T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

DENİZ KAYNAKLI *STREPTOMYCES* TÜRLERİNDEN YENİ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Elif COŞKUN

Referans no: 10318589

EDİRNE-2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

DENİZ KAYNAKLI *STREPTOMYCES* TÜRLERİNDEN YENİ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Elif COŞKUN

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK/TÜBAP
Edirne-2022

Tez No:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirdiğim çalışmalarım sırasında destek olan ve yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ ve Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e, bu süreçte hep yanımda olan çok değerli arkadaşım Aslı Esra YALÇIN'a, beni her zaman destekleyen, inanan ve yanımda olan biricik anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim. Tez çalışmama 118Z412 nolu proje ile maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve TÜBAP-2020-105 nolu proje desteği için Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

DENİZEL DOĞAL ÜRÜNLER VE KEŞİF SÜRECİ 3

BİYOAKTİF METABOLİT KAYNAĞI OLARAK DENİZ AKTİNOMİSETLERİ 5

SEKONDER METABOLİTLER 9

ANTİBİYOTİK ÜRETİCİSİ OLARAK *STREPTOMYCES* TÜRLERİ 22

AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI 26

YAPI AÇIKLAMA METODLARI 30

GEREÇ VE YÖNTEMLER 35

BULGULAR 65

TARTIŞMA 73

SONUÇLAR 144

ÖZET 151

SUMMARY 153

KAYNAKLAR 155

TABLOLAR DİZİNİ 176

ŞEKİLLER DİZİNİ 177

ÖZGEÇMİŞ 182

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ala : Alanin

APT : Attached Proton Test

Ara-A : Arabinofuranosiladenin

Ara-C : Arabinofuranosilsitozin

Ara-T : Arabinofuranosiltimin

Ara-U : Arabinofuranosilurasil

ATCC : American Type Culture Collection

BuOH : Bütanol

CFU : Koloni oluşturan birim

CLSI : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

COSY : Korelasyon Spektroskopisi (Correlation Spectroscopy)

C-18 : Karbon-18

DCM : Diklorometan

DKP : Diketopiperazin

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

ESBL : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

EtOAc : Etil asetat

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FDAA : 2,4-dinitro-5-florofenil-1-alaninamid

Gly : Glisin

HeLa : İnsan Rahim ağzı hücre hattı

HETCOR : Heteronükleer korelasyon

HIV : Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

HMBC : Heteronuclear Multi Bond Coherence

HMQC : Heteronükleer çoklu kuantum korelasyon

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HPLC-MS :Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi

HSQC : Heteronükleer tek kuantum korelasyon

HSV : *Herpes simplex* virüs

Ile : İzolösin

IR : Infrared Spektroskopi

ISP : International *Streptomyces* Project

LC : Sıvı Kromatografisi

LC-MS : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

Leu : Lösin

MCF : İnsan meme kanseri hücre hattı

MEF : Mouse embryonic fibroblast

MeOH : Metanol

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton broth

MOPS : 3-[N-morpholino]-propansulfonic acid

MK : Menakinon

MRSA : Metisiline Dirençli *S. aureus*

MS : Kütle Spektrometresi

NCI : Ulusal Kanser Enstitüsü

NFK : Normal faz kromatografi

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spektroscopy

pH : Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi (Power of Hydrogen)

Phe : Fenilalanin

ppm : Milyonda bir birim (parts per million)

Pro : Prolin

RNA : Ribonükleik asid

rpm : Dakikadaki devir sayısı

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

rRNA : Ribozomal ribonükleik asit

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

SLM : Sabouraud Liquid Medium

tRNA : Taşıyıcı ribonükleik asit

TFK : Ters faz kromatografi

TTX : Tetrodotoksin

Trp : Triptofan

Tyr : Tirozin

Val : Valin

VRE : Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*

VZV : *Varicella-zoster* virüs

°C : Santigrad derece

µm : Mikrometre

α : Alfa

β : Beta

GİRİŞ VE AMAÇ

İlaç keşfinde önemli bir rol oynayan doğal ürünler tıp tarihinin temelini oluşturmaktadır. Henüz etkili bir tedavisi bulunamayan pek çok hastalığın tedavisi için doğal ürünler, değerli bir ilaç kaynağıdır. Araştırmalar, insanların 60.000 yıldan beri hastalıkları tedavi etmek için doğal bileşenleri ve bunların yarı-sentetik türevlerini kullandığını kanıtlamaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, dünya nüfusunun neredeyse %65'i birçok rahatsızlığın tedavisi için ilk savunma aracı olarak doğal biyoaktif bileşenleri kullanmaktadır (2).

Doğal ürünler, ilaç keşfi çalışmalarında yeni tanımlanan moleküller için önemli bir kaynak olmaktadır (3). Penisilinin antibiyotik özelliklerinin 1928'de Alexander Fleming tarafından tespit edilmesinden, antibiyotiklerin “altın çağı”na ve yirminci yüzyılın sonlarına kadar, mikrobiyal sekonder metabolitlerden gelen güçlü biyolojik aktivite ve benzeri görülmemiş yapısal çeşitlilik farmasötik keşiflere katkı sağlamıştır. Bununla birlikte 1990’larda, kombinatoriyal kimya ve bilgisayar destekli tasarımda yeni tekniklerin gelişimi ile ilaç keşif stratejileri değişmiştir (4). Öte yandan, mikrobiyal kaynakların ilaç keşif çalışmaları için yeterince araştırılmaması ve muazzam bir biyoçeşitliliğe sahip birçok habitatın henüz örneklendirilmemiş olması araştırmacıları bu alana yönlendirmektedir (5).

Dünya okyanuslarının geniş alanı göz önüne alındığında (dünya yüzeyinin %71’i), ilk başta toprak bakterilerini içeren kapsamlı ilaç keşif çabalarının bu ekosisteme yayılmamış olması şaşırtıcıdır. Bununla birlikte, okyanusun çeşitli habitatlarından örnek almak, özel ekipman ve derin okyanus ortamları söz konusu

olduğunda yeni teknolojilerin geliştirilmesini gerektirir. Toprak bakterilerinin (özellikle aktinomisetler) ilaç keşfi için kullanıldığı dönemde, ilaçla ilgili en önemli bakteri gruplarının okyanusa özgü olmadığı öne sürülmüştür (6). Deniz bakterilerinin varlığı 1950'lerde araştırılmaya başlanmıştır (7). Okyanustaki bakterilerin %1'inden azı geleneksel besleyici agar ortamında koloniler oluşturabilmektedir. Bu zorluktan dolayı okyanus bakterilerinin keşfi ve incelenmesi için bu konuda çalışan araştırmacılar çok az motivasyon bulmakta idi (8).

Okyanusların deniz suyunda ml başına 10^6 ve okyanus dibi çökeltilerinde mL başına 10^9 özgün mikrobiyal bolluklara sahip, oldukça karmaşık bir ortam olduğu bilinmektedir. DNA Dizileme yöntemleri ile deniz mikrobiyal ekolojisi incelendiğinde, bu organizmaların ne kadar karmaşık, benzersiz ve son derece uyumlu oldukları görülmektedir (9). Deniz bakterilerinin biyolojisi anlaşılmaya başlansa da bu organizmaların kimyasal aktiviteleri büyük ölçüde keşfedilmemiştir (10).

Yakın zamana kadar, mikrobiyal kökenli antibiyotiklerin çoğu *Actinomycetales* takımına ait karasal bakterilerden izole edilmiştir. Tüm mikroorganizmalar arasında aktinomisetler şüphesiz en büyük sekonder metabolit üreticileridir (10-12). Şu anda bilinen mikrobiyal metabolitlerin %45'i (~10.000 bileşik) çeşitli *Actinomycetales* takımından izole edilmiştir. Bu bileşiklerin ise %75'i *Streptomyces* türlerine aittir (11).

Bu çalışmanın amacı; Karadeniz sediment örneklerinden (*S. hoynatensis, S. klenkii*) ve İzmir Çamaltı tuzlası sediment örneklerinden izole edilmiş (*S. smyrnaeus*) *Streptomyces* türü aktinomisetlerin optimal büyüme gösterdiği besi yerlerinde fermantasyonunun gerçekleştirilmesi, elde edilen ham ekstrelerin ve fraksiyonlarının (n-hekzan, kloroform, etil asetat ve bütanol) biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, bu mikroorganizmaların ürettiği metabolitlerin izolasyonu, saflaştırılması, yapılarının aydınlatılması ve saf bileşiklerin antiproliferatif ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasıdır. Bu üç organizmanın ürettiği sekonder metabolitlerin izolasyonunda öncelikli hedefimiz biyoaktif yeni bileşiklerin bilim dünyasına kazandırılması olmuştur. Bu nedenle majör bileşiklerin yanı sıra minör bileşiklerin de izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bileşiklerin yapıları 1D (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, APT-NMR) ve 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), UV, IR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik yöntemler ile belirlenmiştir.

GENEL BİLGİLER

DENİZEL DOĞAL ÜRÜNLER VE KEŞİF SÜRECİ

Biyolojik olarak aktif denizel doğal ürünlerin arayışı, 1951 yılında Bergmann ve Feeney araştırmacılarının öncü çalışmaları ile başlamıştır (13,14). Bir Karayip deniz süngeri olan *Tectitethya crypta (Cryptotethya crypta)* üzerinde çalışırken, Spongouridin (Ara-U) ve Spongotimidin (Ara-T) adlı iki arabinozil glikozidi izole etmiş (15) ve bu moleküllerin biyoaktif özelliklere sahip olduğunu karakterize etmişlerdir (13). Spongouridin'in sentetik analoğu olan Vidarabin (Ara-A), daha sonra *Streptomyces antibioticus*'un fermantasyon kültüründen izole edilmiş ve *Herpes simplex virüsü* (HSV) ve *Varicella-zoster virüsü*'ne (VZV) karşı güçlü bir antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Vidarabin 1976 yılında FDA tarafından onaylanmış ve ilk sistemik antiviral ajan olarak tarihe geçmiştir ancak sahip olduğu düşük çözünürlük ve gösterdiği toksisite sebebiyle 1992'de ilacın üretimi durdurulmuştur. Spongotimidin'in ise yarı-sentetik türevi Sitarabin (Ara-C), hematolojik malinitelerin tedavisinde diğer kemoterapi ajanlar ile kombinasyon halinde kullanılan bir pirimidin yapılı antimetabolit ajandır. Akut miyeloid lösemi tedavisinde en sık kullanılan Sitarabin, aynı zamanda akut lenfositik lösemi, kronik miyelojen lösemi, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma için kombine kemoterapi tedavisi için endikedir. Sitarabin'e FDA tarafından 1969 yılında merkezi sinir sistemini etkileyen lösemi ve lenfoma tedavisi ve profilaksisi için onay verilmiştir (16,17).

