

Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların
Antioksidan Özelliklerinin
Belirlenmesi

Aysel KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2011

Determination of Antioxidant Properties of Microfungi Isolated from Hipersaline
Environments

Aysel KAYA

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of General Biology

August 2011

Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların Antioksidant Özelliklerinin
Belirlenmesi

Aysel KAYA

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Semra İLHAN

Ağustos 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Aysel Kaya'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Semra İLHAN

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞCEN

Üye : Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Antioksidanlar, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türlerinin vücuda verdiği yoğun zararı azaltabilen veya tamamen ortadan kaldıracı maddelerdir. Genelde bitkisel kaynaklar doğal antioksidan olarak kullanılırken, son yıllarda ekstrem ortamlardan izole edilen metabolitlerinde bu amaçla kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ekstrem bir ortam olan tuzlu ortamlardan izole edilen mikrofunguslar, yeni antioksidan maddeler için doğal bir kaynak oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada, tuzlu ortamlardan izole edilen mikrofungusların antioksidan özelliklerinin belirlenebilmesi için, Folin-Ciocalteu kolorimetrik metodu kullanılarak toplam fenolik madde içeriği, DPPH (2,2-difenilpikrilhidrazil) üzerinden serbest radikal süpürücü etki ve antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) spesifik enzim aktivitesi araştırılmıştır. Serbest radikal süpürücü etki tayini için üç farklı konsantrasyon (9.6×10^{-4} , 1.8×10^{-3} ve 3.6×10^{-3} mg/mL) kullanılmıştır. Ayrıca serbest radikal süpürücü etki ince tabaka kromatografisi ile değerlendirilmiştir. Toplam fenolik madde miktar tayininde; 1 (%98), 9 (%82), 17 (%50), 5 (%45) ve 15 (33) kodlu izolatlar yüksek aktivite göstermiştir. Serbest radikal süpürücü etki açısından ise; 1 (%86), 2 (%69), 7 (%67), 8 (%78), 9 (%76), 13 (%79), 15 (%78) dir. Süperoksit dismutaz, spesifik enzim aktivitesi 20 adet fungustan 12 tanesinde (izolat numaraları sırasıyla; 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19 ve 20) yüksek bulunurken, spesifik katalaz aktivitesi 16 tanesinde (1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20) yüksek bulunmuştur.

Sonuçlara göre, tuzlu ortamlardan izole edilen funguslar serbest radikal süpürücü aktivite ve spesifik enzim aktiviteleri açısından korelasyon göstermektedir. Bu çalışma yeni doğal antioksidan maddelerin keşfi bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mikrofungus, DPPH, Toplam fenolik madde, SOD, Katalaz

SUMMARY

Antioxidants, which are produced during normal metabolism, reactive oxygen species in some of the extensive damage to the body-killing substances that can reduce or completely. Generally used as vegetable sources of natural antioxidants, extreme environments in recent years, several studies have demonstrated that isolated metabolites can be used for his purpose. Microfungi isolated from the salty environments of extreme environments, constitute a natural resource for new antioxidant substances.

In this study, the antioxidant properties of microfungi isolated from saline environments in order to determine the Total Phenolic content, DPPH (2,2-difenilpikrilhidrazil) via free radical scavenging effect and antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, the enzyme specific activity was investigated. For the determination of free radical scavenging effect of three different concentrations (9.6×10^{-4} , 1.8×10^{-3} and 3.6×10^{-3} mg/ml) were used. In addition, free radical scavenging effect was evaluated thin-layer chromatography. Quantification of total phenolic compounds; 1 (%98), 9 (%82), 17 (%50), 5 (%45) and 15 (33) coded isolates showed high activity. In terms of the free radical scavenging effect; 1 (%86), 2 (%69), 7 (%67), 8 (%78), 9 (%76), 13 (%79), 15 (%78) is. Superoxide dismutase, a specific enzyme activity in fungi out of 20 12 of them (numbers of isolates, respectively; 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19 and 20) high, while the specific catalase activity and 16 (1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20) were higher.

According to the results, free radical scavenging activity of fungi isolated from salty environments, and had a correlation specific enzyme activities. This study is important for the discovery of new natural antioxidant substances.

Key Words: Microfungi, DPPH, Total Phenolic compounds, SOD, Catalase.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın tüm aşamalarında beni yönlendiren ve her türlü imkanı sağlayan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra İLHAN'a

Tüm tez aşaması boyunca her daim yanımda olup laboratuvar çalışmalarımda bana değerli bilgileriyle destek olan hocam Sayın Öğr. Gör. Zerrin CANTÜRK'e

Laboratuvar çalışmalarımda her zaman sorularıma içtenlikle cevap veren ve bilgilerini esirgemeyen hocam Sayın Arş. Gör. Bükay YENİCE GÜRSU'ya

Çalışma arkadaşlarımdan doktora öğrencileri Burcu AKÇAL başta olmak üzere Y.Erçin KOCABIYIK'a, lisans bitirme öğrencisi olan Özden ÖZKÖK'e ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Eğitimimde ve her konuda olduğu gibi çalışmam boyunca bana olan inançları, güvenleri ve manevi destekleri için canım aileme ve Ozan GÜLEN'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Funguslar ve Genel Özellikleri.....	3
2.2. Ekstrem Mikroorganizmalar.....	6
2.2.1. Ekstremofillerin Sınıflandırılması.....	8
2.2.2. Halotolerant ve Halofilik Fungusların Önemi.....	10
2.2.3.Funguslarda Üretilen Sekonder Metabolitler.....	12
2.3. Serbest Radikaller.....	14
2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri.....	16
2.4.1. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	18

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	19
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	19
2.5.1. Antioksidan Aktiviteden Sorumlu Doğal Bileşikler.....	21
2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemleri-Antioksidan Enzimler.....	23
3. MATERYAL VE METOD.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Besiyerleri.....	27
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	30
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	30
3.2. Metod.....	31
3.2.1. Araştırma Bölgesinin Özellikleri.....	31
3.2.2. Örnek Alınması ve Fungus İzolasyonu.....	32
3.2.3. Fungus İdentifikasyonu	33
3.2.4. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini.....	33
3.2.5. İnce Tabaka Kromatografi (İTK) ile Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi.....	34
3.2.6. Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini.....	34
3.2.7. Antioksidan Enzimlerin Tayini.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. BULGULAR.....	39
4.1. Tuz Gölünden İzole Edilen Funguslar.....	39
4.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Sonuçları.....	42
4.3. İTK Sonuçları.....	45
4.4. Serbest radikal süpürücü etki Tayini Sonuçları.....	46
4.5.Süperoksit Dismutaz ve Katalaz için Spesifik Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Tuz Gölü'nün konumu ve örnekleme istasyonları.....	31
3.2. Bovine serum albümin standart grafiği.....	36
4.1. Tuz gölünden izole edilen fungusların MEA besiyerindeki görüntüleri.....	40
4.2. 20 adet fungus filtratının gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarları....	44
4.3. 20 adet fungus filtratına ait DPPH çözeltisi püskürtülmüş İTK plakları.....	45
4.4. Çalışılan fungus filtratlarının 3 farklı konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkileri.....	48

ÇİZELGELER

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve kimlikleri.....	17
3.1. SOD Standart solüsyonunun hazırlanması.....	36
3.2. SOD Test Prosedürü.....	37
4.1. Tayin edilen fungus izolatları.....	39
4.2. Seçilen fungus filtratlarının gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarı.....	42
4.3. 20 adet fungus filtratının % inhibisyon ortalamaları.....	47
4.4. SOD ve KAT enzimlerinin sonuçları (U/mg protein).....	50

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

SOD	:	Süper Oksit Dismutaz
KAT	:	Katalaz
DPPH	:	2,2-difenilpikrilhidrazil
BHT	:	Butillenmiş Hikroksitoluol
İTK	:	İnce Tabaka Kromotografisi
MY10-12	:	%10 glukoz-%12 NaCl agar
MY50G	:	%50 glukoz malt ekstrakt yeast ekstrakt agar
MEA	:	Malt Ekstrakt Agar
GA	:	Gallik Asit
%	:	Yüzde
g	:	Gram
mg	:	Miligram
°C	:	Santigrat Derece
L	:	Litre
µl	:	Mikrolitre

1.GİRİŞ

Ekstremofillerin bir grubu olan halofiller, yoğun tuzlu çevrelerde, özellikle doğal tuz gölleri ve güneş etkisiyle meydana gelen tuz göletlerinde yaşarlar (Madigan and Marrs, 1997).

Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında, besiyelerinde kolay üretilibilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler (Horiskoshi and Grant, 1998).

Yakın zamana kadar yüksek oranda tuz içeren çevrelerdeki mikrobiyal komünitenin ağırlıklı olarak *Archaeae* ve *Bacteria* türleri ve ökaryotik bir alg türü olan *Dunaliella salina* olduğu düşünülse de, günümüzde bu tip ekstrem çevrelere uyum sağlamış halotolerant ve halofilik fungusların da varlığı ortaya çıkarılmıştır (Ventosa, 2004).

Biyoteknoloji; insanların hayatlarını ilgilendiren hücresel sistemlerin geliştirilmesi, sosyal ve ekonomik olarak yararlı hale getirilmesi amacını taşımaktadır. Funguslar da biyoteknolojide fermentatif prosesler ile özellikle sekonder metabolitlerin eldesinde önemli yer tutmaktadırlar (Nogurira et al., 2006).

Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen, özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli birtakım fonksiyonlar üstlenirler. Atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme bu fonksiyonlar arasındadır (Vining, 1990).

Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu çeşitli görevlerin dışında sekonder metabolitler antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünsüpresif gibi çok çeşitli farmasötik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Monaghan, 1990).

Polifenolik bileşikler yaygın olarak kullanılan sekonder metabolitlerden biridir. Kaynak olarak bitki, mantar ve filamentli funguslardan elde edilirler (Miller et al., 1995).

Bu çalışmada tuzlu ortamlardan izole edilen fungal filtratlarda toplam fenolik madde içeriği, DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki ve antioksidan aktivite tayini içinde süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan mikrofunguslar; ülkemizde bulunan Tuz Gölü'nden izole edilmiş olması yönüyle özgün ve önemli bir çalışmadır. Yüksek oranda tuz içeren doğal ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar sahip oldukları metabolitler açısından oldukça çeşitlilik göstermektedir. Doğal antioksidanların keşfi hem bilimsel hem de ekonomik açıdan önemlidir. Bu nedenle yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğal kaynaklı yeni antioksidan maddelerin belirlenmesi, ileriki çalışmalarda ise kimyasal içeriklerinin aydınlatılması bakımından da önem taşımakta ve bu çalışmalara bir temel oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Funguslar ve Genel Özellikleri

Hücresel organizasyonları ve davranışları bakımından diğer tüm canlılardan farklılık gösteren eşsiz bir organizma grubu olarak tanımlanan funguslar, çok hücreli organizmaların üç ana evrimsel dalından birini temsil etmektedirler (Deacon, 2005).

Funguslar, gerçek hücre çekirdeklerine sahip, ökaryotik organizmalardır. Bünyelerinde klorofil bulundurmazlar, heterotrofturlar. Besinlerini absorpsiyonla alırlar (Deacon, 2005).

Bugün dünyada, denizde, karada ve havada olmak üzere geniş bir yayılış alanına sahip funguslar, aşağı yukarı 110.000 civarında türe sahiptirler. Doğada bazıları parazit olarak ve bazıları da simbiyotik olarak yaşamlarını sürdürmektedirler (Öner, 1986).

Funguslar için basit bir tanım yapmak mümkün değildir. Çünkü şekil, davranış ve hayat devri yönünden birbirine uymayan çok sayıda organizmayı içerirler (Gücin ve Tamer, 1994).

Genellikle fungusların vejetatif yapıları mikroskop altında incelendiğinde iplik şeklinde yapılardan ibaret olduğu görülür. Birkaç hücreden oluşan bu iplikçiklerin her birine hif (hyphae) denir. Bir türe ait bir yerde bulunan hiflerin tümüne birden misel (mycelium) adı verilir. Funguslarda vejetatif yapının tümüne birden tallus da denir. Fakat misel terimi daha çok tercih edilmektedir. Bazı fungus türleri tek hücreli olduklarından tek bir hücre fungusun tüm yapısını oluşturur. Genellikle funguslarda hifi oluşturan hücrelerin ince uzun silindirik bir yapıları vardır. Hücreler septum denilen ara bölmelerle birbirinden ayrılırlar (Öner, 1986).

Fungus hücreleri etrafında iyi gelişmiş bir hücre çeperi yer alır. Hücre çeperi yapısı bazı türlerde selüloz, bazı türlerde kitin ve bazı türlerde de her ikisinin karışımından ibarettir. Birer polisakkarit olan kitin ve selüloz maddeleri hücre çeperinde amorfik bir yapı içinde mikro fibriller halinde bulunurlar. Gelişmiş türlerde

çeper kitindir. Bazılarında ise selüloz, lignin, mannan, glukoz, kalloz, galaktan ve diğer bazı organik maddeler bulunabilirler (Çolakoğlu, 1999).

Hücre duvarı, hücreleri çevresel koşulların olumsuz etkisinden korumasının yanı sıra, antijenik bir özelliğe ve bazı enzimleri içermeleri nedeniyle de fizyolojik bir aktiviteye sahiptir. Yapısında, polisakkaridler (yaklaşık %80) daha fazla olmak üzere protein (%5-15) ve lipidler (%3-10) bulunmaktadır. Bunların miktarları; fungus türüne, besiyerinin bileşimine ve çevresel koşulların durumuna göre az çok değişebilmektedir (Arda, 2000).

Çekirdek içinde bulunan kromozom, deoksiribonukleik asit (DNA) yapısında olup birden fazla sayıdadır. Kromozomun yapısı ökaryotik ve prokaryotik hücre kromozomlarına benzerlik gösterir. DNA'daki G + C oranı %35-65 arası olup türler arasında bu sınırlar içinde farklar görülmektedir. DNA'nın molekül ağırlığı kromozom sayısına bağlı olarak artmaktadır. Nükleer membranda bulunan delikler, çekirdek içinde sentezlenen mRNA'nın sitoplazmaya geçmesine ve endoplazmik retikulumlar üzerinde geçişine yardımcı olur. DNA'nın yapısı ve sentezi de Watson-Crick modeline uymaktadır. Çekirdekçik bir veya birkaç tane olabilmektedir. Yapısında %80 RNA ve ayrıca protein de bulunmaktadır (Arda, 2000).

