (2021) tarafından deniz organizmalarıyla ilişkili olduğu bilinen farklı *Aspergillus* cinsi türlerinden izole edilen ve tanımlanan çeşitli alkaloidleri incelemişlerdir. Çalışmalarında yaklaşık 174 alkaloidin rapor edildiği ve bunlardan 66'sı, esas olarak antiviral, antibakteriyel, antifungal, sitotoksik, antioksidan ve antifouling aktivitelerini göstermişlerdir. Bunun yanı sıra, DNA-giraz, topoizomeraz IV, dihidrofolat redüktaz, transkripsiyonel düzenleyici TcaR (protein) ve aminoglikozid nükleotidil transferaz içeren farklı mikrobiyal proteinler üzerinde silico çalışmalarla, olası etkilerinin daha iyi hale getirmek için anti-enfektif potansiyel gösteren on altı alkaloid üretmişlerdir. Çalışma sonucunda deniz organizmalarından izole edilen *Aspergillus* türlerinden elde edilen alkaloidlerin, enfeksiyöz hastalıklarla mücadele edebilecek biyoaktif olarak avantaj sağlayacağını ortaya koymuşlardır. (Youssef *et al.* 2021).

Endofitik mantarlardaki kanser karşıtı aktivitelerden sorumlu aktif bileşenler alkaloidler, terpenoidler, glikozitler, saponin, peptitler, steroidler, fenoller, kinonlar ve flavonoidler olduğu bilinmektedir. Kousar ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan çalışmada, entofitik mantarın insan papiller tiroid karsinomu (IHH4), insan pankreası (PANC-1), yumurtalık (OVCAR-3), karaciğer (HepG2), akciğer (A-549), insan lenfoması (U937), insan cilt karsinomu (A431), meme (MCF-7) ve Kaposi sarkomuna karşı kanser karşıtı aktivitelerini vurgulamışlardır. Sonuç olarak ise endofitik funguslardan elde edilen biyoaktif bileşiklerin, G2-M fazında hücre döngüsü durmasını tetikleyen Bax ve Bcl-2 proteinlerinin armasına neden olan mikrotübül ağının bozulmasını ortaya çıkarmış, topoizomeraz II ile bağlanarak DNA

replikasyonunu inhibe ederek, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz ve NF-kB aktivitesini düzenlediği, apoptozis ve hücre döngüsü durmasıyla hücre ölümüne yol açan p21, p27 ve siklinler B/D1/E seviyelerini değerlendirerek kanser karşıtı aktivitelerini gösterdiğini ileri sürmektedir.(Kousar *et al.* 2022). Alkaloitlerin antikanser özelliğini vurgulamak amacı ile Tao ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada Son 5 yılda Çin’de yüzün üzerinde antikanser alkaloiti açığanmıştır. Açıklanan alkaloidlerin etki biçimleri hücre döngüsünü durdurma, protein kinazları inhibe etme, DNA sentezini ve p53 ekspresyonunu etkileme vb. olarak ifade edildiğini vurgulamışlardır. Yeni bulunan birçok alkaloit hem in vitro hem de in vivo olarak güçlü antikanser aktivitesi gösterdiğini ve protein kinaz inhibitörleri veya CDK inhibitörleri olarak hareket eden antikanser alkaloitlerinden bazıları yeni antikanser ajanları olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. (Tao *et al.* 2020). Peng ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise alkaloidin antiviral özelliğini araştırmışlardır. Çalışmada beş yeni gliantripin türevi (1, 2a, 2b, 3, 4) ve yeni bir pirazinokinazolin türevi dahil olmak üzere altı yeni indol alkaloidi ve sekiz bilinen alkaloitle mangrov türevi mantar olan *Cladosporium sp.* PJX-41'i kullanmışlardır. CD, NOESY verileri ve tek kristal X-ışını kırınımı analizi sonucunda elde ettikleri verilere göre İnfluenza virüsü A'ya (H1N1) karşı önemli aktiviteler gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Peng *et al.* 2013).

Fungal pigmentler ve antikanser aktiviteleri

Pigmentler, bitkisel, hayvansal, inorganik veya mikrobiyal kaynaklardan ekstraksiyon, izolasyon, sentez gibi işlemlerle elde edilen boyar maddelerdir. Bu maddeler, gıdalara, ilaçlara, kozmetik ürünlere veya doğrudan insan vücuduna uygulandığında renk verme özelliği gösteren karakteristik bileşenlerdir.(Nimnoi and Lumyong 2011).

Pigmentler, kimyasal yapıları, elde edildikleri kaynaklar ve kullanım alanları gibi çeşitli faktörler dikkate alınarak farklı kategorilere ayrılmaktadır. Pigmentlerin en yaygın sınıflandırılması, elde ediliş yöntemlerine dayalı olarak yapay ve doğal pigmentler olmak üzere iki ana grupta yapılmaktadır (Fabre *et al.* 1993; Bennett and Wallsgrove 1994).

Yapay renk maddeleri, kimyasal yapıları nedeniyle doğada doğal olarak bulunmaz, ancak kimyasal sentez yoluyla üretilebilirler. Bu maddeler, suda veya yağda çözünme özellikleri gösterebilir ve genellikle sentezlerinde kömür katranı kullanılır. Yapay renk maddeleri dayanıklı bir yapıya sahip olmasına karşın, toksik özellikler sergileyebilirler. Yüksek renk verme kapasitesi, geniş renk aralığı ve üstün stabilite gibi avantajlarına rağmen, sentetik boyaların insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri, tüketicileri doğal pigmentlere yöneltmiştir. (Association 1993; Velmurugan *et al.* 2010).

Renk maddeleri, hayvan, bitki veya mikroorganizma gibi biyolojik kaynaklardan elde edildiklerinde doğal olarak kabul edilirler. Doğal pigmentler, organik kökenli olup bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalar tarafından sentezlenen renk maddeleridir. Ayrıca, bazı doğal pigmentler minerallerin yapısında da bulunabilir. Ancak bu pigmentler, sınırlı renk aralığına ve düşük renklendirme gücüne sahip olup, ısı ve pH değişikliklerinden etkilenebilirler(Méndez *et al.* 2011). Bitkilerden elde edilen doğal pigmentler, ışığa, sıcaklığa ve olumsuz pH koşullarına karşı kararsız olmaları, suda düşük çözünürlük göstermeleri ve yıl boyunca sürekli olarak elde edilememeleri gibi dezavantajlar taşır. Bu nedenle, mikrobiyal pigmentler, pigment üretiminin kararlılığı (Räisänen *et al.* 2002) ve kültür teknolojisine ulaşılabilirlik (Parekh *et al.* 2000) gibi nedenlerden dolayı ilgi görmektedir.

Mikrobiyal pigmentler, mikroorganizmaların kendi hücrelerinde biriktirdikleri veya buldukları ortama salgıladıkları çeşitli renkli bileşiklerdir. Doğada, pigment üretme kapasitesine sahip olan mikroorganizmalar, özellikle küfler, mayalar ve bakteriler, yaygın olarak bulunur. Bu mikroorganizmalar, karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, prodigiosinler ve özellikle monaskin, viyolasein ve indigo gibi çeşitli pigmentleri sentezleyebilmektedir (Dufossé 2018).

Fungal pigmentler çevre dostu ve biyobozunur olmalarının yanı sıra immün baskılayıcı, bölünmeyi engelleyici, antioksidan, anti kanser, diyabet hastalığını tedavi edici özellikleri de vardır (Venil *et al.* 2013). Kumaş boyama uygulaması (Hiroshi 2000) yanında tıbbi uygulamalarına odaklanılan viyolasein antibiyotik, antiviral, antiprotozoan, (Matz *et al.* 2004) insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik aktivite (De Carvalho *et al.* 2006), antileishmanial (Leon *et al.* 2001), antiülserojenik (Durán *et al.* 2003), antitümöral ve anti-trypanosomacruzi aktiviteleri de göstermiştir (Andrighetti-Fröhner *et al.* 2003). Tıbbi kullanımları ve tekstil boyama rolünün yanı sıra prodigiosin, doğal deniz ortamlarındaki zararlı algelere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak etkili olduğu görülmüştür. *Streptomyces* veya *Serratia* cinsi, çeşitli kırmızı pirolilpirometen maddeleri üretebilir. Bu maddeler: prodigiosin, metasikloprodigiosin, desmetoksi prodigiosin ve prodigiosin 25-C'dir. Bu maddelerin, özellikle bağışıklık baskılayıcı aktivite gösteren prodigiosin 25-C olmak üzere, antibiyotik ve sıtma karşıtı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Kim *et al.* 2003).

Karotenoidler, sarı, turuncu, kırmızı ve mor gibi çeşitli renklerde bulunan ve siyanobakteriler, bazı arkeler, mantarlar, algler ve bitkiler tarafından sentezlenen önemli pigmentlerdir. Karotenoidler, iki ana gruba ayrılır: karotenler ve ksantofiller. Doğada en yaygın karotenler arasında α -karoten, β -karoten, γ -karoten, torulen ve likopen bulunurken, en bol bulunan ksantofiller β -kriptoksantin, lutein, zeaksantin, astaksantin, fukoksantin ve peridinindir

(Barretto and Vootla 2020; Maoka 2020; Rapoport *et al.* 2021). Küfler tarafından sentezlenen bazı bilinen karotenoidler β -karoten, torulen, likopen, astaksantin ve nörosporaksantindir. *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides* ve *Phycomyces blakesleeanus* gibi birkaç küf türünün β -karoten sentezlediği bilinmektedir; ancak ticari ölçekli üretim genellikle *B. trispora* suşundan yapılmaktadır (Rapoport *et al.* 2021; Sandmann 2022).

Melaninler, biyolojik olarak negatif yüklü, yüksek moleküler ağırlıklı, hidrofobik pigmentlerin yaygın bir sınıfıdır (Hill 1992). Farklı renklerde melaninler bulunmasına rağmen genel olarak koyu kahverengi veya siyah renktedirler ve sulu ve organik çözücülerde çözünmezler ve dolayısıyla geleneksel biyokimyasal ve biyofiziksel tekniklerle incelenmeleri zordur. Bilinen üç ana melanin türü vardır bunlar; kinonlar ve serbest radikalleri içeren karmaşık bir polimerizasyon süreciyle oluşan eumelaninler, tirozin ve sisteinden türetilen feomelaninler ve azotsuz öncüllerden oluşan allomelaninler'dir. (Hamilton and Gomez 2002).

Birçok mikroorganizma sarı renkli, suda çözünen bir vitamin olan riboflavin üretir. Riboflavin genel olarak üç mikroorganizma, askomiset *Ashbya gossypii* (Dufossé 2016), filamentli mantar *Candida famata* (Stahmann *et al.* 2000) ve bakteri türü *Bacillus subtilis* tarafından biyoteknolojik teknikler kullanılarak üretilirken verim ve genetik stabilite açısından en sık *A. gossypii* tarafından üretilir (Jeong *et al.* 2015; Schwechheimer *et al.* 2018). Kullanılan bu mikroorganizmalar meyve suları, çeşitli yiyecekler, işlenmiş peynir, vitaminle güçlendirilmiş süt ürünleri ve bazı enerji içecekleri gibi çeşitli gıda maddeleri için doğal sarı renklendirici çıkarmak için kullanılmaktadır.

Pigment ürettiği bilinen bazı bakteri ve mayalar buldukları ortama renk veren veya hücre içinde kalan maddeler salgırlar. Hücre dışına salgılanan pigmentler besiyeri içerisine karışarak suda çözünüp besiyerinin renk değişimine neden olurken, hücre içi pigmentler suda erimezler ve besiyerini boyamazlar (Rappl 2005).

Son yıllarda, *Staphylococcus aureus* tarafından sentezlenen altın rengindeki stafiloksantin, *Pseudomonas* türleri tarafından sentezlenen mavi-yeşil fikosiyanin ve *Cryptococcus neoformans* ile *Aspergillus* türleri tarafından sentezlenen koyu kahverengi pigmentler önem kazanmıştır. (Hajjaj *et al.* 2000).

Mikrobiyal pigmentler, daha yüksek verim elde edilebilmesi için optimize edilmiş kültürasyon teknolojisi kullanılarak nispeten daha kolay bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Pigment üretiminin biyoreaktörlerdeki kontrollü koşullar altında gerçekleştirilebilmesi funguslardan doğal bir şekilde çeşitli sınıf pigmentlerin üretimi için kolaylık ve avantaj sağlamaktadır. Funguslardan elde edilen bu pigmentler olağanüstü renk yelpazesi oluşturmaktadır (Wickerham *et al.* 1946; Maldonado and Ibarra 2005; Rosenblat *et al.* 2006).

İnsanların yaygın olarak tükettiği gıda, kozmetik, ilaç ve boyaların üretiminde kullanılan bazı yapay renklendiricilerin zararlı etkilere sahip olabilmesi, tüm dünyada insanları doğal kaynaklardan pigment üretmeye yöneltmiştir. Yapılan araştırmalar yapay boya kullanımının çevreye zarar verdiğini ve insan sağlığına olumsuz etki yaptığını kanıtladı. Bu nedenlerden dolayı bitki, hayvan, alg, bakteri, fungus ve liken gibi çeşitli doğal kaynaklardan doğal boya üretimine yönelik araştırmalar devam etmektedir. Çevreye ve insana zarar vermeyen doğal pigmentlerin incelenmesi dünya çapında oldukça önem kazanmış olup, farklı parametreler (sıcaklık, pH, nem, çalkalama hızı ve farklı ortam kaynakları) kullanılarak yapılan çalışmalar giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Filamentli funguslar çeşitli renklerle karakterize edilir. Gıda boyası pigmentleri kolaylıkla ve büyük ölçekte üretilebilir (Harmancıoğlu 1955; Kültür 2007; Tobbyn *et al.* 2010). Doğal pigmentlerin potansiyel üreticileri olarak tanımlanan *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait mikroorganizmalardan *Penicillium* suşlarından elde edilen pigmentler, sitrin üretimi olmadığı için gıda endüstrisinde etkin bir kullanım alanına sahiptir. Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen pigment üretiminde, sıcaklık ve pH; genel olarak metabolik yolların aktive olmasında etkilidir (Hasenekoğlu 1991; de Jonge and Tomasz 1993). Kan şekeri düzeylerini düşürülmesi, kanserin önlenmesi, gıda ürünlerinin renklendirilmesi ve tatlandırılmasında, korunmasında kullanılan kırmızı renkli pigmentlerin üretiminde *Monascus* cinsleri kullanılır (Duran 2001). Venil and Lakshmanaperumalsamy (2009) tarafından yapılan çalışmada kanser ve alerji gibi hastalıklara neden olan kimyasal boyaların aksine mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin antibiyotik ve anti-kanser özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Sharma and Ghoshal (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) türünden elde edilen pigment karışımının biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma, bu ekstraktın DPPH radikal temizleme testinde antioksidan özellik gösterdiğini ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında antikanser aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. Sinha *et al* (2023) çalışmasında, kırmızı maya *Rhodospiridium*'dan elde edilen karotenoid ekstraktının kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma, ekstraktın β -karoten, torulen ve torularhodin içerdiğini, ayrıca güçlü antioksidan (DPPH radikal temizleme aktivitesi), antimikrobiyal ve anti-meme kanseri aktiviteleri sergilediğini ortaya koymuştur. Barretto and Vootla (2020) çalışmalarında, *Cryptococcus rajasthanensis* mayasından elde edilen melaninin biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Analizler, bu melaninin antimikrobiyal, antioksidan (DPPH testi), anti-inflamatuar ve antikanser özellikler gösterdiğini ve terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Surendirakumar *et al.* (2022) yaptığı çalışmada, endofitik küf *Phoma* sp. RDSE17'den elde edilen pigmentin biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Saflaştırılan pigmentin melanin olduğu doğrulanmış ve yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi

sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, *Phoma* sp. RDSE17'den türetilen melaninin patojenik bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, bu pigmentin konsantrasyona bağlı olarak insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde antikanser aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir.

Elawady ve ekibinin (2023) yılında yaptığı bir çalışmada, endofitik mantar *Aspergillus versicolor* SB5'ten elde edilen physcion adlı sarı-turuncu renkte doğal bir antrakinon türevidir olan dihidroksiantrakinon bileşiğinin çeşitli biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Bileşiğin COX-2 ve LOX-1 enzimlerine karşı inhibe edici aktivite gösterdiği ve etkili bir anti-inflamatuar potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. İn vitro antioksidan aktivite testleri, physcion'un DPPH, ABTS, O₂^{•-} ve nitrik oksit (NO[•]) radikallerini temizleyebildiğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe edebildiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, bu bileşiğin güçlü antikolinesteraz aktivitesi sergilediği de tespit edilmiştir (Elawady *et al.* 2023).

Fungal fenolikler ve biyolojik aktiviteleri

Canlı hücreler tarafından üretilen fenolik bileşikler güvenli ve doğal antioksidant moleküllerdir (Farnsworth and Bingel 1977). Tek hücreli ve çok hücreli mantar türleri doğal olarak birçok farklı fenolik metabolit üretmektedir (Yadav *et al.* 2014). Fungal türlerinin doğal olarak ürettiği bu fenolik bileşiklerin farklı çalışmalarda antitümör, antimikrobiyal, antioksidant etkilere ve metabolizma düzenleyici etkisine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Piazzon *et al.* 2012; Alves *et al.* 2013). Bu fenolik bileşikler arasında poliketidler, alkaloidler, terpenoidler vardır (Zhao *et al.* 2022).

Bu bileşiklerden birisi olan lovastatin kolesterol düzenleyicisidir ve *Aspergillus terreus* hücreleri tarafından üretilbildiği tespit edilmiştir (Alberts *et al.* 1980). Başka bir çalışmada, *Emericella nidulans* EGCU 312 suşunun sekonder metabolit olarak 2-Metilbenzilamin, N-heptil-N-oktil, naftalin, 1,2-Benzenedikarboksilik asit, tributil asetilsitrate, bütül ostil ester, etil ester, oktadekanoik asit, tribütül asetilsitrat fenolik bileşiklerini üretebildiği tespit edilmiştir ve bu bileşiklerin antimikrobiyal, antikanser ve antioksidant etki göstermiştir (Khalil *et al.* 2014).

Trametes Hirsuta fungal türünün ürettiği sekonder metabolitleri ve biyolojik aktivitelerini ortaya çıkarmak için yapılan bir çalışmada bu fungal türün fenolik bileşiklerden olan gallik asit, kateşin, 4-Hidroxybenzoic asit, epikateşin üretebildiği tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak bu türün antioksidant etki kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu mantar türünün ürettiği bileşikler farklı Gram (+) ve Gram (-) prokaryotik hücreler üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir (Akgul *ve ark.* 2021).

Bu türün ürettiği bileşiklerden olan gallik asitin birçok farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gallik asit, antitümör, antioksidant, antiinflamatuvar, ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kroes *et al.* 1992; Lee *et al.* 1992; Jang *et al.* 2008). Daha önce yapılan çalışmalarda, bu türün ürettiği kateşin fenolik bileşiğinin antimetastatik, antioksidant, antimutajenik ve antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Menon *et al.* 1999; Bais *et al.* 2002; Geetha *et al.* 2004). Daha önce yapılan çalışmalarda bu türün ürettiği epikateşin molekülünün de antioksidant, antikanser, antimikrobiyal ve antikolajenaz etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Proshkina *et al.* 2016; Betts *et al.* 2017; Geetha *et al.* 2019). Daha önceki çalışmalarda yine aynı türün ürettiği 4-hidroksibenzoik asidin antioksidant, antimikrobiyal ve antikanser etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Cho *et al.* 1998; Chong *et al.* 2009; Seidel *et al.* 2014).

Xylaria cinsinden olan fungi türlerinin birçok farklı fenolik bileşiği üretebildiği bilinmektedir. Bunlardan birisi HIV-1 (insan bağışıklık yetmezliği sendromu virüsü) integraz inhibitörü olan integrik asittir (Singh *et al.* 1999). Buna ek olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri olan ksiloketalleri üretebildikleri gözlemlenmiştir (Lin *et al.* 2001). Yine benzer şekilde herpes simpleks virüsüne karşı antiviral etkiye sahip melisol üretebildikleri tespit edilmiştir (Pittayakhajonwut *et al.* 2005). Aynı şekilde Xylaria türlerinin ksiloallenolid A, antifungal etkiye sahip multiplolidler A ve B, eremofilanolitler, ve kemokin reseptör antagonistiği olan 19,20- epoksisitokalaşin Q üretebildikleri gözlemlenmiştir (Lin *et al.* 2001; Boonphong *et al.* 2001; Jayasuriya *et al.* 2004; Isaka *et al.* 2010).

Fungal ergotionein ve biyolojik aktiviteleri

Ergotionein (EGT), histidinden türetilen, suda çözünebilir bir tiyo-histidin betain amino asididir. 2-merkaptohistidin trimetilbetain olarak da bilinen bu bileşiğin, Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne (IUPAC) göre resmi adı ise (2S)-3-(2-tiokso-2,3-dihidro-1H-imidazol-4-il)-2-(trimetilammonio) propanoattır. (Tanret 1909; Borodina *et al.* 2020). EGT, funguslar (mayalar ve küfler) ve bakteriler tarafından sentezlenebilmesine rağmen, esas üreticileri funguslardır (Arslan *et al.* 2023; Liu *et al.* 2020). Örneğin, bazı mantar türleri (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *Grifola frondosa* vb.), bazı bakteriler (*Mycobacterium smegmatis* ve *Lactobacillus reuteri*) ve mayalar (*Rhodotorula mucilaginosa* DL-X01 ve *Aureobasidium pullulans*) doğal olarak EGT üretebilir (Dubost *et al.* 2006; Pang *et al.* 2022; Xiong *et al.* 2023). Ayrıca, genetik olarak tasarlanmış bazı bakteriler (*Escherichia coli* ve *Methylobacterium aquaticum*, *Mycolicibacterium neoaurum*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Burkholderia pseudomallei*), mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Yarrowia lipolytica*) ve filamentli mantarlar (*Aspergillus*

oryzae) tarafından da EGT'nin üretilebileceği belgelenmiştir (Gamage *et al.* 2018; Hirasawa *et al.* 2023; Qiu *et al.* 2021).

Pang *et al.* (2022) yaptıkları çalışmada, *Pleurotus ostreatus* türevli ergotiyoninin, sıçanlarda dekstran sülfat sodyum kaynaklı ülseratif kolit üzerindeki in vitro antioksidan aktivitesini ve potansiyel etkilerini araştırılmışlardır. EGT, konsantrasyona bağlı olarak yüksek düzeyde antioksidan aktivite sergilemiştir. Ergotiyoninin oral yolla uygulanmasının, proinflamatuvar faktörlerin üretimini azalttığı, TLR4/MyD88/NF- κ B sinyal yolunu inhibe ettiği, kolonun kısılmasını önlediği ve kolon patolojik hasarını önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir.

Hayvanlar, EGT'yi mantar, tahıl ve iç organlar gibi gıdalardan alır ve bu bileşiği hücre zarındaki spesifik karnitin/organik katyon taşıyıcısı OCTN1 (ergotiyonein taşıyıcısı olarak da bilinir) aracılığıyla hücrelere ve dokulara taşırlar (Lamhonwah and Tein 2006; Fu and Shen 2022). Literatürde, EGT'nin insanlara veya hayvanlara uygulandığında bazı dokularda ve organlarda biriktiği gösterilmiştir. Ayrıca, insan hücre dışı sıvılarında, salgılarda ve hayvan seminal sıvılarında da bulunduğu belgelenmiştir (D'Onofrio *et al.* 2022; Halliwell *et al.* 2018). EGT seviyeleri karaciğer ve eritrositlerde en yüksek düzeyde bulunurken, bağırsak, semen, testis, kemik iliği, böbrek, dalak, akciğer, göz ve beyinde de önemli miktarda birikim gösterir. Özellikle oksidatif stres ve inflamasyonun yoğun olduğu dokularda ve organlarda EGT seviyeleri daha yüksektir. EGT, en güçlü antioksidanlardan biri olarak kabul edilir ve OH-, IO_2 , hipokloröz asit (HOCl) ve peroksinitrit (ONOO-) temizleme potansiyeline sahiptir (Aruoma *et al.* 1999; Cheah and Halliwell 2012; Fu and Shen 2022).

Örneğin, EGT'nin glutatyon, troloks (E vitamini analogu) ve ürik asit gibi diğer geleneksel antioksidanlarla karşılaştırıldığında daha üstün bir serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Apparoo *et al.* 2022; Franzoni *et al.* 2006). Ayrıca, EGT antiinflamatuvar, anti-apoptotik ve yaşlanma karşıtı gibi diğer biyolojik aktiviteler de sergiler (Apparoo *et al.* 2022; Chen *et al.* 2024). Antioksidan aktivitesi sayesinde EGT, bazı önemli hücrelerde ve dokularda güçlü bir sitoprotektif etki gösterir. Örneğin, ergotiyonin eritrositleri HOCl hasarına karşı korur (Fu and Shen 2022; Zhang *et al.* 2023). Ayrıca, antioksidan ve antiinflamatuvar potansiyelleri nedeniyle EGT, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, Crohn hastalığı, romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynar. Dahası, yapılan çalışmalar, bu molekülün oksidatif stres veya inflamasyondan kaynaklanan indirgeme kusurlarının azaltılmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Fu and Shen 2022; Zhang *et al.* 2023).

Fungal ergosterol ve biyolojik aktiviteleri

Steroller, hayvanlar, mantarlar ve bitkiler gibi ökaryotik organizmalarda hücre zarlarının temel bileşenlerindedir. Hücre zarlarının yapısal bütünlüğünü, akışkanlığını ve geçirgenliğini korumada kritik roller oynarlar. Ayrıca, bu moleküller çeşitli zarla bağlı enzimlerin işlevini düzenler, madde taşınmasını kolaylaştırır ve hücre döngüsü dinamiklerini kontrol eder (Douglas and Konopka 2014; Jordá and Puig 2020; Girardi Piva *et al.* 2022). Ergosterol, insan sağlığını (antimikrobiyal, antitümör aktivite) geliştirebilen özelliklere sahip ve D2 vitaminine dönüşme kapasitesine sahip oldukça faydalı bir steroldür (Mattila *et al.* 2002; Lee and Aan 2016). Ergosterol, mantar hücre zarlarında yaygın olarak bulunan ve hayvan hücrelerindeki kolesterolle işlevsel olarak benzerlik gösteren önemli bir sterol sınıfıdır. Hücre zarındaki kritik rolünün yanı sıra, ergosterol, mantar mitokondrilerinin korunmasında ve mantar hücrelerinin düşük sıcaklık, donma, düşük şeker, alkol, hipoksik stres, ozmotik stres ve oksidatif strese adaptasyonunda da önemli bir rol oynar (Jordá and Puig 2020; Rangsinth *et al.* 2023). Günümüzde, ergosterolün biyosentetik yolunu hedef alarak, fungal hücre büyümesi ve çoğalması için kritik öneme sahip bu biyoaktif moleküle karşı birçok antifungal biyoreaktif ajan geliştirilmektedir (Rodrigues 2018; Ślusarczyk *et al.* 2021; Vanreppelen *et al.* 2023). Ergosterol, endüstriyel olarak maya fermantasyonu veya mantar miselyumlarından ekstraksiyon yoluyla üretilir. Kolesterole yapısal olarak benzeyen ergosterol, D2 vitamini ve steroid hormon ilaçlarının üretiminde bir öncü madde olarak kullanılmıştır. Ergosterol biyosentez yolunun ara maddeleri, örneğin farnesil difosfat ve skualen, terpenoid üretiminde ve parfüm bileşenleri, ilaçlar ve ileri biyoyakıtlar gibi uygulamalarda kullanımları nedeniyle ekonomik açıdan da büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, ergosterol veya türevleri; antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, anti-HIV ve nöroprotektif etki gibi çeşitli faydalı biyolojik aktivitelere sahiptir (Zhang *et al.* 2017; Vil *et al.* 2018; Sillapachaiyaporn *et al.* 2022).

Ergosterol ve ergosterol peroksit, geniş bir antimikrobiyal aktivite yelpazesi sergiler. Örneğin, *Helicobacter pylori*'nin büyümesi ergosterol tarafından inhibe edilir ve minimum inhibitör konsantrasyonları 10–20 µg/mL arasında değişir. Bu durum, ergosterolün gastrit tedavisinde etkili bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca ergosterol, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* ve *Fusarium verticillioides*'e karşı da antifungal aktivite gösterir (Li *et al.* 2005; Mbambo *et al.* 2012).

Moro *et al.* (2012) yaptığı çalışmada, ergosterol türevleri açısından zengin *Ganoderma lucidum* mantarının bazı lipid açısından zengin fraksiyonlarının MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatlarında antikanser aktivite gösterdiği, ancak normal hücreler üzerinde herhangi bir

etkisi olmadığı saptamışlardır. Bu bulgular, ergosterol türevlerinin kanser karşıtı potansiyelini yansıtmaktadır (Moro *et al.* 2012).

Ergosterolün, yeni terapötiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir öncü olarak ilgi görmesi, bu alanda yeni araştırmalar yapılmasına olanak tanımaktadır. Ergosterol, akciğerler (Wu *et al.* 2018), karaciğer (Lin *et al.* 2017), meme (Li *et al.* 2015), insan mide (Hu *et al.* 2014) ve prostat (Muñoz-Fonseca *et al.* 2021) kanser hücre hatlarında incelenmiş ve bu çalışmalar ergosterolün anti-kanser özelliklerini desteklemiştir.

Fungal peptitler ve antikanser aktiviteleri

Mantarlar, hemen hemen tüm kaynaklarla simbiyotik veya endofitik olarak yaşayan yaygın mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Mantar suşları çeşitli habitatlarda bulunmaktadır. Alkaloidler, poliketidler, terpenoidler ve peptitler gibi çok çeşitli özel metabolitler üretme kapasiteleri nedeniyle önemli bir ekolojik rol oynarlar (Ghoran *et al.* 2022).

Önemli biyolojik aktivitelere sahip çeşitli proteinler mantarlar tarafından işlenmektedir. İşlenen bu proteinlerin birçoğu potansiyel olarak endüstriyel, kozmetik, tıp vb. alanlarda önemli aktivitelere sahiptir. Saflaştırılmış ve karakterize edilmiş mantar proteinleri genel olarak; ribozom inaktive edici proteinler, antifungal proteinler, ribonükleazlar, ubikitin benzeri proteinler ve peptitler, lektinler, selülazlar, ksilanazlar, lakkazlar, invertazlar ve trehaloz fosforilazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Ng, 2004; Ghoran *et al.* 2022). Peptitler, düşük toksisite ve G-protein-bağlantılı reseptörler veya iyon kanalları gibi çeşitli önemli hedeflere karşı iyi afinite göstermeleri ile ilgili farmakolojik veya biyolojik aktivitelere sahip ikincil metabolitler olarak sınıflandırılmaktadır. Yaklaşık 500-5000 Da moleküler ağırlıklara sahip bir dizi iyi düzenlenmiş amino asitten oluşmaktadır. En önemlisi, fungal kökenli peptitler, çok sayıda biyolojik aktivite göstermektedir. Bunlar antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antidiyabetik, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antikanser, antikoagülan, antihipertansif, antiobezite, antialzheimer ve kalsiyum bağlayıcı aktiviteler gibi özellikler sergilemektedir (Giordano *et al.* 2018; Youssef *et al.* 2019; Wang *et al.* 2022).