Biyolojik sistemlerin nükleozid bazını modifiye şeker kısmıyla tanıyacağı

bilindikten sonra kimyagerler, molekülde bulunan pentoz şeker kısımlarını modifiye etmeye yönelmiştir. HIV pozitif hastalarda viremiyi baskılamak için kullanılan ana antiretroviral ilaç olan Zidovudin gibi nükleozid analogları, antitümoral veya antiviral aktivite sergilemesi nedeniyle diğer çeşitli nükleozid analoglarının sentezine yol açmıştır (18). Günümüzde sadece *Tectitethya crypta* gibi süngerler değil, makroalg, mantar, bakteri ve aktinomisetler dahil diğer deniz organizmaları da benzersiz kimyasal yapılara ve pek çok potansiyel biyolojik aktiviteye sahip doğal bileşiklerin araştırılması için kaynak olmaktadır (19).

Endüstriyel kullanıma sahip ilk doğal deniz ürünü Nereistoksin, 1934 yılında deniz halkalı solucanı *Lumbriconereis heteropoda*'dan izole edilmiş, 1962'de toksik etkileri belirlenmiştir (20). Nereistoksin nikotinik asetilkolin reseptörünü bloke ederek etki etmektedir (21). Günümüzde piyasada insektisit olarak satılan Cartap'ın sentezinde prototip olarak kullanılmıştır (22). Cartap oldukça etkili, düşük toksisiteli ve düşük kalıntılı bir pestisit olarak kabul edilmektedir (23,24).

Nereistoksin gibi güçlü toksik etki gösteren denizel doğal ürünlerin çoğu ilaç olarak kullanılmasa da biyokimyasal araçlar olarak büyük önem taşımaktadır (25). Örnek olarak Hawaii tropikal yumuşak mercanı *Palythoa sp*'den izole edilen Palitoksin (26-28) bilinen en zehirli maddelerden biridir, ateşrengi alglerde (*Dinoflagellat*) bulunan analogları Na^+ /K^+ -ATPaz pompasını bloke etmesi nedeniyle tüm memeli hücreleri için çok toksiktir, ancak hücresel iyon taşıma mekanizmalarını incelemek için kullanılabilir (25,29).

Tetrodotoksin (TTX) ve Saksitoksin, midye ve balık gibi birçok deniz organizmasında bulunan ve voltaja bağlı sodyum kanallarının 1. bölgesine bağlanan ve kas ve sinir hücreleri üzerindeki aksiyon potansiyellerinin yayılmasını engelleyen guanidin nörotoksinidir (30,31). İlk olarak *Halichondria okadai* ve *Halichondria melanodocia* süngerlerinden ve çeşitli dinoflagellat türlerinden (32,33) izole edilmiş lipofilik bir polieter olan Okadaik asit ise iyon dengesi, nörotransmisyon ve hücre döngüsü gibi farklı hücresel süreçleri düzenleyen spesifik olarak hücre fosfatazlarını inhibe eden bir tümör promoteridir (34,35). Bu üç toksinin balık, istiridye, deniz tarağı ve midye gibi deniz canlılarında birikmesi ve sonrasında bu canlıların tüketilmesine bağlı birkaç insan zehirlenme vakası görülmüştür (36-38). Yeni keşfedilen denizel bileşiklerde araştırılan en önemli biyoaktivite *in vitro* sitotoksisitedir. Bu nedenle,

kanser hastalığı tedavisini hedefleyen pek çok bileşik halen araştırılmaktadır (39,40).

ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) Gelişimsel Terapötikler Programı; bitkiler, deniz organizmaları, bakteriler ve mantarlardan elde edilmiş yaklaşık 200.000 kadar ekstreden oluşan bir kütüphaneye sahiptir. Yapılan çalışmalarda 13.000'den fazla deniz canlısı örneği incelenmiştir. *İn vitro* tarama programı ile insan tümör hücre hattı deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında; deniz omurgasızlarının kara hayvanları, kara bitkileri ve mikroorganizmalarından yaklaşık dört kat fazla aktiviteye sahip ana ekstre kaynağı olduğunu göstermiştir. Deniz omurgasızları arasında, süngerler en güçlü aktivite spektrumunu sergilerken, onu tulumlar, knidliler ve yosun hayvancıkları izlemiştir (41).

1980'lerde yeni biyoaktif deniz bileşiklerinin çoğu omurgasızlardan izole edilmiştir (40). 1990'lardan itibaren ise *Ascomycota, Actinobacteria, Cyanobacteria* ve *Cnidaria* şubeleriyle araştırma sayısında artış olurken (42-44) *Rhodophyta, Ochrophyta, Echinodermata* ve *Mollusca* şubelerine ait canlılar ile araştırmalarda azalma olmuştur (45).

BİYOAKTİF METABOLİT KAYNAĞI OLARAK DENİZ AKTİNOMİSETLERİ

Dünya yüzeyinin %70'inden fazlasını kaplayan denizler, tüm biyosferin %95'inden fazlasını oluşturan olağanüstü bir biyolojik çeşitlilik içermektedir (46). Mikrobiyal çeşitlilik, inovatif biyoteknoloji için sayısız yeni kimyasal bileşik kaynağıdır (47). Şimdiye kadar denizlerin sadece yüzeyi incelenmiştir. Son tahminler, mikroorganizmaların deniz çökeltilerinde (%0.25) (48) ve özellikle deniz suyunda (%0.001–0.1) (49-51) kültürlenebilirliğinin toprağa (%0.3) (52) kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir. Karasal mikroorganizmalardan (bilinen mikrobiyal bileşiklerin %99'u) bir dizi değerli antibiyotik ve biyoaktif metabolit elde edilmiştir. Ancak bu alandaki çalışmalar, karasal mikoorganizmaların kapsamlı bir şekilde çalışıldığı düşüncesi nedeniyle 1980'lerin sonlarından bu yana azalmıştır (53). Bu bağlamda, araştırmacılar yeni farmasötik bileşiklerin keşfi ve insan patojenleriyle mücadele için yeni ortamlara yönelmiştir.

Okyanus tabanı, yakın zamanda birçok benzersiz aktinomiset formuna sahip bir ekosistem olarak gösterilmiştir (46,54). Aktinomisetlerin okyanus boyunca geniş

çapta dağılmış oldukları ve gelgit bölgelerinde (55), deniz suyunda (56,57) hayvanlarda (57), bitkilerde, süngerlerde (58-60) ve okyanus çökeltilerinde (54,61-63) bulundukları görülmektedir. Nadir deniz aktinomisetlerinin bazıları büyümeleri için deniz suyuna ihtiyaç duymaktadır (55,64-66).

Deniz ortamında aktinomisetlerin (54,64) bu tür benzersiz adaptasyon özelliği, yeni türler için ilginç bir araştırma kaynağı ve farmasötik açıdan önemli bileşikler için umut verici bir kaynaktır (47). Bu vaatlere rağmen, deniz aktinomisetleri üzerinde nispeten az çalışma yapılmış ve bunun sadece küçük bir kısmı metabolit profillerini incelemeye yönlendirilmiştir (11,66).

Deniz çevre koşulları karasal koşullardan son derece farklı olduğundan (67,68), deniz aktinomisetlerinin karasal aktinomisetlerden farklı özelliklere sahip olabileceği ve bu nedenle yeni biyoaktif bileşikler ve yeni antibiyotikler üretebileceği düşünülmektedir (57,69). Bugüne kadar yapılan araştırmalar bu hipotezi desteklemektedir ve deniz aktinomisetlerinin yeni kimyasal yapıya sahip sekonder metabolitler ürettiği gösterilmiştir (11,47). Bu metabolitlerin çoğu yeni biyolojik aktivitelere sahiptir ve terapötik ajanlar olarak geliştirme potansiyeline sahiptir (64,70). Ayrıca deniz aktinomisetlerinin genom dizileri, yeni ajanların keşfedilmesinde yararlı bilgiler sağlamaktadır (71-73). Tablo 1'de, mikrobiyal kaynaklardan izole edilmiş bazı doğal bileşikler sunulmuştur (74-76).

Tablo 1. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilmiş bazı bileşik örnekleri

Doğal ürün	Aktivite	Mikroorganizma Tipi	Üretici organizma
Akarboz	Antidiyabetik	Aktinomiset	*Actinoplanes sp.*
Aktinomisin	Antitumor	Aktinomiset	*Streptomyces anulatus*
Aktinorodin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces coelicolo*
Amfoterisin B	Antifungal	Aktinomiset	*Streptomyces nodosus*
Apramisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptoalloteicus hindustanus*
Bleomisin	Antitumor	Aktinomiset	*Streptomyces verticillus*
Kandisidin	Antifungal	Aktinomiset	*Streptomyces (multiple sp.)*
Sephalosporin	Antibakteriyal	Mantar	*Cephalosporium acremonium*
Sefamisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces clavuligerus*
Mevastatin	Kardiovasküler	Aktinomiset	*Penicillium brevicompactum*
Siklosporin A	Immunomodulator	Mantar	*Tolypocladium inflatum*
Dalbavansin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Nonomuraea sp.*
Daunoribisin	Antitumor	Aktinomiset	*Streptomyces peucetius*
Epotilon	Antitumor	Mikobakteri	*Sorangium cellulosum*
Ekinokandin	Antifungal	Mantar	*Aspergillus nidulans*
Filipin	Antifungal	Aktinomiset	*Streptomyces filipinensis*
Fusidik asit	Antibakteriyal	Mantar	*Fusidium coccineus*
Geldanamisin	Antitumor	Aktinomiset	*Streptomyces hygroscopicus*
Gentamisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Micromonospora purpurea*
Higromisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces hygroscopicus*
Josamisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces narbonensis*
Kanamisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces kanamyceticus*
Lovastatin	Kardiovasküler	Mantar	*Aspergillus terreus*
Milbemisin	Antiparazidik	Aktinomiset	*Streptomyces hygroscopicus*
Mitomisin C	Antitumor	Aktinomiset	*Streptomyces lavendulae*
Mikofenolik asit	Immunomodulator	Mantar	*Penicillium brevicompactum*
Polimiksin D	Antifungal	Basil (bakteri)	*Streptomyces cacaoi*
Ristocetin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Amycolatopsis lurida*
Spektinomisin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces spectabilis*
Streptomycin	Anti-tuberkuler	Aktinomiset	*Streptomyces griseus*
Tylosin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces fradiae*
Viomycin	Antibakteriyal	Aktinomiset	*Streptomyces sp. 11,861*

Deniz Aktinomisetlerinin Farklı Cinsleri

Toplam deniz yüzeyinin sadece %7-8'i kıyı alanıdır ve geri kalanı derin denizlerdir, bunun %60'ı 2000 m'den daha derin sularla kaplıdır (77). Derin denizler yüksek basınç, düşük sıcaklık, ışık eksikliği, değişken tuzluluk ve oksijen konsantrasyonu ile karakterize edilen benzersiz ve ekstrem bir ortama sahiptir (78). Derin deniz alanı coğrafi olarak geniş olmasına rağmen, derin deniz mikrobiyal çeşitliliği ile ilgili bilimsel bilgi ve araştırma yetersizdir (77). Bununla birlikte, yeni antibiyotiklerin keşfi için iyi bir mikroorganizma kaynağı olduğu gösterilmiştir (78).