Funguslar katı ortamlarda üretildikleri zaman miselyal koloniler, maya benzeri, membranöz, granüler ve pleomorfik olmak üzere başlıca beş türde koloni oluşturmaktadırlar. Bu varyasyonlar, fungusların genetik karakterleri ile yakından ilgili iseler de besiyerinin kimyasal yapısına, kültürün eskiliğine, çevresel koşulların durumuna da bağlıdır (Arda, 2000).

Funguslar sporlanma ile eşeysiz ve eşeyli olarak üreme yeteneğine sahiptirler. Sporlar olgunlaştıktan sonra hifadan ayrılarak serbest hale gelir ve uygun ortam ve koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü fungusları oluştururlar (Arda, 2000).

Funguslarda; artrospor, blastospor, klamidiospor, konidiospor ve sporangiospor olmak üzere beş tür aseksüel spor oluşumuna rastlanmaktadır. Seksüel sporlar ise askospor, basidiospor, oospor ve zigospor olmak üzere dört tarzda oluşurlar.

Fungusların fotosentetik pigmentleri olmadığından, karbon ve enerji kaynağı olarak organik maddeleri kullanmak zorunda kalmışlardır (Demir ve ark., 2004).

Funguslar, karbon ve enerji kaynaklarını birçok substratlardan temin edebilirler. Doğada serbest halde yaşayan fungusların birçoğu enerji gereksinimleri için bitkisel orijinli kaynaklardan yararlanır. Fungusların büyük bir çoğunluğu da glikoz, sakkaroz, nişasta, maltozu ayrıştırabilir ve bunlardan yararlanabilir. Bazıları da yağ asitlerini, organik asitleri ve gliserolü enerji kaynağı olarak ve ayrıca hekzos ve pentoz şekerlerinin türevlerini (üronik asit ve şeker alkollerini) kullanabilirler. Bunların hücre membranlarından geçişinde permeaz enzimlerinin rolü fazladır (Arda, 2000).

Fungusların hücre duvarlarında, kitin ve selüloz karakterinde substansların bulunması, devamlı değişen ve çok çeşitli çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlamalarına imkan tanır. Örneğin funguslar, bakterilerin dayanamayacakları kadar yüksek konsantrasyondaki şeker (%50) solüsyonuna karşı direnç gösterirler. Çünkü yüksek ozmotik basınca karşı, bakteriler kadar duyarlı değildir ve bunu hücre duvarının yapısındaki maddelerle sağlarlar. Bu nedenle, reçel ve jöleler funguslar tarafından kolayca kontamine edilebilirler. Ancak, bazı fungus türlerinin de %15 şeker yoğunluğunda üremelerinde sınırlanma meydana gelmektedir (Arda, 2000).

Fungusların minimal ve maksimal pH limitleri 2-11 arasında değişebilir. Asit karakterdeki meyveler veya suları (domates, portakal, limon, greyfurt, mandalina vs.) buzdolabı ısısında olsalar bile, fungusların üremeleri için iyi bir ortam oluşturabilirler (Arda, 2000).

Rutubet, fungusların üremelerinde çok önemli etkenlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki rutubet genellikle üreme üzerine olumlu etkide

bulunur. Rutubet azaldıkça fungusların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Fungusların rutubete olan gereksinimleri türler arasında değişiklik gösterir (Arda, 2000).

Fungusların üreme ısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklılıklar gösterir. Bu sınırlar 0-60 °C arasında değişebilmektedir. Hifalar maksimal ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterir. Buzdolabı ısısında üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan funguslara her zaman rastlamak mümkündür. Termofilik olanlar ise 60°C'nin üstünde bile gelişebilirler (Arda, 2000).

Funguslar genellikle aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişip, ürerler. Bu nedenle havada bulunduğu miktar kadar oksijen, üreme için gereklidir. Oksijenin azlığı veya mikroaerofilik koşullar üremeyi ve gelişmeyi sınırlar (Arda, 2000).

Fungusların üremeleri için ışık, gerek duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik funguslar da direkt ışık olmadan üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar. Ultraviyole ışınları fungistatik bir etkiye sahip olmasına karşın iyonizan ışınlar öldürebilirler (Arda, 2000).

2.2. Ekstrem Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitelerin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, düşük sıcaklık, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ekstrem olarak bahsedilen çevrelerde de bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003).

Ekstremofiller bu zor şartlara yapısal ve moleküler düzeyde adapte olmuşlardır. Ekstremofil mikroorganizmalar yaşadıkları çevre koşullarına göre;

- Termofiller (Thermophiles),
- Psikrofiller (Psychrophiles),
- Alkalifiller (Alkaliphiles),
- Asidofiller (Acidophiles),
- Halofiller (Halophiles),
- Barofiller (Barophiles),
- Metalofiller (Metalophiles)

gibi isimlerle ifade edilmektedirler (Demirjian et al., 2001).

Ekstremofillerin yüksek sıcaklık derecelerinde aktif enzimleri ve alışılmışın dışındaki diğer özellikleri sebebiyle, kimyasal ve biyolojik prosesler arasındaki boşluğu dolduracağı düşünülmektedir (Leuschner and Antranikian, 1995).

Ekstrem mikroorganizmaların, endüstriyel proseslerde kullanımı, hem ekonomik hem de teknolojik açıdan önemli avantajlar sağlamaktadır. Ekstremofiller, diğer canlılarda bulunmayan önemli özelliklere sahiptirler (Aguilar et al., 1998).

Ekstremofillerin, metabolik prosesler ve biyolojik fonksiyonlarını, ekstrem koşullarda çalışabilen protein ve enzimlerle yürüttükleri (Niehaus et al., 1999), ekstremofil enzimlerinin yüksek bir termostabiliteye sahip oldukları açıklanmıştır (Rossi and Rosa, 1993).

Ekstremofillerin anaerobik ve aerobik kemolitotroflar ve heterotrofları içerdikleri; nişasta, hemiselüloz, protein ve peptidler gibi farklı polimerik substanslardan yararlanabildikleri de yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır (Niehaus et al 1999, Vorgias and Antranikian, 2000).

Günümüze kadar ekstremofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan polisakkarit parçalayan selülaz, amilaz, pullulanaz, lipaz, esteraz ve fitaz gibi enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve endüstriyel işlemler için yeni imkanlar sağlanmıştır (Haki and Rakshit, 2003).

Ayrıca ekstremofil membranlarının, ilaç formülasyonlarında kullanılabilen son derece stabil surfaktantları içerdiği de belirtilmiştir (Marshall, 1997).

2.2.1. Ekstremofillerin Sınıflandırılması

√ **Termofiller:** Wiegel (1998), bu grup mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarının çok geniş bir aralıkta değiştiğini, Stetter (1996) ise, mikroorganizmaların gelişimi için kabul edilmiş sıcaklık aralıklarının, bazı küfler için -12°C kadar düşük ve anaerobik arke olan *Pyrococcus furiosus* ve benzer arkeler için 113°C kadar yüksek olabildiğini, $10 - 40^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığının (mezobiyotik) ve 6.0-8.0 pH değerleri (nötrale yakın), insanlar ve *E.coli* gibi mezofil mikroorganizmalar için normal gelişme koşulu olarak kabul edildiğini bildirmişlerdir (Madigan and Marris, 1997; Wiegel, 1998).

√ **Asidofiller:** Doğadaki asidik bölgeler, jeokimyasal reaksiyonlar (örneğin, bazı sıcak sular ve hidrotermal kaynaklarda sülfür gazı üretimi gibi) veya asidofillerin metabolik aktiviteleri sonucunda oluşmaktadır. Bazı asidofillerin hücre membranından ve hücre duvarından pH 1.0'in altında çalışabilen ekstremozimler izole edildiği belirtilmiştir (Madigan and Marris, 1997).

√ **Alkalifiller:** Yüksek karbonatlı topraklar ve soda göllerinden izole edilmiştir (Madigan and Marris, 1997).

√ **Psikrofiller:** Yeryüzündeki soğuk çevreler, sıcak alanlardan daha fazladır. $1-3^{\circ}\text{C}$ ortalama sıcaklığa sahip okyanusların, dünya yüzeyinin yaklaşık %70'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Psikrofiller, 15°C 'nin altındaki sıcaklıklarda yaşama adapte olmuş mikroorganizmalardır ve Kuzey (Arktik) ve Güney (Antartika) Buz Denizi'nden ve okyanus diplerinden izole edilmişlerdir. Yapılan çalışmalarda çok soğuk çevrelerde de,

sıcak çevreler gibi yaşamın olduğu anlaşılmıştır (Madigan and Marris, 1997; Sellek and Chaudhuri, 1999).

Mezofilik enzimlerin, düşük sıcaklıklarda aktivitelerini kaybettiği, psikrofil enzimlerinin ise düşük sıcaklıklara dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Sellek and Chaudhuri, 1999).

√ **Halofiller:** Ekstremofillerin bir başka önemli grubu, yoğun tuzlu çevrelerde, özellikle doğal tuz gölleri ve güneş etkisiyle meydana gelen tuz göletlerinde yaşayan halofillerdir (Madigan and Marris, 1997).

Afrika, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yüksek tuzlu bölgelerden çeşitli halofillerin izole edildiği bildirilmektedir (Sellek and Chaudhuri, 1999).

Halofillerin, gelişmek ve yapılarını korumak için doymuş tuz çözeltilerine gerek duyduğu, bunlarda hücre içi tuz konsantrasyonunun, hücre dışı tuz konsantrasyonu kadar yüksek olduğu ve bu koşullarda bile aktif proteinler içerdiği anlaşılmıştır (Rossi and Rossa, 1993).

Halofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında nasıl yaşamlarını sürdürülebildikleri *Halobacterium* gibi model organizmalarla yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu tip mikroorganizmaların çevrelerindeki yüksek ozmotik basınçta yaşabilmek için temel olarak iki strateji geliştirdiği kabul edilmektedir. Bunlardan ilki olan iç tuz stratejisinde, hücre içinde K^+ veya bazı hücrelerde Na^+ akümüle edilir ve böylece tüm hücre içi sistemler dış ortamdaki yüksek tuz konsantrasyonu nedeniyle oluşan basınca karşı adapte olabilirler. İkinci strateji olan “*compatible solute*” stratejisinde hücre kendisinin ürettiği stabilite edici organik maddeler ile (ektoin, glisin, betain gibi) hücre içi sistemlerin yüksek tuz koşullarına adaptasyonu gereksiz hücre ile ortamın ozmotik basıncını dengeler ve yaşamını sürdürür (Ören, 1999).

Halofillerin, amilaz, proteaz, glikozidaz ve lipaz aktivitesine sahip olmasına karşın, henüz endüstriyel uygulamaların olmadığı ancak bazı restriksiyon endonükleazların ticari olarak üretilebileceği bildirilmiştir (Sellek and Chaudhuri, 1999).

2.2.2. Halotolerant ve Halofilik Fungusların Önemi

Son yıllarda halofilik ve halotolerant funguslar, tuza dirençlilikleri bakımından mükemmel modeller oldukları için çalışma konusu olmaktadır (Petrovic et al., 2002).

Tuz içeren ve içermeyen ortamlarda büyüeyebilen mikroorganizmalar halotolerant olarak adlandırılmıştır. Büyüeyebilmek için tuz gereksinimi olan mikroorganizmalar ise halofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır (Margesin and Schinner, 2001).

Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında besiyerlerinde kolay üretilebilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler. Ancak ekstremofilik mikroorganizmalarla ilgili alınan patent uygulamalarının sadece %20'si halofilik mikroorganizmalara aittir (Horiskoshi and Grant, 1998).

Halofiller Kushner'e göre halofiller (1978, 1993);

- Halofilik olmayanlar (0-1M NaCl),
- Az halofiller (0,2-2,0M NaCl),
- İlımlı halofiller (0,4-3,5M NaCl),
- Ekstremlere yakın halofiller(1,4-4,0 M NaCl),
- Ekstrem halofiller(2,0-5,2M NaCl),
- Halotolerantlar (0->1M NaCl)
- Değişken halofiller (0- >3M NaCl)

olarak sınıflandırılırlar.

Yakın zamana kadar yüksek oranda tuz içeren çevrelerdeki mikrobiyal komünitenin ağırlıklı olarak Archaeae ve Bacteria türleri ve ökaryotik bir alg türü olan *Dunaliella salina* olduğu düşünülse de, günümüzde bu tip ekstrem çevrelere uyum sağlamış halotolerant ve halofilik fungusların da varlığı ortaya çıkarılmıştır. İsrail'deki Ölü Deniz (Dead Sea), Amerika'daki Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake) gibi yüksek tuz konsantrasyonlarına sahip ekstrem çevrelerin halofilik biyotasına yönelik birkaç çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda hipersalin çevrelerdeki fungusların sınırlı sayıda genusa ait olduğu, fakat tahmin edilenden daha yüksek bir çeşitliliğine sahip olduğu görülmektedir. Koyu renkli mayalar meristematik maya benzeri funguslardır ve *Cladosporium* genusuyla ilişkilidirler. En sık rastlanan koyu renkli olmayan funguslar ise genellikle telemorfik safhaya sahip *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait türlerdir. Diğerleri *Wallemia*, *Scopulariopsis* ve *Alternaria*'dır (Ventosa, 2004).

Düşük su aktiviteli ortamlarda gelişebilen kserofilik funguslar, sıklıkla yüksek tuz ya da şeker konsantrasyonuna sahip gıdalardan izole edilmesine rağmen, son zamanlara kadar doğal hipersalin çevrelerden izole edilememiş olması ilginçtir. Yüksek konsantrasyonlarda çözülmüş madde varlığında, bilinen gıda kaynaklı kserofilik birkaç fungus türünde gelişmenin öncelikle ortamın su aktivitesiyle belirlendiği, çözülmüş maddenin kimyasal yapısıyla bağlantılı olmadığı görülmektedir. Bu nedenle 1975'in sonlarına kadar halofilik fungus terimi, sadece birkaç kserofilik gıda kaynaklı tür için kullanılmıştır (Buchan et al., 2003).