Mantarlardan terapötik etkilerden sorumlu polisakkaritler, fenolikler, steroller, proteinler ve peptitler gibi çok sayıda 'potansiyel ilaç' üretebildiği gösterilmiştir. Fizyolojik etkiler gösterebilen ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan izole edilmiş küçük protein parçaları biyoaktif peptit olarak kabul edilmektedir. Biyoaktif peptitler, 2 ila 20 amino asit içeren ve proteinlerden salındığında farklı işlevler sergileyen ve önemli farmakolojik etkilere sahip olabilen protein parçalarıdır (Arslan *ve ark.* 2023; Mirzaei *et al.* 2021). Bu peptitler çoğunlukla bitki ve hayvan proteinlerinden enzimatik hidroliz, asit-alkali hidroliz ve mikrobiyal

fermantasyon yoluyla sentezlenmektedir. Ayrıca, uygun hidroliz yöntemleri kullanılarak alg, maya ve mantarların protein açısından zengin biyokütlesinden de üretilebilirken bazı biyoaktif peptitler ise bakteriler, arkeler, mantarlar, algler, hayvanlar ve bitkiler tarafından doğal olarak üretilebilmektedir (Blagodatski *et al.* 2018; Chakrabarti *et al.* 2018; Zhou *et al.* 2019; Landi *et al.* 2022; Arslan *ve ark.* 2023).

Mantar türevi peptitler çoğunlukla uygun çözücüler ile (en yaygın olarak etil asetat) mantarların kültür ortamından elde edilmektedir. Literatür de yapılan çalışmalarda hazırlanan ekstraktlar yarı katı bir kalıntıda 40 °C'de vakum altında kuruyana kadar buharlaştırmaya tabi tutularak elde edildiği bilinmektedir. (Wang *et al.* 2013; Hu and Dong 2015; Youssef *et al.* 2019). Fungal peptitler sentezlenirken ribozomal veya ribozomal olmayan peptid sentazlar (NRPS'ler) tarafından gerçekleştirilir (Eisfeld 2009; Nagano *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2023). Ribozomal olmayan peptid sentetazların (NRPS'ler), çok çeşitli biyoaktif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Yapısal olarak çok sayıda doğal peptitlerden bir araya gelmektedir. NRP'ler, yapısında yağ asidi yan zinciri içeriyorlarsa lipopeptitleri, karbonhidrat bulundurmasıyla glikopeptitleri ve hidroksi asit kalıntıları ve hem amid hem de ester bağları içeriyorlarsa depsi-peptitleri içeren kısa halkalı, dallı halkalı veya doğrusal peptitler olarak tanımlanmaktadır. Tipik bir NRPS, biyosentezi başlatmak veya peptidi oluşturmak için gerekli tüm enzimatik aktiviteleri içermektedir (Finking *et al.* 2003). Standart olarak 3 basamaktan oluşur. Bunlar; substrat molekülünü seçen ve aktive eden bir adenilasyon (A) alanı, yukarı akış A alanının aktive edilmiş substratının kovalent olarak bağlandığı taşıyıcı protein görevi gören bir tiyolasyon (T) alanı ve bitişik T alanına bağlı substratlar arasında amid bağı oluşumunu katalize eden bir yoğunlaşma (C) alanı gibi basamaklardan oluşmaktadır (Kalb *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2023).

Fungal peptitler, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Asteromyces*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Eurotium*, *Gliocladium*, *Graphium*, *Metarrhizium*, *Penicillium*, *Simplicillium*, *Stagonospora*, *Talaromyces* ve *Trichoderma* dahil olmak üzere farklı mantar cinsleri tarafından doğal olarak üretilmektedir. (Wang *et al.* 2013; Hu and Dong 2015). Mantarlardan elde edilen peptitler üç ana kategoride toplanmıştır. Bunlar; doğrusal, siklik ve depsi-peptitler olarak ayrılmaktadır (Youssef *et al.* 2019; Ghoran *et al.* 2023). Genel olarak bu peptitlere bakacak olursak; doğrusal peptitler yapılan literatür taramasında Liang ve arkadaşlarının *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020'den iki asillenmiş doğrusal dipeptit olan, *simplicilliumtides G* ve *simplicilliumtides H*, Anh ve arkadaşlarının *Aspergillus unguis*'den doğrusal peptit olarak Koniosulfide E (Anh *et al.* 2022), Yao ve arkadaşlarının *Penicillium sp.* SCSIO 41512'den penikamidler A ve penikamidler B (Yao *et al.* 2023), *Aspergillus sp.* SCSIO 41501'den elde

edilen *Aspergillipeptid*ler (Yao *et al.* 2021), *S. obclavatum* EIODSF 020'den elde edilen *Simplicilliumtides A* ve *Simplicilliumtides B* (Liang *et al.* 2016) vb. gibi doğrusal peptitler literatüre kazandırılmıştır. Siklik peptitler ise Scopel ve arkadaşları tarafından *Penicillium sp.* F37'den siklik dipeptit olan cis - siklo- (Leu-Tyr) (Scopel *et al.* 2013), Xie ve arkadaşları tarafından deniz kökenli bir mantar olan *Ascotricha sp.* ZJ-M-5'den siklo- (Pro-Ala) , siklo- (Ile-Leu) ve siklo- (Gly-Pro) (Xie vd., 2013) vb. gibi siklik peptitler tanımlanmıştır. Depsipeptitler ise Guo ve arkadaşları tarafından *Sarocladium kiliense* HDN11-112'den saroklidler A ve saroklidler B (Guo *et al.* 2018) , Ratnayake ve arkadaşlarının *Acremonium sp.*'nin katı fermantasyonundan akremolid A ve akremolid B (Ratnayake *et al.* 2008) vb. gibi depsipeptitleri tanımlamışlardır.

Günümüzde yapılan çalışmalara bakıldığında Wang ve arkadaşları tarafından, yaptıkları çalışmada, deniz kaynaklı *Aspergillus*'tan 232 yeni sekonder metaboliti ve bunların çeşitli biyoaktivitelerini araştırmışlardır. Böylece, çalışma sonucunda hastalıkların tedavisinde ve insan sağlığını desteklemede daha biyoaktif metabolitlerin geliştirilmesi ile deniz kaynaklı *Aspergillus* cinsi mantarların, yeni terapötik ilaçlar için umut verici bir kaynak olacağını ortaya koymuşlardır (Wang and Ding 2018). Peptaibol, çeşitli mantarlar tarafından ribozomal olmayan peptit sentazları (NRPS) kullanılarak salgılanan büyük bir homolog doğrusal biyoaktif peptit ailesi olarak bilinmektedir. Ramachander ve arkadaşları tarafından yapılmış oldukları araştırma çalışmasında Peptaibol'un aktivitesini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ise kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hastalığa karşı oldukça etkili olduğunu ve dahası, leishmaniasis'in peptaiboller - antiamoebin ve suzukasilin A tedavisi, tıbbi tedavide minimum riskle sinerjik yaklaşımlar kullanmak için yeni bir yol açtığını vurgulamışlardır (Ramachander and Turaga 2020). Suarez ve arkadaşlarının biyoaktif peptitler alanında yaptığı bir çalışmada saflaştırılmış peptitlerin, HeLa, AGS ve DLD-1 gibi çeşitli insan kanser hücre hatları üzerinde antioksidan aktivite ve sitotoksik etkiye sahip olduğu araştırmışlardır. Bu aktiviteler bakıldığında deniz kaynaklarından elde edilen peptitlerin kullanımının kanser önleme ve tedavisi için önemli bir potansiyele sahip olduğunu ve antikanser ilaç araştırmalarında moleküler olarak da çalışmaların yapılmasının yararlı olabileceklerini vurgulamışlardır. (Suarez-Jimenez *et al.* 2012).

Mikroorganizmaların kendisi ve ürettikleri ürünler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Birkaç klinik çalışma, probiyotiklerin bağırsak kanseri tedavisi alan hastalarda semptomların ve komplikasyonların hafifletilmesi üzerindeki etkisini bildirmiştir (Liang *et al.* 2016; Yang *et al.* 2016). Probiyotiklerden kaynaklanan gelişmiş bağışıklık sistemi ve bağırsak mukozal bariyeri bu etkilerin nedenleri olabilmektedir (Liu *et al.* 2016).

Meme, kolon, akciğer, pankreas ve karaciğer kanserlerinde aşırı ekspresyonuyla karakterize olan transforming growth factor- β (TGF- β)' yı inhibe ederek anti-prolifretif etki gösteren trichodimerol sekonder metaboliti *Trichoderma longibrachiatum* IBWF049-2000 microfungus hücreleri tarafından üretilir (Serwe *et al.* 2009).

Tablo 2. MCF-7 ve A-549 Hücre Hatları Üzerinde Etkili Olan Bileşikler ve Onları Üreten Suşlar (Nicoletti *et al.* 2008)

Etkili olan bileşik	Tür/Suş
3-O-Methylfunicone	<i>P. pinophilum</i> /LT4
Oxazine Türevi*	<i>P. sizovae</i> /PL10B
Sch 642305	<i>P. canescens</i> /PK5A
Curvulinic acid	<i>P. canescens</i> /PK5A, PL4D
Griseofulvin	<i>P. canescens</i> /PK5A, PL4D <i>P. griseofulvum</i> /PL18A
Asterric acid, sulochrin	<i>P. glabrum</i> /PL6

* 2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahydro-4Hpyrrolo[2,1-b]-1,3-oxazine

Antitümör etki gösteren antibiyotikler kanser hücrelerine karşı etkili kemoterapötik ajanlarının en önemlilerinden biridir (Cragg *et al.* 2012). Topraktan izole edilen mikrofungus hücreleri ümit vaat etmektedir çünkü buldukları ortamda rekabet edebilmeleri çoğu zaman antibiyotiklerin ve diğer engelleyici maddelerin üretimine dayanmaktadır (Nicoletti *et al.*, 2008). Bu kemoterapötikler arasında aktinomisin, ansamisin, antrasiklin, bleomisin, ve starosporin sınıfları bulunmaktadır ve *Streptomyces* türlerinden izole edilmiştir (Cragg *et al.* 2012).

Tablo 3. Bazı Mikrobiyal Türevli Anti-Kanser Ajanlar (Gupta *et al.* 2014)

Bileşik	Mikroorganizma	Etkili olduğu kanser
Actinomycin	<i>Streptomyces spp.</i>	Sarkoma ve eşey hücre tümörü
Bleomycin	<i>Streptomyces verticillus</i>	Eşey hücresi, servik, baş ve boyun kanserleri
Daunomycin	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	Lösemi
Doxorubicin	<i>Streptomyces pneuceticus</i>	Sarkoma, meme, yumurtalık ve akciğer kanseri
Epirubicin	<i>Streptomyces pneuceticus</i>	Meme kanseri
Idarubicin	<i>Streptomyces pneuceticus</i>	Lösemi ve meme kanseri
Mitomycin C	<i>Streptomyces caespitosus</i>	Mide, kolon, anal ve akciğer kanseri

Amaç

Bu tez çalışmasında, topraktan izole edilen tek hücreli filamentli mikrofungusların kültür ekstratının (etil asetat ekstratı) antikanser, antimikrobiyal, antioksidant ve deri-yaşlanma karşıtı özelliklerinin *in vitro*' da ortaya çıkarılmasıdır.

KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde ipliksi mikrofunguslardan elde edilen biyoaktif metabolitlerin ya da ekstratların antikanser, antioksidant, antimikrobiyal, yara iyileştirme ve anti-aging gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu açıklanmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Nicoletti *et al.* (2008), Bazı *Penicillium* türlerinden hazırladıkları kültür ekstratlarının insan akciğer kanser hücreleri (A-5499 ve insan göğüs kanseri hücreleri (MCF-7) hücreleri üzerindeki etkisini araştırdı. Çalışmada 15 farklı *Penicillium* türü suş çalışıldı. Tüm suşlardan kültür ekstraktı elde edildi. Elde edilen kültür ekstraktlarının insan kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bakıldı. 12 türden elde edilen ekstraktların A-549 ve MCF-7 hücrelerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği ve hücrelerde yüksek oranda DNA fragmentasyonuna yol açtığı gözlemlendi.

Dornetshuber-Fleiss *et al.* (2013), yaptıkları bir çalışmada, tarımda biyoinsektisit olarak kullanılan *Metarhizium anisopliae* mikrofungusundan saflaştırdıkları destruksin sekonder metabolitinin, KB-3-1 (insan rahim ağzı kanseri), Caco-2 (insan kolon kanseri), HCT116 (insan kolon kanseri) ve A549 (insan akciğer kanseri) kanser hücre hatlarında anti-anjiyogenik aktivite gösterdiğini ortaya koydu.

Burns *et al.* (2014) yaptıkları bir çalışmada, *Fusobacterium nucleatum* ve *Streptococcus gallolyticus* türlerinden elde ettikleri metabolitlerin insan kolon kanser hücrelerine (HT-29) karşı olan etkisini araştırdı. Bu türlerin kültür izolatlarının HT-29 hücrelerinde yüksek oranda hücre canlılığını azaltıcı etkiye sahip olduğu ortaya konuldu.

Arora *et al.* (2016), yapılan bir çalışmada, *Aegle marmelos* bitkisinde yaşayan *Xylaria psidii* mikrofungus hücrelerinden elde edilen iki bileşiğin (ksilarion A ve 5-metilmellein) insan pankreas kanser hücrelerindeki (MIA-Pa-Ca-2) etkisini araştırdı. Sonuç olarak bu iki bileşiğin de MIA-Pa-Ca-2 hücrelerinde önemli oranda hücre canlılığını azaltıcı etki gösterdiği ortaya kondu.

Mady *et al.* (2016), *Penicillium chrysogenum*' un ürettiği bir indol alkaloidi olan meleagrini saflaştırıp insan göğüs kanseri hücrelerindeki (MDA-MB-231, MDA-468, BT-474, SK BR-3, MCF7 and MCF7-dox) farklı dozlarda sitotoksik etkilerine araştırdı. Meleagrini tüm hücrelerde, hücre canlılığını önemli oranda düşürücü etki gösterdiği ortaya kondu.

Dikmen *ve ark.* (2017), Tuz Gölü'nden izole ettikleri halotolerant *Penicillium chrysogenum*-1 (hPc-1) mikrofungusunun sekonder metabolitlerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki etkisini araştırdı. Metabolitlerin Caco-2 üzerinde yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiği ortaya kondu.

Leite *et al.* (2018), yaptıkları bir çalışmada, *Chaetomium cochliodes* mikrofungus türünden elde ettikleri ketomin sekonder metabolitinin, CT-26 (fare kolon kanseri), ve B16-F10 (fare melanoma) hücreleri üzerindeki etkisini araştırdı. Ketomin molekülünün, tüm hücrelerde yüksek oranda hücre yayılmasını engelleyici ve hücre canlılığını düşürücü etki gösterdiği ortaya kondu.

Fooladi *et al.* (2019), küf türü olan *Neopestalotiopsis* türü SKE15'ten elde edilen eksopolisakkaritin (EPS) antioksidan ve antibakteriyel potansiyelini değerlendirdi. EPS'nin D-glikoz, sorbitol ve D-galaktozdan oluştuğu ve patojenik bakterilere (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bulundu. Ek olarak, *in vitro* antioksidan aktivite denemeleri, EPS'nin DPPH ve OH• radikallerine karşı güçlü temizleme potansiyeli sergilediğini ortaya koydu.

Mishra *et al.* (2019), tıbbi bir mantar olan *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*)'in Hint çeşidinden elde ettikleri peptit fraksiyonlarının (üç peptidin bir karışımı) antioksidan ve antibakteriyel özelliklerini değerlendirdi. Yazarlar, peptit fraksiyonlarının DPPH ve ABTS radikallerini temizleme ve ağır metal iyonlarını şelatlama yeteneğine sahip olduğunu buldular. Ayrıca peptit fraksiyonlarının *Escherichia coli* ve *Salmonella typhi* suşlarına karşı potansiyel antibakteriyel etkiye sahip olduğunu ortaya koydu.

Sung *et al.* (2020), yenilebilir bir mantar olan *Pholiota nameko*'dan elde edilen polisakkaritlerin *in vitro* antioksidan, anti-kollajenaz ve yara iyileştirme aktivitelerini araştırmayı amaçladı. Deneyler, polisakkaritlerin, özellikle PNP-80 fraksiyonunun, hidroksil radikal temizleme aktivitesi ve anti-kollajenaz aktivitesi gösterdiğini ve H₂O₂ ile indüklenen L-929 hücrelerinin hücreSEL ROS içeriğinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu ortaya koydu. Dahası, PNP-80'in özellikle L929 fibroblastlarının çoğalmasını ve göçünü artırdığı belirlendi ve bu da onun güçlü yara iyileştirme aktivitesini gösterdi.

Sharma and Ghoshal (2021), *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) türünden izole edilen pigment karışımının biyolojik aktivitelerini araştırdı. Yazarlar, pigment karışımının DPPH radikal temizleme deneyinde antioksidan potansiyeline ve meme kanseri hücre hattında (MCF-7) antikanser aktiviteye sahip olduğunu gösterdi (Sharma and Ghoshal 2021).

Surendirakumar *et al.* (2022), *Phoma* türü endofitik küf olan RDSE17'den elde edilen pigmentin biyolojik aktivitelerini değerlendirdi. Çalışmada, saflaştırılmış pigment melanin olarak doğrulandı ve melanin pigmenti yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi gösterdi. Yazarlar ayrıca *Phoma* türü RDSE17'den elde edilen melaninin patojenik bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirdiler. Dahası, bu pigment konsantrasyona bağlı bir şekilde insan akciğer kanseri hücrelerinde (A549) antikanser aktivite gösterdi.

Li *et al.* (2022), *Inonotus hispidus* mantarının meyve veren gövdelerinden iki farklı melanin fraksiyonunun (suda çözünen ve suda çözünmeyen melanin) antioksidan yeteneklerini test etti. Suda çözünen melaninin, insan hepatik LO2 hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasarı ve hücre içi ROS'u önemli ölçüde azalttığını buldular.

Chaudhary *et al.* (2022), *Monascus purpureus*'tan (MTCC 369) çıkarılan kırmızı pigmentin DPPH ve ABTS radikal temizleme ve ferrik indirgeme gücü analizlerinde güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, kırmızı pigmentler insan prostat kanseri hücre hattına (LNCaP) karşı karakteristik antikanser aktivite gösterdi.

Hasanien *et al.* (2022), *Talaromyces purpureogenus* AUMC2603'ten elde edilen doğal bir kırmızı pigmentin antioksidan ve antikanser aktivitelerini inceledi. Ham pigment özütü daha sonra antrakınon (dominant) ve herkinona ayrıldı. Hem ham pigment özütü hem de fraksiyonlar DPPH radikal temizleme deneyinde güçlü antioksidan aktivite gösterdi. Dahası, fraksiyonlar meme kanseri hücre hattı (MCF-7), karaciğer kanseri hücre hattı (HepG-2) ve kolon kanseri hücre hattı (HCT116) üzerinde güçlü bir sitotoksik etki gösterdi.

Zhao *et al.* (2022), *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen mannan moleküllerinin antioksidan aktivitelerini araştırdı. Mannan molekülleri (YM50, YM70 ve YM90), DPPH ve OH• radikal temizleme ve ferrik indirgeyici güç analizlerinde antioksidan aktivite gösterdi. Ek olarak, mannan molekülleri fare eritrositleri ve insan kolon epitel hücreleri (Caco-2 hücreleri) üzerinde düşük sitotoksikite ve hemolitik etki de gösterdiler.

Yang *et al.* (2022), *Debaryomyces hansenii* DH-1 türünden elde ettikleri iki yeni ekzopolisakkaritin (S1 ve S2) antioksidan ve antikanser potansiyelini araştırdı. Ana monomerler S1 için mannoz ve glikoz, S2 için mannoz ve galaktoz olarak tanımlandı. Her iki EPS de güçlü OH• radikal temizleme aktivitesi gösterdi. S1 ayrıca güçlü bir ferrik indirgeme kapasitesi gösterdi. Öte yandan, her iki EPS'nin de Hela, HepG2 ve PC-9 kanser hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde engellediği gözlemlendi.

Nataraj *et al.* (2022), *Calocybe indica* türünden elde edilen ham polisakkaritin ksiloz, mannoz, füköz, ramnoz, arabinoz, galaktoz ve glikozdan oluşan bir hetero-polisakkarit

olduğunu gösterdi. Polisakkarit, in vitro radikal temizleme (ABTS, O₂•- ve DMPD radikalleri), indirgeyici güç (bakır ve ferrik indirgeyici güç), metal şelatlama ve lipid peroksidasyon inhibitör aktiviteleri sergiledi. Ayrıca bu çalışmada, polisakkaritin HeLa, HT29, PC-3, HepG2 ve ölümsüzleştirilmiş T lenfosit (Jurkat) hücre hatlarında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu ortaya koydu.

Thimmaraju and Govindan (2022), mantar türü olan *Hypsizygus ulmarius*'tan elde ettikleri suda çözünen bir polisakkaritin (HUP-2) yapısal özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini inceledi. HUP-2, yapısında galaktoz, glikoz, ramnoz ve mannoz içerdiği ortaya çıktı. HUP-2 ayrıca DPPH ve ABTS radikal temizleme analizlerinde ve ferrik indirgeyici güç analizinde antioksidan aktivite gösterdi. Ek olarak, yazarlar HUP-2'nin PC-3 hücreleri üzerinde yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koydu.

Raghavan *et al.* (2022), deniz küfü türü olan *Aspergillus fumigatus* BTMF9'dan izole ettikleri peptit 9'un (MFAP9) A549 hücrelerine karşı antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koydu. Dahası, MFAP9'un standart antioksidanlardan daha yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu belirledi.

Sinha *et al.* (2023), kırmızı maya *Rhodospiridium*'dan elde edilen karotenoid özütünün kimyasal bileşimini ve biyolojik aktivitelerini inceledi. Özütün β-karoten, torulen ve torularhodin içerdiğini ve güçlü antioksidan (DPPH radikal temizleme aktivitesi), antimikrobiyal ve meme kanseri karşıtı aktiviteler gösterdiğini belirlediler.

Liu *et al.* (2023), *Sporidiobolus pararoseus* ZQHL mayasından elde edilen torularhodin pigmentinin antioksidan aktivitesini ve koruyucu potansiyelini inceledi. Çalışmaları, torularhodin'in in vitro DPPH ve ABTS radikallerine karşı güçlü bir temizleme potansiyeline sahip olduğunu ve ayrıca bir makrofaj hücre hattında (RAW 264.7 hücreleri) lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı hücresel iltihabı hafiflettiğini ortaya koydu.

Naveen *et al.* (2023), endofitik *Penicillium radiatolobatum* türü küften elde edilen iki hücre içi polisakkaritin (IPS-1 ve IPS-2) antioksidan ve antikanser özelliklerini değerlendirdi. Her iki IPS'nin de galaktoz, glikoz ve mannoz içerdiği gösterildi. Ancak, IPS-1'de eser miktarda ksiloz da vardı. IPS-1 ile karşılaştırıldığında, IPS-2 ABTS, DPPH ve ferrik indirgeyici güç analizlerinde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdi. IPS-2'nin ayrıca kanser olmayan hücre hatları [insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH3T3)] üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı ve insan prostat kanseri hücre hattında (PC3) ise hücre canlılığını yüksek oranda engellediği belirlendi.

Li *et al.* (2023), *Lepista nuda*'dan elde ettikleri iki polisakkaritin (LNP-1 ve LNP-2) yapısal özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini inceledi. Her iki polisakkaritin de dört farklı monomerden (fükoz, mannoz, glikoz ve galaktoz) oluştuğunu ve insan melanom hücre hattında (A375) sitotoksik etki gösterdiğini, ancak HepG2 hücrelerinde sitotoksik etki göstermediğini ortaya koydu. Ayrıca LNP-2'nin DPPH radikal temizleme deneyinde LNP-1'den daha yüksek antioksidan potansiyeline sahip olduğunu ortaya koydu.

Hu *et al.* (2023), *Talaromyces purpureogenus* türü mantardan elde ettikleri iki EPS'nin (TEPS1 ve TEPS2) yapısal özelliklerini ve yara iyileştirme potansiyelini değerlendirmeyi amaçladı. HPLC tabanlı monomer analizi, TEPS1'in mannoz, riboz, glikoz ve galaktozdan oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu, TEPS2'nin ise yalnızca mannozdan oluşan bir homopolisakkarit olduğunu ortaya koydu. TEPS1'in DPPH, ABTS ve •OH radikal temizleme analizlerine göre TEPS2'den daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Dahası, bu çalışmada, TEPS1'in insan embriyonik böbreği hücrelerinde (HEK293) daha yüksek hücre sel antioksidan ve yara iyileştirme aktivitelerine sahip olduğu kanıtlandı.

Hamidi *et al.* (2023a), filamentli bir mikrofungus olan *Sclerotium glucanicum* DSM 2159 ve bir maya olan *Rhodospiridium babjevae* türlerinden elde edilen EPS'lerin (sırasıyla skleroglukan ve EPS-R) *in vitro* biyoaktif özelliklerini ve *in vivo* yara iyileştirme yeteneklerini araştırmayı amaçladı. *In vitro* deneyler, her iki EPS'nin de insan fibroblast hücre hattında sitotoksik olmadığını ve insan kırmızı kan hücrelerinde fark edilir bir hemolize veya hasara neden olmadığını (hemokompatibilite) ortaya koydu. *In vivo* testler, her iki EPS'nin de erkek Wistar sıçanlarına 10 mg/mL konsantrasyonda uygulandığında olumlu bir yara iyileştirme potansiyeli gösterdiğini ortaya koydu.

Hamidi *et al.* (2023b), *Papiliotrema terrestris* PT22AV mayasından elde edilen EPS'nin yapısal özelliklerini araştırmayı ve ardından antibakteriyel, sitokompatibilite ve yara iyileştirme özelliklerini değerlendirmeyi amaçladı. Yapısal ve biyokimyasal analiz, EPS'nin mannoz ve glikoz monomerlerinden oluşan ortalama 202 kDa moleküler ağırlığa sahip suda çözünür bir heteropolisakkarit olduğunu gösterdi. *In vitro* testler, EPS'nin patojenik bakterilere (*E. coli*, *S. aureus* ve *S. epidermidis*) karşı antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu ve insan fibroblast ve makrofaj hücre hatlarına karşı sitokompatibilite sergilediğini ortaya koydu.

MATERYALLER VE METOT

Materyaller

Kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler analitik saflıkta kullanıldı. Kullanılan sarf malzemeler ve kitler şunlardır: Etanol (Sigma), tris-EDTA (Sigma), trikloroasetik asit (Merck), tiobarbiturik asit (Merck), fosfat tampon solusyonu (Lonza), triptik soy broth (TSB) besiyeri (Merck), patates dekstroz agar (Neogen), Patates Dekstroz Broth (Neogen), Nutrient broth (Merck), Nutrient Agar (Merck), malondialdehid bis (Merck), diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) (Sigma), penisilin-streptomisin antibiotik solüsyonu (Lonza), amfoterisin B solüsyonu (Biological Industries), tripsin-EDTA solüsyonu (Lonza), yüksek glukozlu insan hücresi besiyeri (DMEM) (Lonza), düşük glukozlu insan hücresi besiyeri (Lonza), fetal bovin serumu (Sigma) ve WST-1 hücre canlılık kiti (Biocompare), total protein izolasyon kiti (ProteinEx), total RNA izolasyon kiti (HibriGen), komplementer DNA sentez kiti (Enzo Life Sciences), insan kaspaz 8, kaspaz 3 ve beclin-1 eliza kiti (Elabscience), Quantitatif eş zamanlı PZR kiti (insan kaspaz 1, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF-kB, bax, beclin-1 ve Atg14 gen primerlerini içeren) (Thermo Fisher Sciences) ve laktat dehidrogenaz hücre canlılık kiti (Cayman).

Metot

Besiyerlerinin hazırlanışı

Patates dekstroz agar besiyeri

Patates dekstroz agar (PDA), 1 litresinde 20 g dekstroz, 15 g agar ve 4 g patates infüzyonu bulunduran bir besiyeridir. Besiyerinin hazırlanması için ticari besiyerinden 39 g tartılır ve 1 L saf suya eklenerek otoklav cihazı ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilir. 50 °C'ye kadar soğutulan besiyeri 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılır.

Patates dekstroz broth besiyeri

Funguslardan biyoaktif metabolit eldesi için kullanılan patates dekstroz broth (PDB) besiyeri 1 litresinde 20 g dekstroz, 4 g patates infüzyonu içeren bir besiyeridir. Hazırlanması için 24 g tartılır ve 1 L saf suya eklenir. Ardından otoklav cihazı ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilir.

Nutrient agar besiyeri

Nutrient Agar (NA) besiyerinin 1 litresinde 5 g et peptonu, 3 g et ekstraktı ve 12 g agar mevcuttur. Tez çalışması kapsamında agar well difüzyon testi ile önemli patojenlerin antibiyotik duyarlılık testi için kullanılan bu besiyerinin hazırlanması için 20 g ticari formülasyon tartılarak 1 L'de çözündürülür ve otoklav cihazı ile 121 °C'de 15 dakika steril edilir. 45-50 °C' ye soğutulup steril petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C'de pH'sı 7,0±0,2'dir.

Nutrient broth besiyeri

Nutrient Broth (NB) besiyerinin 1 litresinde 5 g et peptonu ve 3 g et ekstraktı mevcuttur. Bu besiyerinin hazırlanması için 8 g ticari formülasyon tartılarak 1 L'de çözündürülür ve otoklav cihazı ile 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C'de pH'sı 7.0±0,2'dir.

Filamentli mikrofungusların izolasyonu

Mevcut tez çalışmasında ipliksi fungusların izolasyonu Türkiye'nin Bingöl ilindeki farklı lokalizasyonlardan (Merkez, Genç, Karlıova, Solhan) alınan orman toprak örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Bunun için steril kaplara alınan toprak örnekleri laboratuvara getirilerek en kısa süre içerisinde izolasyon çalışmalarına başlanılmıştır. 1 gr toprak örneği alınarak % 0,9 NaCl içeren 10 mL fizyolojik su içerisine eklenmiştir. Alınan 1 mL örnek 9 ml fizyolojik su ile seyreltilmiştir. Gerçekleştirilen 10⁻⁵ seyreltmeden 100 µl örnek alınmış ve Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Petriler 30°C'ye ayarlanmış inkübatörde 24-120 saat inkübasyona bırakılmıştır. Günlük olarak takip edilen fungusların koloni morfolojisi ve mikroskop görüntüleri dikkate alınarak filamentöz fungus olduğu düşünülen koloniler PDA besiyerinde alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. İzole edilen ve saflaştırılan funguslar daha sonra +4 °C'de yatık agar içeren PDA besiyerinde ve stok kültürde kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Filamentli mikrofunguslar ile sekonder metabolit üretimi

İzolatlar PDA üzerinde 7 gün süreyle geliştirildikten sonra küf miselyumunda bir parça çıkartılmış (5 mm çapında) ve 100 ml steril patates dekstroz broth besiyeri (PDB) içeren 250 ml' lik erlenmeyere aktarılmıştır. Erlenler daha sonra çalkalayıcıda 30 °C'de ve 200 rpm'de 10 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

Antikanser aktivite gösteren en iyi izolatın moleküler teşhisi

Çalışmada sadece en yüksek antikanser aktivite gösteren izolat seçilmiş ve bu izolatın moleküler identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Antikanser aktiviteli izolatın seçimi ise aşağıdaki kısımlarda belirtildiği gibi kültür süpernatantlarının ve etil asetat ekstratlarının aktivitesine göre gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada en yüksek antikanser aktivite gösterdiği belirlenen izolat patates dextrose broth (PDB) besiyerinde 25°C de, 150rpm'de, 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından 100mg misel homojenizasyona tabi tutulduktan sonra DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla EcoPURE BYF Genomic DNA Kit (EcoTech Biotechnology, Türkiye) kullanılmış ve izolasyon, üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflığı MultiscanGo (Thermo Scientific) cihazıyla belirlendikten sonra PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır.