Hafif asidik koşullar, nötr sudan daha fazla aktinomiset çeşitliliği barındırma eğilimindedir (57,79). Aktinomisetlerin deniz çökeltilerinden izolasyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır (80). Son değerlendirmelere ek olarak, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia, Rhodococcus*, *Dietzia*, *Prauserella Serinicoccus* (61,81), *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Lamerjespora*, *Marinospora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Verrucosispora, Marinactinospora* ve *Sciscionella* deniz ortamından rapor edilmiştir (81-91).

Denizel Kaynaklı *Streptomyces* Türleri

Aktinomisetler arasında ekonomik öneme sahip organizma grubu olan *Streptomyces*'ler, birçok biyoaktif bileşiklere kaynak olmaktadır (12). Bilinen ticari ve tıbbi olarak yararlı antibiyotiklerin (92,93) yaklaşık dörtte üçü *Streptomyces*'lerden izole edilmiştir. Ayrıca 1990 yılına dek keşfedilen antibiyotiklerin yaklaşık %60'ı ve tarımda kullanılan antibiyotiklerin çoğu *Streptomyces* cinsindendir (94). *Streptomyces*'lerin antibakteriyel (94), antifungal (95-97), insektisidal (98), antitümör (99), antiinflamatuar (100), anti-parazitik (98), antiviral (101), antifouling (102), anti-infektif (103), herbisit ve bitki büyümesini destekleyen bileşiklerin (104) yanı sıra enzim inhibitörleri (105) ve vitaminler (106) gibi birçok farklı ajanı sentezleme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle, endüstriyel olarak önemli mikroorganizmalar olarak geniş çapta kabul edilmektedir (107-109).

SEKONDER METABOLİTLER

Bir organizmanın normal büyümesi, gelişmesi veya üremesi esnasında doğrudan yer almayan, bazı durumlarda organizmanın kendini diğer canlılardan korumak ve hayatta kalmak amacıyla ürettiği biyoaktif doğal ürünlerdir.

Sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları büyük ölçüde özgün ve karmaşıktır. Ancak bu benzersiz çeşitliliğe sahip olan sekonder metabolitler, organizmaların ömrü boyunca her zaman üretilmezler. Organizmanın kültür ortamında fermantasyonu esnasında veya primer metabolitlerin biyosentetik yolaklar ile sekonder metabolitleri oluşturması gibi farklı yollar izlenerek üretilirler.

Metabolit Üretimi İçin Fermantasyon Süreci

Aktinomisetler yüksek G+C içerikli Gram-(+) bakterilerdir (63). Aktinomisetlerin fermantasyon koşullarının optimizasyonu (110,111) sekonder metabolitlerin üretimini birkaç kat artırabilmektedir (111-114). Sekonder metabolitlerin üretimi, büyüme yavaşladığında veya durduğunda başlamaktadır (115-118), bu nedenle kolayca bulunabilen karbon kaynağı, bol miktarda azot veya fosfor ile baskılanabilir, bunların tümü aktinomisetlerin aktif olarak büyümesine katkıda bulunur (119). Bu nedenle hazırlık aşamasında büyüme çok yavaştır ve düzenleyici proteinler yeni bilgiler temelinde sentezlenir (110). Üretim aşamasında büyüme hızı azalır ve sekonder metabolit üretimi en yüksektir (120).

Aktinomisetlerdeki sekonder metabolitlerin üretimi, mevcut besinler (121,122), pH (112), kısmi oksijen basıncı (pO_2) (119), sıcaklık (112), çalkalama (113), mineral tuzları (123), metal iyonları (124), öncüler (110,125), indükleyiciler (110,116) ve inhibitörler (120) gibi çeşitli fermantasyon parametrelerinden büyük ölçüde etkilenir. Bu genellikle organizmadan organizmaya değişir (119,126).

Aktinomisetlerden İzole Edilen Sekonder Metabolitler

1928'de penisilinin keşfi, antibiyotik çağını ve mikroorganizmaların klinik olarak etkili doğal ürünler için zengin bir kaynak olduğunu göstermiştir (127). O zamandan beri mikroorganizmalardan 10.000'den fazlası biyolojik olarak aktif olan yaklaşık 50.000 doğal ürün keşfedilmiştir (12). Şu anda 1000'den fazla mikrobiyal metabolit, antibiyotik, antitümör ajan ve agrokimyasallar klinikte kullanılmaktadır (12,95). Yakın zamana kadar mikrobiyal kökenli antibiyotiklerin çoğu, yalnızca *Actinomycetales* takımına ait karasal bakterilerden izole edilmekte idi (11-13).

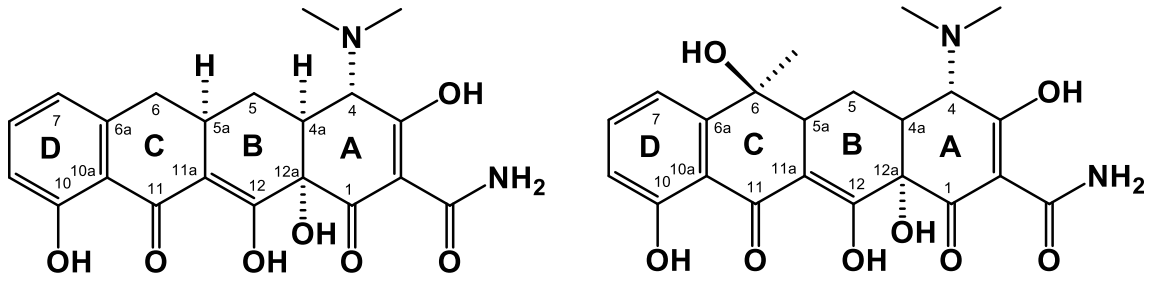
Tüm mikroorganizmalar arasında aktinomisetler şüphesiz en büyük sekonder metabolit üreticileridir (12). Şu anda bilinen mikrobiyal metabolitler arasında, %45'i (~10.000 bileşik) çeşitli *Actinomycetales* takımından izole edilmiştir, bu bileşiklerin %75'i *Streptomyces*'ten ve %25'i ise nadir aktinomiset kaynaklıdır (12). Bununla birlikte *Micromonospora, Actinomadura, Streptoverticillium, Actinoplanes, Nocardia, Saccharopolyspora* ve *Streptosporangium* cinsleri antimikrobiyal özellikte metabolit üretmekte ve giderek artan antibiyotik keşfinde önemli bir rol oynamaktadır (11-13).

Nadir aktinomisetler; mükemmel biyoaktif etkinliğe sahip, genellikle düşük toksisite sergileyen, çeşitli, özgün, benzeri görülmemiş ve bazen çok karmaşık kimyasal yapıya sahip bileşikler üretmektedir (12,128). Antibiyotiklerin çoğu, normalde kültür ortamında salgılanan hücre dışı metabolitlerdir (113). Aktinomisetlerin peptidler/glikopeptidler (129,130), tetrasiklinler (131), makrolidler (132), aminoglikozitler, antrasiklinler (133), β-laktamlar (134), laktonlar (135) ve siklodipeptitler gibi çeşitli antibiyotik türlerini ürettiği bilinmektedir (12).

Tetrasiklinler

Tetrasiklin grubunun ilk üyeleri klortetrasiklin ve Oksitetrasiklin, 1940'ların sonlarında sırasıyla *Streptomyces aureofaciens* ve *Streptomyces rimosus*'tan izole edilmiştir. Keşfedilen tetrasiklinler, aminoaçil-tRNA'nın ribozomal alıcı bölgesine bağlanmasını önleyerek protein sentezini engeller. Tetrasiklinler, çok sayıda Gram-(+) ve Gram-(-) bakterilere, klamidya, mikoplazma, riketsiya gibi atipik organizmalara ve protozoan parazitlere karşı aktivite gösteren geniş spektrumlu ajanlardır. Bu ajanların antimikrobiyal özellikleri ve ciddi yan etkilerinin olmaması, insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanıma yol açmıştır.

Tetrasiklin molekülleri, çeşitli fonksiyonel grupların eklendiği doğrusal bir kaynaşmış tetrasiklik çekirdek A, B, C ve D olarak adlandırılan halkalar içerir. Antibakteriyel aktivite gösteren en basit tetrasiklin 6-deoksi-6-demetiltetrasiklindir (Şekil 1) ve bu yapı minimum farmakofor olarak kabul edilmiştir (136). Tetrasiklin moleküllerinde aktivite için önemli yapısal özellikler; lineer kaynaşmış tetrasiklik halkasındaki 4a, 12a (AB halka bağlantısı) ve 4 (dimetilamino grubu) pozisyonlarının doğal olarak oluşan (α) stereokimyasal konfigürasyonlarının ve keto-enol sisteminin korunmasıdır (Şekil 1).



6-deoksi-6-demetiltetrasiklin
(farmakofor)

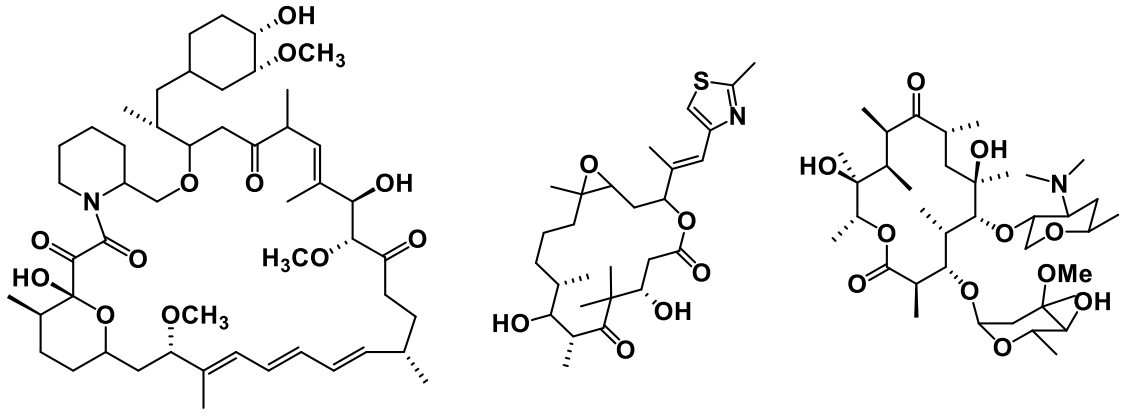
Tetrasiklin

Şekil 1. Doğal olarak oluşan Tetrasiklin örnekleri

Makrolidler

Makrolidler ve makrolaktonlar, bir veya daha fazla deoksi şekerin bağlı olduğu büyük bir makrosiklik lakton halkası içerir. Esas olarak Gram-(+) ve Gram-(-) bakteri ve mantarlar tarafından üretilen, yapısal olarak çok çeşitli ve devasa kimyasal iskelete sahip bileşiklerin oluşturduğu bir antibiyotik sınıfıdır.