Tuz bataklıkları, tuzlu topraklar ve deniz gibi kısmen tuzlu doğal çevrelerdeki fungusların izolasyonunu tanımlayan sadece birkaç literatüre rastlanmaktadır. Ancak, son zamanlarda sadece ekstrem denebilecek, neredeyse NaCl ile doygunluğa ulaşmış tuzlu doğal çevrelerde bulunan funguslar üzerine çalışmalar başlamıştır (Gunde-Cimerman, et al., 2000; Mandeel, 2002; Grishkan, et al., 2004).

Cladosporium, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Wallemia* cinsleri hipersalin çevrelerde gelişme yeteneğinde olan funguslardır. Bu grubun temsilcileri tarafından biyomoleküllerin üretimi endüstriyel, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalarda oldukça fazla kullanılmaktadır (Ventosa, 2004).

Halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Bunlar;

1. Besinlerde ve besin endüstrinde (protein kaynağı olarak *Spirulina spp.* yetiştirilmesi, *Dunaliella spp.* gibi gliserol, beta karoten ve proteince yüksek organizmalar kullanımı) ,

2. Enzimlerin üretiminde (yüksek tuz konsantrasyonlarında çalışabilen amilaz, lipaz, beta laktamaz ve proteaz enzimlerin eldesinde),

3. İlaç endüstrisinde (çeşitli antimikrobiklerin eldesinde),

4. Petrol kazanımında

5. Çevre biyoteknolojisinde (tuzlu ya da alkali endüstriyel sularda fosfat giderilmesinde, kirletilmiş hipersalin ortamlarda kontaminant indikatör olarak) (Da Costa et al., 1989).

1928 yılında Alexander Fleming'in tesadüf sonucu *Penicillium notatum* adlı fungusun ürettiği penisilini keşfetmesiyle mikrobiyal kaynaklı doğal ürün araştırmaları başlamıştır. Bu tarihten sonra mikroorganizmalardan yeni antimikrobiyal bileşiklerin elde edilmesi amacıyla yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucu yeni sekonder metabolitler keşfedilmiştir (Oskay, 2009).

2.2.3. Funguslarda Üretilen Sekonder Metabolitler

Biyoteknoloji; insanların hayatlarını ilgilendiren hücresel sistemlerin geliştirilmesi, sosyal ve ekonomik olarak yararlı hale getirilmesi amacını taşımaktadır. Funguslar da biyoteknolojide fermentatif prosesler ile özellikle sekonder metabolitlerin eldesinde önemli yer tutmaktadır (Nogurira et al., 2006).

Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli birtakım fonksiyonlar üstlenirler. Atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme bu fonksiyonlar arasındadır (Vining, 1990).

Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu çeşitli görevlerin dışında sekonder metabolitler antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünsüpresif gibi çok çeşitli farmasötik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Monaghan, 1990).

Sekonder metabolitler 5 başlık altında toplanır;

- Antitümör Ajanlar
- Proteaz-Peptidaz İnhibitörleri
- Kolesterol Biyosentezi İnhibitörleri
- İmmünosupressantlar
- Antibakteriyel ajanlar

Antibiyotikler, sekonder metabolitlerin en iyi bilinenlerdendir. 1983-1994 yılları arasında keşfedilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal kaynaklıdır. 23.000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si funguslar, % 16'sı ise diğer bakteri türlerince üretilmektedir (Oskay, 2009).

Günümüze kadar yapısal olarak farklı çoğu biyoaktif ve fungal metabolit izole edilip karakterize edilmiştir. Ve bunlar bazı değerli ilaçların geliştirilmesinde ve pestisitlere karşı kullanılmak için geliştirilmişlerdir (Dreyfus and Chapela, 1994; Strobel and Daisy, 2003).

Metabolit üreten fungusların büyük çoğunluğunu *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* ve *Fusarium* türleri oluşturmaktadır. (Schulz et al, 2002).

Fungal sekonder metabolitler genellikle düzenleyici, kimyasal haberci veya antibiyotik olarak işlev görmektedirler. Çoğunun geniş antitümör aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Fungal kökenli sekonder metabolitlerden bazıları şunlardır; Alfa sarcin, gliotoksin, trichodimerol, L-lizin alfa oksidaz, fumagillin, declauxin, chrysanthones (Dreyfus and Chapela, 1994).

Poliketid Metabolitleri; Aflatoksinler (*Aspergillus* sp.), Patulin (*Penicillium* sp.), Orsellik asit, Statinler, Fumonisin

Aromatik Bileşikler; genellikle *Fusarium* türlerinden elde edilir (Vining, 1990).

2.3. Serbest Radikaller

Oksijen insan yaşamı için çok gerekli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock, 1998).

Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar, 1996).

Serbest radikaller, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup, bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler (Hurst et al., 1997; Jornot et al., 1998; Mills et al., 1998). Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan nokta ile gösterilir (Akkuş, 1995).

Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için

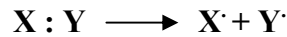
radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Serbest radikaller kanser ve kalp hastalığı gibi kronik hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (Mourente, 1999).

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Cross, 1987).

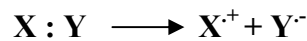
Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (Sitokrom P450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır.

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar.

1.Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya *homolitik kırılma* denir ve bu durumda her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.

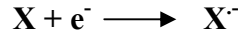


2.Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır ve iyonlar meydana gelir.



3.Normal bir moleküle elektron transferi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle, bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron taşır hale

gelirse, bu indirgenme radikal oluşumuna neden olur (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000; Kılınç ve Kılınç, 2002; Altan ve ark., 2006).



2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif Oksijen Türleri (ROS) sadece oksijen radikallerini (O_2^- , RO_2^\bullet , RO^\bullet ve OH^\bullet) değil, H_2O_2 , $ONOO^-$, $HOCl$ ve nonradikal ozonu (O_3) da içine alan bilim adamları tarafından sıklıkla kullanılan ortak bir terimdir. Reaktivite göreceli bir terimdir. Ne süperoksit ne de hidrojen peroksit, özellikle sulu solüsyonlarda reaktif değildir. Bundan dolayı, bazı yazarlar reaktif terimi yerine “*oksidan türler*” terimini kullanır. Diğer ortak kullanılan terim ise “*oksidanlar*”dır. Bununla birlikte O_2^- ve H_2O_2 sulu solüsyonlarda redüktan ve oksidan olarak aktivasyon gösterir (Reznick et al., 1998).

Serbest oksijen radikali biyokimyasında kilit rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallere iyonları ve hidroksil radikalleridir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonucusu meydana gelir. Radikal tanımına göre oksijen *diradikal* yapıya sahip bir moleküldür. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar (Akkuş, 1995).

Oksijen bulunan bir ortamda, oksijenin metabolize edildiği aerobik canlılarda daima radikal üretimi gerçekleşir. Hücresel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları çizelge 2.1’de görülmektedir (Dündar ve Aslan, 2000).

Çizelge 2.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri (Dündar ve Aslan, 2000)

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H^{\bullet}	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH^{\bullet}	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2^{\bullet}	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif etkili
Perhidroksi radikal	HO_2^{\bullet}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO^{\bullet}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl_3	CCl_4 metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS^{\bullet}	Sülfürlü ve paylaşılmamış elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO^{\bullet}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO^{\bullet}	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

2.4.1. Serbest radikallerin kaynakları

Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir.

a) Biyolojik kaynaklar

- Aktive olmuş fagositler
- Antineoplastik ajanlar: nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler : alkol ve uyuşturucu maddeler
- Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.

b) İntrasellüler kaynaklar

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu
- Enzimler ve proteinler : ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- Mitokondrial elektron transportu
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b5)
- peroksizomlar : oksidazlar, flavoproteinler
- plazma membranı : lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu
- oksidatif stres yapıcı durumlar : iskemi, travma, intoksikasyon (Özkan ve Fıışkın, 2004).

2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadırlar. Serbest radikaller nötralize edilmedikleri takdirde; hücre membran proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleustaki genetik kodu içinde taşıyan nükleik aside (DNA) etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla vücut birçok savunma mekanizması geliştirmiştir. Bunlar “*antioksidan savunma sistemleri*” veya kısaca “*antioksidanlar*” olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler (Akkuş, 1995).

Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler (Akkuş, 1995).

Doğal (Endojen) Antioksidanlar

a- Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon peroksidaz

- Glutasyon-S-transferaz
- Hidroperoksidaz

b- Enzim olmayanlar

- i- lipid fazda bulunanlar; α - tokoferol (E-vitamini), β -karoten
- ii- sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar); askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktofenin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon.

Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)

- Ksantin oksidaz inhibitörleri,
- NADPH Oksidaz inhibitörleri,
- Rekombinant Süperoksit Dismutaz,
- Trolox-C
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Haris, 1992);

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- a. Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırıcı etki,
- b. Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- c. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a. Süpürücü (*scavenging*) etki: ROS'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme olayına denir. (Ör: Enzimler.)

b. Bastırıcı (*quencher*) etki: ROS'leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma veya inaktif şekle dönüştürme olayına denir. (Ör: Flavinoidler, vitaminler).

c. Onarıcı (*repair*) etki

2.5.1. Antioksidan Aktiviteden Sorumlu Doğal Bileşikler

√ Polifenoller

Fenoller, hidroksil gruplarından dolayı radikal giderme yeteneğine sahip, oldukça önemli bileşenlerdir. Fenolik bileşikler serbest radikallerin nötralizasyonuna yol açıp hidrojen peroksidin verdiği zararlardan insan hücrelerini koruyarak önemli bir rol üstlenirler (Fidan ve ark., 2008).

Kahkonen ve ark. (1999) yaptıkları araştırmada, antioksidanların hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterdiklerini ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere döndürerek oluşan antioksidan radikalinin, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki paylaşılmamış elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olduğunu ve bu nedenle antioksidan moleküllerin yapılarında genellikle fenolik fonksiyon taşıdıklarını belirtmişlerdir (Başer, 2002).

Fenolik asit ve esterlerinin antioksidan aktivitesi moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ile orantılı olarak artmaktadır (Balasundram et al., 2006).

Antioksidan aktivitelerini, hidrojen atomlarını vererek, hidroksil, singlet oksijen, peroksil, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak göstermektedirler (Halliwell, 2002).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteyle ilişkilendirildiği ve lipit peroksidasyonunda önemli bir rol oynadığı, meyve ve sebzelerde zengince bulunan polifenolik bileşiklerin günlük bir gramın üzerinde alındığında gen mutasyonu ve kanser hücrelerinin oluşumu üzerine inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Eryiğit, 2006).

Polifenolik bileşikler yaygın olarak kullanılan sekonder metabolitlerden biridir. Kaynak olarak bitkiler, mantarlar ve filamentli funguslardan elde edilirler. Çok çeşitli biyolojik aktiviteleri arasında antioksidan özellik içeren anti inflamatuvar, antitümör, antimutajenik, antikarsinojenik, antibakteriyal ve kardiyovasküler koruyucu etkileri sayılabilir (Miller et al., 1995).

√ **Flavonoidler**

Flavonoidler ve diğer polifenoller canlılarda ROS'ların geniş bir kısmını temizleyerek çok güçlü bir antioksidan aktivite gösterirler. Bitkilerdeki antioksidan etkiden sorumlu maddeler flavonoidlerdir. Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan, sarı renkli, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propan (C6-C3-C6) yapısındaki fenolik bileşikler olup vitamin benzeri maddelerdir. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; damarları genişletici, vücut direncini arttırıcı, alerjiyi önleyici, östrojenik ve virüslere karşı koruyucu etkileri de söz konusudur (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008; Arzani et al., 2007).

2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemleri-Antioksidan Enzimler

Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte (bir gen-bir enzim) ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, iyon tepkimesi (pH) ve basınç koşulları bulunmaktadır (Arosio et al., 2000).

Günümüzde enzimler kimya, ilaç ve gıda endüstrisinde, boya, dericilik ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tarım, tıp, veterinerlik ve tekstil endüstrisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Özellikle enzimatik savunma sistemleri; reaktif oksijen türevleri, reaktif nitrojen türevleri ve onların ara ürünlerini ortadan kaldırma, nötralize etme ya da süpürme yeteneğine sahip molekülleri içerir (Mruk et al., 2002).

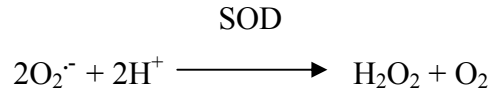
En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT) dır. Antioksidan enzimler koordineli bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere çevirirler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez (Arosio et al., 2000).

Sentetik antioksidanlardan BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) ve TBHQ (tertiary butylhydroquinone) genellikle yiyecek endüstrisinde gıda katkı maddesi olarak sıkça kullanılırlar ve kullanım amacı lipid

peroksidasyonun engellenmesidir. Ancak bunların kullanımı, degradasyon esnasında toksik ve kanserojen bileşenlerin oluşması nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle daha sağlıklı, daha etkili ve ekonomik olan doğal antioksidanların kullanımı tercih edilmektedir (Mathew and Abraham, 2006).

√ Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan Süperoksit dismutaz enzimi, toksik ve reaktif olan süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder. Hidrojen iyonu kullanır ve oksijen üretir. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defanstır.



Üç tür Süperoksit Dismutaz vardır:

1. Mitokondride lokalize Mn-SOD
2. Sitozolda lokalize Cu-Zn SOD
3. Bakır içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir.

Cu/Zn SOD öncelikle ökaryotların sitozolünde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde bulunur, Mn-SOD ökaryotlar ve prokaryotların mitokondrisinde ve Fe-SOD da prokaryotlarda bulunur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dur (Mruk et al, 2002).

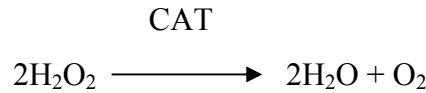
Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de cereyan eder. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş olmaktadır.

Süperoksit dismutaz enzimi varlığında ise pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Memişoğulları, 2005).

Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku O₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (Akkuş, 1995).

√ **Katalaz (KAT)**

Katalaz, molekül ağırlığı 24000 olan ve aktif merkezinde 4 tane ferrihem grubu bulunduran bir enzimdir. Aerobik hücrelerin çoğunda katalaz enzimi bulunur. Görevi; hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır (Akkuş, 1995).



Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim, bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil, hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine ise etki etmez (Karabulut ve Özerol, 2002).

Katalaz, kataliz görevini iki farklı yoldan gerçekleştirir:

- 1) H₂O₂'nin parçalanması (katalitik reaksiyon)
- 2) Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidik reaksiyon) (Mavelli et al., 1984).

Katalaz kofaktör olarak demire ihtiyaç duyar ve aktivitesi oksidatif kas fibrillerinde en yüksektir (Deaton et al., 2003).

Katalaz ve glutatyon peroksidaz primer enzimatik savunma sistemleridir. Katalaz; kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfuzyon hasarı, artrit, norodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir (Yılmaz ve Ozan, 2003).

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerleri

*Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Ticari besiyeri kullanılmıştır (Fluka). 1 L distile suda 50 g besiyeri çözdürülerek 15 dk 1,1 atm basınçta 121 °C’de otoklavlanmıştır.

*MY10-12- (%10 glukoz-%12) NaCl Malt Ekstrakt Yeast Agar

Malt Ekstrakt	20g
Pepton.....	1g
Glukoz.....	100g
Yeast Ekstrakt.....	5g
Agar	20g
Distile Su.....	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak otoklavlanmadan kaynar su içerisinde 100°C’de 30 dk süre bekletilerek hazırlanmıştır (Gunde-Cimerman et al., 2000).

*MY50G- (%50 Glukoz) Malt Ekstrakt Yeast Agar

Malt Ekstrakt	20g
Pepton.....	1g
Glukoz.....	100g
Yeast Ekstrakt.....	5g
Agar	20g
Distile Su.....	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak glukoz hariç otoklavlanmıştır. Glukoz çözeltisi ayrıca hazırlanıp kaynar su içerisinde 30 dk süre bekletildikten sonra otoklavdan çıkmış olan besiyerine ilave edilmiştir (Gunde-Cimerman et al., 2000).

***%10 NaCl Malt Ekstrakt Agar**

Malt Ekstrakt	20g
Pepton.....	1g
Glukoz.....	20g
Agar	20g
NaCl.....	100g
Distile Su.....	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

***%17 NaCl Malt Ekstrakt Agar**

Malt Ekstrakt	20g
Pepton.....	1g
Glukoz.....	20g
Agar	20g
NaCl.....	170g
Distile Su.....	1 L

Besiyeri bileşenlerinden tuz ayrı olarak çözelti halinde hazırlanmış ve pH 6,5 a ayarlanıp otoklavlanmıştır. Besiyerine otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

***%24 NaCl Malt Ekstrakt Agar**

Malt Ekstrakt	20g
Pepton.....	1g
Glukoz.....	20g
Agar	20g
NaCl.....	240g
Distile Su.....	1 L

Besiyeri bileşenlerinden tuz ayrı olarak çözelti halinde hazırlanmış ve pH 6,5 a ayarlanıp otoklavlanmıştır. Besiyerine otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

***Antiradikal aktivite için özel besiyeri**

Sükroz (Amresco-3073B45).....	3g
Yeast (LabM-MC1).....	0,1g
Polypepton (Fluka-77199).....	0,1g
K ₂ HPO ₄ (Merck-105104).....	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya-39636).....	0,05g
KCl (Merck-4936).....	0,05g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck-1.0965).....	0,001g
Distile su.....	100 ml

Besiyeri bileşenleri tartılarak 121 °C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır (Arora and Chandra, 2010).

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

* **Kimyasal Maddeler;** Gallik Asit (Acros-410825000), Folin Ciocalteu reaktifi (Sigma-F9252), Metanol (Riedel-de Haen-24229), Sodyum karbonat (Sigma-Aldrich-S2127), Etil asetat (Merck-1.00868), BHT (butillenmiş hidroksitoluol), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Triton X-100 (Sigma-T8787), Na₂CO₃ (Merck-106.404),

*****DPPH Çözeltisi;** 0,005g DPPH tartılarak 200 ml metanolde çözülürerek taze hazırlanmıştır.

*****Folin Ciocalteu Çözeltisi;** 1 ml Folin Ciocalteu 9 ml distile suda çözülürerek taze hazırlanmıştır (0,02 mg/ml konsantrasyonda).

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- * Soğuk Blok - Magna Lyser
- * Yeşil Seramik Boncuklar - Magna Lyser
- * Mikroplaka Okuyucu- Biotek XS
- * Homojenizatör - Magna Lyser (Roche)
- * Santrifüj - Mikro 120 (Hettich)
- * Spektrofotometre – Cecil (Aqua Quest)
- * Terazi – Sartorius ve Scaltec
- * Otoklav – Hirayama
- * Sterilizatör – Memmert
- * İTK plakları - 20×20cm silica gel (25 TLC aluminium sheets) - Merck

3.2. Metod

3.2.1. Araştırma Bölgesinin Özellikleri

Tuz Gölü; 38° 45' Kuzey, 33° 24' Doğu coğrafik konumda bulunmaktadır. İç Anadolu Bölgesi'nde Ankara, Konya ve Aksaray illerinin sınırının kesiştiği yerde yer alır. Yüzölçümü bakımından Türkiye'nin ikinci büyük ve en sığ gölüdür. Türkiye'nin tuz ihtiyacının %40' ı bu gölden sağlanır. Deniz seviyesinden 905 metre yüksekte ve maksimum ölçüleri kuzeyden güneye 80, doğudan batıya ise 60 kilometredir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tuz Gölü'nün konumu ve örnekleme istasyonları

Yağış alanı 11.900 km² olan Tuz Gölü, dışarıya akıntısı olmayan kapalı bir havza gölüdür. Koçhisar Gölü olarak da bilinir. Yağış alanının genişliğine rağmen beslenme kaynakları zayıftır. Göle su getiren akarsular, yazın suları iyice azalan ya da tamamen kuruyan derelerdir. Bunlar Şereflikoçhisar'dan gelen Peçenek Çayı,

Aksaray'dan gelen Melendiz Çayı, güneyden ve batıdan gelen İnsuyu, Karasu, Kırkdelik çaylarıdır. Gölün ortalama su seviyesi 40 cm civarında, yağışın arttığı mayıs ayında ise yaklaşık 110 cm'dir. Kimyasal bileşim itibariyle burada mutfak tuzu (sodyum klorür) karakterinde bir tuzluluk hakimdir ve sodyum klorür oranı, magnezyum klorür ve sodyum sülfat oranlarından yüksektir.

3.2.2. Örnek alınması ve Fungus İzolasyonu

Tuz gölü ve çevresinde belirtilen 4 farklı istasyondan (Şekil 3.1) su örnekleri alınmıştır. Mikrofungus izolasyonu membran filtrasyon yöntemi ile yapılmıştır.

Su örnekleri en kısa sürede işleme alınmıştır. Her bir örnekten 50 ml alınarak 0,45 µm çaplı steril nitroseluloz membran filtreden (Millipore) aseptik şartlarda geçirilmiştir. Filtreler %10 glukoz-%12 NaCl agar (MY10-12), %50 glukoz Malt Ekstrakt yeast ekstrakt agar (MY50G) ve %17, 24 ve 30 oranlarında NaCl içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) olmak üzere 5 farklı besiyerine yerleştirildikten sonra petriyerler 25-27°C de 60 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca petriyerler izolasyon için takip edilmiştir (Gunde-Cimerman et. al., 2000).

%10 glukoz-%12 NaCl agar (MY10-12), %50 glukoz Malt Ekstrakt yeast ekstrakt agar (MY50G) da gelişen funguslar, %17 NaCl içeren MEA besiyerlerine inoküle edilmiş ve burada gelişebilen koloniler MEA'a aktarılmıştır. %17 ve %10 oranında tuz konsantrasyonuna sahip olan MEA besiyerinde gelişebilen funguslar MEA da kültüre alınıp 27°C' de 14 gün inkübasyona bırakılmış ve +4°C de saklanmıştır. Gerektiğinde aktiflenerek kullanılmışlardır.

3.2.3. Fungus İdentifikasyonu

İzolasyon aşamasında elde edilen fungus izolatları öncelikle genus düzeyinde "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" den yararlanılarak belirlenmiştir (Barnett and Hunter, 1999). Daha sonra her genusa ait türler aşağıda belirtilen kaynaklar doğrultusunda tanımlanmıştır.

İzolatların teşhisinde *Penicillium* türleri için “A Manual of The *Penicillium*” (Raper and Thom, 1949) ve “The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*” (Pitt, 1979); *Aspergillus* türleri için “The Genus *Aspergillus*” (Raper and Fennell, 1965) ve “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich, 2002) adlı eserler esas alınmıştır.

Aspergillus ve *Penicillium* dışındaki Moniliaceae familyasına ait diğer türler ile Dematiaceae familyasına ait türlerin teşhisi için “A Manual of Soil Fungi” (Gilman, 1957), “Dematiaceous Hyphomycetes” (Ellis, 1971) eserleri kullanılmıştır.

Yukarıda söz edilen kaynaklara dayalı identifikasyon işlemi ağırlıklı olarak stereomikroskop ve ışık mikroskobu ile inceleme gerektirmektedir. Mikrofungusların mikroskobik incelemesi “Lacto-cotton blue mounting” çözeltisinde hazırlanan preparatlarla yapılmıştır (Sime et al., 2002).

3.2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu kolorimetrik metodu kullanılarak yapılmıştır (Folin and Ciocalteu, 1928).

Her bir örnek için renkli şişelere

- 100 µl fungus filtratı
- 500 µl Folin Ciocalteu çözeltisi (%10'luk)
- 1500 µl Na₂CO₃ (%20'lik sulu)

konularak 2 saat karanlıkta bekletilmiştir. Sonuçlar UV spektrofotometre de 750 nm dalga boyunda okunarak standart olarak kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiğine göre hesaplanmıştır.

3.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi

Fungus filtratları 1:1 oranında metanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra örnekler İTK plakları (Merck 20×20cm Silica Gel) üzerinde metanol-etil asetat (9:1) çözücü sisteminde yürütülerek UV altında muhtemel bileşen veya bileşen grupları belirlenmiştir. UV altında belirlendikten sonra % 0,2'lik metanolde hazırlanan DPPH' çözeltisi püskürtülerek 15 dakika sonra mordan sarıya dönüşen spotlar antioksidan aktivite gösteren bileşen veya bileşen grubu olarak değerlendirilmiştir (Wagner et al., 1984)

3.2.6. Serbest Radikal Süpürücü Etki

Bu yöntemde, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin indirgenmesi spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahipse metanolik DPPH çözeltisinin rengini o kadar çok açması beklenir. DPPH' radikalinin 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde, antioksidan aktivitenin varlığı belirlenir (Kartal, 2002).

Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kısa zamanda sonuç vermesinin yanı sıra çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmediğinden de tercih edilmektedir (Molynex, 2004; Sanchez-Moreno et al., 1998; Çakır ve ark., 2003).

Filtratların serbest radikal süpürücü aktiviteleri Sanchez-Moreno ve ark.'nın (1998) modifiye edilmiş metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde kullanılmak üzere funguslar, 50 ml lik erlenlerdeki 30 ml sıvı besiyerine ekilmiştir. 7 gün boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Arora and Chandra, 2010). 7 günün sonunda fungusların misel kısımları sıvı besi yerinden Whatman No:1 kağıdı kullanılarak süzölmüştür.

Elde edilen filtratların Serbest Radikal Süpürücü Etkileri incelenmiştir. 0,005 g DPPH, 250 ml metanolde çözülerek taze hazırlanmıştır. Koyu renkli şişelere her örnek için sırasıyla 50 µl, 100 µl, 200 µl filtrat konulmuştur. Her şişeye 3 ml DPPH çözeltisi eklenerek 20 sn vorteksle karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek 517 nm’de absorbans değerleri kaydedilmiştir. % Antioksidan İndeksi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

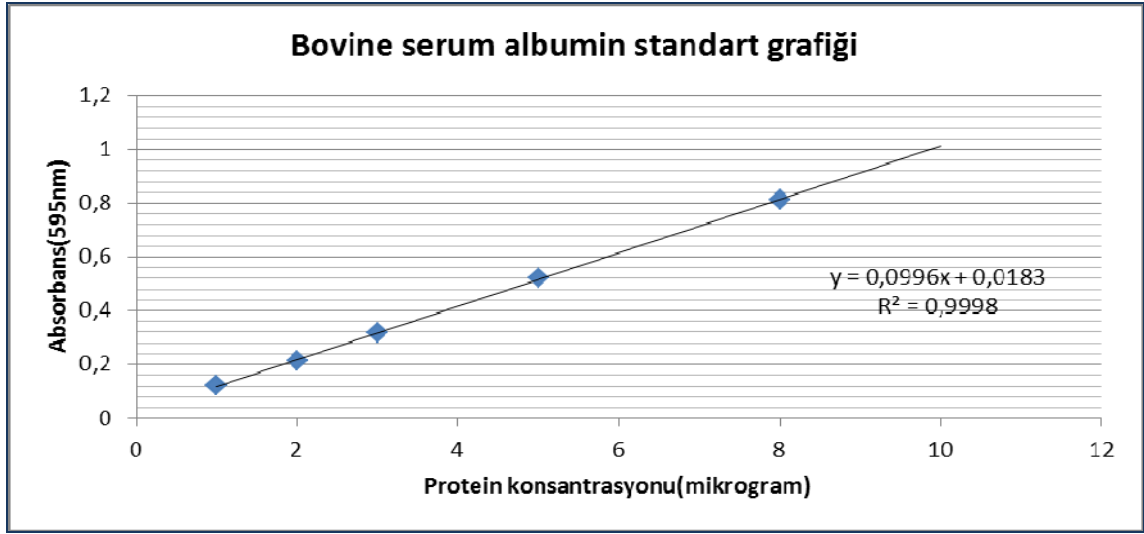
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

Her örnek 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı şekilde çalışılmıştır. Referans madde olarak sentetik antioksidanlardan BHT (Bütillenmiş hidroksitoluol)’nin sonuçları ile karşılaştırılmış ve radikal süpürücü etki sonuçlarına göre ortalamayı temsil edecek 20 fungal izolat diğer testler için seçilmiştir (Arora and Chandra, 2010).