Bu izolatın moleküler karakterizasyonunda fungal sistematikte sıklıkla tercih edilen Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesinin çoğaltımı için, ITS1 (5'TCCGTTGGTGAACCAGCGG3') ve ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') primerleri kullanılmıştır. PZR reaksiyonu, her iki primerden 2 µl, 25 µl EcoTaq 2x PCR Master Mix (EcoTech Biotechnology, Türkiye), 1 µl kalıp DNA ve 20 µl steril dH₂O ile son hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak hazırlanmıştır. PCR döngüsü; başlangıç denatürasyonu 98°C'de 30 sn, denatürasyon 94°C'de 10 sn, bağlanma 55°C'de 15 sn, uzama 72°C de 15 sn, 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 1 dakika olarak programlanmıştır.

PCR ürünleri, %0,8'lik agaroz jelde, 100bp DNA markırı ile 75 V'da 40 dakika boyunca yürütülerek değerlendirildikten sonra, EcoSpin PCR Purification Kit (EcoTech Biotechnology, Türkiye) ile saflaştırılarak ticari bir firma (BMLabosis, Türkiye) aracılığıyla sekanslanmıştır. Her iki primer ile dizileme sonucu elde edilen sekans verileri, BioEdit programı ile birleştirildikten sonra BLASTN 2.16.0+ programı kullanılarak GenBank'ta (Zhang vd. 2000) olan diğer türlerle karşılaştırılmış ve sekans verilerinin girişi gerçekleştirilerek erişim numarası alınmıştır. Çalışmanın takip eden aşamalarında bu izolat kullanılmıştır.

Biyolojik aktivite denemeleri için kültür süpernatantlarının ve etil asetat ekstratlarının hazırlanması

10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda PDB kültüründe gelişen misel biyoması ilk önce süzülerek ardından da santrifüj işlemi (6000 rpm' de 10 dk) ile kültürden uzaklaştırılmış ve elde edilen süpernatantlar biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca kültür süpernatantlarından etil asetat ekstratları da hazırlanmış ve ekstratlarında biyolojik

aktiviteleri test edilmiştir. Bunun içinde, süpernatantlar eşit miktarda etil asetat (1:1) eklenerek ekstre edilmiştir. Etil asetat fraksiyonu toplanmış ve evaporator kullanılarak yoğunlaştırılmıştır. Ekstratların miktarı belirlendikten sonra her küf izolatının etil asetat ekstratı final konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde tekrar etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Çalışmanın takip eden aşamalarında ise söz konusu ekstrat istenilen dozlarda seyreltilerek kullanılmıştır.

Kültür süpernatantlarının ve etil asetat ekstratlarının antikanser etkinliğinin araştırılması

İnsan kanser hücrelerinin ve insan normal fibroblast hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması

İnsan kolon kanseri hücreleri (HT-29), insan akciğer kanseri hücreleri (A-549), insan nöroblastom kanseri hücreleri (SH-SY5Y), Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü genetik laboratuvarından temin edildi. İnsan prostat kanseri hücreleri (DU-145) Erzurum Teknik üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü genetik laboratuvarından temin edildi. İnsan akciğer fibroblast hücreleri (MRC-5) Türkiye Şap Enstitüsü'nden temin edildi. Hücreler hücre flasklarında % 10 oranında fetal bovin serumu ve % 1 oranında penisilin-streptomisin antibiyotik solusyonu ve % 1 oranında amfoterisin B eklenmiş DMEM hücre besiyerinde %5 CO₂ içeren etüvde 37° C'de çoğaltıldı.

Süpernatantların ve ekstratların kanser hücre hatlarına uygulanması

Kanser hücreleri çoğaltıldıktan sonra santrifüj edilen kültür süpernatantları 0.22 µm şırınga filtresi süzölmüş hücre besiyeri ile seyreltilerek hücrelere farklı dozlarda eklendi. İzolatların antikanser aktiviteleri birbiri ile karşılaştırılırken kültür süpernatantının veya etil asetat ekstratının (50 µg/ml dozdaki ekstrat) 50 µl' si kuyucuklara eklenmiştir. En yüksek antikanser aktiviteye sahip izolat belirlendikten sonra, ilgili izolatın ekstratının farklı konsantrasyonlarının (12,5-200 µg/ml konsantrasyonlarda 50 µl' lik hacimde) antikanser aktivitesi test edilmiştir.

WST-1 hücre canlılık analizi

Hücre canlılık analizi, WST-1 hücre canlılık kiti protokolüne göre yapıldı. Tüm hücre hatlarının hücreleri uygun koşullarda çoğaltıldı ve 96-kuyucuklu plakaya herbir kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilerek belirlenen dozlarda (12.5, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml) sekonder metabolitlerin etil asetat ekstratı hücre besiyeri ile hazırlanarak hücrelere eklendi. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 3 µL WST-1 maddesi eklenir. Hücreler en az 3 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra her bir örneğin 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri plaka okuyucu (SpectraMax, Molecular Devices) cihazıyla alındı ve hücre canlılık analizleri yapıldı.

Reaktif oksijen türevleri analizi

Reaktif oksijen türevleri (ROS) analizi diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak yapıldı. Hücreler ekilip belirlenen dozlarda sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra hücreler kaldırılıp santrifüjle toplandı. Herbir örneğe 10 µL DCFH-DA (2 µM) eklendi ve karanlık ortamda 37° C'de 1 saat inkübe edildi. Sonra, herbir örneğin 485 nm'de eksitasyon ve 525 nm'de emisyon dalga boylarında spektraflorometre cihazı (SHIMADZU) ile relatif floresan şiddeti ölçümü alınarak sonuçlar RFU olarak ifade edildi (Shen *et al.* 1996).

Lipid peroksidasyonu analizi

Lipid peroksidasyonu (LPO) malondialdehitten (MDA) oluşan tiobarbitürik asit reaktif türleri (TBARS) ölçümüne dayalı yöntemle yapıldı. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı belirlenen dozlarda hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra hücreler alınarak 250 µL trikloroasetik asid (70% w/v) 1 mL tiobarbitürik asit (0.8% w/v) ile reaksiyona sokulup 95° C'de kaynayan su banyosunda 30 dakika boyunca tutuldu. Sonra buza konularak 5 dakika beklendi. Maksimum rpm'de santrifüj edildikten sonra 532 nm dalgaboyunda her bir örneğin absorbans değerleri alındı ELISA reader (Molecular Devices) cihazıyla alındı ve malondialdehid bis kullanılarak hazırlanan standart grafiğine göre herbir örneğin MDA seviyeleri nM olarak ifade edildi (Smith *et al.* 1982).

Total protein izolasyonu

İnsan kanser hücreleri, kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra belirlenen dozlarda sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra hücreler toplandı ve protein izolasyon kiti kullanılarak kit protokolüne göre her bir örnekten tüm proteinler izole edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde santrifüj edilip süpernatant kısmı total protein örneği olarak alındı.

Kaspaz 3, kaspaz 8 ve Beclin-1 protein miktarlarının ELISA yöntemi ile ölçülmesi

Tüm kanser hücreleri çoğaltıldıktan sonra sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı hücre besiyeri ile 200 µg/ml dozda hazırlandı ve tüm kanser hücrelerine 24 saat uygulandı. Kontrol grubuna ekstrakt uygulanmadı. Hücreler toplandı ve eliza kit protokollerine göre ELISA cihazı (Molecular Devices) kullanılarak kaspaz 3, kaspaz 8 ve beclin-1 proteinlerinin miktarları ölçülerek analiz edildi.

Total RNA izolasyonu

İnsan kanser hücreleri kültür ortamında çoğaltıldı. Hücrelere sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı belirtilen dozda uygulandıktan 24 saat sonra hücreler toplandı ve total RNA izolasyon kiti kullanılarak kit protokolüne göre total RNA izole edildi. Her bir örnekten elde edilen RNA'nın saflığı ölçülüp yeterince saf olduğu belirlendikten sonra RNA örnekleri komplementer DNA sentezi için kullanıldı.

Komplementer DNA sentezi

Komplementer DNA sentezi komplementer DNA (cDNA) sentez kiti protokolüne göre yapıldı. RNA örneklerinden 10'ar µl PZR tüplerine alındıktan sonra kit protokolüne göre her bir RNA örneği için reaksiyon kuruldu ve tüm işlemler buzda yapıldı. Termal döngülü PZR cihazında (Sensoquest Labcycler) RNA örnekleri komplementer DNA'ya dönüştürüldü.

Eş Zamanlı Quantitatif Polimeraz zincir reaksiyonu ile gen ekspresyonlarının analizi

İnsan kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF-κB, beclin-1, bax, kaspaz 1 ve Atg14, genlerinin ekspresyon miktarları β-aktin kontrol geninin ekspresyon miktarı uygun primerler ve QRT-PZR kiti kullanılarak kit protokolüne göre eş zamanlı PZR cihazında (QIAGEN) genler çoğaltılarak her bir örneğin Ct değerleri bulundu. Gen ekspresyon miktarları Ct (döngü eşiği) methodu ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplandı (Livak and Schmittgen 2001).

Tablo 4. İnsan Gen Primer Dizileri

Gen Adı	Primerler	Primer Dizisi
Kaspaz-9	İleri primer	5'-TGTCTACGGCACAGATGGA-3'
	Geri primer	5'-GGACTCGTCTTCAGGGGA-3'
Kaspaz-3	İleri primer	5'-GTAGATGGTTTGAGCCTGAG-3'
	Geri primer	5'-CCAGTGCATATGGAGAAATG-3'
Bax	İleri primer	5'-GGCCCACCAGCTCTGAGCAGA-3'
	Geri primer	5'-GCCACGTGGGCGTCC CAAAGT-3'
Kaspaz 8	İleri primer	5'-CACTAGAAAGGAGGAGATGGAAAG-3'
	Geri primer	5'-CTATCCTG TTCTCT-TGGAGAGTCC-3'
Kaspaz 1	İleri primer	5'-ATCCGTTCCATGGGTGAAGGTACA-3'
	Geri primer	5'-CAAATGCCTCCAGCTCTGTAATCA-3'
Atg14	İleri primer	5'-ATGAGCGTCTGGCAAATCTT-3'
	Geri primer	5'-CCCATCGTCCTGAGAGGTAA-3'
NF-κB	İleri primer	5'-GCGTACACATTCTGGGGAGT-3'
	Geri primer	5'-CCGAAGCAGGAGCTATCAAC-3'
Beclin-1	İleri primer	5'-CAAGATCCTGGA CCGTGTCA-3'
	Geri primer	5'-TGGCACTTTCTGTGGACATCA-3'
β-aktin	İleri primer	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
	Geri primer	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

Antimikrobiyal aktivite tayini

Bu aşamada etil asetat ekstratının farklı konsantrasyonlarının (250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml) antimikrobiyal etkinlikleri Agar Well (Kuyucuk) difüzyon testine göre belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi test etmek için gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus cereus* ATCC 11778, gram negatif bakteri olarak da *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 kullanılmıştır. Bunun için test bakterileri ilk olarak nutrient broth (NB) besiyerinde 24 saat çoğaltılmış ve kültürlerin yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan kültürlerden 0,1 mL alınarak steril pamuklu çubukla nutrient agar (NA) üzerine yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra NA üzerinde bir delici yardımıyla 6 mm'lik kuyucuklar açılmıştır. Her kuyucuğa 40 µl olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki ekstratı (250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml) eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından petriler 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuk etrafında oluşan zonlar ölçülmüştür.

Tablo 5. Bakteri Suşları

Mikroorganizma Adı	ATCC Kodu
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43894
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 13883

Etil asetat ekstratının *in vitro* antioksidant aktivite tayini

Etil asetat ekstratının DPPH radikali giderme potansiyeli

Ekstratın DPPH radikalini giderme potansiyeli Blois (1957) tarafından önerilen yöntemle test edilmiştir. Aktivite ölçümü için 0,9 ml DPPH çözeltisi (0,05-3,2 mg/ml), 0,3 ml ekstrat çözeltisine (12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml) ilave edilmiş ve karışım oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika süreyle reaksiyona sokulmuştur. Bu sürenin sonunda, reaksiyon karışımının absorbans değeri 517 nm'de ölçülmüştür. Deneyler süresince deiyonize su (0,3 mL) kontrol olarak (A_0) ve vitamin C (askorbik asit) çözeltisi (12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH radikali giderme potansiyeli aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Temizleme} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: ekstrat/askorbik}$$

asit çözeltisi yerine etil asetat/deiyonize su ve DPPH ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_1 : etilasetat/deiyonize su içerisinde ekstrat/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve DPPH ile

hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_2 : DPPH içermeyen fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin absorbansını temsil etmektedir) (Blois 1957).

Etil asetat ekstraktının ABTS radikali temizleme potansiyeli

Ekstratın ABTS radikal giderme potansiyeli, Cheng *et al.* (2021) ve Ji *et al.* (2022) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir. Yöntem için 9,9 mg potasyum persülfat 15 ml 5,55 mmol/L ABTS sulu çözeltisi ile karıştırılmış ve mavi-yeşil bir renk oluşumu için çözelti karanlık bir ortamda 25°C'de 15 saat inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda çözeltinin absorbans değeri 734 nm'de 0,70 oluncaya kadar PBS (100 µmol/L, pH 7,4) kullanılarak seyreltilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstratın (12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml) 1 ml' si ve ABTS solüsyonu (2 ml) 25 dakika süreyle reaksiyona sokulmuş ve bu sürenin sonunda karışımın 734 nm'deki absorbans değeri ölçülmüştür. Askorbik için aynı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Radikal süpürme} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol:}$$

Ekstrat/askorbik asit çözeltisi yerine etil asetat/deiyonize su ve ABTS ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_1 : etil asetat/deiyonize su içerisinde ekstrat/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve ABTS ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_2 : ABTS içermeyen fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin absorbansını temsil etmektedir).

Etil asetat ekstraktının hidroksil radikali temizleme potansiyeli

Ekstratın nin hidroksil radikal (OH•) temizleme aktivitesi, Qiao *et al.* (2009) tarafından önerilen yöntemle göre araştırılmıştır. Bunun için, farklı konsantrasyonlarda (12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml) hazırlanan ekstratın 0,5 ml' si, 0,5 ml salisilik asit çözeltisi (9 mmol/L), 0,5 ml FeSO₄ çözeltisi (9 mmol/L) ve 0,5 ml H₂O₂ çözeltisi (9 mmol/L) ile karıştırılmıştır. Bu karışım daha sonra 37°C'de 40 dakika süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun sonunda absorbansı 510 nm'de ölçülmüştür. Deneyle pozitif kontrol olarak ekstrat ile aynı konsantrasyonda askorbik asit çözeltisi kullanılmıştır. Radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Radikal temizleme} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol:}$$

ekstrat/askorbik asit çözeltisi yerine etil asetat/deiyonize su ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_1 : etil asetat/deiyonize su içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_2 : H₂O₂

içermeyen (yerine deiyonize su) fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin absorbansını temsil etmektedir).

Etil asetat ekstraktının nitrik oksit radikali temizleme aktivitesi

Ekstraktın nitrik oksit (NO•) radikali giderme potansiyeli Larocca *et al.* (2018) tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml) hazırlanan ekstraktın 0,1 ml' si, 20 mM sodyum nitroprussid çözeltisinin 0,1 ml' si ile karıştırılmış ve 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bu karışıma 0,1 ml Griess reaktifi ilave edilmiş ve final karışımı karanlıkta 10 dakika süreye tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon taöamlandıktan sonra karışım için absorbas 560 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümlerinde pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Radikal giderme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Radikal Temizleme} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol:}$$

ekstrat/askorbik asit çözeltisi yerine etil asetat/deiyonize su ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_1 : etil asetat/deiyonize su içerisinde ekstrat/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin absorbansını temsil etmektedir).

Etil asetat ekstraktının deri-yaşlanma karşıtı potansiyelinin deri-fibroblast hücrelerinde araştırılması

İnsan dermal fibroblastları (NHDF'ler), % 1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu ve %10 fetal sığır serumu içeren fibroblast büyüme ortamında çoğaltılmıştır (%5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosferle 37 °C'de). Ortam 2-3 günde bir yenilenmiş ve fibroblastlar % 70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. Yaşlanma sürecini taklit etmek için NHDF'ler, büyüme ortamındaki 96 yuvalı bir plakada 10000 hücre/kuyucuk yoğunlukta gece boyunca kültürlenmiş ve ardından senesensi indüklemek için NHDF' lerin bir grubuna 300 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenmiş ve herhangi bir madde ilavesi yapılmayan grup kontrol grubu olarak seçilmiştir. H₂O₂' nin toksik etkisine karşı ise doz denemelerinde H₂O₂ + ekstrat grupları (250 µM H₂O₂ + 50-600 µg/ml) oluşturulmuştur. Deney grupları 24 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Tüm koşullarda ortam yalnızca % 0.5 FBS içermiştir) (Quiles *et al.* 2022). Bu sürenin sonunda gruplardaki hücre canlılığı WST-1 ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlara göre ekstraktın H₂O₂'nin oluşturduğu hasara yani yaşlanmaya karşı koruyucu potansiyeli değerlendirilmiştir.

İstatiksel Analiz

Graphpad Prism 5 programı kullanılarak istatiksel analizler yapıldı. One-way ANOVA ve Dunnet post test yöntemleri ile veriler analiz edildi. En küçük istatiksel önem derecesi $p<0.05$ olarak kabul edildi.



ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

İzolatların *in vitro* Antikanser Etkinliğinin Karşılaştırılması

Bu tez çalışmasında, patates dektroz agar (PDA) besiyeri üzerinde orman altı toprak örneklerinden toplam 43 adet filamentli mikrofungus izole edilmiştir. Bu izolatlar arasında ise koloni morfolojisi, pigmentasyon ve mikroskopik incelemelere göre farklı tür veya cins olabileceği düşünülen 15 izolat seçilmiş ve çalışmanın takip edilen aşamalarında kullanılmıştır. Bu izolatlar daha sonra PDA besiyerinde aktifleştirildikten sonra patates dektroz broth (PDB) besiyerine aktarılmış ve bu besiyerinde 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodunun sonunda kültürler santrifüj edilmiş ve elde edilen filtratlar 20 µm çapındaki filtrelerden geçirilerek final süpernatantları hazırlanmıştır. Hazırlanan final süpernatantlarının ise kanser hücre hatlarına karşı doğrudan sitotoksitesi araştırılmıştır. Literetürde mikroorganizmalarının etil asetat ekstraktlarının diğer organik çözücülerle hazırlanan ekstratlara oranla daha yüksek biyolojik aktivite (antimikrobiyal, antikanser, antioksidant vb) sergiledikleri belirtilmektedir. Bu yüzden mevcut çalışmada izolatların final süpernatantlarından hazırlanan etil asetat ekstraktlarında antikanser etkinliği araştırılmıştır. Tablo 5' de verilen sonuçlardan da görülebileceği gibi WST-1 hücre canlılık testine göre bazı izolatların (GA2, GA6, GA8, GA10 ve GA14) süpernatantlarının (50 µl) ve etil asetat ekstraktlarının (50 µg/ml' nin 50 µl' si) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki oluşturmaktan ziyade tam tersine onların canlılığını artırmıştır. Antikanser etki gösteren izolatlar içinse süpernatantlara oranla etil asetat ekstraktlarının daha yüksek antikanser etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Tablo 5' de özetlenen sonuçlar ayrıca bütün izolatlar arasında gerek süpernatantın gerekse etil asetat ekstraktının etkinliği açısından bütün kanser en yüksek antikanser aktiviteye sahip olan izolatın GA7 olduğunu göstermektedir. Bu yüzden çalışmanın takip eden aşamaları için GA7 kodlu izolat seçilmiş, bu izolatın moleküler identifikasyonu, etil asetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *in vitro* antikanser, antimikrobiyal, antioksidant ve antiaging (yaşlanma karşıtı) özelliği test edilmiştir.

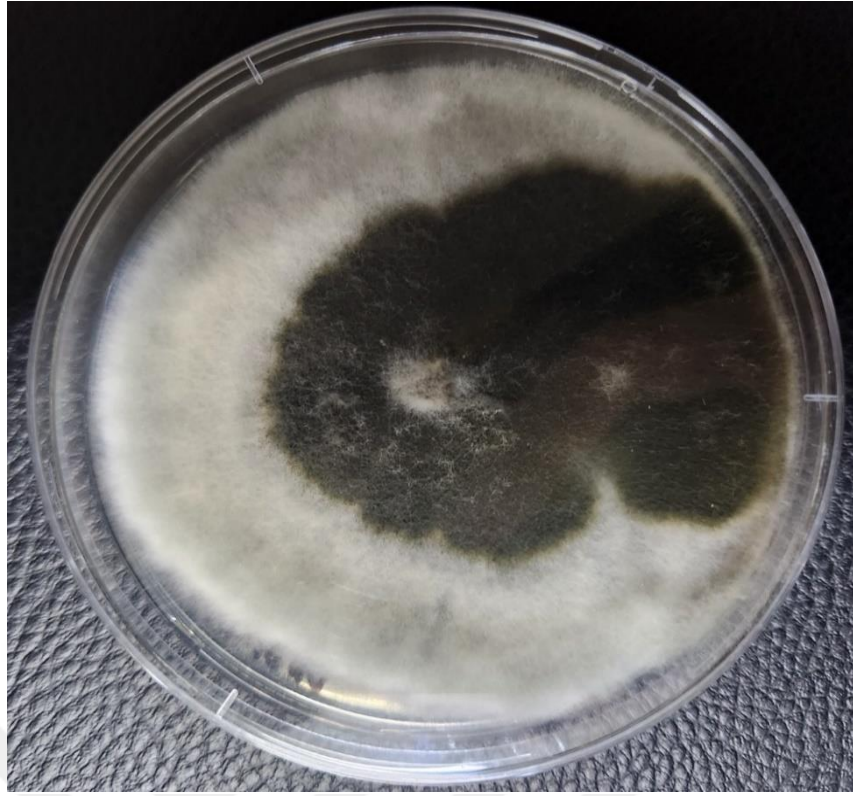
Tablo 6. Fungal İzolatların Kültür Süpernatantlarının ve Etil Asetat Ekstratlarının Antikanser Etkinliği

İzolat kodu	Hücre canlılığı (%)							
	HT-29		DU-145		SH-SY5Y		A-549	
	S	EA	S	EA	S	EA	S	EA
GA1	96	78	76	65	70	67	64	57
GA2	91	112	93	98	100	103	95	93
GA3	86	85	78	81	89	80	78	70
GA4	77	76	83	80	74	70	84	80
GA5	82	76	92	90	74	76	81	69
GA6	100	109	102	106	111	119	107	114
GA7	34	26	40	32	29	19	34	27
GA8	100	94	97	90	96	90	102	88
GA9	78	64	70	56	82	67	66	59
GA10	102	106	104	116	108	116	102	115
GA11	56	49	55	47	61	47	54	43
GA12	58	58	62	60	53	50	55	49
GA13	67	60	56	55	58	57	60	59
GA14	100	98	107	111	102	109	104	106
GA15	56	45	45	40	64	60	67	42

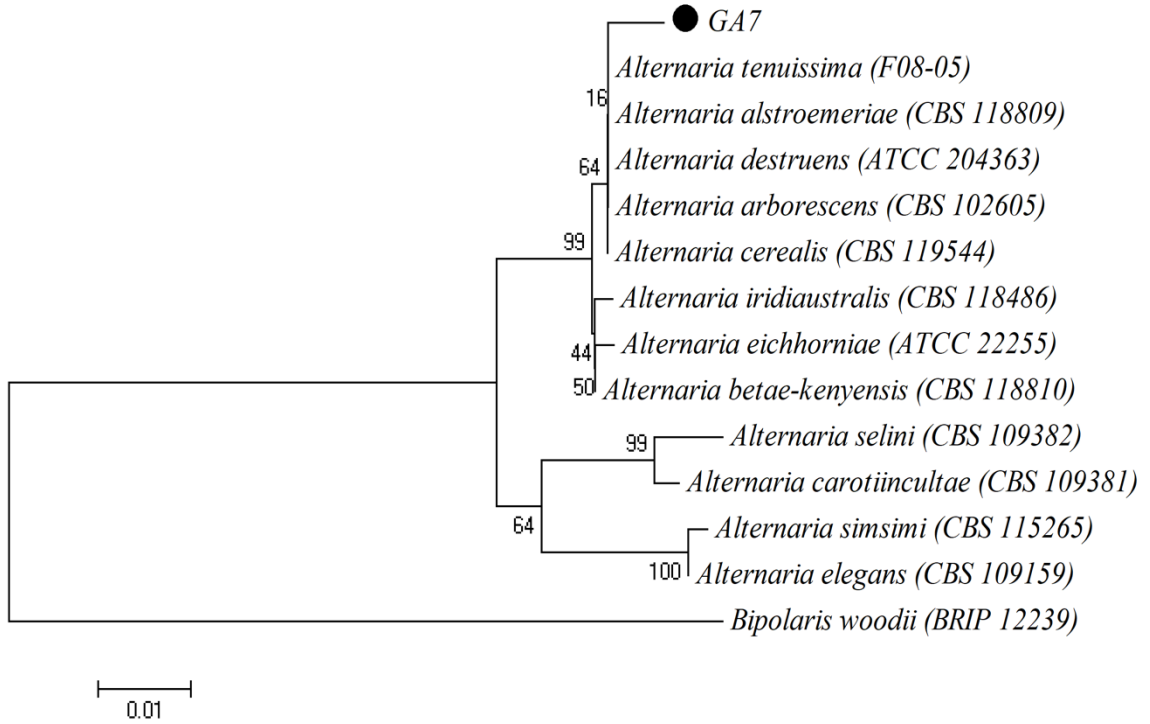
Etil asetat ekstratı (EA) 50 µg/ml konsantrasyonda test edilmiştir.

GA7 kodlu izolatın moleküler identifikasyonu

Moleküler analizlere göre GA7 kodlu izolat, *Alternaria tenuissima* mikrofungusu olarak teşhis edilmiştir (GenBank: PQ302315).



Şekil 2. *Alternaria tenuissima* PDA besiyerindeki görüntüsü

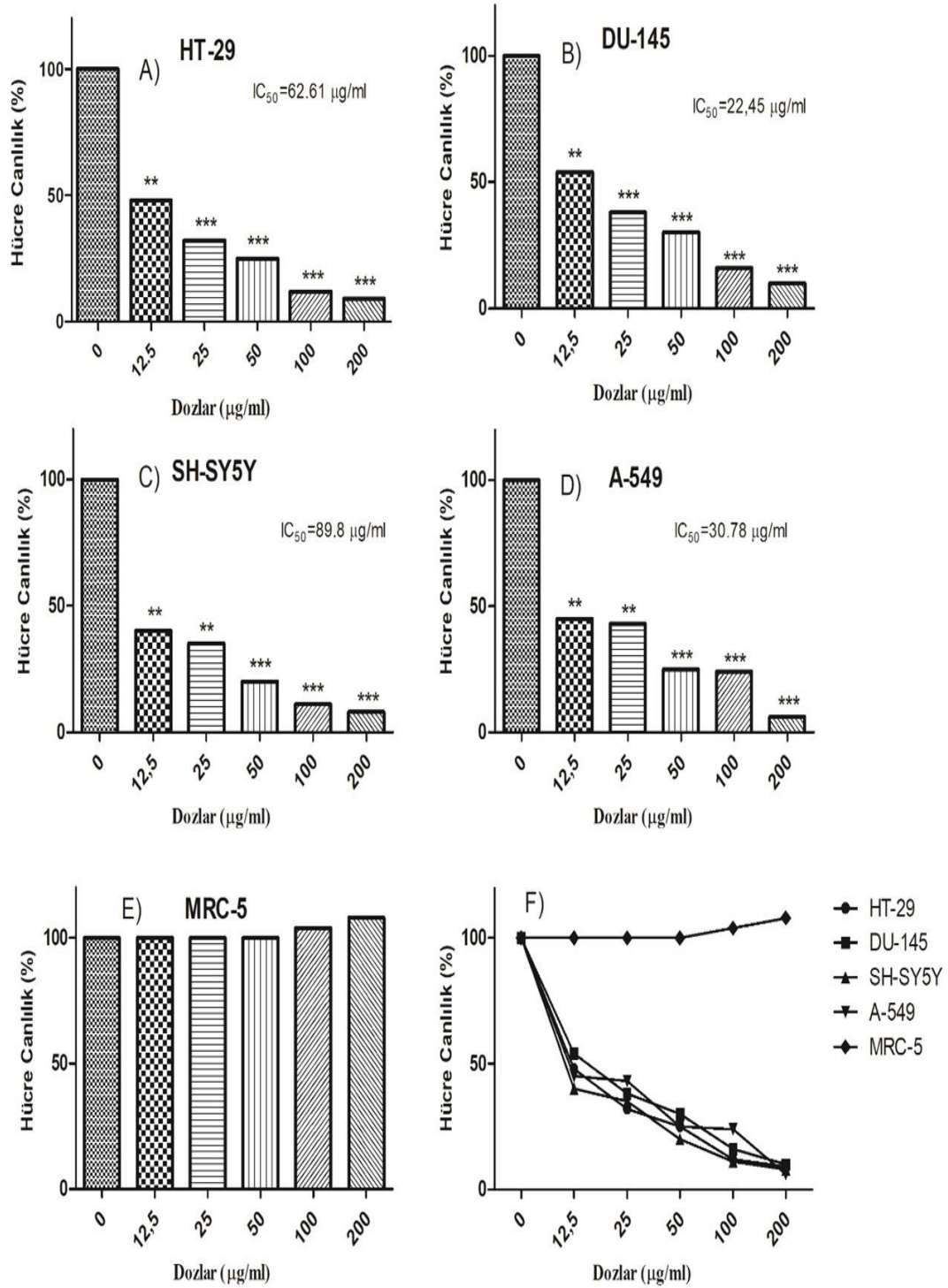


Şekil 3. GA7 izolatının 16S rRNA gen sekans verilerine göre hazırlanan filogenetik ağacı

Etil asetat ekstraktının doz-bağımlı antikanser etkinliğinin araştırılması

Çalışmanın bu aşamasında *A. tenuissima* GA7 izolatının etil asetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (12.5, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL) farklı kanser hücre hatlarına 24 saat

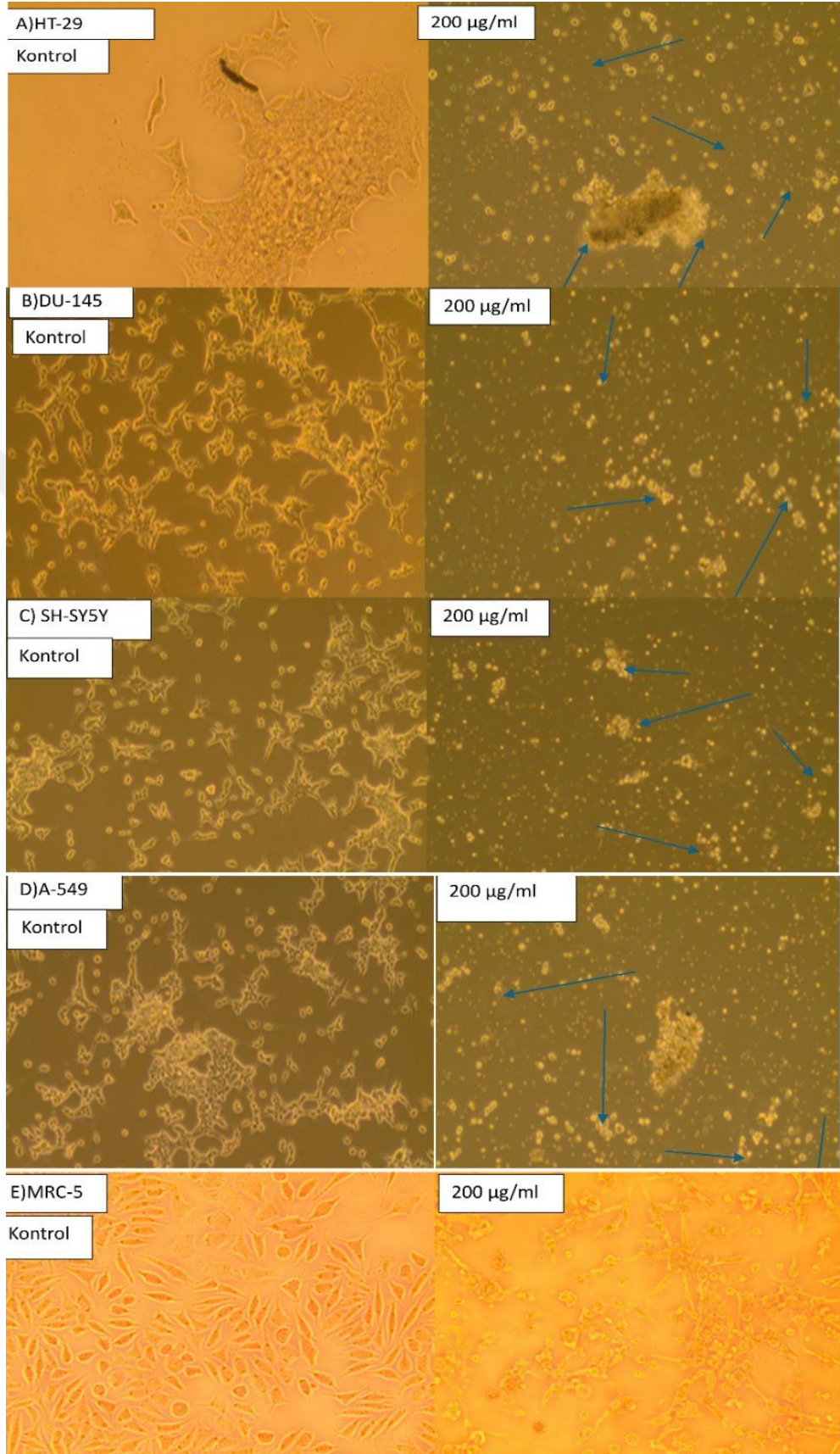
uygulanarak antikanser etkinlikleri araştırılmıştır. Belirtilen konsantrasyonlarda ekstratın sağlıklı hücre hattına (MRC-5) karşıda olası toksisitesi test edilmiştir.