Sadece yapıları ve biyolojik kökenleri değil, aynı zamanda biyolojik aktiviteleri de oldukça çeşitlidir. Küçük üyeli makrolidler (12 ve 14 atomlu halkaya sahip) ve orta üyeli makrolidler (16 atomlu halkaya sahip), tıpta enfeksiyonların tedavisi için kullanılmaktadır. Bakteri ribozomlarında protein sentezini güçlü bir şekilde inhibe ederek antibakteriyel aktivite sergilerler. Makrolid grubuna ait bileşiklerin gösterdiği diğer biyolojik aktivitelere örnek olarak, antifungal, immünosupresif, insektisit ve antihelmintik aktivite verilebilir (137). İlk makrolid antibiyotik Eritromisin A (Şekil 2), Gram-(+) bakterilere karşı gösterdiği aktivite sebebiyle 1952 yılında piyasaya sürülmüştür. Şekil 2'de makrolid sınıfına ait birkaç örnek verilmiştir.



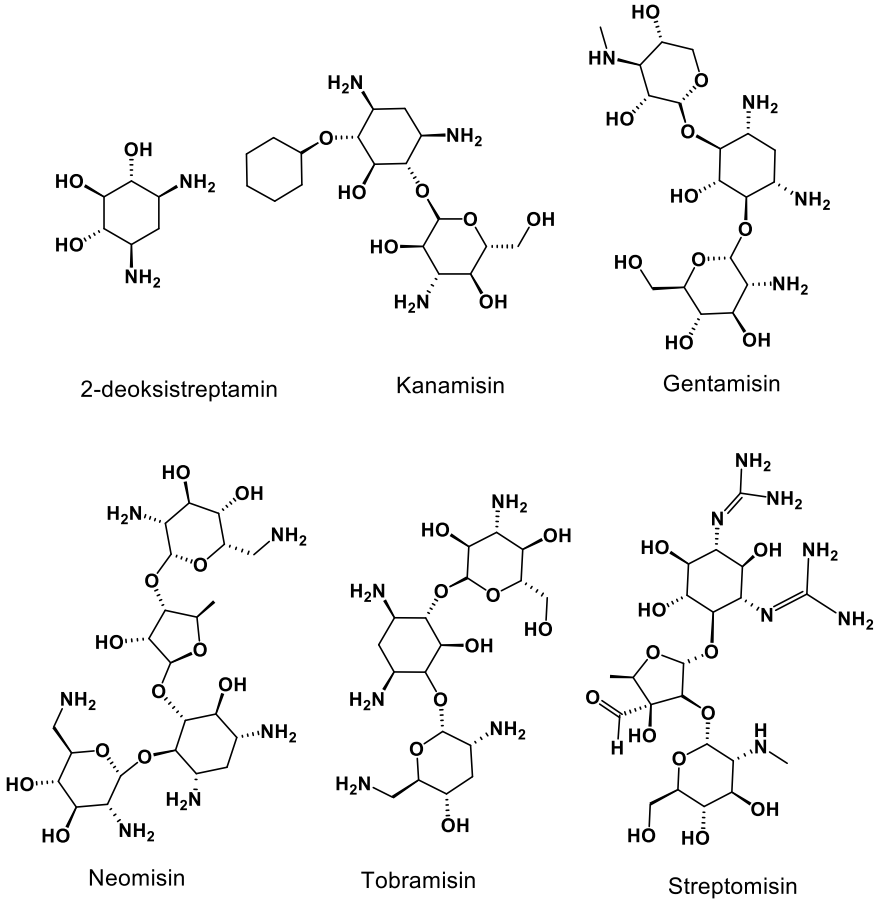
Şekil 2. Doğal olarak oluşan Makrolid örnekleri

Aminoglikozitler

Aminoglikozitler, amino modifiye glikozit (şeker) içeren protein sentezini inhibe ederek antibakteriyal aktivite gösteren bir antibiyotik kategorisidir. Aminoglikozit antibiyotikler, Gram-(-) aerob bakterilere karşı bakterisidal aktivite sergilerken Gram-(+) ve Gram-(-) anaerob bakterilere karşı aktivite sergilememektedir (138).

Streptomyces griseus kültürlerinden izole edilen Streptomisin, terapötik kullanıma sunulan ilk aminoglikozit antibiyotiktir. *Mycobacterium tuberculosis*'in etken olduğu tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılan en eski ilaç olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra tularemi hastalığı (*Francisella tularensis*) ve veba hastalığı (*Yersinia pestis*) tedavisinde de kullanılmaktadır.

Streptomisin, aminoglikozit sınıfına ait bileşiklerde ortak bulunan 2-deoksistreptamin grubuna sahip değildir. 2-deoksistreptamin içeren amino-glikozit bileşiklere kanamisin, tobramisin, gentamisin ve neomisin örnek verilebilir (Şekil 3).

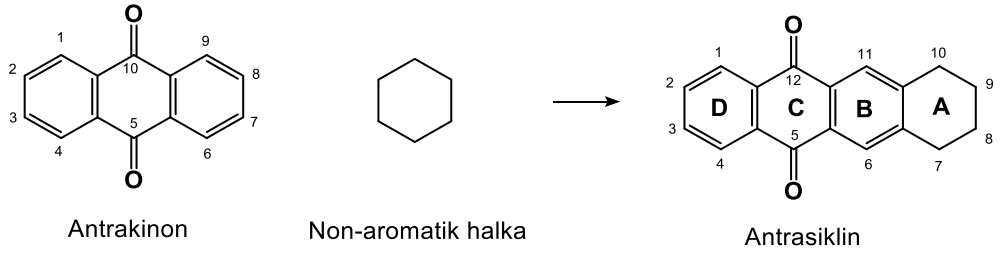


Şekil 3. Doğal olarak oluşan Aminoglikozit örnekleri

Antrasiklinler

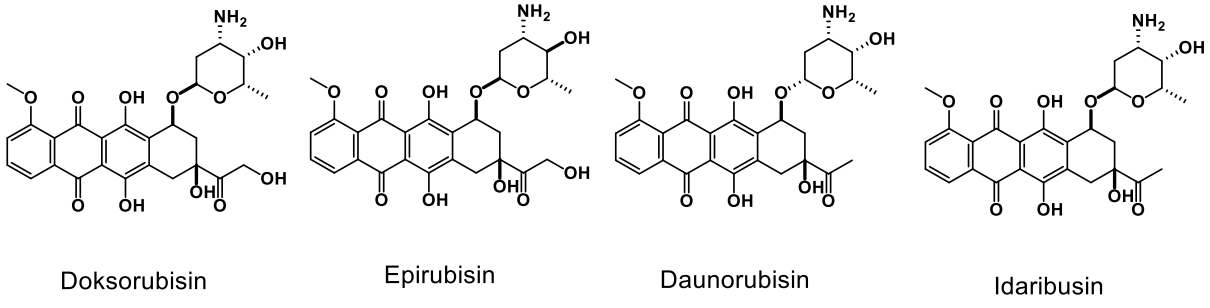
Antrasiklinler, *Streptomyces* türlerinden izole edilen antikanser ajan olarak kullanılan bir ilaç sınıfıdır (139). Antrasiklinler şimdiye kadar geliştirilmiş en etkili antikanser tedavileri arasındadır ve diğer herhangi bir kemoterapötik ajan sınıfından daha fazla kanser türüne karşı etkilidir. Bu kanser türleri arasında lösemi, lenfoma, meme kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türü bulunmaktadır.

Antrasiklinlerin kimyasal yapısı, temel olarak A, B ve C halkaları ve doymuş D halkası ve bu halkalar üzerinde kinon, fenolik grup veya diğer fonksiyonel grup eklenmiş antrasiklin (antrakinon) çekirdeğine dayanır. Suda çözünürlük, D halka sistemi üzerindeki çoğunlukla 7 konumuna mono veya polisakkarit substitüentlerin eklenmesi ile sağlanmaktadır (Şekil 4) (140).



Şekil 4. Antrasiklin halkasının kimyasal yapısı

Keşfedilen ilk antrasiklin, *S. peucetius* tarafından doğal olarak üretilen Daunorubisin'dir. Klinik olarak en önemli antrasiklin ilaçlar Şekil 5'te verilen doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisin'dir (141).

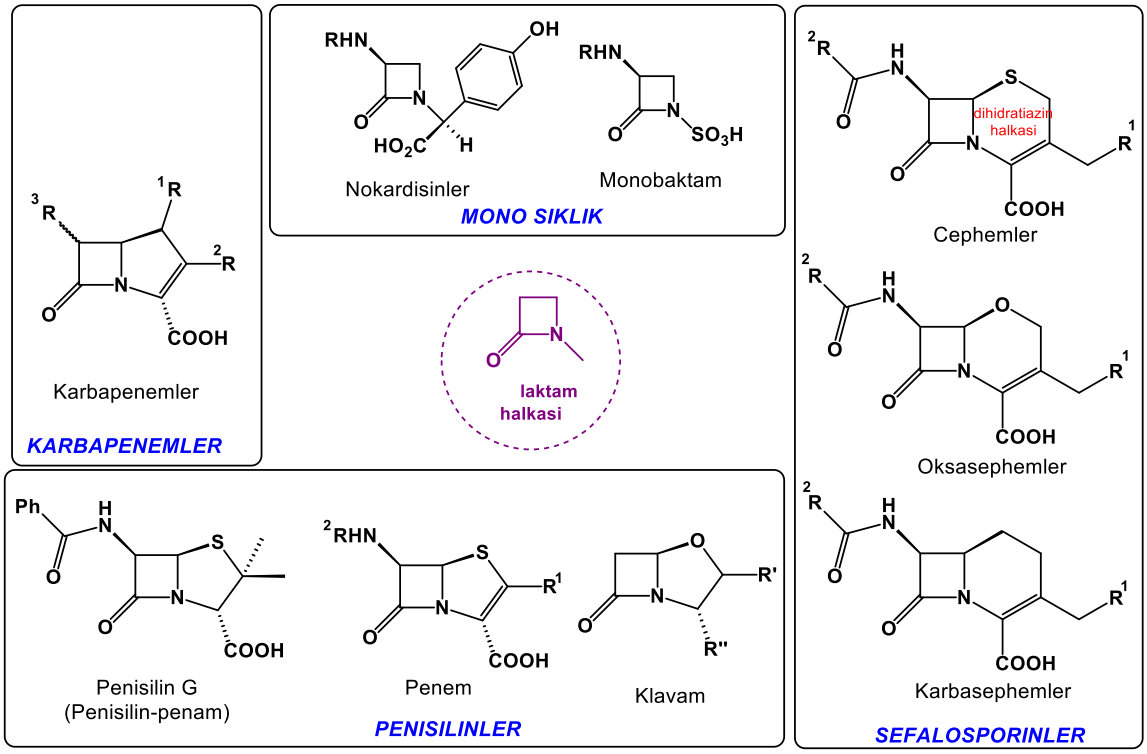


Şekil 5. Doğal olarak oluşan Antrasiklin örnekleri

Beta-laktam Antibiyotikler (β-laktam)

Beta-laktam sınıfı bileşikler, yapılarında bir β-laktam halkası içermektedir. Sefalosporinler, karbapenemler, penisilinler, monobaktamlar ve bekta-laktamaz inhibitörlerini kapsayan beta-laktamlar, keşfedilen en başarılı antibiyotik sınıfı olarak kabul edilmektedir (Şekil 6) (142). Çoğu beta-laktam antibiyotik, bakteri organizmasında hücre duvarı biyosentezini özellikle peptidoglikan tabakasının son çapraz bağlanma aşamasını bozarak inhibe eder. Beta-laktamlar, Gram-(-) ve Gram-(+) bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir (143).