3.2.7. Antioksidan Enzimlerin Tayini

Toplam fenolik madde sonuçlarından ortalamayı temsil eden 20 adet fungus örneği antioksidan enzim taramasına tabi tutulmuştur. Enzimlerden SOD ‘Cell Biolabs’ adlı markanın STA-340 nolu reaksiyon kitiyle, KAT ‘Cayman’ adlı markanın 707002 nolu reaksiyon kitiyle çalışılmıştır.

SOD ve Katalaz spesifik enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için bovine serum albuminden 1mg/mL olacak şekilde Şekil 3.2 de belirtilen değerlere göre standart çözelti hazırlandı. Bundan 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mikrolitre alınarak seri dilüsyonlar hazırlandı. Bradford reaktifiyle 30 dk bekletilerek 595 nm de okundu. Elde edilen sonuçlara göre çizilen grafik Şekil: 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Bovine serum albümin standart grafiği

√ SOD (Süperoksit Dismutaz)

SOD enziminin tayininde Cell Biolabs markalı (katalog no: STA-340) reaksiyon kiti kullanılmıştır. Kit prospektüsünde yazan metoda göre çalışma solüsyonları hazırlanıp, uygun koşullarda saklandı ve 2 tekrarlı çalışılarak sonuçlar 490 nm’de UV spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar kit içersinde yer alan pozitif kontrol ile karşılaştırmıştır.

◆ **SOD Standardının Hazırlanması;** + 4 C de çözünen SOD standartı 1:4 oranında, 1 x SOD test Bufferı ile dilüe edilmiştir. Daha sonra 96 lık plakaya 10 µl transfer edilmiştir. Çizelge 3.1 deki gibi ana karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. SOD Standart solüsyonunun hazırlanması

Bileşen	Kuyucuk başına düşen hacim
Ksantin Solüsyonu	5 µl
Kromojen Solüsyonu	5 µl
10x SOD test buffer	10 µl
Deiyonize su	60 µl
TOPLAM	80 µl

Her bir kuyucuğa yukarıdaki 80 µl ana karışım eklenmiştir.

◆ **Test Prosedürü;** Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SOD Test Prosedürü

Bileşen	Boş	Örnek
SOD Örneği	0 µl	X µl
Ksantin Solüsyon	5 µl	Y µl
Kromojen Solüsyonu	5 µl	5 µl
10x SOD Test Bufferı	10 µl	5 µl
Deiyonize su	70 µl	70-(X-Y) µl
TOPLAM	90 µl	90 µl

Sonuçta, her bir kuyucuğa 10 µl ön dilüe olan 1x ksantin oksidaz solüsyonu eklenmiş ve karıştırılmıştır. 1 saat 37 C’de inkübe edilmiştir. Sonuçlar 490 nm de okunmuştur.

$$\text{SOD Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{(\text{Kör Absorbans} - \text{Örnek Absorbans})}{\text{Örnek Absorbans}} \times 100$$

√ **KAT (Katalaz)**

Katalaz enziminin tayininde Cayman marka (katalog no: 707002) reaksiyon kiti kullanılmıştır. Kit prospektüsünde yazan metoda göre çalışma solüsyonları hazırlanıp, uygun koşullarda saklanmış ve 2 tekrarlı çalışılarak sonuçlar 540 nm’de UV spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar kit içerisinde yer alan pozitif kontrolle karşılaştırılmıştır.

1. Test Buffer (x10) (1 ml + 9 ml distile su); Örnek Buffer (x10) (1 ml + 9 ml distile su) hazırlanmıştır.

2. Katalaz kontrolü inaktive olmaması için çalışma sırasında hazırlanmıştır. Katalaz kontrolü ilk önce 50 µl alınmıştır. Alınan örneklerin üzerine dilüe edilmiş örnek bufferdan 950 µl ilave edilmiştir.

Test Prosedürü;

96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl örnek buffer (dilüe), 30 µl metanol, 20 µl örnek ve 20 µl H₂O₂ eklenerek reaksiyonun başlatılması sağlanmıştır. Reaksiyon başladığı zaman mümkün olduğu kadar hassas ve çabuk bir şekilde H₂O₂ eklenmiştir. 20 dk oda sıcaklığında inkübatörde inkübe edilmiştir.

Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyucuğa 30 µl potasyum hidroksit eklenmiştir ve sonra her kuyucuğa purpold (kromojen) ilave edilmiştir.

Plakanın kapağı kapatıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 10 µl potasyum periyodat eklenmiş ve 5 dk daha oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda sonuçlar 540 nm absorbansta okunmuştur.

$$\text{Katalaz Aktivitesi} = \frac{\text{Örnek } (\mu\text{M})}{20 \text{ min}} \times \text{Örnek Dilüsyonu}$$

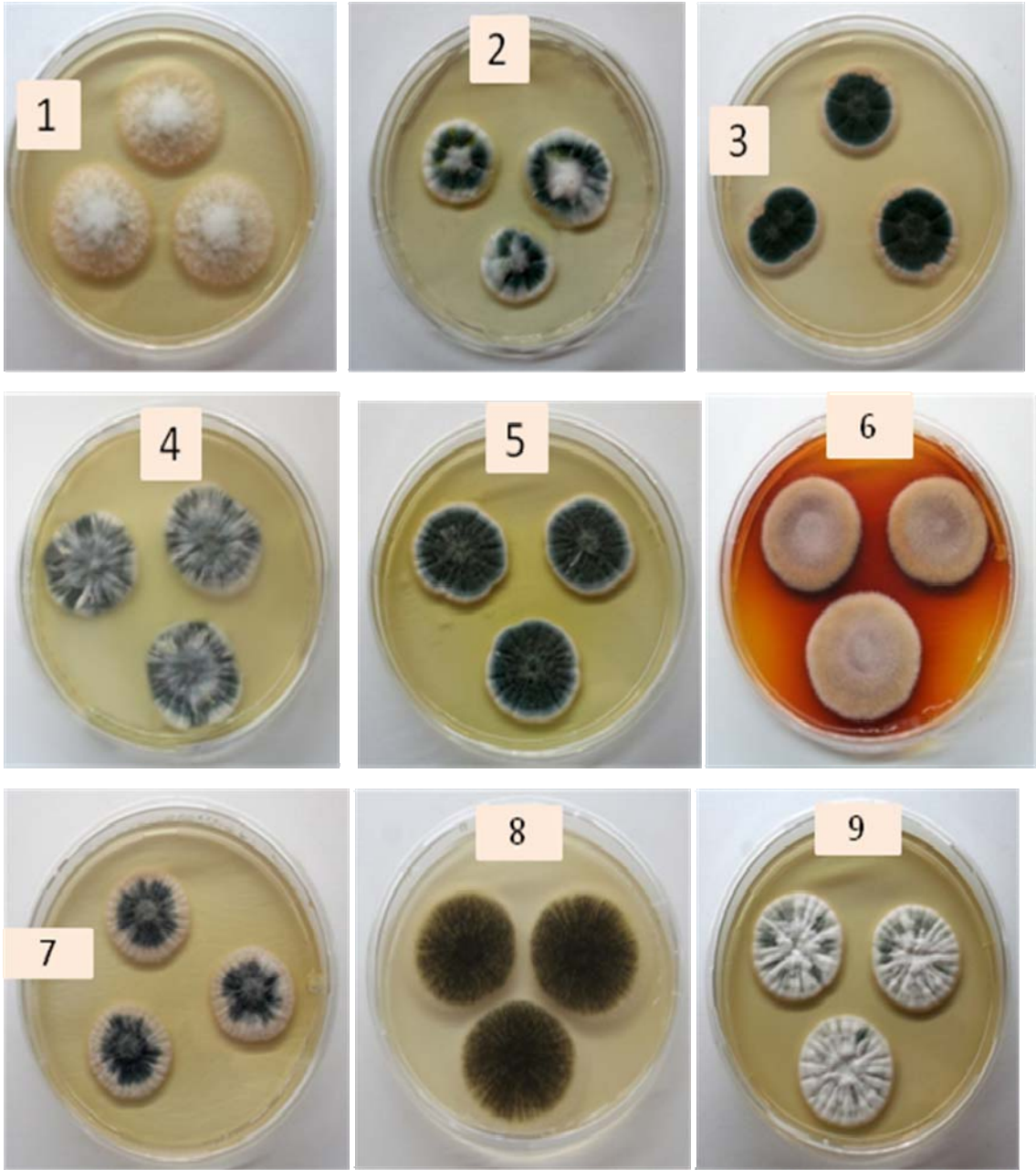
4. BULGULAR

4.1. Tuz Gölünden İzole Edilen Funguslar

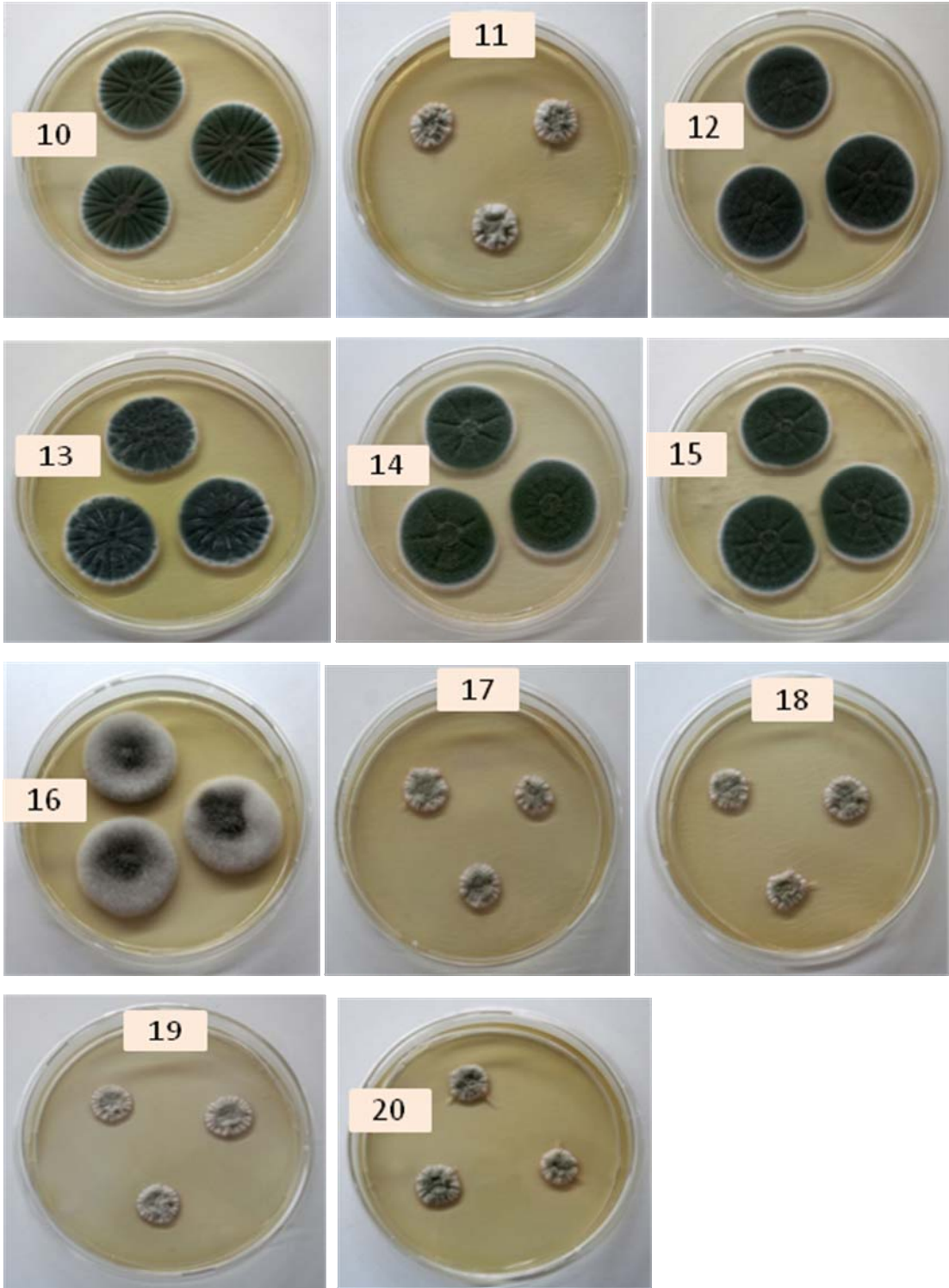
İzolasyon çalışması sonunda 50 mikrofungus izolatu elde edilmiş ve saflaştırarak muhafaza edilmiştir. İzolatların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarına göre yapılan eleme sonucunda 20 izolat seçilmiştir. İzolat listesi Çizelge 4.1’de ve bu izolatların MEA besiyerindeki 7 günlük görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tayin edilen fungus izolatları

<u>İzolat No</u>	<u>Cins vada Tür</u>	<u>İzolat No</u>	<u>Cins vada Tür</u>
1	<i>Aspergillus terreus</i>	11	<i>Penicillium sp.6</i>
2	<i>Penicillium sp.1</i>	12	<i>Penicillium chrysogenum</i>
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	13	<i>Penicillium sp.3</i>
4	<i>Penicillium sp.2</i>	14	<i>Penicillium chrysogenum</i>
5	<i>Penicillium sp.3</i>	15	<i>Penicillium chrysogenum</i>
6	<i>Penicillium sp.4</i>	16	<i>Alternaria alternata</i>
7	<i>Penicillium sp.2</i>	17	<i>Penicillium sp.6</i>
8	<i>Aspergillus niger</i>	18	<i>Penicillium sp.6</i>
9	<i>Penicillium sp.5</i>	19	<i>Penicillium sp.6</i>
10	<i>Penicillium chrysogenum</i>	20	<i>Penicillium sp.6</i>



Şekil 4.1. Tuz Gölünden izole edilen fungusların MEA besiyerindeki 7 günlük görüntüleri



Şekil 4.1. Tuz Gölünden izole edilen fungusların MEA besiyerindeki 7 günlük görüntüleri (devam)

4.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Sonuçları

Belirlenen 20 fungus filtratının, toplam fenolik madde miktarları gallik aside eşdeğer olarak (mg GA/g) olarak hesaplanmıştır. Filtratların toplam fenolik madde miktarları çizelge 4.2 de verilmiştir. (Çizelge 4.2; Şekil 4.2)