Şekil 4. Etil asetat ekstratının doz-bağımlı antikanser etkinliğinin test edilmesi. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs kontrol, ** $p<0.01$ vs kontrol ve *** $p<0.001$ vs kontrol olarak verilmiştir)

Aşağıdaki şekilde etil asetat ekstratının 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunun, tüm kanser hücrelerinde hücre ölümünü arttırdığına dair fotoğraflar mevcuttur. Bu fotoğraflara göre, etil asetat ekstratı

kanser hücrelerinde hücre canlılığını ekstrakt eklenmeyen kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır. MRC-5 hücrelerinde ise sitotoksik etki göstermemiştir.

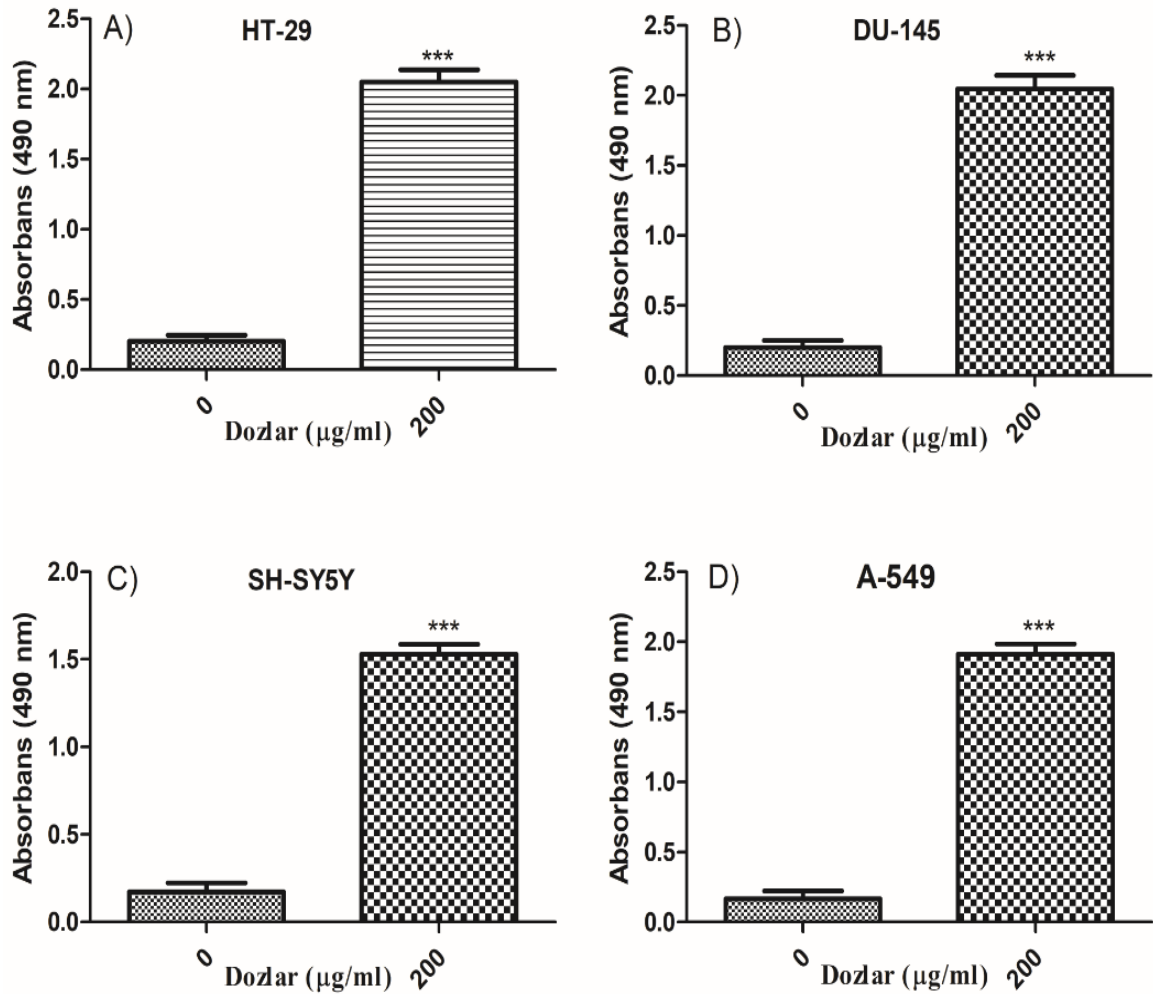


Şekil 5. Yüksek doz ekstraktının (200 µg/ml) kanser hücreleri ve fibroblast hücrelerindeki etkilerinin mikroskop görüntüleri

LDH Salınımı Analiz Sonuçları

Hücrelerde LDH salınımı hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi gösteren parametrelerden birisidir. LDH salınımının artması ölen hücre sayısının arttığını ve hücre canlılığının azaldığını gösterir (Smith *et al.* 2011).

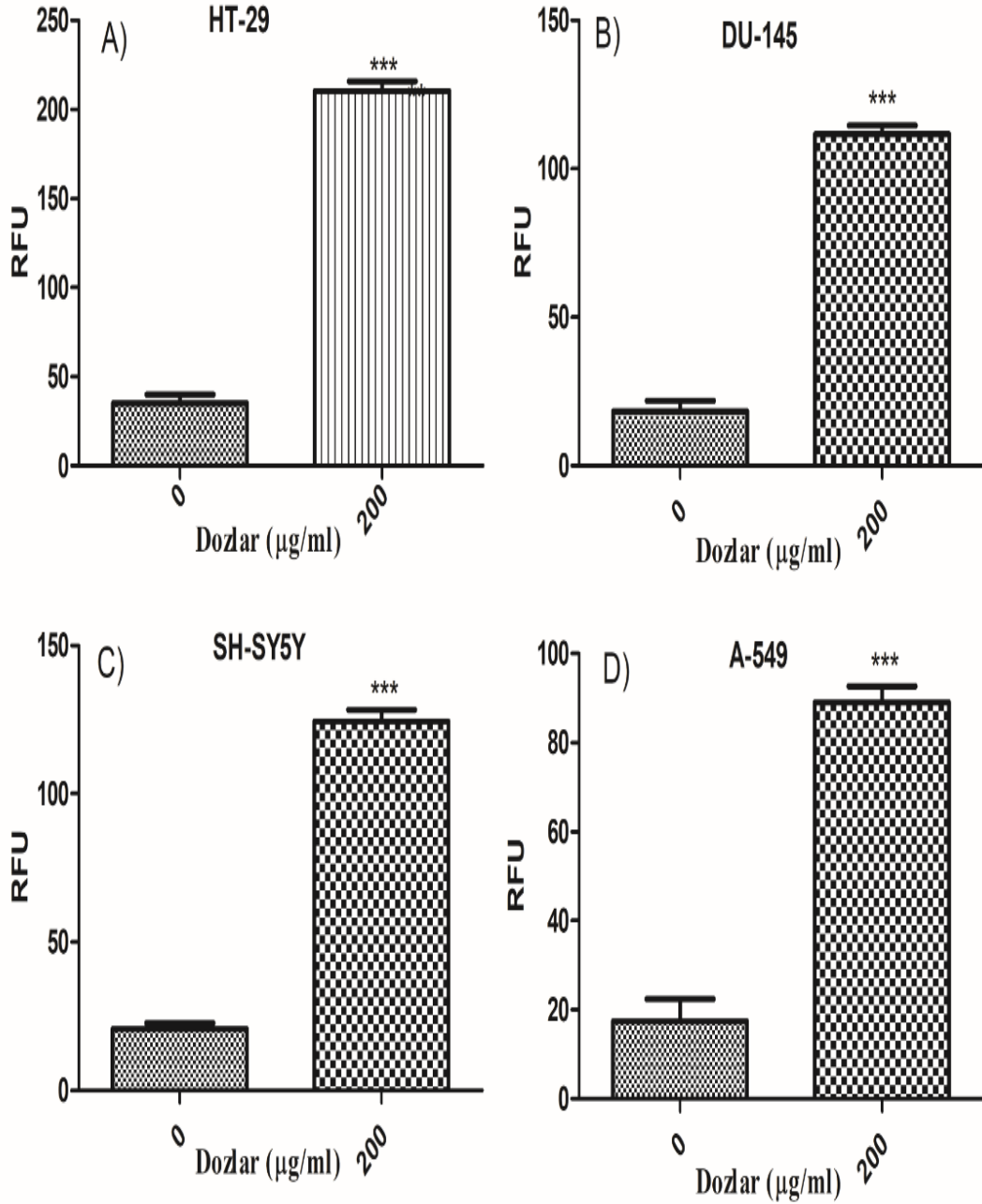
LDH salınım sonuçlarına göre sekonder metabolitlerin izolatının etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda kanser hücrelerinden LDH salınımını istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 6. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerine 24 saat belirtilen dozda uygulanmasının LDH salınım miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs 0, ** $p<0.01$ vs 0 ve *** $p<0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

ROS Analiz Sonuçları

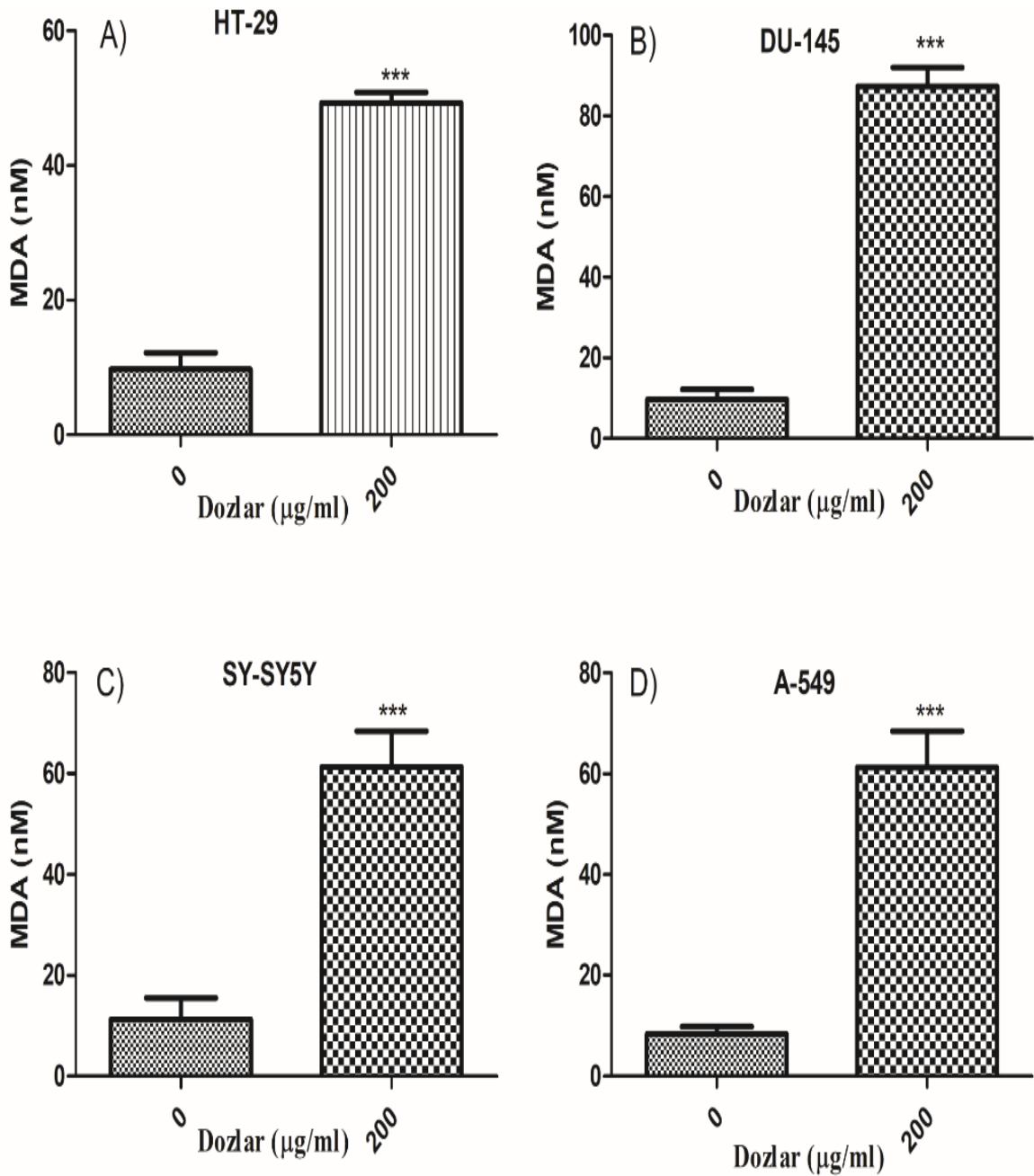
Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda, tüm kanser hücre hatlarında ROS miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 7. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının ROS miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler (Veriler ortalama \pm SS ve n=5 olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs 0, ** $p < 0.01$ vs 0 ve *** $p < 0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

Lipid Peroksidasyonu Sonuçları

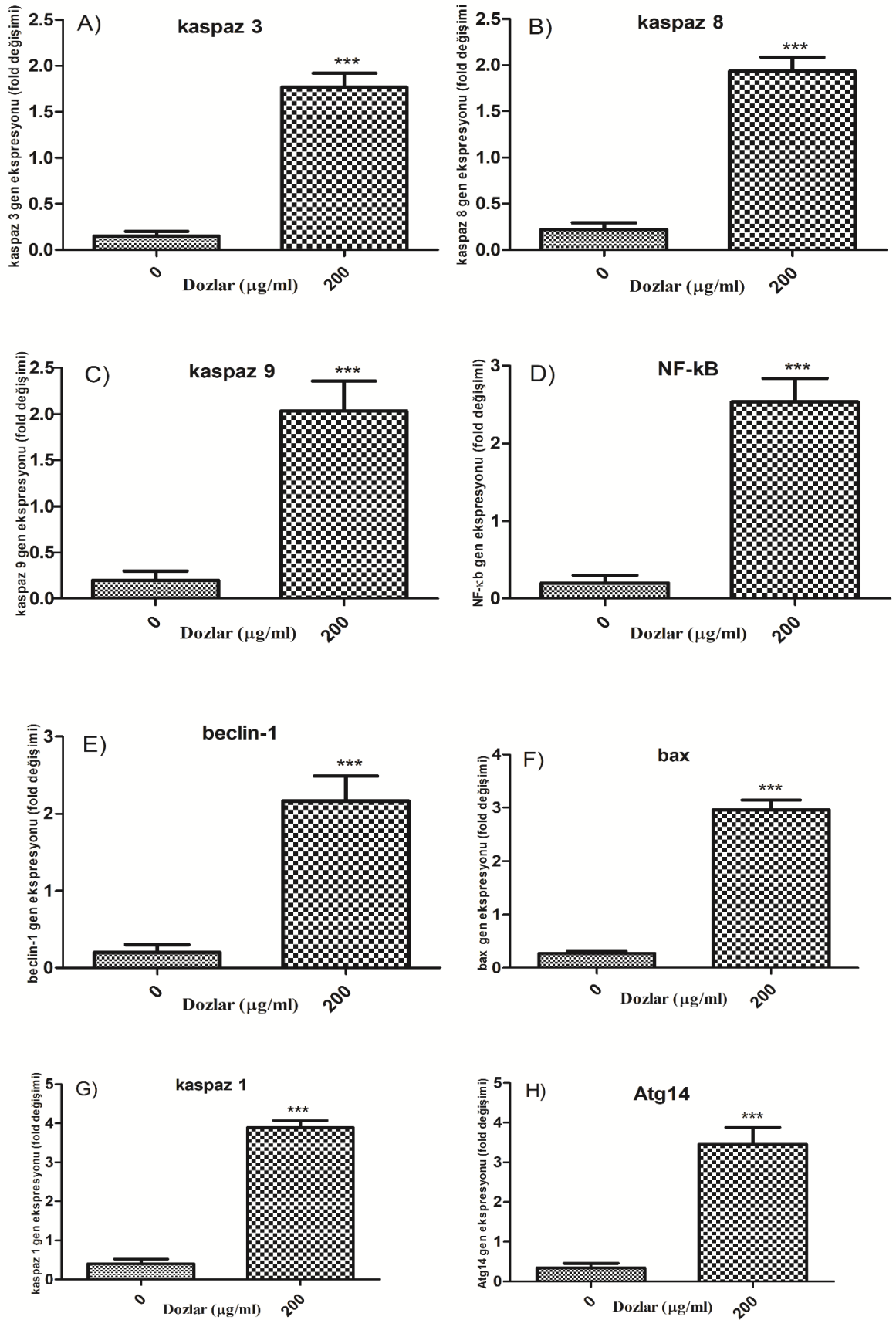
Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda, tüm kanser hücre hatlarında LPO göstergesi olan MDA miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p < 0.001$).



Şekil 8. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının kanser hücrelerinde 24 saatlik etkisinin LPO miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafikler (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs kontrol, ** $p<0.01$ vs kontrol ve *** $p<0.001$ vs kontrol olarak verilmiştir)

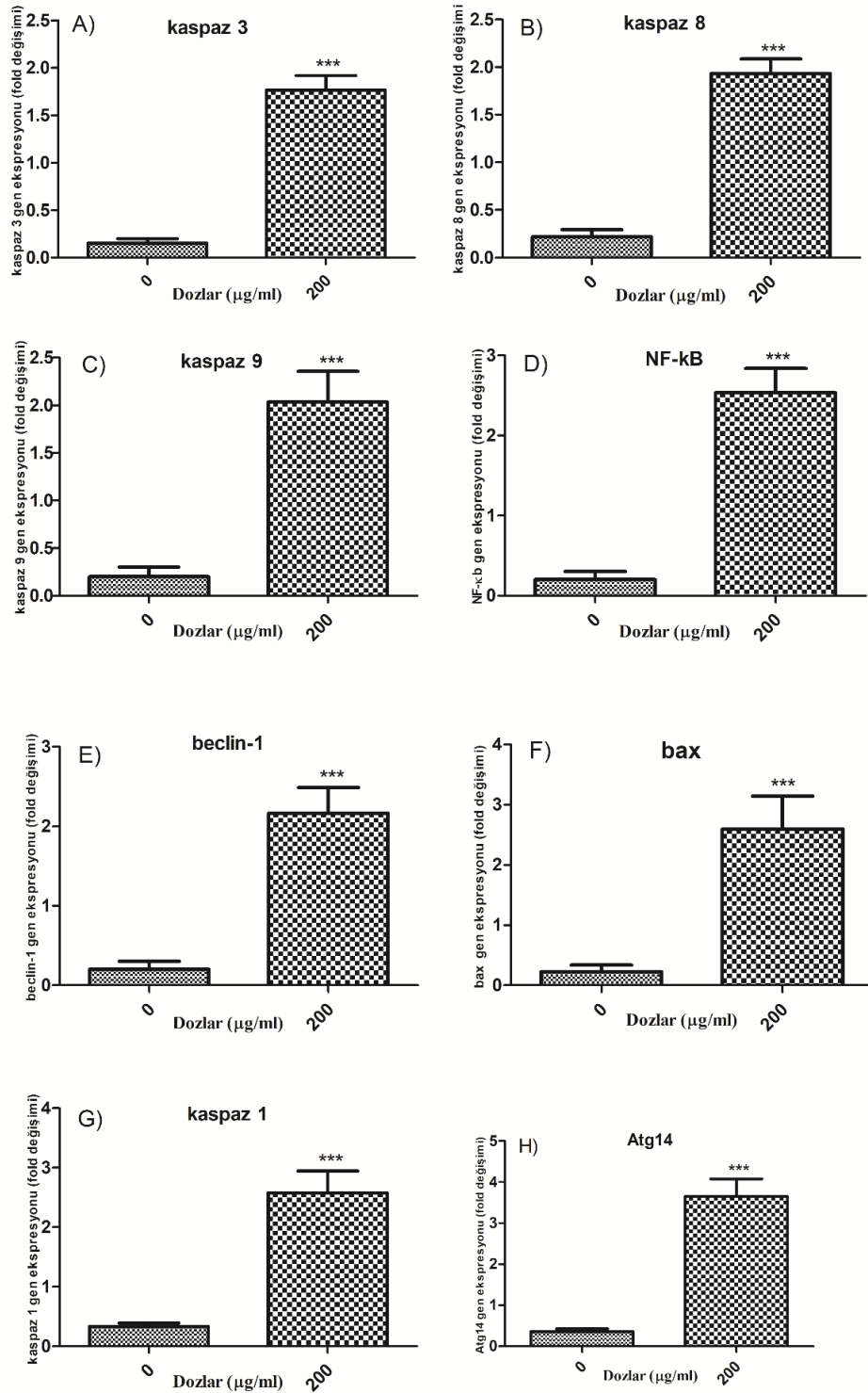
Kantitatif Eş Zamanlı PZR Sonuçları

Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, HT-29 hücre hattında, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF- κ B ve beclin-1 genlerinin ekspresyon miktarlarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).



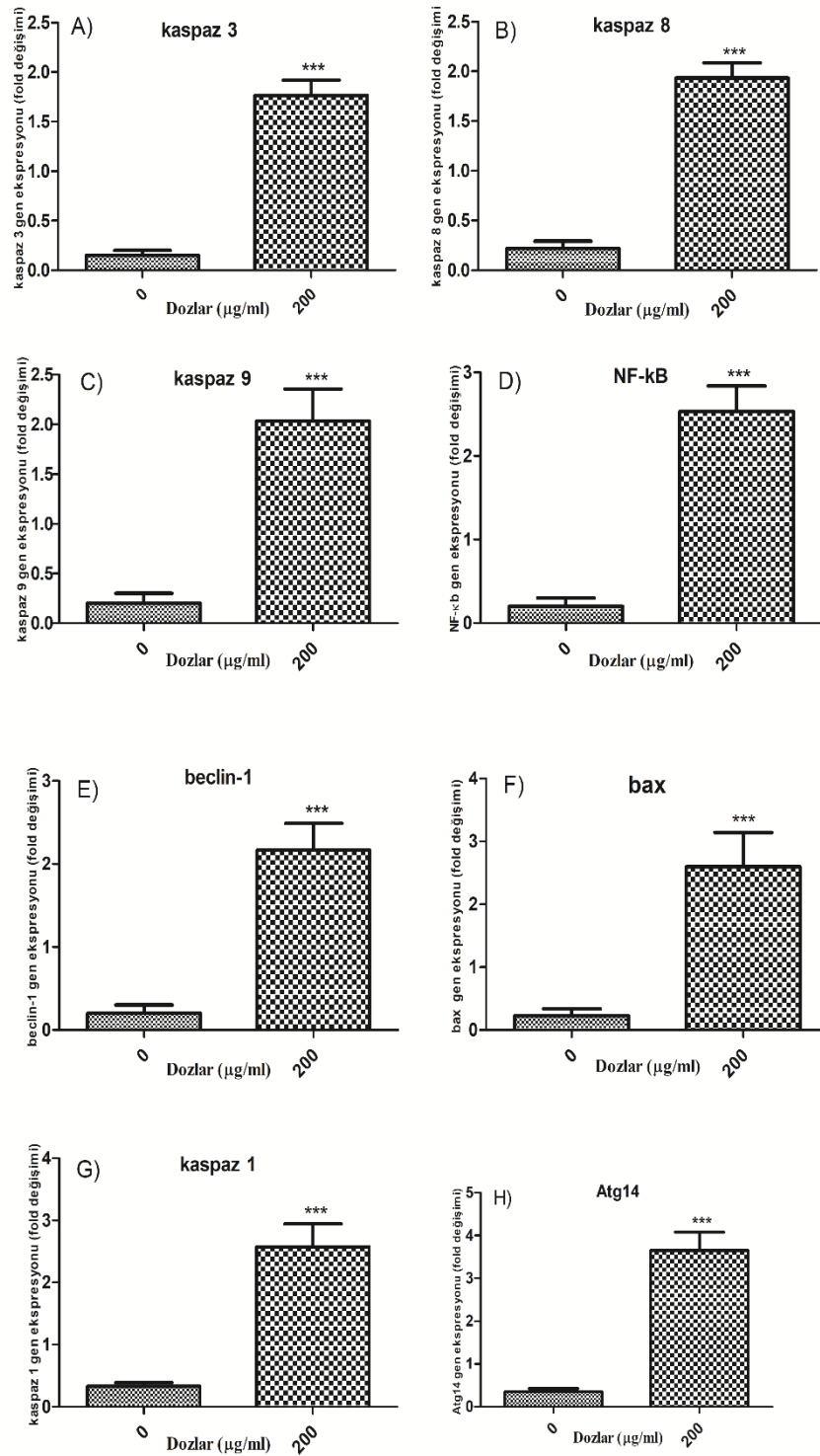
Şekil 9. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı HT-29 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-κB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafikler (Veriler ortalama ± SS ve n=5 olarak analiz edilmiştir. * p<0.05 vs 0, ** p<0.01 vs 0 ve *** p<0.001 vs 0 olarak verilmiştir)

Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, DU-145 hücre hattında, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF-kB ve beclin-1 genlerinin ekspresyon miktarlarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p < 0.001$).