İlk beta-laktam bileşik olan Penisilin, 1928'de Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum*'un (*Penicillium chrysogenum* olarak yeniden adlandırılmıştır) nadir bir varyantından izole edilmiştir. Penisilin'in, 1940'ta büyük ölçekte üretilen ilk antibiyotik olduğu ve II. Dünya Savaşı sırasında milyonlarca yaralıyı kurtardığı bilinmektedir (144).



Şekil 6. Beta-laktam antibiyotik sınıflarının genel kimyasal iskelet yapıları

Siklodipeptitler

Siklodipeptitler (siklik dipeptitler) genellikle 2,5-diketopiperazinler (2,5-DKP'ler) veya dioksopiperazinler olarak adlandırılır. Prolin, triptofan, valin, alanin, histidin, lösin, izolösin, fenilalanin, serin ve tirozin gibi iki amino asidin yoğunlaşmasından kaynaklanır (145).

En küçük siklopeptidlerdir ve mantarlar, bakteriler, bitkiler ve hayvanlar dahil olmak üzere birçok organizmada dağılırlar (145-148). 1924'teki ilk rapordan bu yana, çok sayıda biyoaktif siklodipeptidin sitotoksik, antitümör, antiviral, antifungal, antibakteriyel, antiprion, antioksidan, antihiperglisemik ve ayrıca biyofilm ve glikosidaz inhibe edici aktiviteler gösterdiği keşfedilmiştir (146-148).

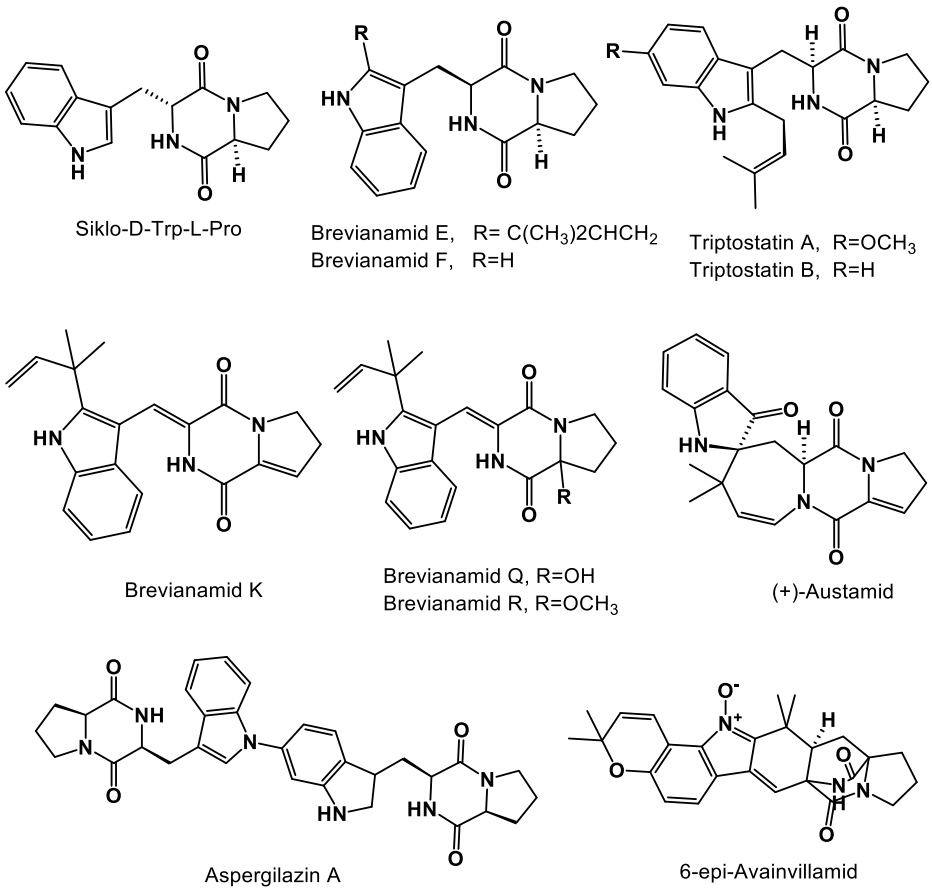
Bugüne kadar toplam 635 fungal siklodipeptid tanımlanmış ve araştırılmıştır. Biyosentetik kökenlerine ve yapısal karakterlerine göre bu siklodipeptidler şu şekilde sınıflandırılır:

- triptofan-prolin siklodipeptidler
- triptofan-triptofan siklodipeptidler
- prolin siklodipeptidler
- triptofan siklodipeptidler
- Non-triptofan-nonprolin siklodipeptitler
- tiyo analogları

2,5-DKP'lere ait olmayan bazı özel siklodipeptidler non-triptofan-nonprolin analoglar grubuna dahil edilmiştir (149).

Triptofan-prolin siklodipeptidler

Bu gruptaki bileşikler, triptofan ve prolin amino asitlerinin kondenzasyonuyla meydana gelir ve bu oluşum reaksiyonu genellikle heterosiklizasyon ve izoprenil ilavesiyle modifiye olabilir (148). Şimdiye kadar mantarlardan yaklaşık 120 adet triptofan-prolin siklodipeptid izole edilmiştir. Esas olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinde bulunmaktadır ve ayrıca *Alternaria, Paecilomyces ve Pseudallescheria* gibi diğer cinslerden de izole edilmiştir (145). Bazı Triptofan-prolin siklodipeptit çeşitleri Şekil 7'de verilmiştir.

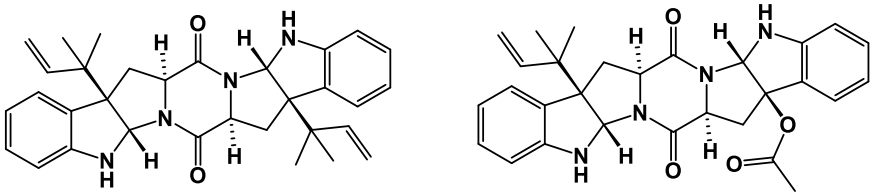


Şekil 7. Bazı Triptofan-prolin siklodipeptitler

Triprostatin A ve B, deniz kaynaklı mantar *Aspergillus fumigatus*'un fermantasyonu sonucu izole edilmiştir (150). Triprostatin A meme kanseri tedavisinde kemoterapötiklere direnç aracılık eden çoklu ilaca dirençli meme kanseri proteininin bir inhibitörü olarak etki etmektedir (151). Buna karşın triprostatin B memeli hücre döngüsü inhibitörüdür ve potansiyel antikanser ajanı olarak dikkat çekmektedir (152).

Triptofan-Triptofan Siklodipeptidler

İki triptofan ünitesine sahip olan ditriptofan siklodipeptitler filamentli mantarlarda, özellikle *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerinde yaygın olarak bulunmaktadır. *Amauroascus sp'den* (153) izole edilen Amauromin ve *A. terreus*'tan izole edilen Amauromin B (154) ditriptofan siklodipeptitlere örnektir (Şekil).

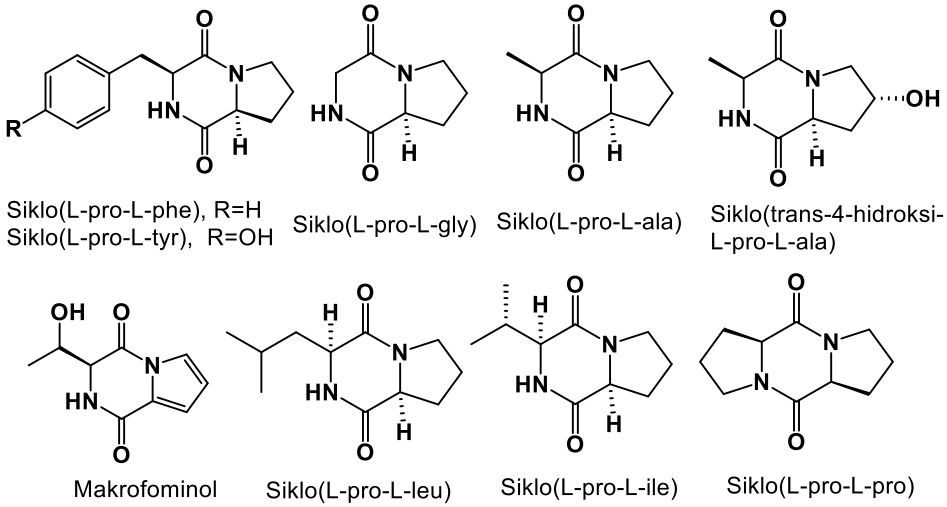


Amauromin Amauromin B

Şekil 8. Bazı Triptofan-triptofan siklodipeptitler

Prolin Siklodipeptidler

Bu gruptaki bileşikler, prolin amino asidi ve başka bir amino asidin kondenzasyonundan oluşmaktadır. Siklo (L-Pro–L-Ala), *Alternaria alternata*'dan (155) izole edilmiştir (Şekil 9). Bu bileşik, mantar büyümesini etkilemeden aflatoksijenik mantarlarda aflatoksin üretimini inhibe etmektedir (156). Makulozin-2 ve makulozin-1 olarak da adlandırılan Siklo (L-Pro–L-Phe) ve siklo(L-Pro–L-Tyr), benekli karahindiba (*Centaurea maculosa*) üzerinde yaşayan *Alternaria alternata* tarafından üretilen mantar fitotoksinleridir (155).