Çizelge 4.2. Seçilen fungus filtratlarının gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarı

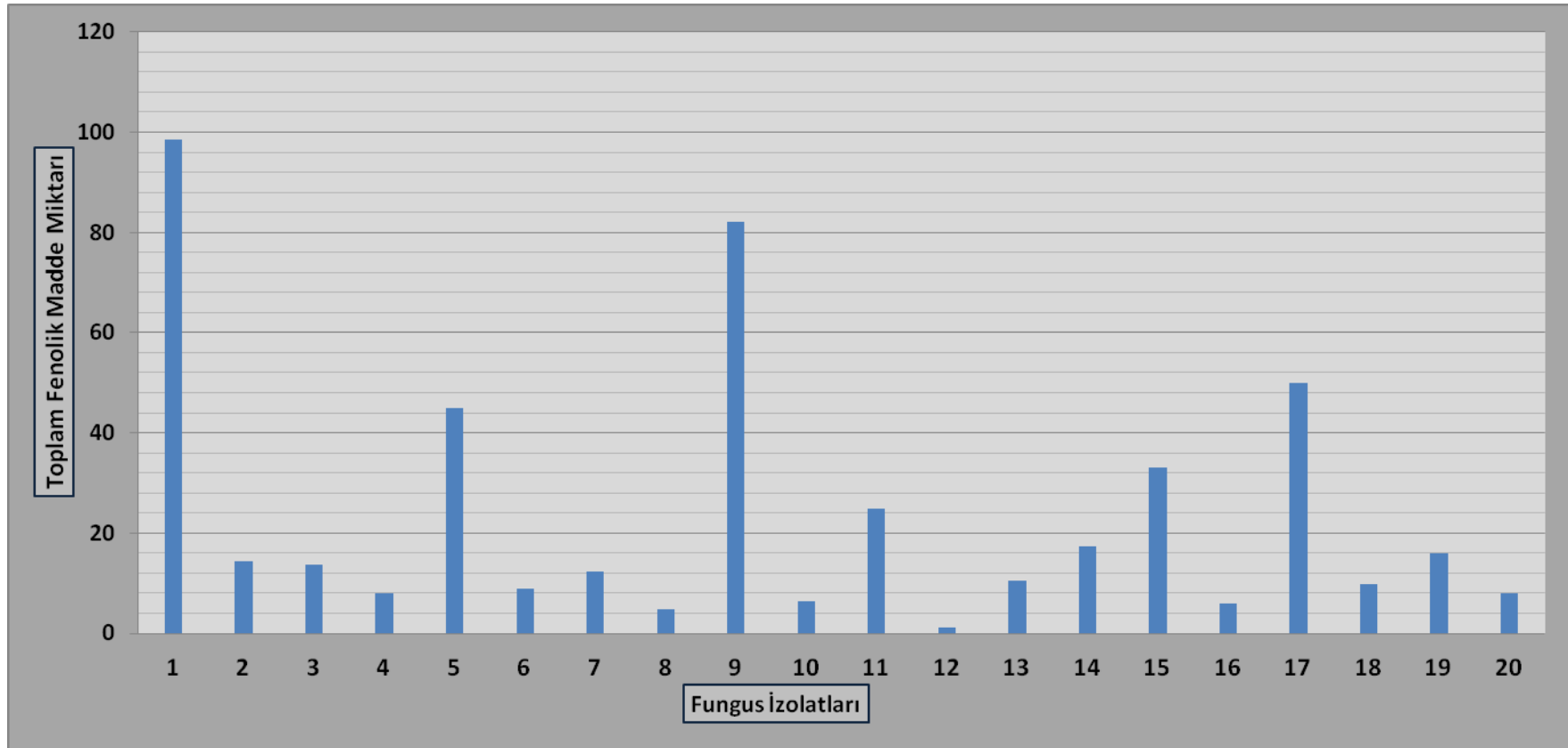
(Sonuçlar mg/g \pm standart sapma, gallik aside eşdeğer)

<u>İzolat No</u>	<u>Fungus</u>	Toplam Fenol Madde Miktarı (mg GA/g \pm standart sapma)
1	<i><u>Aspergillus terreus</u></i>	98 \pm 1,83
2	<i><u>Penicillium sp.1</u></i>	14 \pm 0,26
3	<i><u>Penicillium chrysognum</u></i>	14 \pm 0,97
4	<i><u>Penicillium sp.2</u></i>	8 \pm 0,12
5	<i><u>Penicillium sp.3</u></i>	45 \pm 0,61
6	<i><u>Penicillium sp.4</u></i>	9 \pm 0,19
7	<i><u>Penicillium sp.2</u></i>	12 \pm 0,28
8	<i><u>Aspergillus niger</u></i>	5 \pm 0,23
9	<i><u>Penicillium sp.5</u></i>	82 \pm 0,26
10	<i><u>Penicillium chrysognum</u></i>	6 \pm 0,19
11	<i><u>Penicillium sp.6</u></i>	24 \pm 0,17
12	<i><u>Penicillium chrysognum</u></i>	1 \pm 0,16
13	<i><u>Penicillium sp.3</u></i>	11 \pm 0,19
14	<i><u>Penicillium chrysognum</u></i>	17 \pm 0,03
15	<i><u>Penicillium chrysognum</u></i>	33 \pm 0,03
16	<i><u>Alternaria alternata</u></i>	6 \pm 0,01
17	<i><u>Penicillium sp.6</u></i>	50 \pm 0,02
18	<i><u>Penicillium sp.6</u></i>	10 \pm 0,04
19	<i><u>Penicillium sp.6</u></i>	16 \pm 0,06
20	<i><u>Penicillium sp.6</u></i>	8 \pm 0,02

Fungus filtratlarında incelenen toplam fenolik madde miktarı izolat numaralarına göre;

1 > 9 > 17 > 5 > 15 > 11 > 14 > 19 > 2 = 3 > 7 > 13 > 6 > 4 = 20 > 10 = 16 > 8 > 12
şeklindedir.

Toplam fenolik madde miktarı en yüksek fungus; *Aspergillus terreus* iken bunu iki *Penicillium* sp. izolatı izlemiştir. İncelenen funguslar arasında en düşük toplam fenolik madde miktarı içeren izolat ise; *Penicillium chrysogenum* olarak belirlenmiştir.

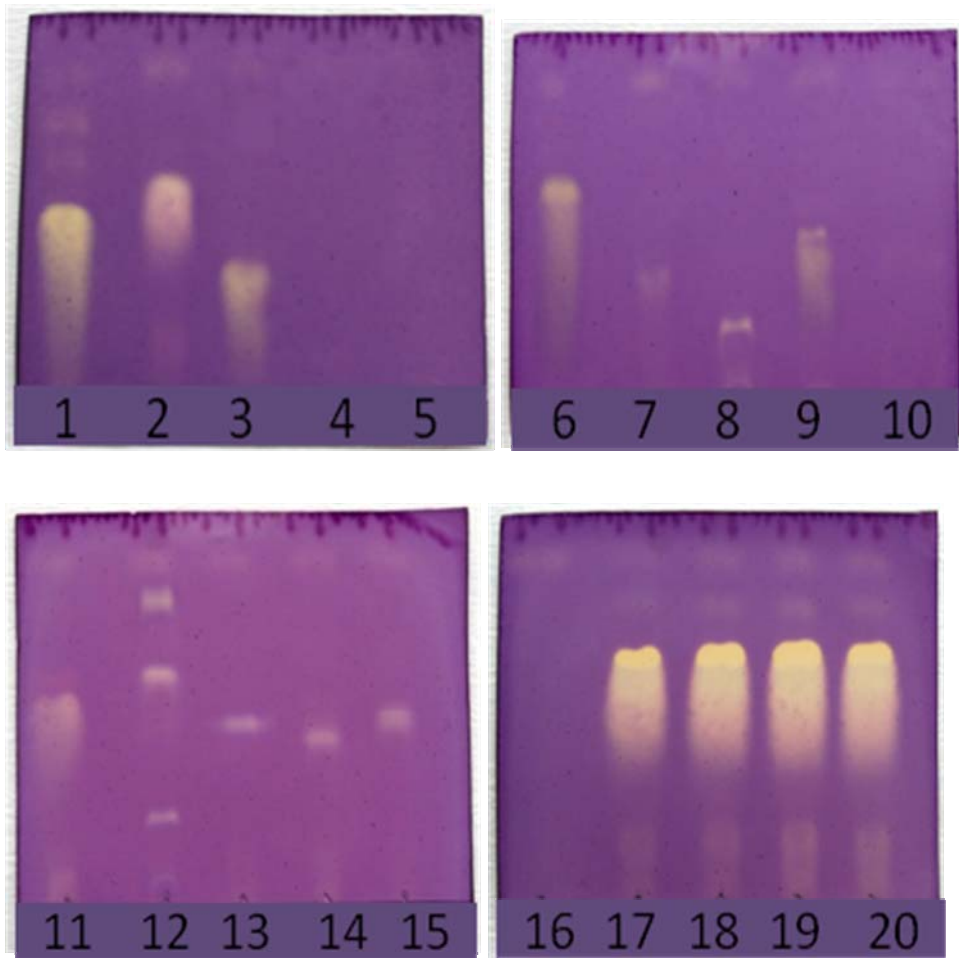


Şekil 4.2. 20 adet fungus filtratının gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarları

(GA/g \pm standart sapma)

4.3. İTK Sonuçları

Antioksidan aktiviteden sorumlu muhtemel bileşen veya bileşen grupları doğrudan İTK tabakaları üzerinde belirlenmiştir. Mordan sarıya dönüşen spotlar antioksidan aktivite gösteren bileşen veya bileşen grubu olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 20 adet fungus filtratına ait DPPH çözeltisi püskürtülmüş İTK plakları

4.4. Serbest radikal süpürücü etki tayini sonuçları

İzole edilen 20 adet fungusta DPPH kararlı radikalinin antioksidan maddeler varlığında davranışı incelenmiş olup, deney bölüm 3.2.3 te belirtilen yolla yapılmıştır. Çalışılan fungus izolatlarının radikal süpürücü etkinliğinin ölçütü olarak derişimlere karşı % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve standart antioksidan BHT'nin değerleriyle karşılaştırılmıştır. Denenen konsantrasyonlar arasında tüm örneklerin en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyon 200 µl olarak belirlenmiştir.

Tayin edilen 20 adet fungusun serbest radikal süpürücü aktiviteleri DPPH serbest radikali üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar 3 farklı konsantrasyonda BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4).

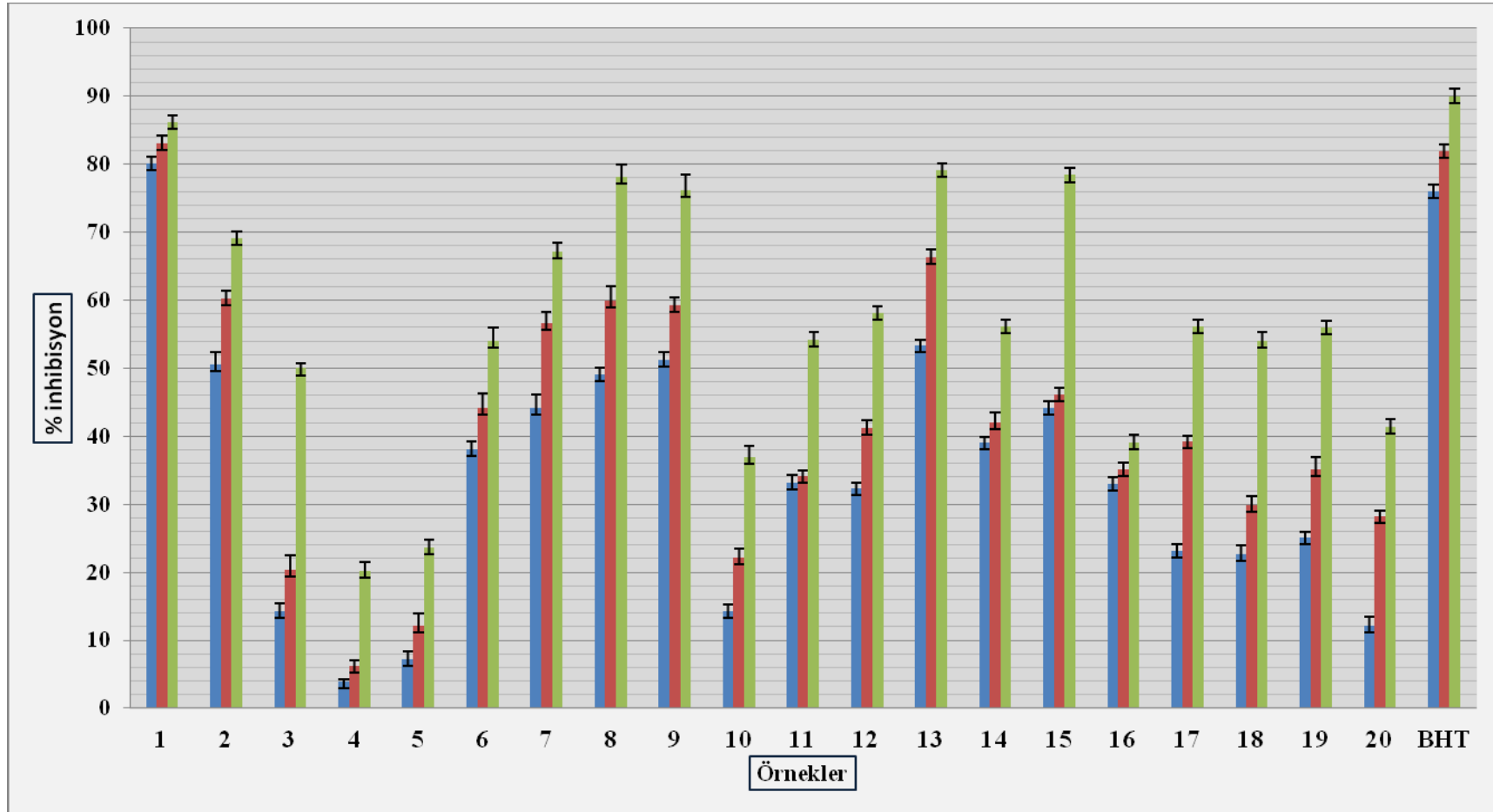
$9,6 \times 10^{-4}$ mg/mL'de en düşük aktivite gösteren fungus filtratı; *Penicillium sp.2* (%4) ve *Penicillium sp.3* (%7) olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite gösteren fungus filtratı ise; *Aspergillus terreus* (%80) olarak belirlenmiştir.