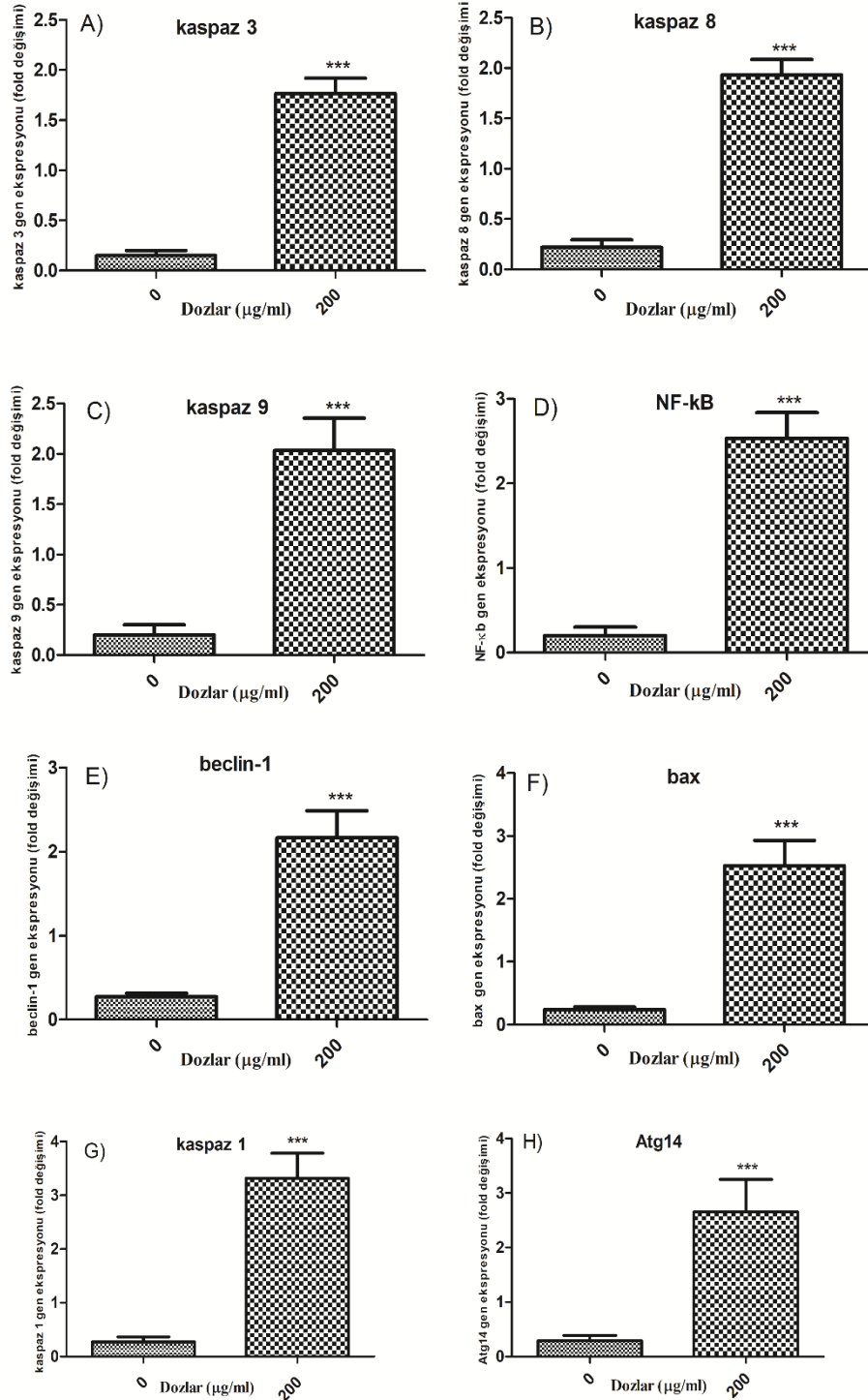
Şekil 10. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı DU-145 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs 0, ** $p < 0.01$ vs 0 ve *** $p < 0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, SH-SY5Y hücre hattında, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF-kB ve beclin-1 genlerinin ekspresyon miktarlarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 11. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı SH-SY5Y hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs 0, ** $p<0.01$ vs 0 ve *** $p<0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

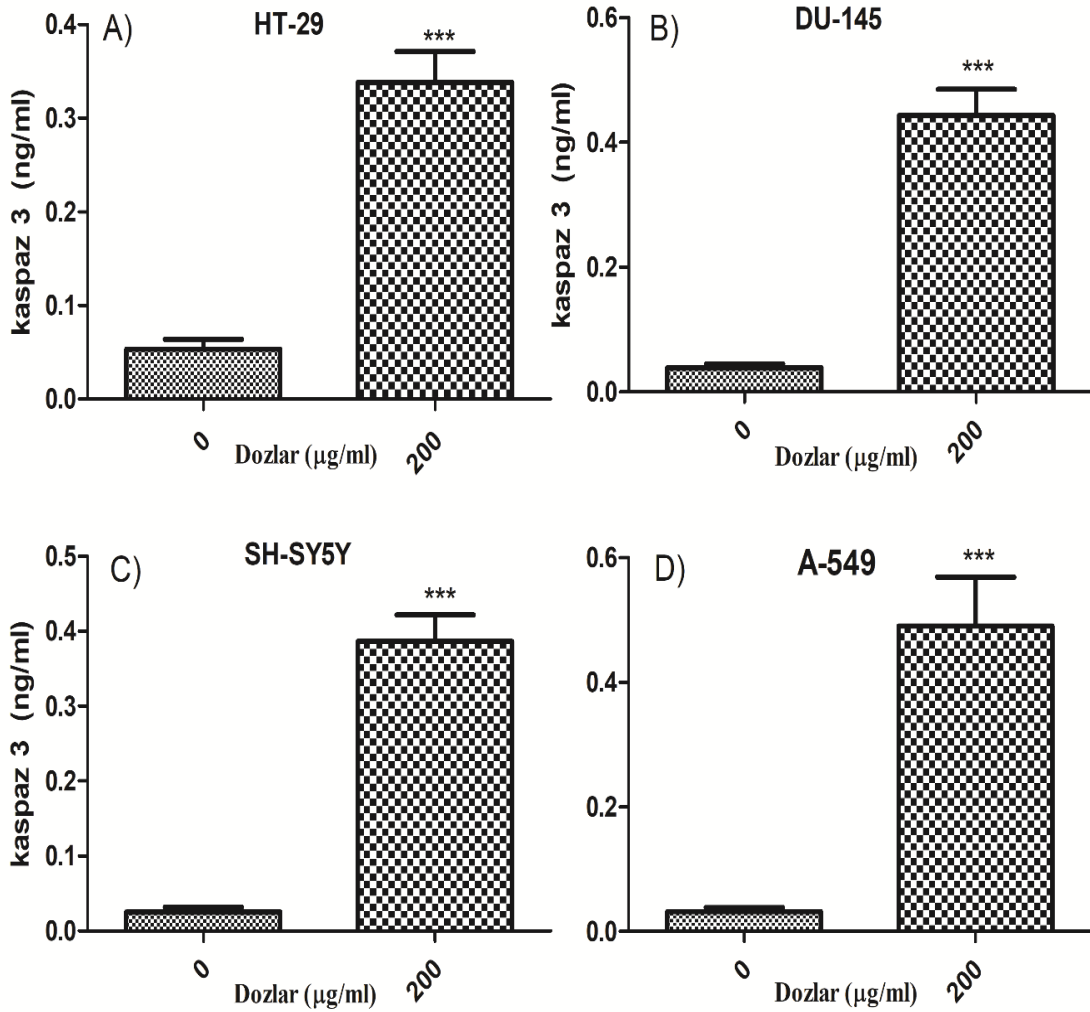
Aşağıdaki şekilde A-549 hücrelerinde genlerin ekspresyon değişimleri verilmiştir. Kültür izolatının etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda, A-549 hücre hattında, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, NF-kB ve beclin-1 genlerinin ekspresyon miktarlarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p < 0.001$).



Şekil 12. Sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktının 24 saat uygulandığı A-549 hücrelerinde A) kaspaz 3, B) kaspaz 8, C) kaspaz 9, D) NF-kB, E) beclin-1, F) bax, G) kaspaz 1 ve H) Atg14 genlerinin ekspresyon ölçümlerinin ekstrakt eklenmeyen gruba göre değişimini gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs 0, ** $p < 0.01$ vs 0 ve *** $p < 0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

Kaspaz 3 Proteini ELISA Analiz Sonuçları

Pro kaspaz 3'ün aktif kaspaz 3'e dönüşerek aktif kaspaz 3 enziminin miktarının hücrede artması apoptozun iç yolak aktivasyonunun bir göstergesidir (Stennicke *et al.* 1998). Kaspaz 3 ELISA analiz sonuçlarına göre sekonder kültür izolatının etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda, tüm kanser hücrelerinde kaspaz 3 miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).

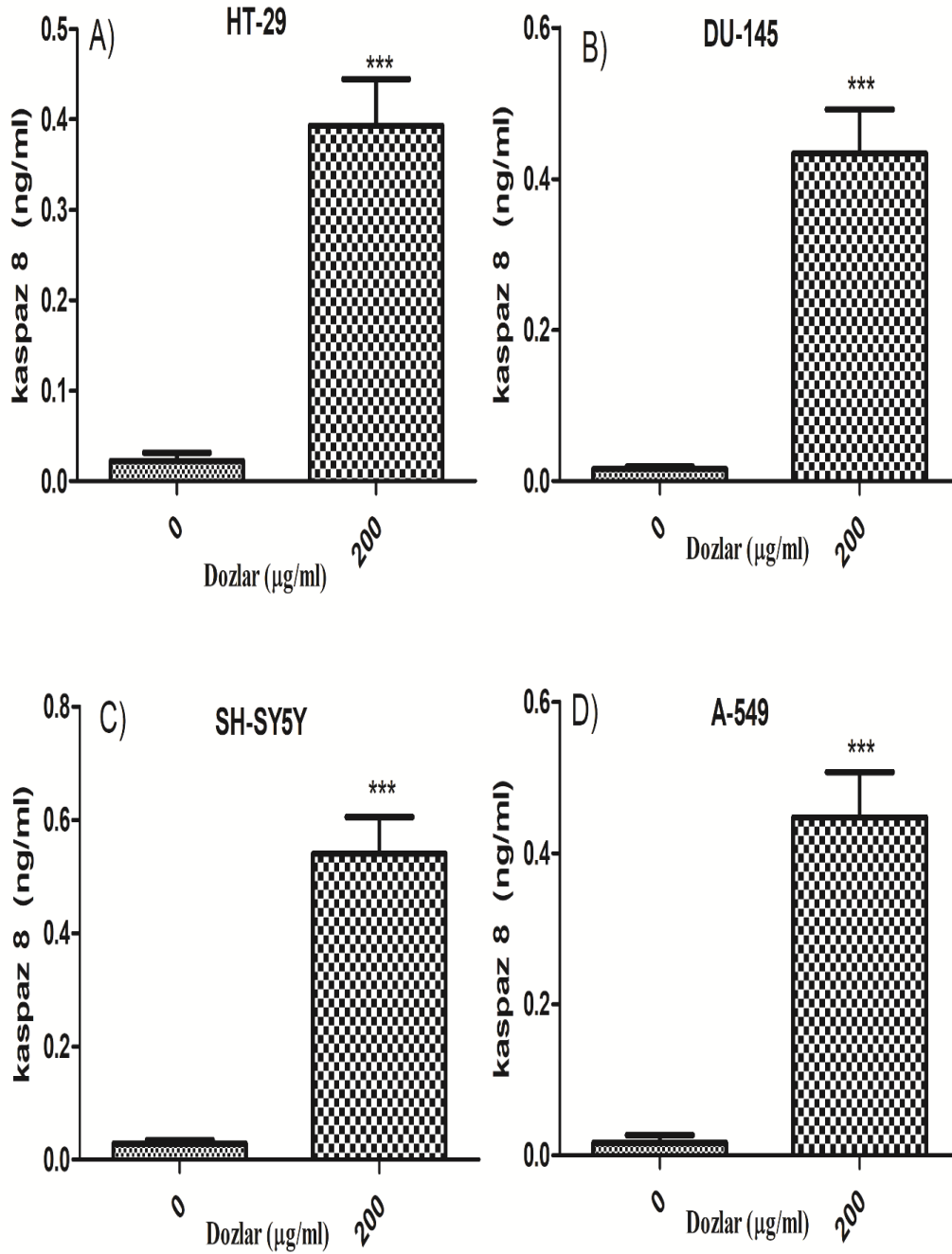


Şekil 13. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının belirtilen dozda A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının kaspaz 3 miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs kontrol, ** $p<0.01$ vs kontrol ve *** $p<0.001$ vs kontrol olarak verilmiştir)

Kaspaz 8 Proteini ELISA Analiz Sonuçları

İnsan hücrelerinde, pro kaspaz 8'in aktif kaspaz 8 enzimine dönüşerek kaspaz 8 protein miktarının hücrede artması, programlı hücre ölümü olan apoptozun dış yolak aktivasyonunun bir göstergesidir (Kang *et al.* 2004). Kaspaz 8 ELISA analiz sonuçlarına göre sekonder

metabolitlerin etil asetat ekstraktı, tüm kanser hücrelerinde kaspaz 8 miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).

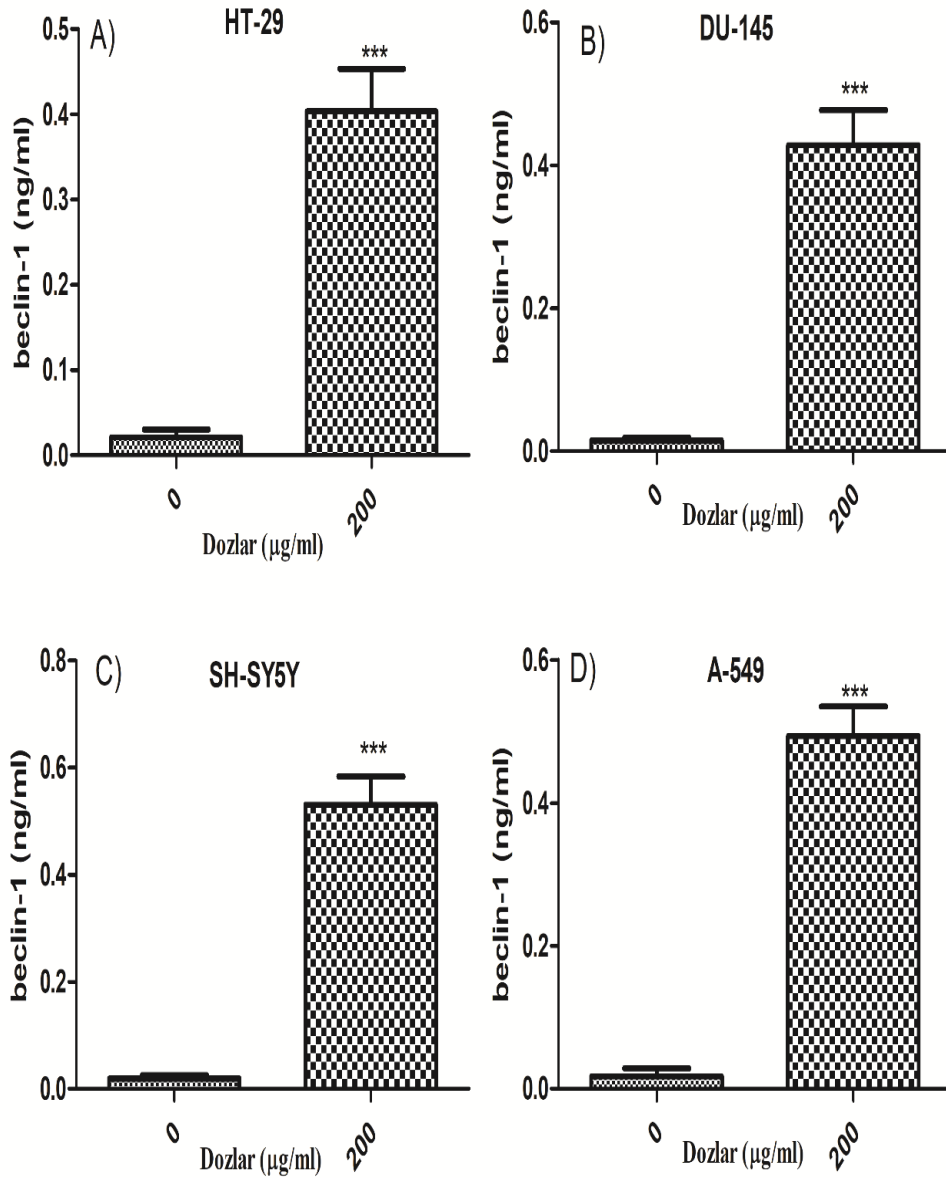


Şekil 14. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının belirtilen dozda A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasının kaspaz 8 miktarlarında yol açtığı değişimi gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs kontrol, ** $p<0.01$ vs kontrol ve *** $p<0.001$ vs kontrol olarak verilmiştir)

Beclin-1 Proteini ELISA Analiz Sonuçları

İnsan hücrelerinde, beclin-1 protein ekspresyonunun artması, programlı hücre ölümlerinden birisi olan otofajinin arttığının bir göstergesidir (Kang *et al.* 2011). Beclin-1 ELISA analiz sonuçlarına göre sekonder metabolitlerin etil asetat ekstraktı, uygulanan dozda

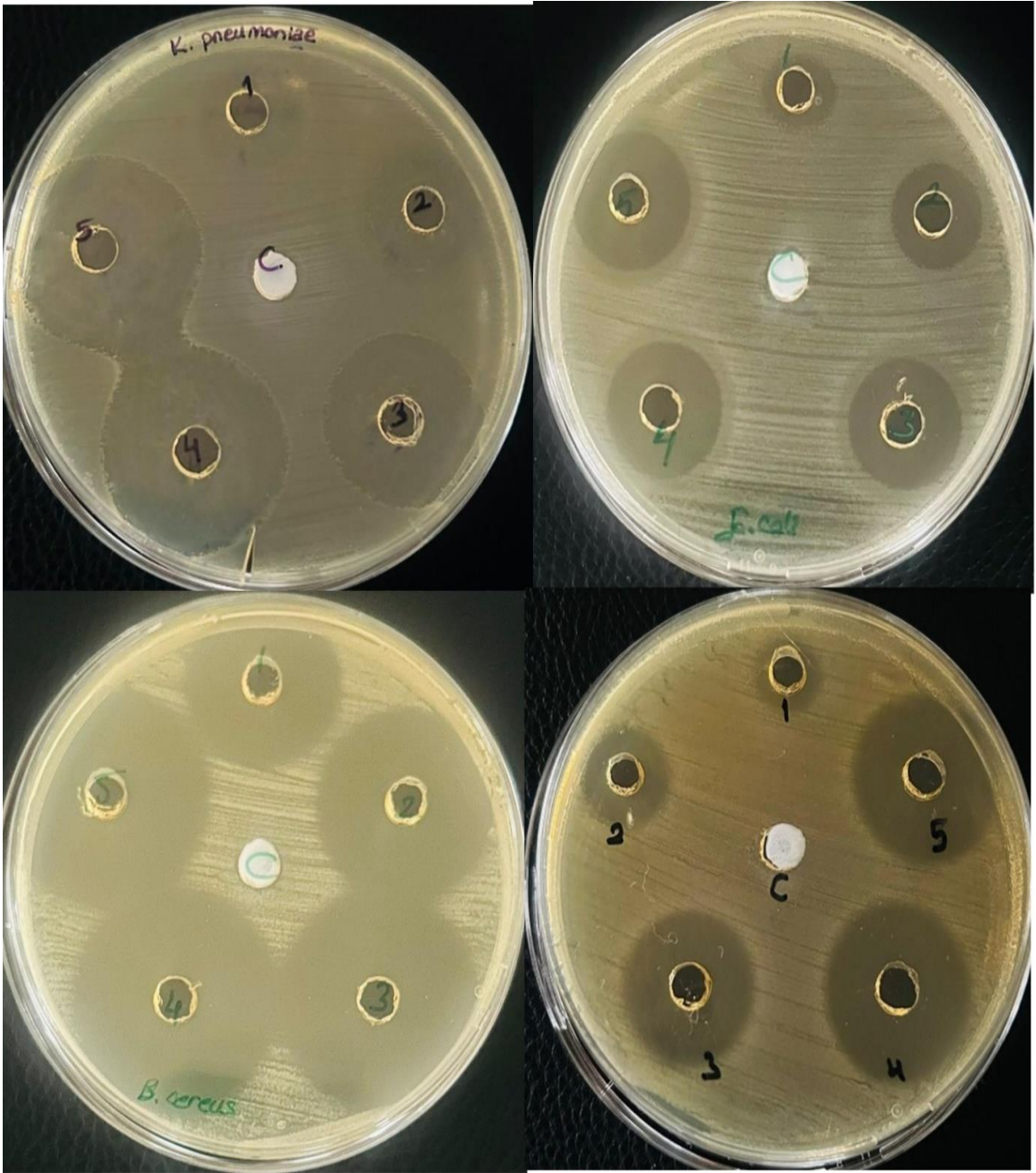
tüm kanser hücre hatlarında, beclin-1 protein ekspresyon miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 15. Sekonder metabolitlerinin etil asetat ekstraktının A) HT-29, B) DU-145, C) SH-SY5Y ve D) A-549 hücrelerine belirtilen dozlarda 24 saat uygulanmasının beclin-1 protein ekspresyonu miktarındaki değişimi gösteren grafiklerdir. (Veriler ortalama \pm SS ve $n=5$ olarak analiz edilmiştir. * $p<0.05$ vs 0, ** $p<0.01$ vs 0 ve *** $p<0.001$ vs 0 olarak verilmiştir)

Etil Asetat Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre etil asetat ekstraktı, *Bacillus cereus* (ATCC 33019), *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC) bakteri suşlarına karşı tüm dozlarda yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlendi. Ekstrak, tüm dozlarda zon oluşturdu. Zon çapları ölçülerek tablo 6'da belirtildi. Şekil 16'da etil asetat ekstraktının farklı dozlarının etki gösterdiği bölgeler açıkça görülmektedir.



Şekil 16. Etil asetat ekstraktının Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemi sonucu elde edilen antimikrobiyal aktivite bulguları; (A) *K. pneumoniae*, (B) *E. coli*, (C) *B. cereus*, (D) *S. aureus*

Tablo 6’da etil asetat ekstraktının farklı dozlarda *Bacillus cereus* (ATCC 33019), *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakterilerinin çoğaldığı agarlı katı besiyerinde oluşturduğu zon çapları belirtilmiştir. Bu verilere göre etil asetat ekstraktı tüm dozlarda antimikrobiyal etki göstererek tüm türlerde zon oluşturmuştur. Tüm bakteri türlerinde en düşük zon çapı en düşük dozda oluşmuştur. 1000 ve 1250 µg/mL dozlarda tüm türlerde en fazla ve aynı çapta zon oluşmuştur. 250-1000 µg/mL arasında doz artışına bağlı olarak zon çapları artış göstermiştir. Etil asetat ekstraktının hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilerde doza bağlı antimikrobiyal etki göstererek zon oluşturduğu çıkarımı yapılabilir.

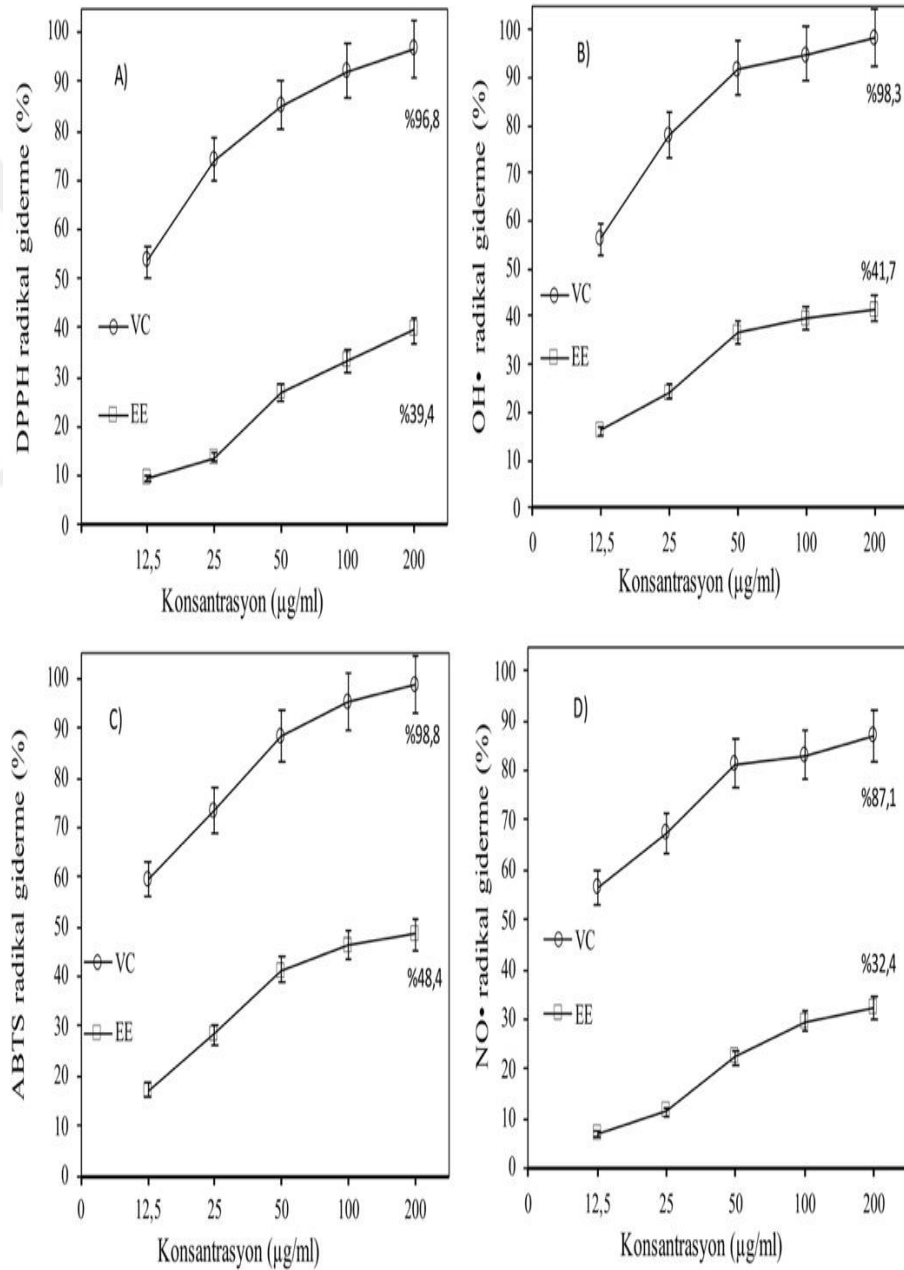
Tablo 7. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Etil Asetat Ekstraktı dozu	250µg/mL	500 µg/mL	750 µg/mL	1000 µg/mL	1250 µg/mL
Mikroorganizma					
<i>S. aureus</i>	13 mm	20 mm	28 mm	32 mm	32 mm
<i>B. cereus</i>	31 mm	34 mm	42 mm	43 mm	43 mm
<i>E. coli</i>	14 mm	20 mm	24 mm	24 mm	24 mm
<i>K. penumoniae</i>	21 mm	24 mm	32 mm	40 mm	40 mm

Etil asetat ekstraktının antioksidant aktivitesi

Canlılarda rekatif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak mitokondri, kloroplast, endoplazmik retikulum, peroksizomlar, lizozom, sitoplazma ve plazma membranları gibi yapılarda üretilmektedir. Hücrel metabolizmanın yanısıra radyasyon, sigara, ilaçlar, ağır metaller ve hastalık gibi dışsal faktörlerde ROS ve RNS üretimine sebebiyet vermektedir (Jasid *et al.* 2006; Hameister *et al.* 2020; Ashok *et al.* 2022; Curieses Andrés *et al.* 2023). Normal seviyede yani düşük veya orta düzeylerde ROS/RNS hücrelerde sinyal iletiminde görev alarak hücrel fonksiyonların (hücrelerin çoğalması ve farklılaşması, apoptoz vb.) yerine getirilmesinde görev alır. Bu durum aynı zamanda iyi stres (God stress) olarak da bilinir. Halbuki, normalin üzerindeki ROS/RNS seviyeleri hücrelerde oksidatif strese neden olmakta (Bad stress) ve oluşan oksidatif stres ise hücrel moleküller (proteinler, nükleik asitler, lipitler vb) üzerinde hasar oluşturmaktadır. Bu moleküllerde ortaya çıkan hasar ise nihayetinde deri yaşlanması, kanser, infertilite ve bağırsak hastalıkları gibi insan yaşamını ve sağlığını tehdit eden anormalliklerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Martinez and Andriantsitohaina 2009; Phaniendra *et al.* 2015; Phaniendra *et al.* 2015; Eddaikra and Eddaikra 2021; Ashok *et al.* 2022; Jomova *et al.* 2023; Arslan *et al.* 2023; Arslan *et al.* 2024). Hücrelerde ise ROS/RNS seviyeleri, endojen antioksidantlar (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve eksojen antioksidantlar ile normal seviyelerde tutulmaktadır (Rao *et al.* 2011; Moussa *et al.* 2019; Hussain and Kayani 2020; Arslan *et al.* 2023). Bitkisel ve hayvansal gıdaların yanısıra mantarlar, algler ve bakterilerde eksojen antioksidantların önemli kaynakları olarak işlev görmektedir (Mirończuk-Chodakowska *et al.* 2018; Chandra *et al.* 2020; Panova and Tatikolov 2023; Arslan *et al.* 2023; Rahim *et al.* 2024). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, mantarlardan elde edilen ergotion, pigment, polisakkarit, peptit, fenolik ve alkaloid gibi metabolitlerin veya bunları içeren ekstratların antioksidant aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Dewi *et al.* 2012; Yadav *et al.* 2014; Giese *et al.* 2015; Sugiharto *et al.* 2016; Hameed *et al.* 2017; Mishra *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020; Gong *et al.* 2023). Mevcut çalışmada da, kültür süpernatantından hazırlanan etil asetat ekstraktının antioksidant aktivitesi *in vitro*' da

NO•, OH•, DPPH ve ABTS radikallerine karşı test edilmiş ve askorbik asit de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler için etil asetat ekstratının 5 farklı konsantrasyonu (12,5, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml) test edilmiştir. Şekilde özetlenen verilerden de görülebileceği gibi, test edilen bütün konsantrasyonlarda ekstrat bütün radikallere karşı antioksidant özellik sergilemiştir. Ekstraktın en güçlü radikal süpürme potansiyeli ABTS radikaline, bunu takiben de sırasıyla OH•, DPPH ve NO• radikaline karşı belirlenmiştir. Dahası, ekstratın radikal giderme potansiyelinin konsantrasyona bağlı olarak sürekli bir artış trendinde olduğu gözlemlenmiştir. Ekstrakt, bütün radikallere karşı süpürme kapasitesi gösterse de, bu kapasitesi askorbik asit ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur.



Şekil 17. Ekstratın farklı radikallere karşı antioksidant potansiyeli. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikali, hidroksil radikali (OH•), nitrik oksit radikali (NO•) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali

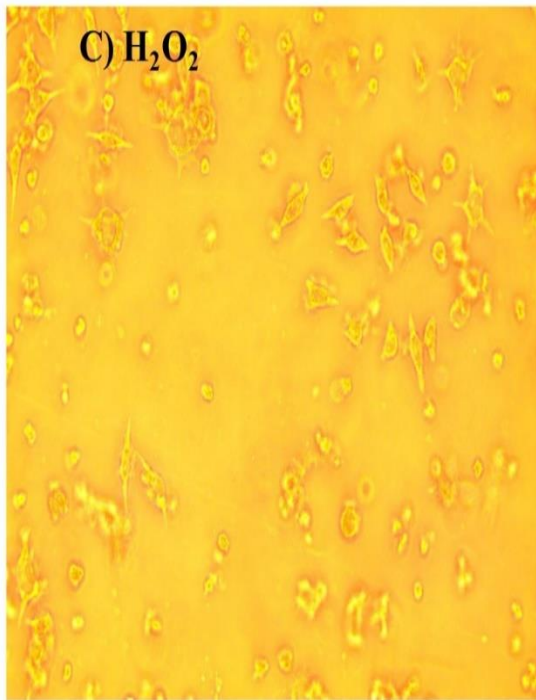
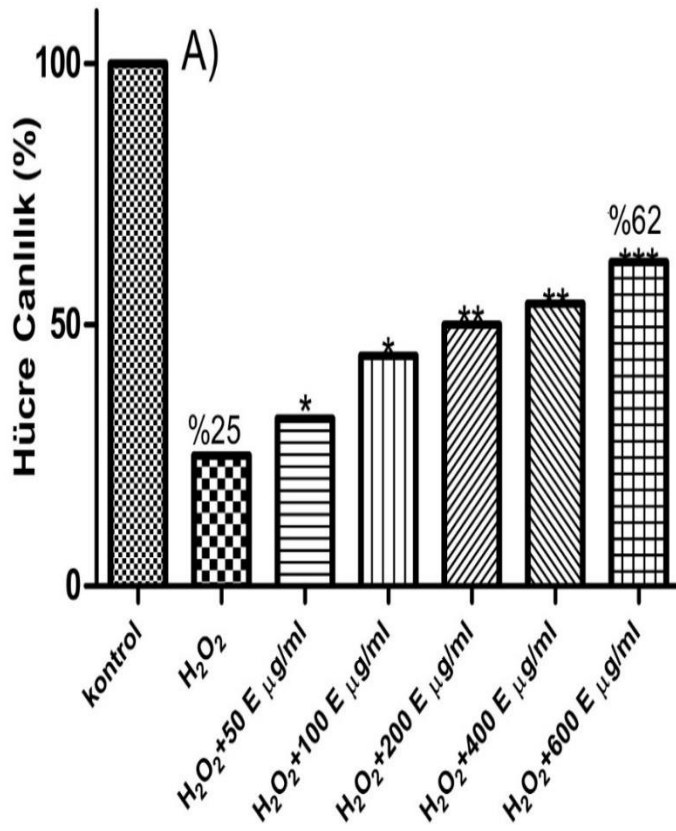
Ekstratın deri-yaşlanma karşıtı potansiyelinin deri-fibroblast hücrelerinde araştırılması

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri; nem ve ısı düzenlenmesi, uyarıları algılama, radyasyona, çevresel ve mekanik streslere karşı koruma, bağışıklık düzenlenmesi ve D vitamini sentezi gibi birçok önemli fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (Archer, 2010; Anderson *et al.* 2015). Yaşlanma süreci deri, ovaryum ve pankreas gibi bütün organları etkilemektedir. Bununla birlikte, yaşlanma işaretleri en belirgin olarak deride ortaya çıkmaktadır. Yaşlanma süreciyle birlikte, deride kırışıklıklar, gevşeklik, elastoz ve anormal pigmentasyon gibi değişiklikler belirginleşmektedir (Glaser and Stienecker, 2000; Broekmans *et al.* 2009; Kim *et al.* 2021; Salminen *et al.* 2022). ROS birikmesiyle ortaya çıkan oksidatif stres diğer organlarda olduğu gibi deri yaşlanmasında en önemli sebebi olarak kabul edilmektedir. Yaşlılığa bağlı olarak ROS yani oksidatif stress birikimide arttığı için, yaşlanma süreci deride yapısal anaormallikler oluşturmaktadır. Normal fizyolojik yaşlanmanın yanısıra, güneşe yani ultraviyole (UV) radyasyona maruz kalmada deri yaşlanmasının diğer önemli sebebi olarak kabul edilmektedir (Gu *et al.* 2020; Salminen *et al.* 2022).