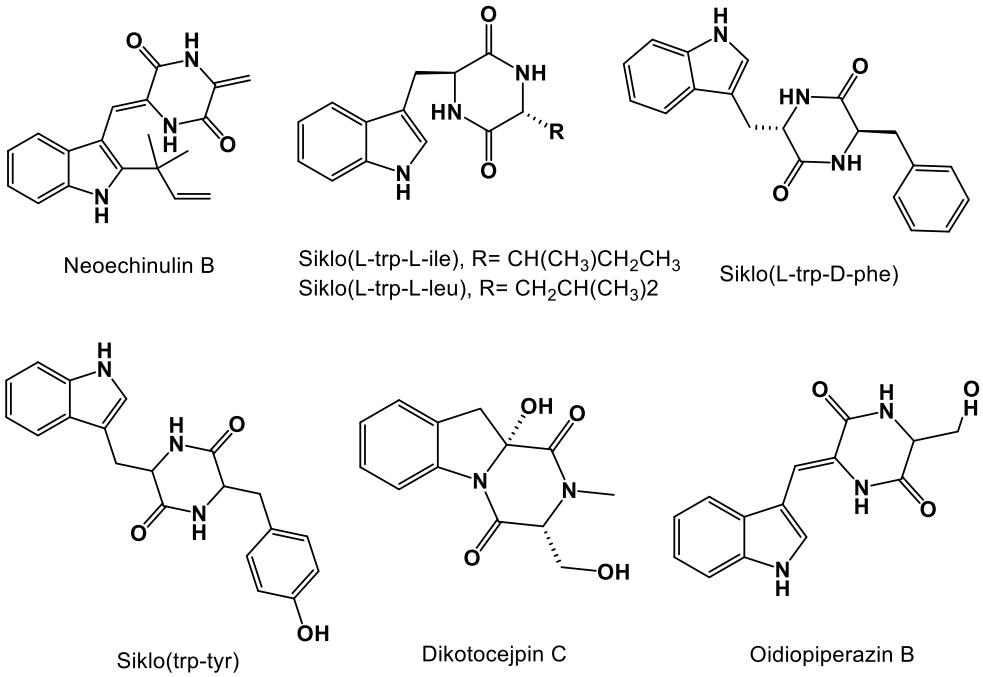
Siklo(L-pro-L-phe), R=H
Siklo(L-pro-L-tyr), R=OH
Siklo(L-pro-L-gly)
Siklo(L-pro-L-ala)
Siklo(trans-4-hidroksi-L-pro-L-ala)
Makrofominol
Siklo(L-pro-L-leu)
Siklo(L-pro-L-ile)
Siklo(L-pro-L-pro)

Şekil 9. Bazı Prolin siklodipeptitler

Triptofan Siklodipeptidler

Bu gruptaki bileşikler, triptofan amino asidi ve başka bir amino asidin kondenzasyonundan oluşmaktadır. Triptofan siklodipeptitler de mantarlarda bol miktarda bulunur ve yapısal olarak çeşitli doğal ürün grubunu temsil eder.

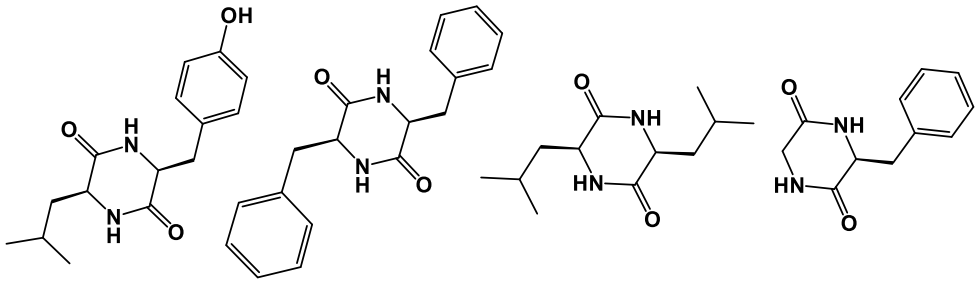
Triptofan siklodipeptidler siklo(L-Trp–D-Ile), siklo(L-Trp–D-Leu) ve ayrıca siklo(L)-Trp–(L)-Phe derin okyanus tortullarından türetilen bir mantar olan *Penicillium brevicompactum*'dan izole edildi (Şekil 10) (157). Neoechinulin B de *Eurototium rubrum'*dan izole edilmiştir. Bu bileşik, beşinci geçişten sonra bile influenza A(H1N1) virüs yayılmasını önlemede etkilidir.



Şekil 10. Bazı Triptofan siklodipeptitler

NonTriptofan-nonprolin Siklodipeptidler

NonTriptofan-nonprolin siklodipeptitler, mantarlardaki bu siklodipeptit grubuna ne triptofan ne de prolinin dahil edilmediği anlamına gelir. Şekil 11'de bu gruba örnek bileşikler gösterilmiştir (149).



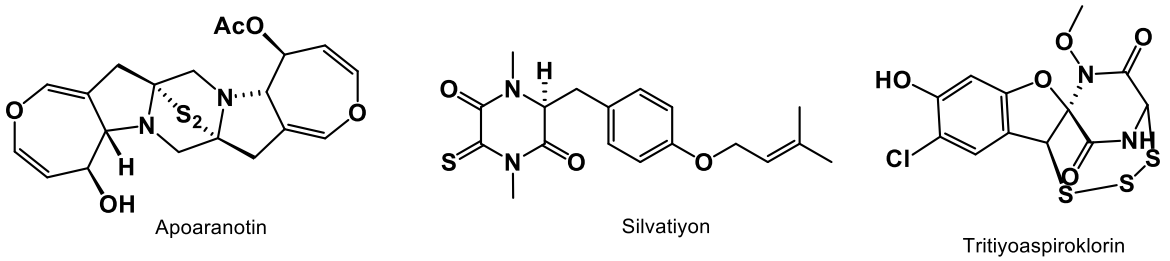
Şekil 11. NonTriptofan -nonprolin Siklodipeptidler

Tiyo-Siklodipeptidler

Tiyo-siklodipeptitler, köprülü veya açık formda tiyo işlevselliği içeren 2,5-diketopiperazinlerdir. Sülfür bağlarının pozisyonlarına göre, tiyo siklodipeptitleri üç alt gruba ayırılır:

- 1,4 köprülü epipolitioksopiperazinler (Apoaranotin)
- 2,5-DKP halkası dışında kükürt köprülü türevler (Tritiyoaspiroklorin)
- Diğer kükürt içeren siklodipeptidler (Silvatiyon)

Bazı Tiyo-siklodipeptit örnekleri Şekil 12'de görülmektedir. Mantarlardan yaklaşık 232 tiyo-siklodipeptid izole edilmiştir (149).



Şekil 12. Tiyo- Siklodipeptidler

Deniz Aktinomisetlerinden Yeni Sekonder Metabolitler

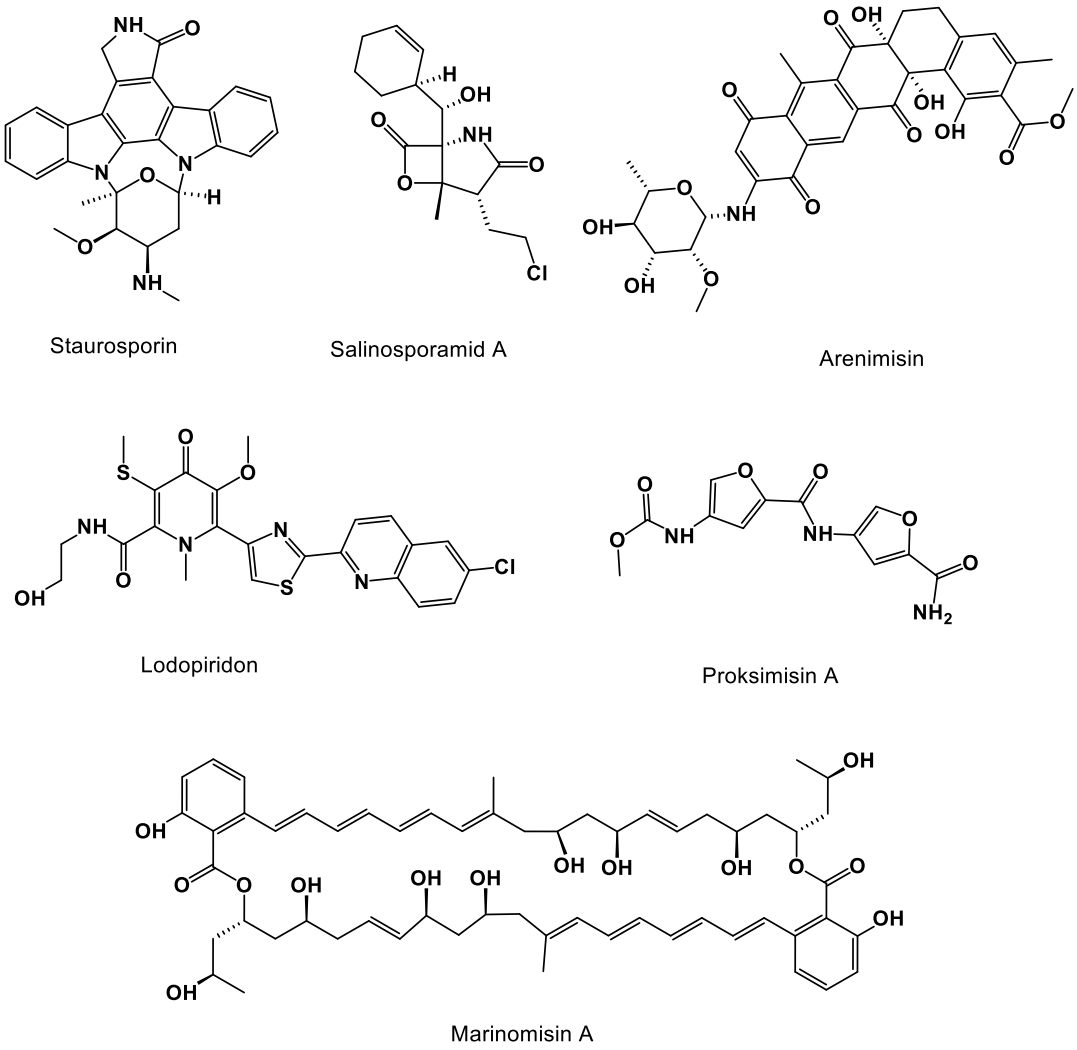
Klinik olarak 30.000'den fazla hastalık tanımlanmış olmasına rağmen, bunların üçte birinden azı semptomatik olarak tedavi edilebilir ve daha azı tamamen tedavi edilebilmektedir (158). Şu anda karşılanmayan tıbbi ihtiyaçları karşılamak için yeni terapötik ajanlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır (159).

Yeni sekonder metabolitlerin keşfinde deniz aktinomisetlerinin ilk tercih olarak kullanılması için henüz erken olmasına rağmen, son birkaç yılda çok sayıda yeni metabolit bu organizmalardan izole edilmiştir (13). Bunlar arasında Şekil 13'te verilen Staurosporin, Salinosporamid A, Lodopiridon, Arenimisin, Marinomisin A ve Proksimisin gibi birkaç bileşik, nadir olmaları ve güçlü ve çeşitli biyoaktiviteleri nedeniyle özellikle ilgi çekicidir. Salinosporamid A, nadir bir deniz aktinomiseti olan *Salinispora tropica'*dan izole edilen yeni, bisiklik beta-lakton gama-laktamdır (68,71). Salinosporamid A, ticari proteazom inhibitörü antikanser ilacı Bortezomib'den farklı mekanizmalarla multipl miyelom hücrelerinde apoptozu indükleyen, oral olarak aktif bir proteazom inhibitörüdür (160). Salinosporamid A, nadir bir deniz aktinomisetinin salin fermantasyonu ile üretilen kanserin tedavisi için ilk klinik adayı temsil eder.

Salinispyrone A ve B, nadir deniz aktinomisetinin filogenetik olarak benzersiz bir türü olan *Salinispora pacifica* 'dan izole edilen yeni poliketidlerdir (161).