$1,8 \times 10^{-3}$ mg/mL'de en düşük aktivite gösteren fungus filtratı; *Penicillium sp.2* (%6) olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite gösteren fungus filtratı ise; *Aspergillus terreus* (%83) olarak belirlenmiştir.

$3,6 \times 10^{-3}$ mg/mL'de en düşük aktivite gösteren fungus filtratı; *Penicillium sp.2* (%20) olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite gösteren fungus filtratı ise; *Aspergillus terreus* (%86) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. 20 adet fungus filtratının % inhibisyon ortalamaları (Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma (n:3) olarak verilmiştir.)

Fungus	% İnhibisyon		
	9.6×10^{-4} mg/mL	1.8×10^{-3} mg/mL	3.6×10^{-3} mg/mL
<i>Aspergillus terreus</i>	80,1 \pm 0,95	83,1 \pm 1,05	86,2 \pm 0,91
<i>Penicillium sp.1</i>	50,5 \pm 1,9	60,2 \pm 1,16	69,1 \pm 1,0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	14,3 \pm 1,13	20,4 \pm 2,1	50 \pm 0,8
<i>Penicillium sp.2</i>	4 \pm 0,3	6,2 \pm 0,83	20,2 \pm 1,22
<i>Penicillium sp.3</i>	7,2 \pm 1,11	12,2 \pm 1,81	23,6 \pm 1,12
<i>Penicillium sp.4</i>	38,1 \pm 1,05	44,1 \pm 2,15	54 \pm 2
<i>Penicillium sp.2</i>	44,2 \pm 1,86	56,7 \pm 1,56	67,2 \pm 1,26
<i>Aspergillus niger</i>	49,1 \pm 0,95	60 \pm 2	78,2 \pm 1,81
<i>Penicillium sp.5</i>	51,3 \pm 1,13	59,2 \pm 1,22	76,2 \pm 2,31
<i>Penicillium chrysogenum</i>	14,3 \pm 0,94	22,2 \pm 1,3	37 \pm 1,6
<i>Penicillium sp.6</i>	33,2 \pm 1,11	34,2 \pm 0,77	54,2 \pm 1,12
<i>Penicillium chrysogenum</i>	32,3 \pm 0,88	41,2 \pm 1,22	58,1 \pm 1,05
<i>Penicillium sp.3</i>	53,3 \pm 0,88	66,3 \pm 1,13	79,1 \pm 0,95
<i>Penicillium chrysogenum</i>	39 \pm 0,9	42 \pm 1,5	56,2 \pm 0,91
<i>Penicillium chrysogenum</i>	44,2 \pm 1,02	46,1 \pm 0,96	78,4 \pm 1,11
<i>Alternaria alternata</i>	33 \pm 1	35,1 \pm 1,05	39,1 \pm 1,05
<i>Penicillium sp.6</i>	23,1 \pm 1,05	39,2 \pm 0,83	56,1 \pm 1,05
<i>Penicillium sp.6</i>	22,6 \pm 1,4	29,9 \pm 1,21	54 \pm 1,26
<i>Penicillium sp.6</i>	25,1 \pm 0,77	35,2 \pm 1,81	56 \pm 1
<i>Penicillium sp.6</i>	12,2 \pm 1,26	28,2 \pm 0,83	41,4 \pm 1,05
BHT	76 \pm 1,03	82 \pm 0,91	90 \pm 1,1



Şekil 4.4. Çalışılan fungus filtratlarının 3 farklı konsantrasyonda ($3,6 \times 10^{-3}$, $1,8 \times 10^{-4}$, $9,4 \times 10^{-4}$ mg/mL) serbest radikal süpürücü etkileri

4.5. SOD ve Katalaz için Spesifik Enzim Aktivitesi Sonuçları

20 adet fungus izolatında antioksidan enzimlerden SOD ve KAT aktivitelerine bakıldığında kontrole göre; 2, 3, 10, 13, 14, 15, 16 ve 17 numaralı fungus izolatları SOD enzimi aktivitesi göstermediği halde; 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19 ve 20 numaralı fungus izolatlarında SOD enzimi aktivitesi yüksek değerlerde ölçülmüştür.

KAT aktivitesinde ise; 2, 3, 7, 12 numaralı fungus izolatları katalaz aktivitesi göstermediği halde; 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20 numaralı fungus izolatları yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. SOD ve KAT enzimlerinin sonuçları (U/mg protein)

İzolat No	Fungus	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)
1	<i>Aspergillus terreus</i>	70,5	121
2	<i>Penicillium sp.1</i>	14,9	15,6
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	27,2	17,3
4	<i>Penicillium sp.2</i>	108	28,3
5	<i>Penicillium sp.3</i>	48	33
6	<i>Penicillium sp.4</i>	49	61,1
7	<i>Penicillium sp.2</i>	40,4	12,1
8	<i>Aspergillus niger</i>	70,3	36,8
9	<i>Penicillium sp.5</i>	123	31,2
10	<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1	24
11	<i>Penicillium sp.6</i>	50	30,6
12	<i>Penicillium chrysogenum</i>	83	17,3
13	<i>Penicillium sp.3</i>	6,1	76,8
14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	31,6	21,1
15	<i>Penicillium chrysogenum</i>	27,7	23,3
16	<i>Alternaria alternata</i>	25,6	62,5
17	<i>Penicillium sp.6</i>	37	23
18	<i>Penicillium sp.6</i>	78	32,1
19	<i>Penicillium sp.6</i>	70,9	47,5
20	<i>Penicillium sp.6</i>	71,7	98,6
SOD Kontrol		39	
Katalaz Kontrol			20,7

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İç Anadolu Bölgesinde yer alan Tuz Gölü yüksek oranda tuz içeriğinden dolayı ekstrem bir çevredir ve tuzu seven ya da tuza hoşgörülü olan organizmaları barındırır. Bu nedenle halofilik ya da halotolerant olarak nitelendirilecek mikrofungusların izolasyonu için Tuz Gölü suyu seçilmiştir. İzolasyonda membran filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Sularda bulunan mikrofunguslara ait propagül (spor, hif parçası vs) sayısı topraktakinden çok daha az orandadır. Bu da sulardan mikrofungus izolasyonunda büyük hacimlerde suyun kullanılmasını gerektirir. Aseptik koşullarda filtrasyon işlemi sonucunda filtre kağıdı üzerinde toplanan propagüllerin gelişerek koloni oluşturmasını sağlamak üzere çeşitli besiyerleri kullanılmıştır. Tuz oranının da bu tip fungusların gelişiminde önemli olduğu dikkate alınarak %12, ve 17 tuz içeren MEA besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca osmofilik özellikteki mikrofungusların gelişimi için %50 glukoz içeren MY50G besiyeri de izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Gunde et al, 2000).

İzolasyonun ilk aşamasında 50 fungal izolat elde edilmiştir. Bu izolatların filtratları toplam fenolik madde miktarı açısından değerlendirilmiştir. Fenoller, hidroksil gruplarından dolayı radikal giderme yeteneğine sahip, oldukça önemli bileşenlerdir. (Fidan ve ark., 2008). Kahkonen ve ark. (1999) yaptıkları araştırmada, antioksidanların hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterdiklerini ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürerek oluşan antioksidan radikalinin, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki paylaşılmamış elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olduğunu ve bu nedenle antioksidan moleküllerin yapılarında genellikle fenolik fonksiyon taşıdıklarını belirtmişlerdir (Başer, 2002).

Son yıllarda yeni antioksidan maddelerin keşfi için çok farklı çalışmalar yapılmıştır. Hindistan'nın Encab bölgesinin çeşitli yerlerinden izole edilen toprak funguslarının yaklaşık % 45'inin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında bu tezdeki besiyerinde kullanılan sükrozun ve sodyum nitratın varlığında funguslarda en yüksek antioksidan aktivite saptanmıştır (Arora and Chandra, 2010).

Yapılan çalışmada klasik identifikasyon yöntemiyle tanımlanan mikrofunguslar; *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait türlerdir. Literatüre göre tuzlu ortamlardan izole edilen mikrofunguslar çoğunlukla; *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Acremonium* ve *Fusarium* cinslerine ait türleridir (Kreiner et al., 2002). Fungusların çok geniş bir kısmı antioksidan madde üretir. Bunların arasında en önemlileri; *Penicillium roquefortii* (Hayashi et al., 1995), *Aspergillus candidus* (Yen and Lee, 1996), *Mortierella sp.* (Hirota et al., 1997), *Emericella falconensis* (Takahashi et al., 2000) ve *Acremonium* genusudur (Yen and Lee, 1996). Antitümör ajanlar, antibiyotikler, immunosupresantların yanında antioksidanlarda sekonder metabolit olarak değerlendirilmektedir. Funguslardaki antioksidan savunma sistemleri, bakteri ve mayalara oranla daha az çalışılmıştır (Kreiner et al., 2002).

Toplam fenolik madde miktarına göre yapılan eleme sonucunda 20 fungal izolat seçilmiştir. Bunlar *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Penicillium chrysogenum* (5 izolat) ve *Penicillium* spp (12 izolat) den oluşmaktadır. Toplam fenolik madde içeriğine göre *A. terreus* (98 mg GA/g), *Penicillium* sp 5 (82 mg GA/g), *Penicillium* sp 6 (50 mg GA/g), *Penicillium* sp 3 (45 mg GA/g) ve *P. chrysogenum* (33 mg GA/g) yüksek aktivite göstermiştir.

DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki açısından ise; *A. terreus* (%86), *Penicillium* sp 3 (%79), *A. niger* (%78), *P. chrysogenum* (%78), *Penicillium* sp 5 (%76), *Penicillium* sp 1 (%69) ve *Penicillium* sp 2 (%67) kayda değer aktivite göstermişlerdir. Toplam fenolik madde miktarı ve DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki sonuçları incelendiğinde; *Aspergillus terreus* (1), *Penicillium* sp.5 (9) ve *Penicillium chrysogenum* (15) türlerinin her iki deneyde de yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. *Aspergillus candidus* MTCC 2202'un broth filtratlarında yapılan bir çalışmada ise antioksidan aktivite (DPPH ile) ve sıçanlardaki ödemlere bakılarak anti-inflamatuar aktivite çalışılmıştır. Çeşitli *A. candidus* broth filtrat ekstratlarındaki toplam fenolik madde içeriği ile radikal süpürücü etkileri arasında belirli bir korelasyonun olduğu gözlenmiştir (Malpure, 2006). Bu korelasyon çalışmamızda da dikkati çekmektedir.

Süperoksit dismutaz, spesifik enzim aktivitesi 20 adet fungustan 12 tanesinde (izolat numaraları sırasıyla; 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19 ve 20) yüksek aktivite gösterirken, spesifik katalaz aktivitesi 16 tanesinde (1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20) yüksek değerlerde ölçülmüştür.

SOD ve KAT sonuçlarına göre *A.terreus* (1), *Penicillium sp.2* (4), *Penicillium sp.3* (5), *Penicillium sp.4* (6), *A.niger* (8), *Penicillium sp.5* (9) ve *Penicillium sp.6* (11) türlerinin her iki enzim deneyinde yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Toplam fenolik madde miktarı, DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki, SOD ve KAT sonuçları birlikte değerlendirildiğinde *A. terreus* (1) ve *Penicillium sp.5* (9) türlerinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır. Antioksidan madde üreten funguslara ilişkin literatürler incelendiğinde önde gelen cins ve türlerin *Penicillium roquefortii* (Hayashi et al., 1995), *Aspergillus candidus* (Yen and Lee, 1996), *Mortierella sp.* (Hirota et al., 1997), *Emericella falconensis* (Takahashi et al., 2000) ve *Acremonium* cinsi türler olduğu dikkati çeker (Yen and Lee, 1996).

Aspergillus candidus (CCRC 31543)'un broth filtratlarındaki antioksidan bileşenleri ve onların antioksidatif özelliklerinin güvenilirliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise 3 ana bileşik izole edilmiştir (3,3'-dihydroxyterphenyllin, 3-hydroxyterphenyllin ve candidusin B). Bu 3 bileşiğin peroksidasyon inhibisyonu %95 oranında tokoferolden daha yüksektir. Fakat BHA ise eşit olarak 12,5-200 Ig/ml olarak yüksek bulunmuştur. Güvenlik açısından yapılan çalışmalar sonucunda bu 3 bileşiğin insan bağırsak hücrelerinde 407 (µM 407) ne sitotoksik ve genotoksik aktivitesinin olduğu ne de *Salmonella typhimurium* TA98 VE TA100 a karşı mutajenik etkisi olduğu saptanmamıştır (Yen et al., 2001).

Reaktif oksijen türleri (ROS), fungusların metabolik aktiviteleri sonucunda oluşurlar. Funguslardaki ROS'ların, mekanik hasar, ışık, açlık ve diğer organizmalarla etkileşimi gibi çeşitli stres koşullarında üretimleri artmaktadır. Fungal organizmanın gelişimi süresince ROS'ların düzenlenme seviyesinin çok önemli olduğu bilinmektedir (Gessler et al., 2007).

Reaktif oksijen moleküllerini toksik olmayan moleküller haline getiren antioksidan enzimler üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Bulgaristan'nın Livingston adasının çeşitli yerlerinden 18 toprak örneğinden 109 filamentli fungus izole edilmiştir. 30 türde aerobik organizmalardaki oksidatif strese savunma amaçlı üretilen ve reaktif oksijen moleküllerini toksik olmayan moleküller haline getiren antioksidan enzimlerden katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri 15 C'de daha aktif bulunmuştur. (Tosi et al., 2010). Diğer bir çalışmada ise *Fusarium* türlerinde, antioksidan enzim aktivitesine bağlı olarak membranlardaki lipit peroksidasyon ve toplam sialik asit (TSA) seviyelerine bakılmış; SOD, KAT), Glutatyon peroksidaz (GSHPx) enzimleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Kayali ve Tarhan, 2005). Diğer bir çalışmada ise, yeni bir fungal katalaz bulunmuş olup, karakterizasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır (Lartillot et al, 1988).