Günümüzde, derideki yaşlanmayı durdurma veya engellemeye yönelik olarak yeni cilt bakım ürünlerini geliştirme çalışmaları artan bir yoğunlukta devam etmektedir. Bu durum ise, kozmetik endüstrisi pazarının her geçen gün daha da büyümesini sağlamaktadır. Cilt bakım ürünleri derinin su tutma kapasitesini artırma, kollajen sentezini indüklemeye ve pigmentasyonu engellemenin yanısıra antioksidant ve anti-inflammatory aktivite gösterme mekanizmaları ile yaşlanma karşıtı özellik göstermektedir (Albayrak 2023). Literatürde, deri yaşlanmasının engellenmek için bitki, bakteri ve mantar gibi organizmalardan elde edilen polisakkarit, fenolik, alkaloid, peptit gibi metabolitlerin veya bu metabolitleri içeren ekstratların kullanılabilceği rapor edilmektedir (Jahan *et al.* 2017; Letsiou *et al.* 2020; Wang *et al.* 2021; Michalak 2022; Prommaban *et al.* 2022; Dua *et al.* 2023).

Bu tez çalışmasında da *A. tenuissima*'nın etil asetat ekstratının antioksidant aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Hatta, antikanser aktivite çalışmaları sırasında ekstratın akciğer sağlıklı hücre hatları (MRC-5) üzerinde toksik etki yapmadığı hatta 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda onların büyümesini teşvik ettiği tespit edilmiştir. Bu yüzden, mevcut tez çalışmasında, antioksidant potansiyeli ve MRC-5 hücre hatları üzerindeki büyüme teşvik edici özelliği göz önüne alınarak, ekstratın *in vitro* deri-yaşlanma karşıtı özelliğide test edilmiştir. Deri yaşlanma modeli insan deri fibroblast hücreleri (NHDF'ler) ile hazırlanmıştır. Şekil 18 A-D' den görülebileceği gibi H₂O₂ uygulaması kontrole oranla NHDF'lerin canlılığını azaltmış (hücre canlılığı % 25), ancak ekstrakt H₂O₂ ile birlikte uygulandığında, özellikle 200 µg/ml'lik yüksek dozun (% 62'lik hücre canlılığı) H₂O₂'nin sitotoksik etkisine karşı bir koruyucu etki

sağlamıştır. Bu sonuç, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı ekstratın fibroblast hücrelerini koruma potansiyeline sahip olduğunu ve bu yüzden de oksidatif stres kaynaklı deri yaşlanmasına karşı ekstraktın kozmetik ürünlerinde kullanılabileceğini işaret etmektedir.



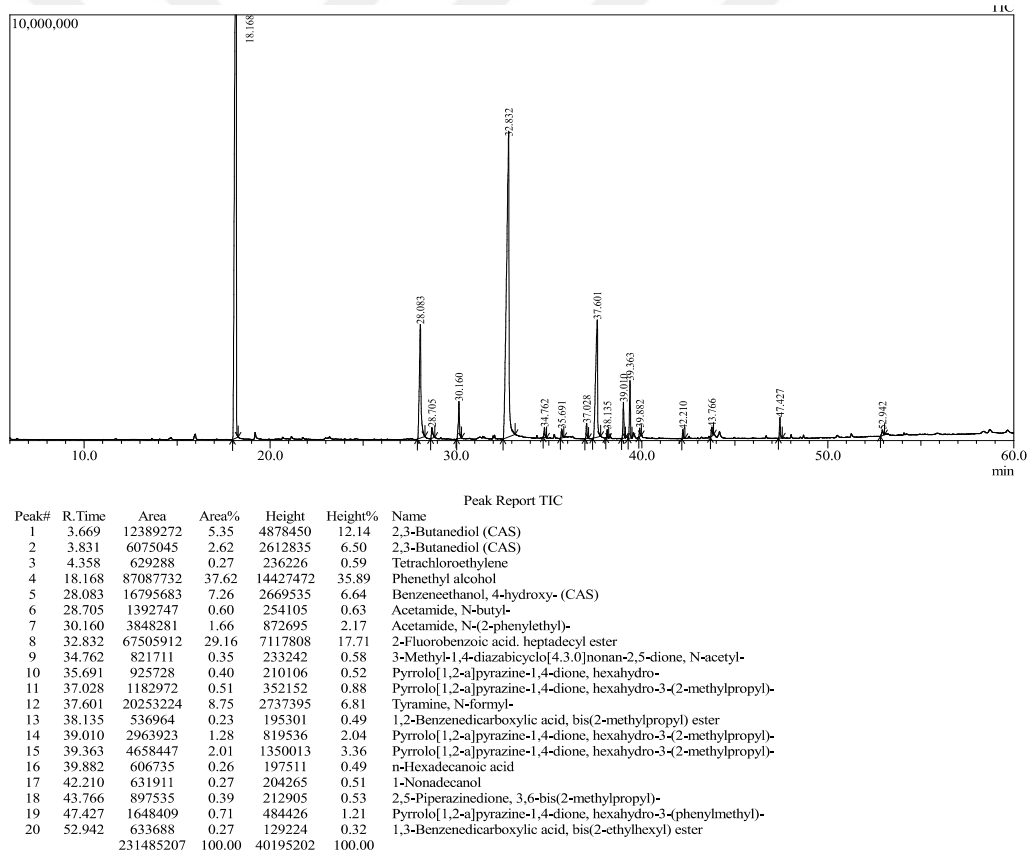
Şekil 18. A) H₂O₂ kaynaklı hücresel hasara karşı etil asetat ekstraktının farklı dozlarda insan normal deri fibroblast hücrelerindeki etkisi B) kontrol grubunun görüntüsü C) H₂O₂ uygulanan hücrelerin görüntüsü D) H₂O₂ ile beraber 600 µg/mL ekstrakt uygulanan hücrelerin görüntüsü (Veriler ortalama ± SS ve n=5 olarak analiz edilmiştir. *p<0.05 vs kontrol, **p<0.01 vs kontrol ve ***p<0.001 vs kontrol olarak verilmiştir)

Ekstratın kimyasal içeriğinin belirlenmesi

Bu tez çalışmasında microfungusun etil asetat ekstraktı kütle spektrometrisine bağlı gaz kromatografisi (GC-MS) yöntemi ile analiz edilmiş ve yirmi adet bioaktif molekül içerdiği tespit edilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalara bakıldığında farklı tür mükrofungusların izolatlarının bu moleküllerden bazılarını içerdiği ve bu moleküllerin farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (Farhat *et al.* 2022).

Daha önce yapılan bir çalışmada, topraktan elde edilen fungus olan *Aspergillus arcovardensis* SSSIHL-01 türünden elde edilen miselyal özütü GC-MS ile analiz edilmiştir. Miselyal özütün anti-inflamatuar aktivite gösterdiği bildirilen etil linoleat, oleik asit, n-heksadekanoik asit ve etil palmitat gibi bazı önemli bileşikleri içerdiği keşfedilmiştir (Skanda and Vijayakumar 2021). Başka bir çalışmada, *Botryosphaeria dothidea* türü mikrofungusun etil asetat ekstaktının yüksek antioksidant kapasiteye ve serbest radikal giderme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu türden elde edilen izolat GC-MS ile analiz edildiğinde heksahidropirrolizin-3-on, 1.2-benzenedikarboksilik asit bis(2-metilpropil) ester ve 3.6-bis(2-metilpropil)-2.5-piperazindion bileşiklerini içerdiği analiz edilmiştir (Druzian *et al.* 2020). Başka bir çalışmada endofitik mikrofungus *Talaromyces trachyspermus* türünden elde edilen kültür izolatu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* türü bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Ayrıca kültür izolatının hekzan ekstraktı GC-MS yöntemi ile analiz edildiğinde eikosan, oleik asit, n-heksadekanoik asit, etil Oleat, sis-vaksenik asit ve heptakozan moleküllerini içerdiği ortaya konmuştur (Farhat *et al.* 2022). Başka bir çalışmada, makrofungus olan *Rigidoporus microporus* türünden elde edilen kültür izolatının metanol ve aseton ekstraktları *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhi* türlerine karşı yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Ekstraktlar GC-MS ile analiz edildiğinde heksadekan, n-heksadekanoik asit, pentadekanoik asit, oktadekan, heksadekanoik asit, n-oktadekanoik asit, di-n-oktil ftalat (1, 2-benzenedikarboksilik asit, dioktil ester) ve n-dekanoik asit bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir (Falade *et al.* 2017). Başka bir çalışmada, endofitik mikrofungus *Annona muricata* türünden elde edilen kültür izolatının etil asetat ekstraktının *Streptococcus mutants*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, ve *Escherichia coli* türlerine karşı farklı dozlarda antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca etil asetat ekstraktı GC-MS ile analiz edildiğinde 20 farklı bileşik içerdiği ve bunlardan birinin n-Heksadekanoik asit olduğu keşfedilmiştir (Egbo *et al.* 2024). Başka bir çalışmada, *Penicillium islandicum* ve *Aspergillus tamarii* türü mikrofunguslardan elde edilen kültür izolatlarının etil asetat ekstraktları

Streptococcus pneumoniae, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Ayrıca HepG2 kanser hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Her iki türün izolatının etil asetat ekstraktı GC-MS ile analiz edildiğinde çok sayıda bileşik bulundurduğu ve bu bileşikler arasında 1,2-Benzenedikarboksilik asit ve n-Heksadekanoik bulunduğu tespit edilmiştir (Abdel-Hady *et al.* 2016). Benzer şekilde başka bir çalışmada, endofitik mikrofunguslar olan *Alternaria alternata* P02PL2 ve P02MS1 ve *Nigrospora oryzae* P02MS2A suşlarından elde edilen kültür izolatlarının metanol ekstraktlarının farklı tür Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde farklı dozlarda antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm suşların metanol ekstraktları GC-MS ile analiz edildiğinde 2-florobenzoik asit heptadeasil ester içerdiği keşfedilmiştir (Fanele and Ndlovu 2023). Tüm bu yapılan çalışmalar gözden geçirildiğinde farklı mikrofungus türlerinin sekonder metabolit olarak farklı bioaktif bileşikler ürettiği ve bu bileşiklerin farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 19. Ekstratın kimyasal içeriği

Önceden yapılmış çalışmalara göre mikrofungusların sekonder metabolit olarak ürettiği birçok molekülün birçok farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu keşfedilmiştir (Leung *et al.* 2009). Birçok mikrofungus türünün ürettiği metabolitlerin yüksek antioksidant kapasitesi ve serbest radikal giderici özelliği vardır (Tosi *et al.* 2010). *Alternaria* türü mikrofungusların birçok farklı sekonder metabolit ürettiği ve ürettikleri bu moleküllerin birçok biyolojik

aktiviteye sahip olduğu keşfedilmiştir (Lou *et al.* 2013). Bu çalışmada, izole edilen *Alternaria tenuissima* mikrofungusunun ürettiği metabolitlerin yüksek antioksidant kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada bu türden izole edilen polisakkaritlerin antioksidant kapasitelerinin yüksek olduğu ve serbest radikalleri yok ettiği bulunmuştur (Wang *et al.* 2019). Başka bir çalışmada, *Alternaria* türünden *Alternaria alternata* AE1 suşunun ürettiği metabolitler yüksek serbest radikal giderme aktivitesi göstermiştir (Chatterjee *et al.* 2019). Farklı bir çalışmada, *Chaetomium globosum* CDW7 türünden elde edilen flavipin molekülünün ve kültür ekstraktlarının yüksek serbest radikal giderme özelliği olduğu gözlemlenmiştir (Ye *et al.* 2013). Başka bir çalışmada, *Fusarium tricinctum* T6 mikrofungus türünden elde edilen metabolitlerin etil asetat ekstraktının serbest radikal giderme kapasitesinin yüksek olduğu keşfedilmiştir (Vasundhara *et al.* 2016). *Phellinus igniarius* türü mikrofungustan elde edilen ekstraktan saflaştırılan phelligridimer A metabolitinin antioksidant kapasitesinin ve serbest radikal giderme oranının oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (Wang *et al.* 2005). Aynı şekilde *Alternaria* cinsi fungus olan *Alternaria* sp. Samif01 türünden elde edilen kültürlerin etil asetat ekstraktının serbest radikal giderme kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Tian *et al.* 2017). Literatürdeki bu çalışmalar, mikrofungus izolatlarından elde edilen etil asetat ekstraktlarının yüksek antioksidant kapasiteye sahip olduğunu doğrulamaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Alternaria tenuissima* mikrofungusunun ürettiği metabolitlerin etil asetat ekstraktının antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edildi. Metabolitlerin etil asetat ekstraktının Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda da birçok farklı türde mikrofunguslardan elde edilen metabolitlerin ve ekstraktlarının antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Sette *et al.* 2006). Yapılan bir çalışmada *Alternaria tenuissima* AUMC14342 mikrofungus türünden elde edilen metabolitlerin etil asetat ekstraktı farklı bakteri türlerine karşı (*P. aeruginosa*, *S. Aureus*) karşı 30 µg/mL dozda yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir (Mousa *et al.* 2021). Yine başka bir çalışmada *Alternaria alternata* mikrofungusundan elde edilen metabolitlerin etil asetat ekstraktının *B. Subtilis* ve *S. aureus* türlerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur (Chandra *et al.* 2021). Aynı şekilde *Alternaria alternata* türünün ürettiği metabolitlerin etil asetat ekstraktının *S. aureus* ve *E. Coli* bakteri türlerinde yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Fernandes *et al.* 2009). Benzer şekilde *Alternaria brassicicola* ML-P08 türü mikrofungusundan elde edilen kültür izolatının etil asetat ekstraktının *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, ve *Pseudomonas fluorescens* bakteri türlerine karşı 1.8 ve 3.9 µg/mL dozlarda antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Gu 2009). Yapılan başka bir çalışmada, *Alternaria* türü olan *Alternaria alternata* mikrofungusundan elde edilen ekstraktın *Bacillus subtilis* bakterisinde 8.6 µg/mL dozda antibakteriyel etki gösterdiği

bulunmuştur (Wang *et al.* 2014). Başka bir çalışmada, *Alternaria tenuissima* PE2 mikrofungusunun kültür metabolitlerinin etil asetat ekstraktının Gram (+) *Bacillus subtilis* MTCC121, *Listeria monocytogenes* MTCC657, *Staphylococcus aureus* MTCC96, *Staphylococcus epidermidis* MTCC2639 ve Gram (-) olan *Salmonella typhimurium* MTCC98, *Escherichia coli* MTCC1667 bakteri türlerine karşı 40, 80 ve 100 µg/mL dozlarda yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Chatterjee *et al.* 2022). Başka yapılan bir çalışmada, *Alternaria sonchi* türü mikrofunguslardan izole edilen sekonder metabolitlerden olan chloromonilicin molekülünün *B. subtilis* ve *E. coli* bakteri türlerine karşı 0.5 µg/disk konsantrasyonda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Danilova *et al.* 2020). Başka bir çalışmada, *Alternaria* türü olarak izole edilen 20 mikrofungus türünün çoğundan elde edilen metabolitlerin etil asetat ekstraktının *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas syringae* bakteri türlerine karşı farklı dozlarda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Berestetskiy *et al.* 2018). Literatürdeki bu veriler mikrofungus izolatlarındaki sekonder metabolitlerin antimikrobiyal etki oranının çok yüksek olduğunu ispatlamaktadır.

Daha önce yapılan birçok çalışmada, filamentli mikrofungus hücrelerinden elde edilen metabolitlerin insan kanser hücrelerinde antikanser etki gösterdiği ve hücre canlılığını azaltıcı etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Evidente *et al.* 2014). Ayrıca başka birçok çalışmada insan kanser hücrelerinde programlı hücre ölümü olan apoptoz ve otofaji ile ölen hücre sayısını arttırdıkları tespit edilmiştir (Koul *et al.* 2016; Ofir 2024). Bu tez çalışmasında mikrofungus metabolitlerinin farklı insan kanser hücrelerinde farklı dozlarda yüksek sitotoksik etki göstermesi, daha önce elde edilen veriler ile tutarlılık göstermektedir.

Programlı hücre ölümlerinden birisi olan apoptoz birçok farklı hücrede gözlemlenen bir ölüm şeklidir (Reed 2000). Canlılarda yaşam dengesinin devam etmesine sağlayan önemli bir yere sahiptir (Hengartner 2000). Dokularda homeostazın sürmesini sağlayan mekanizmalardan birisidir (Red 2000). Hücrelerin apoptozla ölmesine yol açan birçok farklı sebep vardır (Hockenbery 1995). Bu sebeplerden birisi ya da birkaçı sebebi ile hücreler apoptoz ile ölebilir (Letai 2017). Farklı sebeplerden dolayı hücrelerde apoptoz tetiklendiğinde, hücre ya da hücreler iç ve dış yolak olmak üzere iki farklı yolak üzerinden apoptoz ile ölebilir (Vaux and Strasser 1995). Apoptoz iç yolak ve dış yolak olmak üzere iki farklı yolak üzerinden gerçekleşebilir. Bu yollarda görev yapan apoptozun gerçekleşmesini sağlayan kaspaz enzimleri vardır. Kaspaz 2, 8,9 ve 10 başlatıcı kaspazlardır. Kaspaz 3, 6 ve 7 ise hücrenin parçalanmasını sağlayan yürütücü kaspazlardır. Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, ve 14 ise inflamatuvar kaspazlardır ve hücrede apoptozun gerçekleşmesini sağlarlar (Li and Yuan 2008).

Bu tez çalışmasında mikrofungusların kültür süpernatantlarının etil asetat ekstraktı, insan kanser hücrelerinde antikanser etki göstererek apoptotik hücre ölümlerini arttırmıştır. Etil asetat ekstraktı, A-549, SH-SY5Y, DU-145 ve HT-29 insan kanser hücrelerinde apoptozun göstergesi olan bax, kaspaz 9, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 1 genlerinin ekspresyonunu kontrol genine göre önemli oranda arttırmıştır. Ayrıca kaspaz 8 ve kaspaz 3 enzim miktarlarını artırarak apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda, birçok mikrofungus türünden elde edilen metabolitlerin ve bu metabolitlerin ekstraktlarının insan kanser hücrelerinde antikanser etkiye sahip olduğu ve apoptotic hücre ölümlerine yol açtığı gözlemlenmiştir (Kim *et al.* 2017). Yapılan bir çalışmada, *Chaetomium* türü microfunguslardan izole edilen sekonder metabolitlerden olan diketopiperazinlerin insan kolon kanser hücre hattında (HT-29) hücre canlılığını azalttığı ve kaspaz 3 miktarını artırarak apoptotic hücre ölümlerini arttırdığı tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2017). Başka bir çalışmada, *Alternaria* cinsi mikrofunguslardan elde edilen alternariol mikotoksininin insan kolon kanser hücrelerinde (HCT-116) hücre canlılığını önemli oranda düşürdüğü ve kaspaz 9 ve kaspaz 3 miktarını artırarak apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (Bensassi *et al.* 2012). Başka bir çalışmada, *Alternaria tenuissima* AUMC143 mikrofungus'un ürettiği metabolitlerden elde edilen metabolitlerin etil asetat ekstraktının HeLa ve MCF-7 insan kanser hücreleri üzerinde 50-60 µg/mL dozlarda bile sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Mousa *et al.* 2022). Ayrıca, *Alternaria alternata* türünün kültüründen elde edilen bioaktif moleküllerin etil asetat ekstraktının insan fibrosarkoma (HT-1080), insan kolon kanseri (HCT-116) ve insan prostat kanser hücrelerinde (PC-3) hücre canlılığını önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir (Katoch *et al.* 2023). Başka bir çalışmada, *Alternaria tenuissima* TER995 suşu hücrelerinin kültüründen elde edilen paklitakselin farklı kanser hücre hatlarında (HepG-2, MCF-7, Hep-2, A-549 ve CHO-K1) farklı dozlarda yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiği keşfedilmiştir (Ismail *et al.* 2017). Başka bir çalışmada, mikrofungus türü *Penicillium pinophilum* hücrelerinin kültüründen elde edilen sekonder metabolitlerden olan dikatenarin and skirin moleküllerinin insan pankreatik kanser hücrelerinde (MIA PaCa-2) serbest radikal miktarını arttırdığı ve buna bağlı olarak mitokondriyal transmembran potansiyelini bozarak mitokondriye bağımlı apoptozu tetikleyip, kaspaz 3 enzim miktarını ve apoptotic hücre sayısını arttırdığı belirlenmiştir (Koul *et al.* 2016). Başka bir mikrofungus türü olan *Aspergillus fumigatus* kültürünün etil asetat ekstraktından elde edilen sekonder metabolit olan demethoxyfumitremorgin C molekülünün PC-3 hücrelerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca aynı molekülün PC-3 hücrelerinde bax, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 miktarını arttırdığı ve bcl-2, ras ve Akt protein miktarını azalttığı ve buna bağlı olarak hücrelerin apoptoz ile ölümünü arttırdığı gözlemlenmiştir (Kim *et al.* 2017). Başka bir çalışmada *Aspergillus* cinsi mikrofunguslardan

elde edilen kültürün etil asetat ekstraktından saflaştırılan gliotoksinin insan HeLa ve kondrosarkoma (SW1353) hücrelerinde farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca bu hücelere uygulanan gliotoksin, bax, sitokrom c, kaspaz 3, kaspaz 9 ve kaspaz 8 proteinlerinin miktarını arttırıp bcl-2 protein miktarını azaltmıştır. Buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümlerini yüksek oranda arttırdığı bulunmuştur (Nguyen *et al.* 2013). Başka bir çalışmada, *Theissenia rogersii* 92031201 suşundan elde edilen kültürden saflaştırılan küçük tropolone türü molekül olan pycnidione metabolitinin A-549 hücrelerinde hücre canlılığını yüksek oranda azaltarak sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca bu molekül, A-549 hücrelerinde reaktif oksijen türevlerini arttırıp mitokondriyel membran potansiyelini bozmuştur. Kaspaz 3 ve 8 enzim miktarlarını arttırarak apoptotik ölümleri arttırmıştır (Hsiao *et al.* 2012). Benzer şekilde pek çok çalışma, filamentli mikrofungusların ürettiği bioaktif moleküllerin insan kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ispat etmektedir.

Otofaji canlılarda homeostazı devam ettiren bir diğer programlı hücre ölüm şeklidir (Mizushima 2007). Otofajide hücre içindeki makromoleküllerin ve organellerin kesecikler içerisinde lizozoma aktarılması ve lizozomda parçalanarak hücrenin kendini sindirmesini sağlayan hücre ölümüdür. Otofajinin gerçekleşmesini sağlayan proteinler otofaji ile alakalı proteinlerdir (Atg proteinleri) (Mizushima 2007). Atg proteinleri otofajide hücre içeriğinin sindirilmesi için gerekli olan keseciklerin oluşmasında görev yaparlar. Keseciklerin oluşabilmesi için Atg proteinleri LC-3 ve beclin-1 gibi proteinler ile etkileşerek kompleks oluştur ve otofagozom oluşumunu başlatır. İnsan hücrelerinde otofagozom oluşumunu sağlayan yolakların birisinde beclin-1 proteini ile Atg14 kompleks oluşturarak otofaji yolağı başlar (Glick *et al.* 2010). Otofajide beclin-1 ve Atg14 proteinlerinin bu kritik rolünden dolayı, bu çalışmada bu genlerin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır ve mikrofungus metabolitleri bu genlerin ekspresyonlarını önemli oranda arttırmıştır.

Bu tez çalışmasında, mikrofungusların etil asetat ekstraktı, insan kanser hücrelerine uygulandığında otofajik hücre ölümlerini arttırmıştır. Etil asetat ekstraktının kanser hücrelerine uygulanması otofajik hücre ölümlerinin belirteçlerinden olan beclin-1 ve Atg14 genlerinin gen ifadesini kontrol genine göre tüm kanser hücrelerinde istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır. Aynı şekilde beclin-1 protein miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır. Böylelikle, sekonder metabolitlerin otofajik hücre ölümlerini tetiklediği gözlemlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmaları incelediğimizde, mikrofungus metabolitlerinin insan hücrelerinde otofajiyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Ofir 2024). Daha önce yapılan bir çalışmada, *Phoma* cinsi mikrofungusların izolatlarından saflaştırılan ergosterol ve ergosterol peroksit (EP) moleküllerinin HeLa, A-549 ve MCF-7 insan kanser hücrelerinde farklı dozlarda

sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ergosterol peroksin A-549 hücrelerinde reaktif oksijen türevlerini arttırarak p53 ve sitokrom c protein miktarlarını ve buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümlerini arttırdığı belirlenmiştir. Ek olarak ergosterol peroksin A-549 hücrelerinde Akt1, mTOR, Smad2 ve Smad3 protein miktarlarını azaltıp p-JNK, fibronektin ve p27 proteinlerinin miktarlarını arttırarak otofajik hücre ölümlerini tetiklediği belirlenmiştir (Wu *et al.* 2018). Başka bir çalışmada ise *Chaetomium* cinsi mikrofungusların etil asetat ekstraktından elde edilen alkaloid olan Chaetocochin J molekülünün insan kolon kanser hücrelerinde (HCT-116) önemli sitotoksik etki gösterdiği ve HCT-116 hücrelerinde flow sitometre yöntemi ile apoptotik ve otofajik hücre ölümlerini arttırdığı, hücrelerde caspaz 3 ve bax protein miktarlarını arttırdığı ve PI3K, Akt1 ve mTOR protein miktarlarını azalttığı rapor edilmiştir (Hu *et al.* 2021). Yine başka bir çalışmada başka bir mikrofungus cinsi olan *Talaromyces* cinsi mikrofunguslardan izole edilen rasfonin molekülünün insan böbrek kanseri hücrelerinde (ACHN) 6 µm konsantrasyonda bile yüksek sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca flow sitometre sonuçlarına göre apoptoz ve nekroz oranını çok arttırdığı ve LC-3 protein miktarını arttırarak bu hücrelerde otofajik ölüm oranını yükselttiği rapor edilmiştir (Sun *et al.* 2016). Literatürdeki tüm bu veriler, mikrofungus hücrelerinin ürettiği sekonder metabolitlerin insan kanser hücrelerinde otofajik ölümleri arttırdığını ispat etmektedir.

Yapılan bu çalışmada, mikrofungus kültür izolatının etil asetat ekstraktı insan normal fibroblast hücrelerinde (MRC-5) sitotoksik etki göstermemiştir. Mikrofungusların ürettiği farklı antioksidant etkiye sahip fenolik ve flavanoid bileşikler normal hücreler üzerinde koruyucu etki göstermiş olabilir. Literatürdeki bazı veriler bu durumu desteklemektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada *Aspergillus chevalieri* TM2-S6 türü mikrofungustan elde edilen kültür metabolitlerinin izolatları insan normal deri fibroblast hücreleri (NHDF) üzerinde hücre canlılığını arttırıcı etki göstermiş ve izolatlarda bulunan sekonder metabolitler hidrojen peroksin oluşturduğu oksidatif strese karşı fibroblast hücrelerini korumuştur ve hücre canlılık oranını hidrojen peroksin etkisine karşı farklı dozlarda arttırmıştır (Letsiou *et al.* 2020). Tüm bu veriler ışığında değerlendirme yapıldığında mikrofungus izolatlarında bulunan sekonder metabolitlerin insan kanser hücrelerinde farklı yollar üzerinden hücre ölümlerini arttırarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve normal fibroblast hücrelerinde koruyucu etki göstererek hücre çoğalmasını tetiklediği ve insan normal fibroblast hücresi yaşlanmasını azalttığı söylenebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında farklı toprak örneklerinden izole edilen mikrofungusların kültür süpernatantlarından hazırlanan etil asetat ekstratlarının antikanser etkinliği test edilmiş ve GA7 kodlu izolatın etil asetat ekstratının en yüksek antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu izolat *Alternaria tenuissima* olarak teşhis edilmiştir. *In vitro* antikanser aktivite çalışmalarında, ekstratın insan kanser hücrelerinden LDH salınımını arttırdığı gözlenmiştir. Bu ekstrat insan kanser hücrelerinde ROS oluşumunu ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunu önemli oranda arttırmıştır. Ekstrat, *in vitro* koşullarda insan kanser hücrelerine zarar vererek hücrelerde Nf-kB geninin ekspresyonunu arttırmıştır. Ekstrat insan kanser hücrelerinde apoptoz belirteçlerinden olan aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerinin genlerinin ekspresyonunu ve ayrıca aktif kaspaz 3 ve kaspaz 8 enzimlerinin miktarını arttırmıştır. Dahası, ekstrat insan kanser hücrelerinde otofaji göstergesi olan beclin-1 geninin gen ifadesini ve protein düzeyini arttırmıştır. Söz konusu etil asetat ekstraktı, insan kanser hücrelerinden farklı olarak insan akciğer fibroblast hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Etil asetat ekstraktında bulunan moleküller, *in vitro koşullarda* insan akciğer fibroblast hücrelerinin ve insan deri fibroblast hücrelerinin çoğalmasını tetiklemiştir. Ekstraktın *in vitro* da ABTS, DPPH, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini giderme testlerine göre antioksidant aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Dahası ekstraktın, H₂O₂ ile indüklen hücre yaşlanmasına karşı deri fibroblastlarını koruyarak anti-aging (yaşlanma karşıtı) aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak filamentli mikrofunguslar, faydalı birçok biyolojik aktivitelere sahip moleküller üretebilmektedir. Bu moleküllerden bazıları bilinmekte olup ilaç üretiminde ve hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, filamentli mikrofunguslar tarafından sentezlenen yeni molekülleri keşfetmek, hastalıklar için yeni ilaçların üretilmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

Mevcut çalışmada da, bir filamentli mikrofungus olan *Alternaria tenuissima*'nın etil asetat ekstratının antikanser, antibakteriyel, antioksidant ve yaşlanma karşıtı biyolojik aktivitelere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu yüzden ekstrat, farmasotik ve kozmetik endüstrilerinde kullanım alanı bulabilir. Bununla birlikte, bu varsayım desteklemek için *in vivo* çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Dahası, yeni çalışmalarda, etil asetat ekstratının yara iyileştirme, antiviral ve nöroprotektif gibi diğer potansiyel biyoaktiviteleri de test edilebilir. Öte

yandan, ekstrattaki her aktif bileşen ayrı ayrı saflaştırılabilir ve saf moleküllerinde biyolojik aktiviteleri ayrı ayrı test edilebilir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Hady, H., Abdel-Wareth, M. T. A., El-Wakil, E. A., & Helmy, E. A. (2016). Identification and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Penicillium islandicum* and *Aspergillus tamaris* ethyle acetate extracts. *pharmaceuticals*, 6(4), 2021-2039.
- Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., & Bakar, F. A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Molecular cancer*, 9, 1-18.
- Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. J., & Ward*, C. W. (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57, 1050-1093.
- Afzal, K., Shukla, A. C., & Srivastava, D. K. (2022). Protocols for Extraction, Isolation, and Purification of Secondary Metabolites of Mushroom and Its Applications. In *Applied Mycology: Entrepreneurship with Fungi* (pp. 165-186). Cham: Springer International Publishing.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- Akgul, H., Aslan, A., Akata, I., Gunal, S., Bal, C., & Baba, H. (2021). Phenolic content and biological activities of *Trametes hirsuta*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 4130-4135.
- Al Mousa, A. A., Abouelela, M. E., Hassane, A. M., Al-Khattaf, F. S., Hatamleh, A. A., Alabdulhadi, H. S., ... & Abo-Dahab, N. F. (2022). Cytotoxic potential of *alternaria tenuissima* AUMC14342 mycoendophyte extract: a study combined with LC-MS/MS metabolic profiling and molecular docking simulation. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(10), 5067-5085.
- Al Mousa, A. A., Mohamed, H., Hassane, A. M., & Abo-Dahab, N. F. (2021). Antimicrobial and cytotoxic potential of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* AUMC14342 isolated from *Artemisia judaica* L. growing in Saudi Arabia. *Journal of King Saud University-Science*, 33(5), 101462.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., ... & Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3957-3961.
- Allen, M. Millett, P. Dawes, E. Rushton, N. (1994). Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clinical Materials*, 16(4), 189-194.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Froufe, H. J. C., Abreu, R. M. V., Martins, A., & Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 346-357.