Arenimisin, nadir deniz aktinomiseti *Salinispora arenicola* tarafından üretilen benzo(α)tetrasen kinon sınıfına ait yeni bir antibiyotiktir (11). Bu yeni yapısal türev, *S. arenicola* suşundan izole edilmiş yeni bir antibiyotik sınıf olan benzo(α)tetrasen kinon sınıfına ait ilk bilimsel rapordur. Arenimisin, rifampin ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili antibakteriyel aktiviteye sahiptir ve ilaca dirençli *Staphylococcus* ve diğer Gram pozitif insan patojenlerine karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteler sergiler.

Ek olarak, *Salinispora tropica* suşu ayrıca dört benzeri görülmemiş bileşik üretmiştir; Sporolide A, Arenicolide A, Cyanosporaside A ve Salinispyrone A (71). Bu vurgulanan yapılar, yeni sekonder metabolitlerin üretimi için deniz aktinomisetlerinin muazzam potansiyelini göstermektedir.



Şekil 13. *Streptomyces* türlerinden izole edilmiş yeni sekonder metabolitler

ANTİBİYOTİK ÜRETİCİSİ OLARAK *STREPTOMYCES* TÜRLERİ

Antibiyotiklerin keşfinin başarısına ve üretim sürecindeki ilerlemelere rağmen, bakteriyel enfeksiyonlar, başta çocukları ve yaşlıları etkileyen ve yılda yaklaşık 17 milyon ölüm ile dünya çapında hala ikinci önde gelen ölüm nedenidir. *Streptomyces*'ten türetilen antibiyotiklerin tarihi, 1942'de Streptotirisin keşfiyle başladı ve iki yıl sonra streptomisinin keşfi ile bilim adamları, cins içindeki antibiyotik arayışlarını yoğunlaştırdı. Günümüzde antibiyotiklerin %80'i *Streptomyces* cinsinden elde edilmektedir (162).

Streptomyceae Familyasının Genel Özellikleri

Streptomycetaceae familyası, 1943'te Waksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır (163). Organizmalar nadiren parçalanan, genellikle dallanmış bir substrat miselyumu oluşturan, Gram-(+) aerobik aktinomisetlerdir. Aktinomisetlerin yaşam döngüsünün bir parçası olan olgunluk döneminde, hava miselyumu üç ila daha fazla spordan oluşan zincirler oluşturur. Öte yandan, kısa spor zincirleri üreten birkaç tür bulunmaktadır. Substratın ve hava miselyumunun renginden sorumlu çok çeşitli pigmentler üretilmektedir. Organizmalar oksidatif tipte bir metabolizmaya sahip kemo-organotrofiktir ve farklı pH aralıklarında büyüme göstermektedirler.

Streptomyces Cinsinin Genel Özellikleri

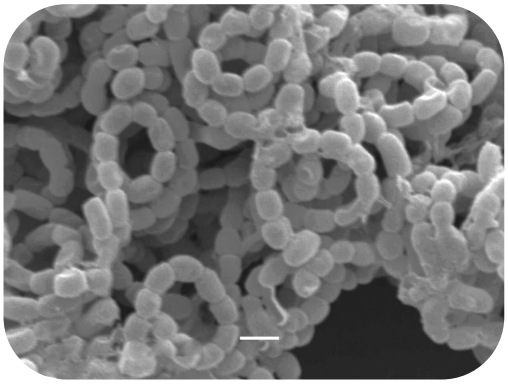
Streptomyces toprakta, bataklıklarda ve kıyı deniz habitatlarında büyüyen ve mantarlara benzer filamentli bir yapıya sahip Gram-(+) bakteri cinsidir. *Streptomyces*'in morfolojik farklılaşması, bir spor zincirine farklılaşabilen bir hif tabakasının oluşumunu içerir. Bu süreç Gram-pozitifler arasında benzersizdir ve özel ve koordineli bir metabolizma gerektirir. *Streptomyces*'lerin en ilginç özelliği, başta antimikrobiyal ve immünosupresif olmak üzere antifungal, antiviral, antitümoral, anti-hipertansif gibi çeşitli biyoaktiviteye sahip sekonder metabolit üretme yeteneğidir (164-166).

Bu nedenle *Streptomyces* türleri, hücredeki ortak ara maddelerin biyokimyasal yolaklarla daha karmaşık yapılara dönüşmesiyle olşan sekonder metabolitler için zengin bir kaynağıdır. Sekonder metabolit sentezlenme sürecinin başlaması için önce spor oluşumu gerçekleşmelidir; bir spor uygun besin, ısı ve nem koşulları sağlandığında, mikrobiyal tüp oluşur ve hif meydana gelir. Ardından hava hifleri oluşur, bu hifler büyüme ve hücre döngüsü gibi süreçleri başlatmada görev alır. *Streptomyces* türleri, aynı ortamda temas halinde olduğu diğer mikroorganizmalarla ve hatta aynı cins içinde rekabet eder, bu esnada sekonder metabolitler üretimi gerçekleşir. Üretilen bu sekonder metabolitler türe özgüdür ve çoğunlukla antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Çalışmada Kullanılan *Streptomyces* Türlerinin Genel Özellikleri

Streptomyces hoynatensis

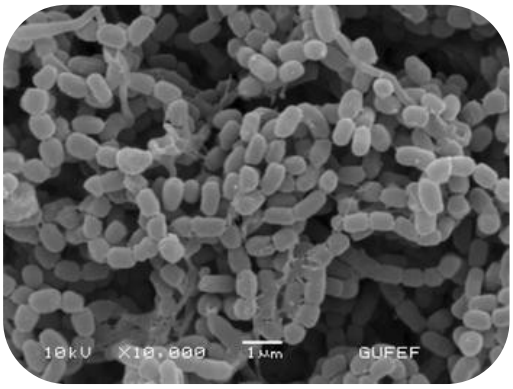
Streptomyces hoynatensis, 2010'da Türkiye'nin Karadeniz kıyılarından, Melet Nehri (Ordu) açıklarından, 12 m derinlikten tarama ile toplanmış bir tortu örneğinden izole edilmiştir (Örnekleme bölgesi GPS koordinatları 40°59.650′ N ve 37°58.953′ D) (167). Düz yüzeyli sporlar ile spiral spor zincirlerine farklılaşan dallı substrat hifleri ve hava miselyumu oluşturan aerobik Gram-(+) aktinomisettir. Elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 14'te verilmektedir.



Şekil 14. 21 gün boyunca 28 °C'de ISP-4 besi yerinde büyütülen *S. hoynatensis* suşunun taramalı elektron mikrografı. Bar, 1µm'yi ifade etmektedir.

Streptomyces klenkii

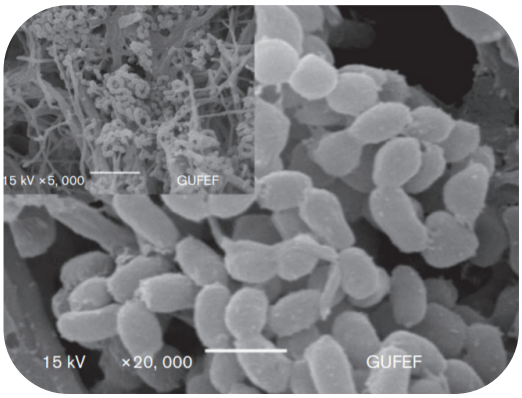
S. klenkii, 2010'da Türkiye'nin Karadeniz kıyısı Melet Nehri (Ordu) boyunca 45 m derinlikte tarama ile toplanan bir tortu örneğinden izole edilmiştir (GPS koordinatları 41°00.353' K ve 37°57.489' D) (168). Düz yüzeyli sporlar ile spiral veya retinakulum-apertum spor zincirlerine farklılaşan dallı substrat hifleri ve hava miselyumu oluşturan aerobik Gram-(+) aktinomisettir. Elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 15'te verilmektedir.



Şekil 15. 14 gün boyunca 28 °C'de ISP-4 besi yerinde büyütülen *S.klenkii* suşunun taramalı elektron mikrografı. Bar, 1μm'yi ifade etmektedir.

Streptomyces smyrnaeus

S. smyrnaeus, 2006 'da İzmir Çamaltı Tuzlası'nından tarama ile toplanan bir tortu örneğinden izole edilmiştir (169). Düz yüzeyli sporların spiral zincirlerine farklılaşan dallı substrat hifleri ve hava miselyumu oluşturan aerobik Gram-(+) aktinomisettir. Elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 16'da verilmektedir.



Şekil 16. 21 gün boyunca 28 °C'de DSMZ 1240 besi yerinde *S.smyrnaeus'un* taramalı elektron mikrografı. Bar, 1μm ve 5 μm'yi ifade etmektedir.

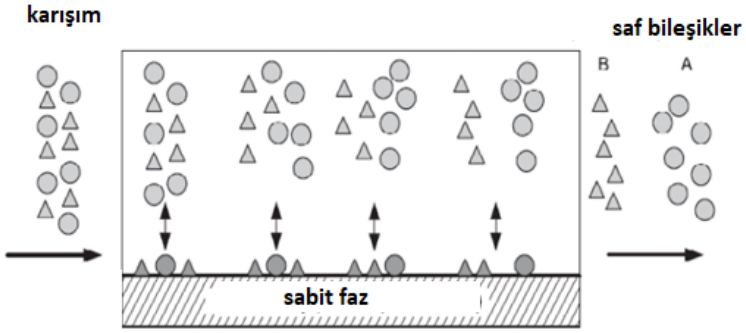
AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI

Kromatografik Yöntemler

Kromatografinin kelime olarak ilk kullanımı, MS Tswett'in 1906'da yayınlanan klorofil bileşikleri hakkındaki makalesine dayanmaktadır. Kromatografi (Yunanca chroma 'renk'ten, grafein 'yazmak'tan gelen renklerle yazma) anlamına gelmektedir (170). Kromatografi, karışımların ayrılması için bir dizi laboratuvar tekniği için ortak bir terimdir. Ayırma işlemi genel olarak moleküllerin bir yüzey üzerinde tutunma dayanır. Bir "hareketli faz" içinde çözülmüş bir karışımın, hareketli ve durağan fazlar arasındaki diferansiyel ayrılmaya dayalı olarak, analiti karışımdaki diğer moleküllerden ayıran sabit bir fazdan geçirilmesini içerir. Kromatografi preperatif veya analitik ölçekte gerçekleştirilebilir.

Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi, hareketli fazın sıvı olduğu herhangi bir kromatografik prosedürdür. İdeal bir durumda ayırma gerçekleşir çünkü optimum koşullar altında bir karışımdaki her bir bileşen, karışımdaki diğer bileşenlere göre hareketli ve sabit faz ile farklı şekilde etkileşime girer.