Sonuç olarak, tuzlu çevrelerde yaşayan mikrofunguslardan ağırlıklı olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait bazı türler diğerlerine göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermişlerdir. Bunlardan biri olan *A. terreus* uygulanan üç farklı test sonucuna göre oldukça yüksek aktivite göstermiştir.

Bu nedenle yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar funguslar gibi doğal kaynaklardaki yeni antioksidan maddelerin belirlenmesi, ileride yapılacak çalışmalara ışık tutarak kimyasal yapı analizlerinin yapılması ve yeni moleküllerin keşfedilmesine yol açması bakımından önem taşımakta ve bu çalışmalara bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguilar, A., Ingemansson, T., and Magnien, E., 1998, Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union, *Extremophiles*, 2, 367-373.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 123 s.
- Altan, N., Düncel, A., Koca, C., 2006, Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem)*, 31 (2), 51–56.
- Arda, M., 2000, Temel Mikrobiyoloji, IX. Bölüm, Medisan Yayın Seri:45, 92 s.
- Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L. M. P., 2000, *Pharmacol & Toxicol.* 87, 229-233.
- Arora, D. S., and Chandra, P., 2010, Assay of Antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 765-777.
- Arzani, A., Zeinali, H., Razmjoo, K., 2007, Iron and Magnesium Concentrations of Mint Accessions (*Mentha* spp.) *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 323–329.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic Compounds in Plant and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses, *Food Chem.*, 99, 191-203.
- Başer, K. H. C., 2002, Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasotikler, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29–31 Mayıs 2002, Özet Kitabı. Eskişehir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bayşu S. N., ve Bayşu, N., 2008, *Biyokimya, Güneş Tıp Kitapevleri*, 1. Baskı. Ankara.
- Buchan, A., Newell, S. Y., Butler, M., Biers, E. J., Hollibaugh, J. T. and Moran, M. A., 2003, Dynamics of bacteria and fungal communities on decaying Salt Marsh Grass, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 11, 6676-6687.
- Barnett H. and Hunter B., 1999, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi (P. 218)*, St. Paul: APS.
- Cakir, A., Mavi, A., Yıdırım, A., Duru, M.E., Harmandar, M., and Kazaz, C., 2003, Isolation and Characterization of Antioxidant Phenolic Compounds from the Aerial Parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation, *J. Ethnopharm.*, 87, 73-83.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E.T., 1987, *Ann Intern Med.* 107, 526-545.
- Çolakoğlu, G., 1999, *Tohumuz Bitkiler Sistematiği (Bacteriophyta, Cyanophyta, Phycophyta, Mycophyta, Lichenes)* , Marmara Üniv. Yay. No. 648, Fen-Edebiyat Fak. Yay. No. 37.
- Da Costa, M. S., Duarte, J. C., Williams, R. A. D., 1989, *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*, Elsevier Applied Science, London and New York.
- Deacon, J. W., 2005, *Fungal Biology*. Blackwell Publishing Professional; 4 Edition, ISBN: 1405130660. 372 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demir, G., Özcan, H. K., Elmaslar, E., Borat, M., 2004, Decolorization of Azo Dyes by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Fresenius Environmental Bulletin*, (Vol. 13) (No. 10) 979-984.
- Demirjian, D. C., Francisco, M. V., Constance, S. C., 2001, Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144-151.
- Deaton C. M. and Marlin D. J., 2003, Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, Vol 2, No 3, 278-291.
- Diplock, A., 1998, Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, Belgium, 59 p.
- Dreyfuss, M. M. and I. H. Chapela, 1994, Potential of fungi in the Discovery of Novel, Low Molecular Weight Pharmaceuticals. In: *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. Gullo, V.P. (Ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, MA., pp: 49-80.
- Dündar, Y., ve Aslan, R., 2000, Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*, 29, 95-101.
- Ellis M., 1971, *Dematiaceous Hyphomycetes*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Links.
- Eryiğit, F., 2006, *Mentha Pulegium L. ve Salvia Tomentosa Miller Bitkilerinin Metanol Özütlerinin In Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fidan F. A., 2007, Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu İle Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Fidan, F. A., Enginar, H., Ciğerci, I. H., Korcan, S. E., Özdemir, A., 2008, The Radioprotective Potential of Spinacia Oleracea and Aesculuc Hippocastanum Against Ionizing Radiation with Their Antioxidant and Antimicrobial Properties, Journal of Animal and Veterinary Advances. 7 (12), 1528–1536.
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., Belozerskaya, T. A., 2007, Reactive oxygen species in regulation of fungal development, Biochemistry Biokhimiia Volume: 72, Issue: 10, Pages: 1091-1109.
- Grishkan, I., Nevo, E., Wasser, P., 2004, Micromycetes from the Saline Arubotaim Cave: Mount Sedom, The Dead Sea Southwestern Shore, Israel. J Arid Environments, Vol. 157, Issue 4, 431-443.
- Gilman, J., 1957, A Manual of Soil Fungi, Ames (Iowa, USA: The Iowa State University Press).
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, G. S. Plemenitas, A., 2000, Hypersaline water in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts, Fems Microbiology Ecology 32: 235–240.
- Gücin, F., ve Tamer Ü., 1994, Mikolojiye Giriş, Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Ders Notları No:1, Bursa.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haki, G. D., and Rakshit, S. K., 2003, Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology* 89: 17–34.
- Halliwell, B., 2002, Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo, *Handbook of Antioxidants*, 2nd Ed., Ed. by Cadenas, E. and Packer, L., University of Southern California School of Pharmacy, USA.
- Harris, E. D., 1992, Regulation of Antioxidant Enzymes, *Faseb Jour*, 6, 2675– 2683.
- Hayashi, K, I., Suzuki, K., Kawaguchi, M., Nakajima, T., Suzuki, T., Numata, M., Nakamura, R., 1995, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 319.
- Hirota A, Morimitsu Y, Hojo H, 1997, New antioxidative indophenol- reducing phenol compounds isolated from the *Moretiarella* sp. fungus. *Biochi Biotechnol Biochem* 61(6), 247-650.
- Horikoshi, K., and Grant, W. D., 1998, *Extremophiles*, 93-133.
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervi, B., Williamson, G., 1997, Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2, *Biochem. Soc. Trans.*, 25, S559.
- Jornot, L., Petersen, H., Junod, A. F., 1998, Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions, *Biochem J*, 335, 85-94.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., 1999, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954-3962.

Karabacak, C., 2007, Bazı *Scutellaria Orientalis* Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karabulut, A., Özerol, E., 2002, Yaş ve Sigara İçiminin Eritrosit Katalaz Aktivitesi ve Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(2), 85–88.

Kartal, N., 2002, Farklı işlemlerle izole edilen bitki özütlerinin antioksidan özelliği ve Kromatografik analizleri, Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kayali, H., A, Tarhan, L., 2005, Functions of Antioxidant Enzyme Activities on the Membrane Bound Total Sialic Acid and Lipid Peroxidation Level in *F. Equiseti* and *F. Acuminatum*, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.*, 33(3), 319-328.

Kawasaki, L., and Aguirre, J., 2001, Multiple catalase genes are regulated in *Aspergillus nidulans*, *J. Bacteriol.*, 183, 1434-1440.

Kılınç K., Kılınç A., 2002, Oksijen Toksisitesinin aracı molekülleri olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 33(2), 110–118.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Klich M., 2002, Identification of Common *Aspergillus* Species. 122 Pp, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Kushner, D. J., 1978, Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In Kushner D.J. (ed): *Microbial Life in Extreme Environments*, London: Academic Press, 87-103.

Kushner, D.J., 1993, Growth and nutrition of halophilic bacteria in Vreeland Hachstein L (eds): *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: FL CRC Press, 87-103.

Kreiner, M., Harvey, L. M., Mcneil, B., 2002, Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition, *Enzyme Microb. Tech.*, 30,346-353.

Lartillot, S., Kedziora, P., Athias, A., 1988, Purification and Characterization of a New Fungal Catalase, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 1532-2297, Volume 18, Issue 3, Pages 241 – 246.

Leuschner, C. and Antranikian, G., 1995, Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 95-114.

Madigan, M. T. and Mairs, B. L., 1997, Extremophiles. *Scientific American*, 276(4), 66-71.

Mandeel, Q.A., 2002, Microfungal community associated with rhizosphere of *Zygophyllum qatarense* in arid habitats of Bahrain. 50, 665-681.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marchelli, R., and Vining, L. C., 1975, Terphenyllin, a novel p-terphenyl metabolite from *Aspergillus candidus*, *J Antibiotics* 28(4), 328-331.
- Margesin, R., and Schinner, F., 2001, Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, *Extremophiles* 5, 73-83.
- Marshall, C., 1997, Cold-adapted enzymes, *Trends in Biotechnology*, 15, 359-364.
- Mathew, S., Abraham, T.E., 2006, Studies on the antioxidant activities of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models, *Food Chem.*, 94, 520-528.
- Memişoğulları, R., 2005, Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 3, 30–39.
- Mills, E. M., Takeda, K. Y., 1998, *Biol Chem*, 273, 22165-8.
- Miller, M. J., Diplock, A. T., Rice-Evans, C.A., 1995, Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1794-1801.
- Mourente, G., and Diaz-Salvago, E., 1999, Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) crustacea, decapoda, *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 124, 405-416
- Molynex, P., 2004, The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Monaghan, J. J., 1990, Flows in the Modern Laplacian Theory, Preprint.
- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Meng-yun, Mo., Cheng, C.Y., 2002, Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility, *Contraception*, 65, 305-311.
- Müftüoğlu, M., 2003, DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem)*, 28 (1), 20–24.
- Nawar, W. W., 1996, *Lipids in Food Chemistry*, O.R. Marcel Dekker, New York, Fennema (Ed), 225-319.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Köhler, M., Antranikian, G., 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 711-729.
- Nogurira, M. A., Diaz, G., Andriali, W., Faiconi, A. F., Stangarlin, S. R., 2006, Secondary metabolism from *Diplodia maydis* and *Sclerotium rolfsi* with antibiotic activity. *Braz. J. Microbiol.*, 37, 14-16.
- Oğul, Y. T., 2006, Romatoid Artritli hastalarda Antioksidan tablo ve Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Oskay, M., ve Tamer, A., 2009, Streptomyces kökenli Antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını, *Journal of New World Science Academy*, 2009, 4, 48-60.
- Öner, M., 1986, Genel Mikrobiyoloji, Bölüm 3, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 56-98.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ören, A., 1999, Bioenergetic aspects of halophilism, *Microbiol. Mol. Biol. Review.*

Özkan A., ve Fışkın K., 2004, Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidan enzimler, *Turkish J. Hematol. Oncol.*, No 1, Vol. 14.

Pitt J., 1979, *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces.* 634 Pp, London etc.

Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., 2002, Cellular Responses to Environmental Salinity in the Halophilic Black Yeast *Hortaea Werneckii*, *Mol Microbiol*, 45, 665-672.

Raper K. and Thom C., A., 1949, *Manual of the Penicillia.* 875 Pp, Williams and Wilkins, Baltimore: Maryland, USA.

Raper K. and Fennell D., 1965, *The Genus Aspergillus*, 686 Pp, The Williams and Wilkins Comp. Baltimore, USA.

Reznick, A. Z., Packer, L., Sen, C. K., Holloszy, J. O., Jackson, M. J., 1998, *Oxidative Stres in Skeletal Muscle. Free Radical and Oxidative Damage in Biology and Medicine: (Barry Halliwell).* I. Edition, Birkhauser Publisher. London.

Rossi, M. and Rosa, M. D., 1993, *Extremophiles in biotecnology*, Sixth European Congress on Biotechnology Frieze, 1, 120-121.

Sakac, V., and Sakac, M., 2000, Free Oxygen Radiacals and Kidney Diseases part I. *Med Pregl.* 53(9–10), 463–74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F., 1998, A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Schulz, S. C., Boyle, S. D., Raeger, A., Rommert, K. K., 2002, Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.*, 106: 996-1004.
- Sellek, G. A., and Chaudhuri, J. B., 1999, Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles, *Enzyme and Microbiol. Technology*, 25(6), 471-482.
- Sime A., Abbott L. and Abbott S., 2002, A Mounting Medium for Use in Indoor Air Quality Spore-Trap Analyses, *Mycologia*, 1087-1088.
- Stetter, K. O., 1996, Hyperthermophilic prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 149-158.
- Strobel, G., and B. Daisy, 2003, Bio-perspecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbial.Mol. Biol. Rev.*, 674, 491-502.
- Takahashi, N., Tamagawa, K., Kawai, K. I., Fukui, T., 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23, 989.
- Tosi, S., Kostadinova, N., Krumova, E., Pashova, S., Dishliiska, V., Spassova, B., Vassilev, S., Angelova, M., 2010, Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica, *Polar Biology*, Volume 33, Number 9, 1227-1237.
- Van den Burg, B., 2003, Extremophiles as a source for novel enzymes, 6(5), 213-218.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ventosa, A., 2004, Halophilic Microorganisms, Springer-Verlag, Berlin, Germany 349p.
- Vorgias, C. E., and Antranikian, G., 2000, Glycosyl hydrolases from extremophiles, Glycomicrobiology, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York., 313-340p.
- Vining, L., C, 1990, Functions of secondary metabolites, Annual review of Microbiology, 44,395-427.
- Yagi, R. and Doi, M. 1999, Isolation of an antioxidative substance produced by *aspergillus repens*, Biosci Biochem 63(5), 932-933.
- Yen, G, C., and Lee, C, A., 1996, Antioxidant activity of extracts from molds., J. Food Prot., 59, 1327-1330.
- Yen, G, C., Chang, Y, C., Sheu, F., Chiang, H, C., 2001, Isolation and characterization of antioxidants compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate, J. Agri. Food Chem., 49, 1426-1431.
- Yılmaz, S., ve Ozan, S., 2003, Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi. 28 (4), 252–256.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E. M., 1984, Plant Drog Analysis, Springer-Verlag. 320 p.
- Wiegel, J., 1998, Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. Extremophiles, 2, 257-267.