- Anderson J, Anderson Y, Diyabalanage T (2015) Paving the way with actives for skincare. *Planta Medicine*, 81:IL23.
- Andrighetti-Fröhner, C., Antonio, R., Creczynski-Pasa, T., Barardi, C. and Simões, C., (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.
- Anh, C. V., Yoon, Y. D., Kang, J. S., Lee, H.-S., Heo, C.-S., & Shin, H. J. (2022). Nitrogen-Containing Secondary Metabolites from a Deep-Sea Fungus *Aspergillus unguis* and Their Anti-Inflammatory Activity. *Marine Drugs*, 20(3), 217.
- Apparao, Y., Phan, C. W., Kuppusamy, U. R. and Sabaratnam, V., (2022). Ergothioneine and its prospects as an anti-ageing compound. *Experimental Gerontology*, 170, 111982.
- Arora, D., Sharma, N., Singamaneni, V., Sharma, V., Kushwaha, M., Abrol, V., ... & Gupta, P. (2016). Isolation and characterization of bioactive metabolites from *Xylaria psidii*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Aegle marmelos* and their role in mitochondrial dependent apoptosis against pancreatic cancer cells. *Phytomedicine*, 23(12), 1312-1320.
- Arslan, N. P., Dawar, P., Albayrak, S., Doymus, M., Azad, F., Esim, N., Taskin, M., (2023). Fungi-derived natural antioxidants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1-24.
- Arslan, N. P., Taskin, M., Keles, O. N., (2024). Nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside reverse ovarian aging in rats via rebalancing mitochondrial fission and fusion mechanisms. *Pharm. Res.* 1-15.
- Aruoma, O., Spencer, J. and Mahmood, N., (1999). Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology*, 37(11), 1043-1053.
- Ashok, A., Andrabi, S. S., Mansoor, S., Kuang, Y., Kwon, B. K., & Labhassetwar, V. (2022). Antioxidant therapy in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: Role of nanoparticle-based drug delivery systems in clinical translation. *Antioxidants*, 11(2), 408.
- Association, C. C., (1993). *Surface Coatings: Volume 1 Raw Materials and Their Usage*. (Vol. 1). Springer.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A., Vivanco, J.M. (2002). Enantio-meric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology*. 128(4), 1173-1179.
- Bärlocher, F., & Boddy, L. (2016). Aquatic fungal ecology—How does it differ from terrestrial?. *Fungal Ecology*, 19, 5-13.
- Barretto, D. A. and Vootla, S. K., (2020). Biological activities of melanin pigment extracted from *Bombyx mori* gut-associated yeast *Cryptococcus rajasthanensis* KY627764. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(10), 159.
- Barros-Filho, B. A., De Oliveira, M. C. F., Mafezoli, J., Barbosa, F. G., & Rodrigues-Filho, E. (2012). Secondary Metabolite Production by the Basidiomycete, *Lentinus strigellus*, under Different Culture Conditions. *Natural Product Communications*, 7(6), 1934578X1200700.

- Basmadjian, C., Zhao, Q., Bentouhami, E., Djehal, A., Nebigil, C. G., Johnson, R. A., ... & Désaubry, L. G. (2014). Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in chemistry*, 2, 20.
- Benchimol, S. (2001). p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(11), 1049-1051.
- Bennett, R. N. and Wallsgrave, R. M., (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.
- Bensassi, F., Gallerne, C., El Dein, O. S., Hajlaoui, M. R., Bacha, H., & Lemaire, C. (2012). Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 915-923.
- Berestetskiy, A. O., Gannibal, F. B., Minkovich, E. V., Osterman, I. A., Salimova, D. R., Sergiev, P. V., & Sokornova, S. V. (2018). Spectrum of biological activity of the *Alternaria* fungi isolated from the phyllosphere of herbaceous plants. *Microbiology*, 87, 806-816.
- Betts, J.W., Hornsey, M., Wareham, D.W., La Ragione, R.M. (2017). In vitro and in vivo activity of theaflavin–epicatechin combinations versus multidrug-resistant acinetobacter bau-mannii. *Infectious Diseases and Therapy*. 6(3), 435-442.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Blagodatski, A., Yatsunskaya, M., Mikhailova, V., Tiasto, V., Kagansky, A., & Katanaev, V. L. (2018). Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*, 9(49), 29259-29274.
- Blois MS. (1957). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199–1200.
- Bluhm C, Deslandes Y, Marchessault R, Perz S, Rinaudo M (1982) Solid state and solution conformations of scleroglucan. *Carbohydr Res* 100:117–130.
- Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2001). Multiplolides A and B, New Antifungal 10-Membered Lactones from *Xylaria multiplex*. *Journal of Natural Products*, 64(7), 965-967.
- Borodina, I., Kenny, L. C., McCarthy, C. M., Paramasivan, K., Pretorius, E., Roberts, T. J., van der Hoek, S. A. and Kell, D. B., (2020). The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutrition Research Reviews*, 33(2), 190-217.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Broekmans, F. J., Soules, M. R., & Fauser, B. C. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews*, 30(5), 465-493.
- Broker, L. E., Kruyt, F. A., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3155-3162.
- Burns, M. B., Lynch, J., Starr, T. K., Knights, D., & Blekhman, R. (2015). Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome medicine*, 7, 1-12.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657.
- Carod-Artal, F. J. (2015). Hallucinogenic drugs in pre-Columbian Mesoamerican cultures. *Neurología (English Edition)*, 30(1), 42-49.

- Cedano Maldonado, M. and Villaseñor Ibarra, L., (2005). Organic dyes from fungi and lichens.
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1738.
- Chambergo, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2567-2577.
- Chandra, H., Kumari, P., Prasad, R., Gupta, S. C., & Yadav, S. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity displayed by a fungal endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Picrorhiza kurroa* from Garhwal Himalayas, India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101955.
- Chandra, P., Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849.
- Chatterjee, S., Ghosh, R., & Mandal, N. C. (2019). Production of bioactive compounds with bactericidal and antioxidant potential by endophytic fungus *Alternaria alternata* AE1 isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. *PLoS One*, 14(4), e0214744.
- Chatterjee, S., Ghosh, S., & Mandal, N. C. (2022). Potential of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* PE2 isolated from *Psidium guajava* L. for the production of bioactive compounds. *South African Journal of Botany*, 150, 658-670.
- Chaudhary, V., Katyal, P., Panwar, H., Kaur, J., Aluko, R. E., Puniya, A. K., & Poonia, A. K. (2022). Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer properties of the red biopigment extract from *Monascus purpureus* (MTCC 369). *Journal of Food Biochemistry*, 46(9), e14249.
- Cheah, I. K. and Halliwell, B., (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 784-793.
- Chen, G., Fang, C., Chen, X., Wang, Z., Liu, M., and Kan, J. (2019). High-Pressure Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Mentha Haplocalyx*: Structure, Functional and Biological Activities. *Industrial Crops Prod.* 130, 273–284.
- Chen, L., Zhang, L., Ye, X., Deng, Z. and Zhao, C., (2024). Ergothioneine and its congeners: anti-ageing mechanisms and pharmacophore biosynthesis. *Protein & Cell*, 15(3), 191-206.
- Cheng, S., He, F., Fu, L., & Zhang, Y. (2021). Polysaccharide from *rubescens*: Extraction, optimization, characterization and antioxidant activities. *RSC advances*, 11(31), 18974-18983.
- Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y., Park, K.H. (1998). Antimicrobial activity of 4-hydroxyben-zoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid iso-lated and identified from rice hull. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62(11), 2273-2276.
- Chong, K.P., Rossall, S., Atong, M. (2009). In vitro antimicrobial activity and fungitoxicity of syringic acid, caffeic acid and 4-hydroxyben-zoic acid against *Ganoderma boninense*. *Journal of Agricultural Science*. 1(2), 15.
- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P., & Sava, G. (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89, 137-146.
- Cook, K. M., & Figg, W. D. (2010). Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(4), 222-243.
- Copetti, M. V. (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current opinion in food science*, 25, 52-56.

- Corn, P. G., & El-Deiry, W. S. (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, 24(1), 83-90.
- Costa, T. D. S. A., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25(Suppl. 2), 41-59.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews*, 109(7), 3012-3043.
- Curieses Andrés, C. M., Pérez de la Lastra, J. M., Andrés Juan, C., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2023). From reactive species to disease development: Effect of oxidants and antioxidants on the cellular biomarkers. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e23455.
- Dalinova, A., Chisty, L., Kochura, D., Garnyuk, V., Petrova, M., Prokofieva, D., ... & Berestetskiy, A. (2020). Isolation and bioactivity of secondary metabolites from solid culture of the fungus, *Alternaria sonchi*. *Biomolecules*, 10(1), 81.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- De Carvalho, D. D., Costa, F. T., Duran, N. and Haun, M., (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in vitro*, 20(8), 1514-1521.
- de Jonge, B. L. and Tomasz, A., (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(2), 342-346.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- Dembitsky, V. M. (2014). Naturally occurring bioactive Cyclobutane-containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. *Phytomedicine*, 21(12), 1559-1581.
- Dewi, R. T., S. Tachibana, K. Itoh, and M. Ilyas. (2012). Isolation of antioxidant compounds from *Aspergillus terreus* LS01. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 4(1):10-14.
- Dikmen, M., Cantürk, Z., Artagan, Ö., & Öztürk, N. (2017). Antioxidant, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Secondary Metabolites of Halotolerant *Aspergillus terreus* on Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells.
- Dincsoy, A. B., & Duman, D. C. (2017). Changes in apoptosis-related gene expression profiles in cancer cell lines exposed to usnic acid lichen secondary metabolite. *Turkish Journal of Biology*, 41(3), 484-493.
- Dix, N. J. (Ed.). (2012). *Fungal ecology*. Springer Science & Business Media.
- D'Onofrio, N., Martino, E., Balestrieri, A., Mele, L., Cautela, D., Castaldo, D. and Balestrieri, M. L., (2022). Diet-derived ergothioneine induces necroptosis in colorectal cancer cells by activating the SIRT3/MLKL pathway. *FEBS letters*, 596(10), 1313-1329.
- Dornetshuber-Fleiss, R., Heffeter, P., Mohr, T., Hazemi, P., Kryeziu, K., Seger, C., ... & Lemmens-Gruber, R. (2013). Destruixins: fungal-derived cyclohexadepsipeptides with

- multifaceted anticancer and antiangiogenic activities. *Biochemical pharmacology*, 86(3), 361-377.
- Douglas, L. M. and Konopka, J. B., (2014). Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annual review of microbiology*, 68(1), 377-393.
- Druzian, S. P., Pinheiro, L. N., Susin, N. M. B., Dal Prá, V., Mazutti, M. A., Kuhn, R. C., & Terra, L. D. M. (2020). Production of metabolites with antioxidant activity by *Botryosphaeria dothidea* in submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 13-20.
- Dua, A., Nigam, A., Saxena, A., Dhingra, G. G., & Kumar, R. (2023). Microbial Bioproduction of Antiaging Molecules. *Microbial Bioreactors for Industrial Molecules*, 465-485.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D. and Royse, D. J., (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8(3).
- Dufossé, L., (2016). Pigments, microbial. Reference module in life sciences.
- Dufossé, L., (2018). Microbial pigments from bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries. In *Natural and artificial flavoring agents and food dyes*, (pp. 113-132). Elsevier.
- Durán, N., Justo, G. Z., Melo, P. S., De Azevedo, M. B., Souza Brito, A. R., Almeida, A. B. and Haun, M., (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81(4), 387-396.
- Dy, G. K., & Adjei, A. A. (2013). Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(4), 249-279.
- Eddaikra, A., & Eddaikra, N. (2021). Endogenous enzymatic antioxidant defense and pathologies. *Antioxidants-benefits, sources, mechanisms of action*. IntechOpen.
- Egbo, C. C., Igboaka, D. C., & Uzor, P. F. (2024). Antimicrobial Assay and GC-MS Profile of the Extract of the Endophytic Fungus from *Annona muricata* (Annonaceae) Leaf. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(4), 7030-7034.
- Eisfeld, K. (2009). Non-Ribosomal Peptide Synthetases of Fungi. In *Çinde T. Anke & D. Weber (Ed.), Physiology and Genetics (ss. 305-330)*. Springer Berlin Heidelberg.
- Elawady, M. E., Hamed, A. A., Alsallami, W. M., Gabr, E. Z., Abdel-Monem, M. O. and Hassan, M. G., (2023). Bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus versicolor* SB5 with anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory and antioxidant activities: In vitro and in silico studies. *Microorganisms*, 11(4), 1062.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *nature*, 411(6835), 342-348.
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322.
- Evidente, A., Kornienko, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Lefranc, F., Mathieu, V., & Kiss, R. (2014). Fungal metabolites with anticancer activity. *Natural product reports*, 31(5), 617-627.
- Fabre, C., Santerre, A., Loret, M., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G. and Blanc, P., (1993). Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, 58(5), 1099-1102.

- Falade, O. E., Oyetayo, V. O., & Awala, S. I. (2017). Evaluation of the mycochemical composition and antimicrobial potency of wild macrofungus, *Rigidoporus microporus* (Sw). *J Phytopharmacol*, 6(2), 115-125.
- Fanele, A., & Ndlovu, S. I. (2023). Endophytic fungal species *Nigrospora oryzae* and *Alternaria alternata* exhibit antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *BMC complementary medicine and therapies*, 23(1), 323.
- Farhat, H., Urooj, F., Sohail, N., Ansari, M., & Ehteshamul-Haque, S. (2022). Evaluation of nematicidal potential of endophytic fungi associated with healthy plants and GC-MS profiling of metabolites of endophytic *Fusarium solani*. *South African Journal of Botany*, 146, 146-161.
- Farnsworth NR, Bingel AS. (1977). Problems and prospects of discovering drugs from higher plants by pharmacological screening. In: Wagner H, Wolff P, editors. *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin (Germany): Springer-Verlag; p. 1–22.
- Fernandes, M. D. R. V., Pfenning, L. H., Costa-Neto, C. M. D., Heinrich, T. A., Alencar, S. M. D., Lima, M. A. D., & Ikegaki, M. (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 45, 677-685.
- Finking, R., Neumüller, A., Solsbacher, J., Konz, D., Kretzschmar, G., Schweitzer, M., Krumm, T., & Marahiel, M. A. (2003). Aminoacyl Adenylate Substrate Analogues for the Inhibition of Adenylation Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem*, 4(9), 903-906.
- Fontaine, T., Delangle, A., Simenel, C., Coddeville, B., van Vliet, S. J., Van Kooyk, Y., ... & Latgé, J. P. (2011). Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens*, 7(11), e1002372.
- Fooladi, T., Souidi, M. R., Alimadadi, N., Savedoroudi, P., & Heravi, M. M. (2019). Bioactive exopolysaccharide from *Neopestalotiopsis* sp. strain SKE15: Production, characterization and optimization. *International journal of biological macromolecules*, 129, 127-139.
- Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A. and Balbarini, A., (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60(8), 453-457.
- Fu, T.-T. and Shen, L., (2022). Ergothioneine as a natural antioxidant against oxidative stress-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 850813.
- Gadd, G. M. (Ed.). (2006). *Fungi in biogeochemical cycles* (No. 24). Cambridge University Press.
- Gamage, A. M., Liao, C., Cheah, I. K., Chen, Y., Lim, D. R., Ku, J. W., Chee, R. S. L., Gengenbacher, M., Seebeck, F. P. and Halliwell, B., (2018). The proteobacterial species *Burkholderia pseudomallei* produces ergothioneine, which enhances virulence in mammalian infection. *The FASEB Journal* (12), 6395-6409.
- Geetha, T., Garg, A., Chopra, K., Kaur, I.P. (2004). Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 556(1-2), 65-74.
- Giese, E. C., J. Gascon, G. Anzelmo, A.M. Barbosa, M. A. A. da Cunha, and R. F. Dekker. (2015). Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran

and some other β -D-glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72:125-130.

- Giordano, D., Costantini, M., Coppola, D., Lauritano, C., Núñez Pons, L., Ruocco, N., Di Prisco, G., Ianora, A., & Verde, C. (2018). Biotechnological Applications of Bioactive Peptides From Marine Sources. *Içinde Advances in Microbial Physiology (C. 73, ss. 171-220)*. Elsevier.
- Girardi Piva, G., Casalta, E., Legras, J.-L., Tesnière, C., Sablayrolles, J.-M., Ferreira, D., Ortiz-Julien, A., Galeote, V. and Mouret, J.-R., (2022). Characterization and role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during white wine alcoholic fermentation. *Fermentation*, 8(2), 90.
- Glaser, J., & Stienecker, K. (2000). Pancreas and aging: a study using ultrasonography. *Gerontology*, 46(2), 93-96.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, 58(12), 1134-1141.
- Gong, Z., P. Jiao, F. Huang, S. Zhang, B. Zhou, Q. Lin, J. Liu, and Liang. Y. (2023). Separation and antioxidant activity of the water-soluble yellow *monascus* pigment and its application in the preparation of functional rice noodles. *LWT*, 185:115172.
- Gu, W. (2009). Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1677-1683.
- Gu, Y., Han, J., Jiang, C., & Zhang, Y. (2020). Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing research reviews*, 59, 101036.
- Guo, W., Wang, S., Li, N., Li, F., Zhu, T., Gu, Q., Guo, P., & Li, D. (2018). Saroclides A and B, Cyclic Depsipeptides from the Mangrove-Derived Fungus *Sarocladium kiliense* HDN11-112. *Journal of Natural Products*, 81(4), 1050-1054.
- Gupta, C., & Prakash, D. (2014). Phytonutrients as therapeutic agents. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(3), 151-169.
- Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Ayatollahi, S. A., & Kijjoa, A. (2022). Anthraquinones and Their Analogues from Marine-Derived Fungi: Chemistry and Biological Activities. *Marine Drugs*, 20(8), 474.
- Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Sousa, E., Fernandes, C., & Kijjoa, A. (2023). Peptides from Marine-Derived Fungi: Chemistry and Biological Activities. *Marine Drugs*, 21(10), 510.
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J.-L., Goma, G. and Loubiere, P., (2000). Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and microbial technology*, 27(8), 619-625.
- Halliwell, B., Cheah, I. K. and Tang, R. M., (2018). Ergothioneine—a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS letters*, 592(20), 3357-3366.
- Hameed, A., S. A. Hussain, J. Yang, M. U. Ijaz, Q. Liu, H. A. R. Suleria, and Y. Song. (2017). Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, 9(10):1101.

- Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S. T., Lohmann, C. H., & Singh, G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2073-2087.
- Hamidi, M., Okoro, O. V., Ianiri, G., Jafari, H., Rashidi, K., Ghasemi, S., ... & Shavandi, A. (2023b). Exopolysaccharide from the yeast *Papiliotrema terrestris* PT22AV for skin wound healing. *Journal of Advanced Research*, 46, 61-74.
- Hamidi, M., Okoro, O. V., Rashidi, K., Salami, M. S., Mirzaei Seveiri, R., Samadian, H., & Shavandi, A. (2023a). Evaluation of two fungal exopolysaccharides as potential biomaterials for wound healing applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 49.
- Hamilton, A. J. and Gomez, B., (2002). Melanins in fungal pathogens.
- Hareeri, R. H., Aldurdunji, M. M., Abdallah, H. M., Alqarni, A. A., Mohamed, S. G., Mohamed, G. A., & Ibrahim, S. R. (2022). *Aspergillus ochraceus*: Metabolites, bioactivities, biosynthesis, and biotechnological potential. *Molecules*, 27(19), 6759.
- Harmancıoğlu, M., (1955). Türkiye’de bulunan önemli bitki boyalarından elde olunan renklerin çeşitli müessirlere karşı yün üzerinde haslık dereceleri. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 77, 41.
- Hasanien, Y. A., Nassrallah, A. A., Zaki, A. G., & Abdelaziz, G. (2022). Optimization, purification, and structure elucidation of anthraquinone pigment derivative from *Talaromyces purpureogenus* as a novel promising antioxidant, anticancer, and kidney radio-imaging agent. *Journal of Biotechnology*, 356, 30-41.
- Hasenekoğlu, İ. (1991). Toprak mikrofungusları. In: Atatürk Üniversitesi.
- He, X., Jin, Y., Kong, F., Yang, L., Zhu, M., & Wang, Y. (2023). Discovery, Antitumor Activity, and Fermentation Optimization of Roquefortines from *Penicillium* sp. OUCMDZ-1435. *Molecules*, 28(7), 3180.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Henriques, I. D., & Love, N. G. (2007). The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Research*, 41(18), 4177-4185.
- Hidalgo, M., & Rowinsky, E. K. (2000). The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 19(56), 6680-6686.
- Hill, H. Z., (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays*, 14(1), 49-56.
- Hirasawa, T., Shimoyamada, Y., Tachikawa, Y., Satoh, Y., Kawano, Y., Dairi, T. and Ohtsu, I., (2023). Ergothioneine production by *Corynebacterium glutamicum* harboring heterologous biosynthesis pathways. *Journal of bioscience and bioengineering*, 135(1), 25-33.
- Hiroshi, K., (2000). Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 34, 131-140.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., ... & Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15(13), 1573-1581.
- Hockenbery, D. (1995). Defining apoptosis. *The American journal of pathology*, 146(1), 16.

- Hsiao, C. J., Hsiao, S. H., Chen, W. L., Guh, J. H., Hsiao, G., Chan, Y. J., ... & Chung, C. L. (2012). Pycnidione, a fungus-derived agent, induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 197(1), 23-30.
- Hu, Q., & Dong, T. (2015). Non-ribosomal Peptides from Entomogenous Fungi. İçinde K. S. Sree & A. Varma (Ed.), *Biocontrol of Lepidopteran Pests* (C. 43, ss. 169-206). Springer International Publishing.
- Hu, S., Yin, J., Yan, S., Hu, P., Huang, J., Zhang, G., ... & Zhang, Y. (2021). Chaetocochin J, an epipolythiodioxopiperazine alkaloid, induces apoptosis and autophagy in colorectal cancer via AMPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104693.
- Hu, X., Jiang, D., Li, F., Wu, Z., Huang, Y., Song, S. and Wang, Z., (2014). Ergosterol reverses multidrug resistance in SGC7901/Adr cells. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(5), 396-400.
- Hu, X., Saravanakumar, K., Park, S., Han, K. S., & Wang, M. H. (2023). Isolation, characterization, antioxidant, and wound healing activities of extracellular polysaccharide from endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(6), 3822-3839.
- Huang, L., Shan, Y. J., He, C. X., Ren, M. H., Tian, P. J., & Song, W. (2016). Effects of *L. paracasei* subsp. *paracasei* X12 on cell cycle of colon cancer HT-29 cells and regulation of mTOR signalling pathway. *Journal of functional foods*, 21, 431-439.
- Hussain, F., & Kayani, H. U. R. (2020). Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6(5).
- Isaka, M., Chinthanom, P., Boonruangprapa, T., Rungjindamai, N., & Pinruan, U. (2010). Eremophilane-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. *Journal of natural products*, 73(4), 683-687.
- Ismail, A. A., Ahmed, A. S., Hassan, I. A., El-Sayed, E. S. R., & Karam El-Din, A. Z. A. (2017). Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 5831-5846.
- Jahan, A., Ahmad, I. Z., Fatima, N., Ansari, V. A., & Akhtar, J. (2017). Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: A review. *Phycologia*, 56(4), 410-422.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., & Puntarulo, S. (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 142(3), 1246-1255.
- Jayasuriya, H., Herath, K. B., Ondeyka, J. G., Polishook, J. D., Bills, G. F., Dombrowski, A. W., Singh, S. B. (2004). Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5). *Journal of natural products*, 67(6), 1036-1038.
- Jeong, B.-Y., Wittmann, C., Kato, T. and Park, E. Y., (2015). Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(1), 101-106.
- Ji, N., Liu, P., Zhang, N., Yang, S., & Zhang, M. (2022). Comparison on Bioactivities and Characteristics of Polysaccharides From Four Varieties of *Gastrodia elata* Blume. *Frontiers in Chemistry*, 10, 956724.
- Jiang, H., Chen, T. J., Chi, Z., Hu, Z., Liu, G. L., Sun, Y., ... & Chi, Z. M. (2019). Macromolecular pullulan produced by *Aureobasidium melanogenum* 13-2 isolated from

- the Taklimakan desert and its crucial roles in resistance to the stress treatments. *International journal of biological macromolecules*, 135, 429-436.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 1-76.
- Jordá, T. and Puig, S., (2020). Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), 795.
- Kalb, D., Lackner, G., & Hoffmeister, D. (2013). Fungal peptide synthetases: An update on functions and specificity signatures. *Fungal Biology Reviews*, 27(2), 43-50.
- Katoch, M., Qayum, A., Kumar, A., Rani, P., & Gupta, P. (2023). *Alternaria alternata* (SDHY01/02), a fungus associated with *Lamellodysidea herbacea*: its anticancer potential and responsible constituent (s). *International Microbiology*, 26(4), 1143-1155.
- Kelekar, A. (2006). Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1), 259-271.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khalil, N. M., E. A. Shalaby, D. M. I. A. Ali, E. M. Ali, and A. A. M. Enein, (2014). "Biological Activities of Secondary Metabolites from *Emericella nidulans* EGCU 312. ", *African Journal of Microbiology Research*, vol. 8, issue 20, pp. 2011- 2021.
- Khan, M. S., Zhang, X., You, L., Fu, X., & Abbasi, A. M. (2014). Structure and bioactivities of fungal polysaccharides. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 1-14.
- Khan, Md. A., Tania, M., Liu, R., & Rahman, M. M. (2013). *Hericium erinaceus*: An edible mushroom with medicinal values. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 10(1).
- Kim, D. H., Bang, E., Ha, S., Jung, H. J., Choi, Y. J., Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2021). Organ-differential roles of Akt/FoxOs axis as a key metabolic modulator during aging. *Aging and disease*, 12(7), 1713.
- Kim, H., Han, S., Lee, C., Lee, K., Park, S. and Kim, Y. (2003). Use of prodigiosin for treating diabetes mellitus. In: Google Patents.
- Kim, Y. S., Kim, S. K., & Park, S. J. (2017). Apoptotic effect of demethoxyfumitremorgin C from marine fungus *Aspergillus fumigatus* on PC3 human prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 269, 18-24.
- Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., & Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(5), 309-335.
- Koul, M., Meena, S., Kumar, A., Sharma, P. R., Singamaneni, V., Riyaz-UI-Hassan, S., ... & Singh, S. (2016). Secondary metabolites from endophytic fungus *Penicillium pinophilum* induce ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells. *Planta medica*, 82(04), 344-355.
- Kousar, R., Naeem, M., Jamaludin, M. I., Arshad, A., Shamsuri, A. N., Ansari, N., Akhtar, S., Hazafa, A., Uddin, J., Khan, A., & Al-Harrasi, A. (2022). Exploring the anticancer activities of novel bioactive compounds derived from endophytic fungi: Mechanisms of action, current challenges and future perspectives. *American Journal of Cancer Research*, 12(7), 2897-2919.

- Kroes, B.V., Van den Berg, A.J.J., Van Ufford, H.Q., Van Dijk, H., Labadie, R.P. (1992). Anti inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica*, 58(06), 499-504.
- Kühnel, F., Zender, L., Paul, Y., Tietze, M. K., Trautwein, C., Manns, M., & Kubicka, S. (2000). NF κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6421-6427.
- Kültür, Ş., (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 341-364.
- Lai, C. S.-W., Yu, M.-S., Yuen, W.-H., So, K.-F., Zee, S.-Y., & Chang, R. C.-C. (2008). Antagonizing β -amyloid peptide neurotoxicity of the anti-aging fungus *Ganoderma lucidum*. *Brain Research*, 1190, 215-224.
- Lamhonwah, A.-M. and Tein, I., (2006). Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(4), 1315-1325.
- Landi, N., Clemente, A., Pedone, P. V., Ragucci, S., & Di Maro, A. (2022). An Updated Review of Bioactive Peptides from Mushrooms in a Well-Defined Molecular Weight Range. *Toxins*, 14(2), 84.
- Landowski, T. H., Moscinski, L., Burke, R., Buyuksal, I., Painter, J. S., Goldstein, S., & Dalton, W. S. (2001). CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 42(5), 835-846.
- Larocca, M.; Di Marsico, M.; Riccio, P.; Rossano, R. (2018). The in vitro antioxidant properties of *Muscari comosum* bulbs and their inhibitory activity on enzymes involved in inflammation, post-prandial hyperglycemia, and cognitive/neuromuscular functions. *J. Food Biochemistry*, e12580.
- Lee, I.-K., Yun, B.-S., Han, G., Cho, D.-H., Kim, Y.-H., & Yoo, I.-D. (2002). Dictyoquinazols A, B, and C, New Neuroprotective Compounds from the Mushroom *Dictyophora indusiata*. *Journal of Natural Products*, 65(12), 1769-1772.
- Lee, M. H., Jeong, J.H., Oh, M.J. (1992). Anti-oxidative activity of gallic acid in acorn extract. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 21(6), 693-700.
- Lee, N. K. and Aan, B.-Y., 2016. Optimization of ergosterol to vitamin D 2 synthesis in *Agaricus bisporus* powder using ultraviolet-B radiation. *Food science and biotechnology*, 25, 1627-1631.
- Lee, S., & Sperry, J. (2022). Isolation and biological activity of azocine and azocane alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 54, 116560.
- Leite, M. L., da Cunha, N. B., & Costa, F. F. (2018). Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 183, 160-176.
- Leon, L., Miranda, C., De Souza, A. and Durán, N., 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(3), 449-450.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 275-294.
- Letsiou, S., Bakea, A., Goff, G. L., Lopes, P., Gardikis, K., Weis, M., ... & Ouazzani, J. (2020). Marine fungus *Aspergillus chevalieri* TM2-S6 extract protects skin fibroblasts from oxidative stress. *Marine drugs*, 18(9), 460.

- Leung, P. H., Zhao, S., Ho, K. P., & Wu, J. Y. (2009). Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. *Food Chemistry*, 114(4), 1251-1256.
- Lewis, K., Epstein, S., D'onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 468-476.
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206.
- Li, X., Wu, Q., Xie, Y., Ding, Y., Du, W. W., Sdiri, M. and Yang, B. B., 2015. Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget*, 6(19), 17832.
- Li, Y., Song, Y., Liu, J., Ma, Y. and Tan, R., 2005. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 553-558.
- Liang, S., Xu, L., Zhang, D., & Wu, Z. (2016). Effect of probiotics on small intestinal bacterial overgrowth in patients with gastric and colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol*, 27(3), 227-232.
- Liang, X., Zhang, X.-Y., Nong, X.-H., Wang, J., Huang, Z.-H., & Qi, S.-H. (2016). Eight linear peptides from the deep-sea-derived fungus *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020. *Tetrahedron*, 72(22), 3092-3097.
- Lin, Y., Wu, X. Y., Feng, S. A., Jiang, G. C., Luo, J. H., Zhou, S. N., ... & Jones, E. BG, Krohn, K., Steingrover, K. and Zsila, F. (2001). Five unique compounds: Xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea. *J Org Chem*, 66, 6252-6256.
- Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Zhou, S., Vrijmoed, L. L. P., Jones, E. G. (2001). A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain# 2508) from the South China Sea. *Tetrahedron Letters*, 42(3), 449-451.
- Lin, Y.-C., Lee, B.-H., Alagie, J. and Su, C.-H., (2017). Combination treatment of ergosterol followed by amphotericin B induces necrotic cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(42), 72727.
- Litchman, E. (2010). Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 13(12), 1560-1572.
- Liu, C., Han, M., Lv, F., Gao, Y., Wang, X., Zhang, X., ... & Qian, H. (2023). Study on the Cellular Anti-Inflammatory Effect of Torularhodin Produced by *Sporidiobolus paroseus* ZQHL Isolated from Vinegar Fungus. *Molecules*, 28(3), 1436.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., & Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life sciences*, 60(10), 763-771.
- Liu, X., Huang, Y., Wang, J., Zhou, S., Wang, Y., Cai, M., Tang, Q. and Yu, L., (2020). A study on the antioxidant properties and stability of ergothioneine from culinary-medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(3).
- Liu, Y., Gibson, G. R., & Walton, G. E. (2016). An in vitro approach to study effects of prebiotics and probiotics on the faecal microbiota and selected immune parameters relevant to the elderly. *PLoS One*, 11(9), e0162604.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001, 25(4), 402-8.
- Lockshin, R. A., Osborne, B., & Zakeri, Z. (2000). Cell death in the third millennium. *Cell Death & Differentiation*, 7(1), 2-7.

- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18(5), 5891-5935.
- Ma, Y. M., Liang, X. A., Kong, Y., & Jia, B. (2016). Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(35), 6659-6671.
- Mady, M. S., Mohyeldin, M. M., Ebrahim, H. Y., Elsayed, H. E., Houssen, W. E., Haggag, E. G., ... & El Sayed, K. A. (2016). The indole alkaloid meleagrins, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(2), 113-122.
- Mahmood, Z., Ahmed, S., Azhar, I., Sualeh, M., Baig, M., & Zoha, S. (2010). Bioactive alkaloids produced by fungi I. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 23, 349-357.
- Maldonado, R. (1997). Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(1), 91-104.
- Malumbres, M., & Carnero, A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *PROGRESS IN CELL CYCLE RESEARCH.*, 5, 5-18.
- Maoka, T., 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16.
- Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(3), 669-702.
- Mattila, P., Lampi, A.-M., Ronkainen, R., Toivo, J. and Piironen, V., (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293-298.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. and Jürgens, K., 2004. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1593-1599.
- Mbambo, B., Odhav, B. and Mohanlall, V., 2012. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *J. Med. Plants Res*, 6(38), 5135-5141.
- McDonald, E. R., & El-Deiry, W. S. (2001). Checkpoint genes in cancer. *Annals of medicine*, 33(2), 113-122.
- Méndez, A., Pérez, C., Montañez, J. C., Martínez, G. and Aguilar, C. N., 2011. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(12), 961-968.
- Menon, L. G., Kuttan, R., Kuttan, G. (1999). Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Letters*. 141(1-2), 159-165.
- Michalak, M. (2022). Plant-derived antioxidants: Significance in skin health and the ageing process. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 585.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- Mirzaei, M., Shavandi, A., Mirdamadi, S., Soleymanzadeh, N., Motahari, P., Mirdamadi, N., Moser, M., Subra, G., Alimoradi, H., & Goriely, S. (2021). Bioactive peptides from

- yeast: A comparative review on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 297-315.
- Mishra, J., Rajput, R., Singh, K., Bansal, A., & Misra, K. (2019). Antioxidant-rich peptide fractions derived from high-altitude Chinese caterpillar medicinal mushroom *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) inhibit bacterial pathogens. *International journal of medicinal mushrooms*, 21(2).
- Mishra, J., Rajput, R., Singh, K., Puri, S., Goyal, M., Bansal, A., and Misra, K. 2018. Antibacterial natural peptide fractions from Indian *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24, 543-554.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
- Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., Martínez, J. A. and García-Lafuente, A., 2012. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food chemistry*, 130(2), 350-355.
- Moussa, Z., Judeh, Z. M., & Ahmed, S. A. (2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free radical medicine and biology*, 1, 11-22.
- Mukherjee, D., Singh, S., Kumar, M., Kumar, V., Datta, S., & Dhanjal, D. S. (2018). Fungal biotechnology: role and aspects. *Fungi and their role in sustainable development: current perspectives*, 91-103.
- Muñoz-Fonseca, M. B., Vidal-Limon, A., Fernández-Pomares, C., Rojas-Durán, F., Hernández-Aguilar, M. E., Espinoza, C., Trigos, A. and Suárez-Medellín, J., (2021). Ergosterol exerts a differential effect on AR-dependent LNCaP and AR-independent DU-145 cancer cells. *Natural Product Research*, 35(22), 4857-4860.
- Murphy, E. J., Fehrenbach, G. W., Abidin, I. Z., Buckley, C., Montgomery, T., Pogue, R., ... & Rezoagli, E. (2023). Polysaccharides—Naturally Occurring Immune Modulators. *Polymers*, 15(10), 2373.
- Myung, J., Kim, K. B., & Crews, C. M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Medicinal research reviews*, 21(4), 245-273.
- Nagano, N., Umemura, M., Izumikawa, M., Kawano, J., Ishii, T., Kikuchi, M., Tomii, K., Kumagai, T., Yoshimi, A., Machida, M., Abe, K., Shin-ya, K., & Asai, K. (2016). Class of cyclic ribosomal peptide synthetic genes in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 86, 58-70.
- Nataraj, A., Govindan, S., Ramani, P., Subbaiah, K. A., Sathianarayanan, S., Venkidasamy, B., ... & Pateiro, M. (2022). Antioxidant, anti-tumour, and anticoagulant activities of polysaccharide from *Calocybe indica* (APK2). *Antioxidants*, 11(9), 1694.
- Naveen, K. V., A. Sathiyaseelan, S. Mandal, K. Han, and M. H. Wang. 2023. Unveiling the structural characteristics and bioactivities of the polysaccharides extracted from endophytic *Penicillium* sp. *Molecules*, 28(15):5788.
- Naveen, K. V., Saravanakumar, K., Sathiyaseelan, A., & Wang, M. H. (2023). Comparative Analysis of the Antioxidant, Antidiabetic, Antibacterial, Cytoprotective Potential and Metabolite Profile of Two Endophytic *Penicillium* spp. *Antioxidants*, 12(2), 248.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- Ng, T. B. (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25(6), 1055-1073.

- Nguyen, V. T., Lee, J. S., Qian, Z. J., Li, Y. X., Kim, K. N., Heo, S. J., ... & Jung, W. K. (2013). Gliotoxin isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. induces apoptosis of human cervical cancer and chondrosarcoma cells. *Marine drugs*, 12(1), 69-87.
- Nguyen, V. T., Lee, J. S., Qian, Z. J., Li, Y. X., Kim, K. N., Heo, S. J., ... & Jung, W. K. (2013).
- Nicoletti, R., Buommino, E., De Filippis, A., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A., ... & Tufano, M. A. (2008). Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 189-195.
- Nimnoi, P. and Lumyong, S., 2011. Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1384-1390.
- Nocelli, N., Bogino, P. C., Banchio, E., & Giordano, W. (2016). Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. *Materials*, 9(6), 418.
- Novak, R. (2011). Are pleuromutilin antibiotics finally fit for human use? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 71-81.
- Ofir, R. (2024). Plants and fungi metabolites as novel autophagy inducers and senescence inhibitors. *Exploration of Drug Science*, 2(4), 361-368.
- Paci, M., Cavazza, A., Annessi, V., Putrino, I., Ferrari, G., De Franco, S., & Sgarbi, G. (2004). Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a 10-year clinicopathologic retrospective study. *The Annals of thoracic surgery*, 77(4), 1163-1167.
- Pang, L., Wang, T., Liao, Q., Cheng, Y., Wang, D., Li, J., Fu, C., Zhang, C. and Zhang, J., 2022. Protective role of ergothioneine isolated from *Pleurotus ostreatus* against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rat model. *Journal of food science*, 87(1), 415-426.
- Panova, I. G., & Tatikolov, A. S. (2023). Endogenous and Exogenous Antioxidants as Agents Preventing the Negative Effects of Contrast Media (Contrast-Induced Nephropathy). *Pharmaceuticals*, 16(8), 1077.
- Parekh, S., Vinci, V. and Strobel, R., 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 54, 287-301.
- Pearce, D. A., Bridge, P. D., Hughes, K. A., Sattler, B., Psenner, R., & Russell, N. J. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2), 143-157.
- Peng, J., Lin, T., Wang, W., Xin, Z., Zhu, T., Gu, Q., & Li, D. (2013). Antiviral Alkaloids Produced by the Mangrove-Derived Fungus *Cladosporium* sp. PJX-41. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1133-1140.
- Peters, S., Jaeger, R. J. R., & Spiteller, P. (2008). Red Pyrroloquinoline Alkaloids from the Mushroom *Mycena haematopus*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(2), 319-323.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., & Nardini, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: Synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl

- glucuronide of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12312–12323.
- Pielken, P., Stahmann, P., & Sahn, H. (1990). Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Applied microbiology and biotechnology*, 33, 1-6.
- Pietra, F. (1997). Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Natural product reports*, 14(5), 453-464.
- Pittayakhajonwut, P., Suvannakad, R., Thienhirun, S., Prabpai, S., Kongsaree, P., Tanticharoen, M. (2005). An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron Letters*, 46(8), 1341-1344.
- Porter, A. Jänicke, R., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differentiation*, 6, 99–104.
- Prommaban, A., Sriyab, S., Marsup, P., Neimkhum, W., Sirithunyalug, J., Anuchapreeda, S., ... & Chaiyana, W. (2022). Comparison of chemical profiles, antioxidation, inhibition of skin extracellular matrix degradation, and anti-tyrosinase activity between mycelium and fruiting body of *Cordyceps militaris* and *Isaria tenuipes*. *Pharmaceutical biology*, 60(1), 225-234.
- Proshkina, E., Lashmanova, E., Dobrovolskaya, E., Zemskaya, N., Kudryavtseva, A., Shaposhnikov, M., Moskalev, A. (2016). Geroprotective and radioprotective activity of quercetin, (-)-epicatechin, and ibuprofen in *Drosophila mela-nogaster*. *Frontiers in Pharmacology*. 7. Article ID: 505.
- Pulte, A., Wagner, S., Kogler, H., & Spiteller, P. (2016). Pelianthinarubins A and B, Red Pyrroloquinoline Alkaloids from the Fruiting Bodies of the Mushroom *Mycena pelianthina*. *Journal of Natural Products*, 79(4), 873-878.
- Qiao, D., Ke, C., Hu, B., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., ... & Zeng, X. (2009). Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate polymers*, 78(2), 199-204.
- Qiu, Y., Chen, Z., Su, E., Wang, L., Sun, L., Lei, P., Xu, H. and Li, S., 2021. Recent strategies for the biosynthesis of ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(46), 13682-13690.
- Quiles, J., Cabrera, M., Jones, J., Tsapekos, M., & Caturla, N. (2022). In vitro determination of the skin anti-aging potential of four-component plant-based ingredient. *Molecules*, 27(22), 8101.
- Raghavan, R. M. K., Pannippara, M. A., Kesav, S., Mathew, A., Bhat, S. G., Rafeeq, C. M., & Elyas, K. K. (2022). Production optimization and in vitro evaluation of anti-proliferative, anti-oxidant and anti-inflammatory potential of the antibacterial peptide MFAP9. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(5), 139.
- Räisänen, R., Nousiainen, P. and Hynninen, P. H., 2002. Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. *Textile research journal*, 72(11), 973-976.
- Ramachander Turaga, V. N. (2020). Peptaibols: Antimicrobial Peptides from Fungi. İçinde J. Singh, V. Meshram, & M. Gupta (Ed.), *Bioactive Natural products in Drug Discovery* (ss. 713-730). Springer.
- Rangsinth, P., Sharika, R., Pattarachotanant, N., Duangjan, C., Wongwan, C., Sillapachaiyaporn, C., Nilkhet, S., Wongsirojkul, N., Prasansuklab, A. and Tencomnao, T., 2023. Potential beneficial effects and pharmacological properties of ergosterol, a common bioactive compound in edible mushrooms. *Foods*, 12(13), 2529.

- Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4), 2-7.
- Rapoport, A., Guzhova, I., Bernetti, L., Buzzini, P., Kieliszek, M. and Kot, A. M., 2021. Carotenoids and some other pigments from fungi and yeasts. *Metabolites*, 11(2), 92.
- Rapp, P., & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(11), 938-943.
- Ratnayake, R., Fremlin, L. J., Lacey, E., Gill, J. H., & Capon, R. J. (2008). Acremolides A–D, Lipodepsipeptides from an Australian Marine-Derived Fungus, *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*, 71(3), 403-408.
- Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., & Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of environmental management*, 252, 109496.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415-1430.
- Rodrigues, M. L., 2018. The multifunctional fungal ergosterol. *MBio*, 9(5), 10.1128/mbio.01755-01718.
- Rosenberg, E., & Rosenberg, E. (2021). Eukaryotic Microorganisms are Part of Holobionts. *Microbiomes: Current Knowledge and Unanswered Questions*, 195-229.
- Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R. and Aviram, M., 2006. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1928-1935.
- Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface*, 5, 100022.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2022). Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Research*, 71(7), 817-831.
- Sandmann, G., (2022). Carotenoids and their biosynthesis in fungi. *Molecules*, 27(4), 1431.
- Schwechheimer, S. K., Becker, J. and Wittmann, C., 2018. Towards better understanding of industrial cell factories: novel approaches for ¹³C metabolic flux analysis in complex nutrient environments. *Current opinion in biotechnology*, 54, 128-137.
- Scopel, M., Abraham, W.-R., Henriques, A. T., & Macedo, A. J. (2013). Dipeptide cis-cyclo(Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(3), 624-626.
- Scorrano, L., & Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 437-444.
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M., Diederich, M. (2014). Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. *Cancer Letters*. 343(1), 134-146.

- Sette, L. D., Passarini, M. R. Z., Delarmelina, C., Salati, F., & Duarte, M. C. T. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1185-1195.
- Sharma, R. and Ghoshal, G., 2021. Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 2688-2698.
- Shen, H. M. Shi, Y. C. Shen, Y. and Ong, N. C., 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 (2), 139-146.
- Sillapachaiyaporn, C., Mongkolpobsin, K., Chuchawankul, S., Tencomnao, T. and Baek, S. J., 2022. Neuroprotective effects of ergosterol against TNF- α -induced HT-22 hippocampal cell injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113596.
- Singh, S. B., Zink, D., Polishook, J., Valentino, D., Shafiee, A., Silverman, K., ... & Lingham, R. B. (1999). Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integric acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. *Tetrahedron Letters*, 40(50), 8775-8779.
- Sinha, S., Das, S., Saha, B., Paul, D. and Basu, B., 2023. Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-breast cancer properties unraveled in yeast carotenoids produced via cost-effective fermentation technique utilizing waste hydrolysate. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1088477.
- Skanda, S., & Vijayakumar, B. S. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory metabolites of a soil-derived fungus *Aspergillus arcoverdensis* SSSIHL-01. *Current Microbiology*, 78(4), 1317-1323.
- Ślusarczyk, J., Adamska, E. and Czerwik-Marcinkowska, J., 2021. Fungi and algae as sources of medicinal and other biologically active compounds: A review. *Nutrients*, 13(9), 3178.
- Smith, T. M. Thor, H. Hartzell, P. and Orrenius S., 1982. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 31 (1), 19–26.
- Son, S. Y., Lee, S., Singh, D., Lee, N. R., Lee, D. Y., & Lee, C. H. (2018). Comprehensive secondary metabolite profiling toward delineating the solid and submerged-state fermentation of *Aspergillus oryzae* KCCM 12698. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1076.
- Song Y, Li S, Gong H, Yip RCS, Chen H. Biopharmaceutical applications of microbial polysaccharides as materials: a review. *Int J Biol Macromol* 2023;124259.
- Stahmann, K.-P., Revuelta, J. and Seulberger, H., 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 509-516.
- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 217-245.
- Suarez-Jimenez, G.-M., Burgos-Hernandez, A., & Ezquerro-Brauer, J.-M. (2012). Bioactive Peptides and Depsipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. *Marine Drugs*, 10(5), 963-986.
- Sugiharto, S., T. Yudiarti, and I. Isroli. 2016. Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava. *Antioxidants*, 5(1), 6.
- Sullivan, R., Smith, J. E., & Rowan, N. J. (2006). Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: Translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 49(2), 159-170.

- Sun, H., Wang, W., Che, Y., & Jiang, X. (2016). Fungal secondary metabolites rasfonin induces autophagy, apoptosis and necroptosis in renal cancer cell line. *Mycology*, 7(2), 81-87.
- Sung, T. J., Wang, Y. Y., Liu, K. L., Chou, C. H., Lai, P. S., & Hsieh, C. W. (2020). Pholiota nameko polysaccharides promotes cell proliferation and migration and reduces ROS content in H₂O₂-induced L929 cells. *Antioxidants*, 9(1), 65.
- Surendirakumar, K., Pandey, R. R., Muthukumar, T., Sathiyaseelan, A., Loushambam, S. and Seth, A., 2022. Characterization and biological activities of melanin pigment from root endophytic fungus, *Phoma* sp. RDSE17. *Archives of Microbiology*, 204(3), 171.
- Taby, R., & Issa, J. P. J. (2010). Cancer epigenetics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(6), 376-392.
- Tanret, C., 1909. The new base drawn from rye ergot, ergothioneine. *CR Hebd. Acad. Sci*, 25, 222-224.
- Tao, H., Zuo, L., Xu, H., Li, C., Qiao, G., Guo, M., & Lin, X. (2020). Alkaloids as Anticancer Agents: A Review of Chinese Patents in Recent 5 Years. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 15(1), 2-13.
- Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Bufo, S., & Karaman, R. (2019). The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. *Toxins*, 11(11), 656.
- Thimmaraju, A., & Govindan, S. (2022). Novel studies of characterization, antioxidant, anticoagulant and anticancer activity of purified polysaccharide from *Hypsizygus ulmarius* mushroom. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 27, 100308.
- Tian, J., Fu, L., Zhang, Z., Dong, X., Xu, D., Mao, Z., ... & Zhou, L. (2017). Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities. *Natural Product Research*, 31(4), 387-396.
- Tkacz, J. S., & Lange, L. (Eds.). (2004). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Springer Science & Business Media.
- Tobyn, G., Denham, A. and Whitelegg, M., (2010). *The Western Herbal Tradition E-Book: The Western Herbal Tradition E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Tosi, S., Kostadinova, N., Krumova, E., Pashova, S., Dishliiska, V., Spassova, B., ... & Angelova, M. (2010). Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica. *Polar biology*, 33, 1227-1237.
- Tudu, M., & Samanta, A. (2023). Natural polysaccharides: Chemical properties and application in pharmaceutical formulations. *European Polymer Journal*, 184, 111801.
- Tummers, B, Green, DR. (2017). Caspase-8: Regulating life and death. *Immunology Reviews*, 277, 76– 89.
- Vanreppelen, G., Wuyts, J., Van Dijck, P. and Vandecruys, P., (2023). Sources of antifungal drugs. *Journal of Fungi*, 9(2), 171.
- Vasundhara, M., Baranwal, M., & Kumar, A. (2016). *Fusarium tricinctum*, an endophytic fungus exhibits cell growth inhibition and antioxidant activity. *Indian journal of microbiology*, 56, 433-438.
- Vaux, D., & Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2239-2244.
- Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J.-C. and Oh, B.-T., (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production

- by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 346-350.
- Venil, C. K. and Lakshmanaperumalsamy, P., (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 49-61.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A., (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- Venkatachalam, M., Mares, G., Dufossé, L., & Fouillaud, M. (2023). Scale-up of pigment production by the marine-derived filamentous fungus, *Talaromyces albobiverticillius* 30548, from shake flask to stirred bioreactor. *Fermentation*, 9(1), 77.
- Vil, V. A., Glorizova, T. A., Poroikov, V. V., Terent'ev, A. O., Savidov, N. and Dembitsky, V. M., 2018. Peroxy steroids derived from plant and fungi and their biological activities. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 7657-7667.
- Wachtel-Galor, S. (2011). *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects*. CRC press.
- Wang, F., Jiang, J., Hu, S., Ma, H., Zhu, H., Tong, Q., ... & Zhang, Y. (2017). Secondary metabolites from endophytic fungus *Chaetomium* sp. induce colon cancer cell apoptotic death. *Fitoterapia*, 121, 86-93.
- Wang, K.-W., & Ding, P. (2018). New Bioactive Metabolites from the Marine-derived Fungi *Aspergillus*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(13), 1072-1094.
- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., & Fu, C. (2022). Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 48.
- Wang, W., J. Tan, L. Nima, Y. Sang, X. Cai, and H. Xue. 2022b. Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. *Food Chemistry: X*, 100414.
- Wang, W., Tan, J., Nima, L., Sang, Y., Cai, X., & Xue, H. (2022). Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. *Food Chemistry: X*, 15, 100414.
- Wang, X., Li, Y., Zhang, X., Lai, D., & Zhou, L. (2017). Structural diversity and biological activities of the cyclodipeptides from fungi. *Molecules*, 22(12), 2026.
- Wang, X., Zhang, Z., Zhang, S., Yang, F., Yang, M., Zhou, J., ... & Xu, N. (2021). Antiaging compounds from marine organisms. *Food Research International*, 143, 110313.
- Wang, Y., Li, Y., Li, S., Li, Q., Fan, W., Kiatoukosin, L., & Chen, J. (2019). Extracellular polysaccharides of endophytic fungus *Alternaria tenuissima* F1 from *Angelica sinensis*: Production conditions, purification, and antioxidant properties. *International journal of biological macromolecules*, 133, 172-183.
- Wang, Y., Li, Y., Li, S., Li, Q., Fan, W., Kiatoukosin, L., & Chen, J. (2019). Extracellular polysaccharides of endophytic fungus *Alternaria tenuissima* F1 from *Angelica sinensis*: Production conditions, purification, and antioxidant properties. *International journal of biological macromolecules*, 133, 172-183.
- Wang, Y., Wang, P., Ma, H., & Zhu, W. (2013). Developments around the bioactive diketopiperazines: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(11), 1415-1433.
- Wang, Y., Wang, S. J., Mo, S. Y., Li, S., Yang, Y. C., & Shi, J. G. (2005). Phelligridimer A, a highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with

- antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius*. *Organic letters*, 7(21), 4733-4736.
- Wang, Y., Yang, M. H., Wang, X. B., Li, T. X., & Kong, L. Y. (2014). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Fitoterapia*, 99, 153-158.
- Wang, Z., Sun, Q., Fang, J., Wang, C., Wang, D., & Li, M. (2022). The anti-aging activity of *Lycium barbarum* polysaccharide extracted by yeast fermentation: In vivo and in vitro studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 2032-2041.
- Wickerham, L., Flickinger, M. and Johnston, R., (1946). The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*.
- Wu, H. Y., Yang, F. L., Li, L. H., Rao, Y. K., Ju, T. C., Wong, W. T., ... & Wu, S. H. (2018). Ergosterol peroxide from marine fungus *Phoma* sp. induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 8(1), 17956.
- Wu, M., Huang, T., Wang, J., Chen, P., Mi, W., Ying, Y., Wang, H., Zhao, D. and Huang, S., 2018. Antilung cancer effect of ergosterol and cisplatin-loaded liposomes modified with cyclic arginine-glycine-aspartic acid and octa-arginine peptides. *Medicine*, 97(33), e11916.
- Wyllie, A. H., & Golstein, P. (2001). More than one way to go. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 11-13.
- Xiang, J., Chao, D. T., & Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14559-14563.
- Xiao, Z., Zhou, W., & Zhang, Y. (2020). Fungal polysaccharides. *Advances in pharmacology*, 87, 277-299.
- Xie, L.-R., Li, D.-Y., Wang, P.-L., Hua, H.-M., Wu, X., & Li, Z.-L. (2013). [A new 3, 4-secolanostane triterpenoid from a marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 48(1), 89-93.
- Xiong, K., Dong, N., Yang, B., Chen, Y., Liang, H., Lin, X. and Zhang, S., 2023. Ergothioneine yield of *Rhodotorula* species positively correlated with hydrogen peroxide tolerance. *Food Bioscience*, 53, 102745.
- Xu, D., & Xu, Z. (2020). Indole Alkaloids with Potential Anticancer Activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(21), 1938-1949.
- Xu, W., Gavia, D. J., & Tang, Y. (2014). Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 31(10), 1474-1487.
- Xu, W., Zhang, F., Luo, Y., Ma, L., Kou, X., & Huang, K. (2009). Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydrate research*, 344(2), 217-222.
- Yadav Manila, Yadav Amita, Yadav Parkash. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7(Suppl 1): S256-S26.
- Yadav, A. N., S. Singh, S. Mishra, and A. Gupta. 2019. Recent advancement in white biotechnology through fungi. Cham: Springer International Publishing, 528.
- Yan, J. K., Wang, W. Q., & Wu, J. Y. (2014). Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review. *Journal of Functional Foods*, 6, 33-47.

- Yang, M., Ren, W., Li, G., Yang, P., Chen, R., & He, H. (2022). The effect of structure and preparation method on the bioactivity of polysaccharides from plants and fungi. *Food & Function*, 13(24), 12541-12560.
- Yang, Y., Chen, G., Zhao, X., Cao, X., Wang, L., Mu, J., ... & Zhang, H. (2022). Structural characterization, antioxidant and antitumor activities of the two novel exopolysaccharides produced by *debaryomyces hansenii* DH-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 335.
- Yang, Y., G. Chen, X. Zhao, X. Cao, L. Wang, J. Mu, F. Qi, L. Liu, and H. Zhang. 2022. Structural characterization, antioxidant and antitumor activities of the two novel exopolysaccharides produced by *Debaryomyces hansenii* DH-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1):335.
- Yang, Y., Xia, Y., Chen, H., Hong, L., Feng, J., Yang, J., ... & Ma, Y. (2016). The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a randomized controlled trial. *Oncotarget*, 7(7), 8432.
- Yao, F.-H., Liang, X., & Qi, S.-H. (2023). Two new linear peptides from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO 41512. *Journal of Asian Natural Products Research*, 25(10), 941-948.
- Yao, F.-H., Liang, X., Cheng, X., Ling, J., Dong, J.-D., & Qi, S.-H. (2021). Antifungal peptides from the marine gorgonian-associated fungus *Aspergillus* sp. SCSIO41501. *Phytochemistry*, 192, 112967.
- Ye, Y., Xiao, Y., Ma, L., Li, H., Xie, Z., Wang, M., ... & Liu, J. (2013). Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 7131-7139.
- Yin, H. Xu, L. and Ned A. Porter, A. N., 2011. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111 (10), 5944-5972.
- Youssef, F. S., Alshammari, E., & Ashour, M. L. (2021). Bioactive Alkaloids from Genus *Aspergillus*: Mechanistic Interpretation of Their Antimicrobial and Potential SARS-CoV-2 Inhibitory Activity Using Molecular Modelling. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1866.
- Youssef, F. S., Ashour, M. L., Singab, A. N. B., & Wink, M. (2019). A Comprehensive Review of Bioactive Peptides from Marine Fungi and Their Biological Significance. *Marine Drugs*, 17(10), 559.
- Zapata, J. M., Pawlowski, K., Haas, E., Ware, C. F., Godzik, A., & Reed, J. C. (2001). A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24242-24252.
- Zhang, L., Wang, C., Chen, K., Zhong, W., Xu, Y., & Molnár, I. (2023). Engineering the biosynthesis of fungal nonribosomal peptides. *Natural Product Reports*, 40(1), 62-88.
- Zhang, Y., Cao, G., Li, X. and Piao, Z., 2023. Effects of exogenous ergothioneine on *Brassica rapa* clubroot development revealed by transcriptomic analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6380.
- Zhang, Y., Nielsen, J. and Liu, Z., 2017. Engineering yeast metabolism for production of terpenoids for use as perfume ingredients, pharmaceuticals and biofuels. *FEMS Yeast Research*, 17(8), fox080.
- Zhao, W.-Y.; Yi, J.; Chang, Y.-B.; Sun, C.-P.; Ma, X.-C. Recent studies on terpenoids in *Aspergillus* fungi: Chemical diversity, biosynthesis, and bioactivity. *Phytochemistry* 2022, 193, 113011.

- Zhao, Y., Wang, J., Fu, Q., Zhang, H., Liang, J., Xue, W., ... & Oda, H. (2022). Characterization and antioxidant activity of mannans from *Saccharomyces cerevisiae* with different molecular weight. *Molecules*, 27(14), 4439.
- Zhou, R., Liu, Z. K., Zhang, Y. N., Wong, J. H., Ng, T. B., & Liu, F. (2019). Research Progress of Bioactive Proteins from the Edible and Medicinal Mushrooms. *Current Protein & Peptide Science*, 20(3), 196-219.
- Zorrilla, J. G., & Evidente, A. (2022). Structures and Biological Activities of Alkaloids Produced by Mushrooms, a Fungal Subgroup. *Biomolecules*, 12(8), 1025.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Gürkan AYKUTOĞLU
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise: Elmalı Lisesi	
Lisans: Boğaziçi	
Üniversitesi/	
Moleküler Biyoloji	
ve Genetik Bölümü	
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	