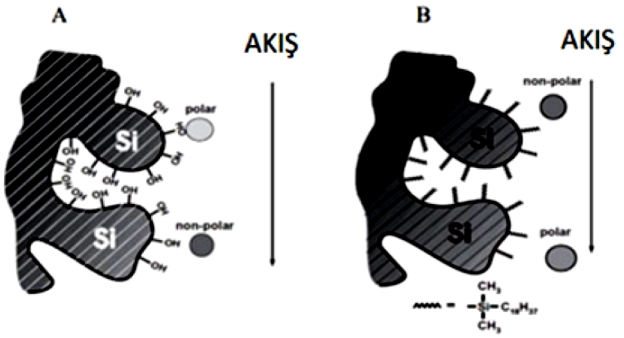
Şekil 17. Sıvı Kromatografinin Prensibi

Homojen bir karışımın (hareketli faz), kolona (sabit faz) enjeksiyonu Şekil 17'de gösterilmektedir. Sabit faza daha yüksek afinite gösteren B bileşeninin sabit faz yüzeyindeki ortalama adsorpsiyon süresi, daha düşük afinite gösteren bileşen A'nınkinden daha yüksektir. Afinitedeki ve adsorpsiyon süresindeki farklılıklar

nedeniyle B bileşeninin kolon boyunca göç hızı düşmektedir. A bileşeni ile kıyaslandığında, B bileşenin kolonu terk etmesi daha geç olmaktadır (170,171).

Normal Faz Kromatografisi (NFK)

Normal faz kromatografisi, analitin bir polar sabit faz (tipik olarak silika veya alümina) ile apolar hareketli faz arasında adsorpsiyonuna/desorpsiyonuna dayanan geleneksel ayırma modudur. Sabit fazın hareketli fazdan daha polar olduğu bir elüsyon prosedürüdür. NFK küçük organik molekülleri saflaştırmak için yaygın kullanılmakta, çözücü olarak hekzan, heptan veya siklohekzan gibi organik çözücüler veya diklorometan ve kloroform gibi halokarbonlar kullanılmaktadır. NFK'de izolasyon işlemleri esnasında apolar özellikteki moleküller silanol gruplarıyla zayıf bağ kurarken, polar özelliğe sahip moleküller daha güçlü etkileşim göstermektedir. NFK'de apolar özellik gösteren moleküller apolar hareketli faz ile bağ kurarak kolondan yavaşça göç etmektedir (Şekil 18-a). Bu yöntem polar moleküllerin ayrımını yapmakta yetersiz kalmaktadır.



Şekil 18. İki temel ayırma modunun şematik diyagramı: a)NFK serbest silanol grupları (Si-OH) ile silika partikülü, b)TFK burada silika partikülü yüzeye bağlı hidrofobik C18 grupları ile kaplanmıştır (172).

Ters Faz Kromatografisi (TFK)

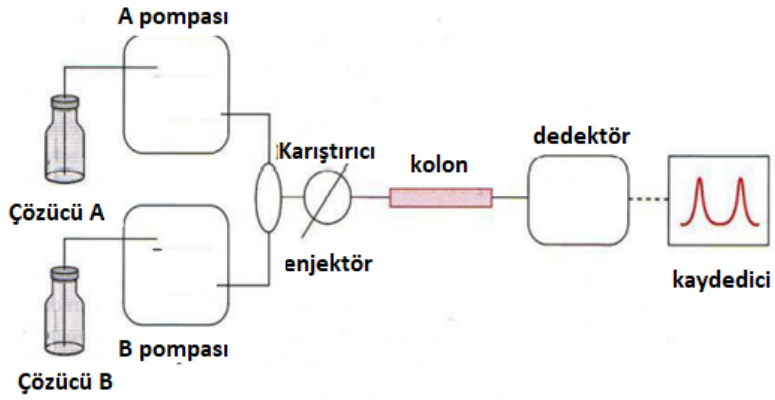
Normal faz kromatografinin yetersiz kaldığı polar moleküllerin analiz işlemi bu yöntemle gerçekleştirilmektedir. TFK'de ayırma işlemi, analitlerin polar hareketli faz ile polar olmayan durağan faz arasındaki adsorpsiyon farkına dayanmaktadır. TFK'de analit ve sabit faz arasında hidrofobik adsorpsiyon gerçekleşirken, hareketli faz ile

çözünme ve hidrofilik etkileşim gerçekleşmektedir. TFK'de sabit faz olarak dimetiloktadesilsilan gibi bir dizi alkil zincir uzunluğa sahip silika dolgu maddesi kullanılmaktadır, en popüler dolgu maddeleri ise C8 ve C18'dir. TFK'de önce polar moleküller elüe olurken, apolar moleküller alkil zincir grubuyla güçlü bir hidrofobik etkileşime girer ve daha geç elüe olur (Şekil 18-b).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), yüksek basınç altında sıvı hareketli faz (polar çözücü) vasıtasıyla katı sabit faza (apolar dolgu maddesi içeren kolona) enjekte edilen karışımı, adsorbsiyon, dağılım ve basınç etkisiyle ayırmak ve saflaştırmak için kullanılmaktadır. HPLC cihazı ters faz kromatografisi prensibine dayanmaktadır. Sabit faz olarak genelde Silika C-18 veya C-8 dolgu maddesi içeren kolon kullanılırken, hareketli faz olarak HPLC-grade çözücü kullanılmaktadır. Genel olarak metanol, su, asetonitril ve bu çözücülerin karışımları kullanılmaktadır.

HPLC ile ayırma işlemi için uygun çözücü ve kolon seçimi yapıldıktan sonra uygun ayırma yönteminin optimize edilmesi gerekmektedir. HPLC'de izokratik ve gradient metodlar olmak üzere iki şekilde ayrım gerçekleştirilebilir. İzokratik metod ile ayrım gerçekleşirken tek bir polaritede çözücü sistemi kullanılır ve sabit basınç uygulanır. Gradient metotta sabit olmayan basınç altında yüksek polariteden azalan polariteye doğru çözücü sistemi değişmekte ve ayrım bu şekilde gerçekleşmektedir.

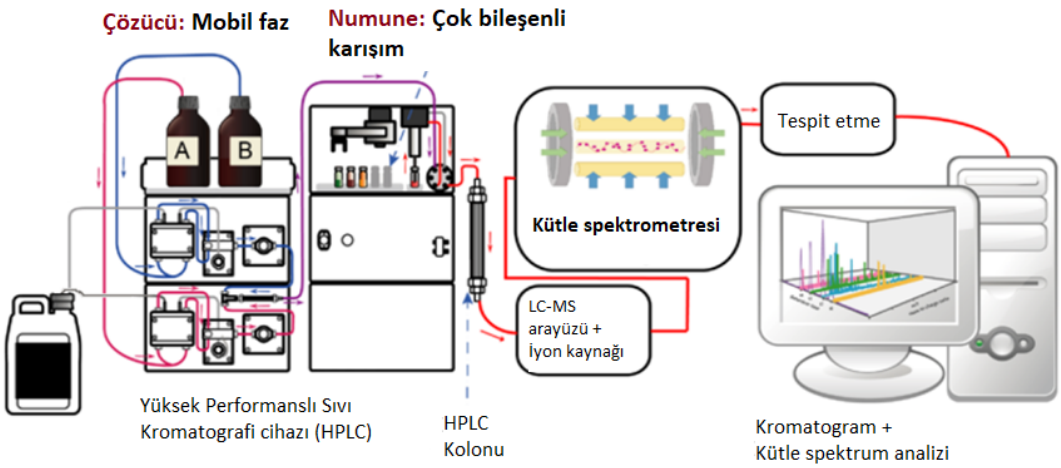


Şekil 19. Bir HPLC sisteminin temel modüllerinin şematik diyagramı

Bir HPLC cihazı enjektör, pompa, kolon ve dedektörden oluşmaktadır (Şekil 19). A ve B pompaları çözücüyü kolona pompalarken enjektör ile numune kolona tatbik edilir. Uygun metod ve çözücü sistemi belirlenir. Karışımdaki maddeler polaritelerine göre yüksek polarite gösteren moleküller çözücüye tutunarak kolondan önce çıkarken, apolar moleküller apolar dolgu maddesi içeren kolona yüksek afinite göstererek tutunur. Ayrımı gerçekleştirmek için çözücü polaritesi git gide düşürülür ve son olarak düşük polaritedeki moleküller de kolondan uzaklaştırılır. Böylece hem yüksek basınç hem de polaritenin etkisiyle saflaştırma işlemi sağlanmaktadır (172).

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS)

Sıvı kromatografi-Kütle spektrometrisi (LC-MS), sıvı kromatografisi (LC) ile fiziksel ayrıma tabi tutulan numunenin sonrasında kütle spektrometirisi (MS) ile elektron bombandırmanına uğrayarak iyonize olması ve kütle-yük (*m/z*) oranlarına göre tespit edilmesini sağlamaktadır. Ortaya çıkan kütle spektrumu, *m/z*'nin bir fonksiyonu olarak üretilen iyonların (nispi) bolluğunun grafiğidir. LC-MS temel olarak beş bölümden oluşur: numune girişi, iyonizasyon, kütle analizörü, iyon tespiti ve veri sistemi. HPLC-MS'de, bir HPLC cihazı özel bir ara yüz aracılığıyla bir kütle spektrometresine bağlanır. HPLC kolonundan ayrılan moleküller kütle spektrometresi tarafından tespit edilir (173,174).



Şekil 20. LC-MS analiz cihazının gösterimi

Ayrıma uğrayacak numune enjektör ile kolona enjekte edilir. LC ünitesinden ayrılan moleküller iyon kaynağı tarafından elektron bombardımına maruz kalır, bu adımında moleküller ve parçalanma ürünleri gaz halinde iyonlara dönüştürülür. İyonize haldeki moleküller daha sonra bir elektromanyetik alan tarafından hızlandırılır ve MS ünitesine (kütle analizörü) gönderilir. Kütle analizörü, iyonize haldeki molekülleri ve parçalanma ürünlerini kütle/yük (*m/z*) oranına göre ayırır. İyonlar daha sonra detektöre ulaşır ve sinyal veri sistemi tarafından kaydedilir (Şekil 20). Veri sisteminden elde edilen sonuç kütle spektrumudur.

YAPI AÇIKLAMA METODLARI

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), bir molekülün manyetik olarak farklı atomlarının sayısı hakkında bilgi vermektedir. Örneğin, bir molekülde hidrojen çekirdekleri (protonlar) incelenirse, farklı türdeki proton sayısı belirlenebilir ve bu protonlar hakkında bilgi edinilebilir. Karbon çekirdekleri için de benzer bilgiler belirlenebilir. Tek kütleye, tek atom numarasına veya her ikisinin de bir dönüşüne sahip olan en yaygın çekirdekler arasında $_{1}H^{1}$, $_{1}H^{2}$, $_{6}C^{13}$, $_{7}N^{14}$, $_{7}N^{15}$, $_{8}O^{17}$ ve $_{9}F^{19}$ bulunmaktadır.

Harici bir manyetik alanın yokluğunda, bir bileşikteki tek tek çekirdekler rastgele yönlendirilir; +1/2 spinli çekirdekler manyetik alanın aynı yönüne yönlenir (a-spin durumu daha düşük bir enerjiye sahiptir), oysa -1/2 spinli çekirdekler manyetik alanın yönünün tersine yönlendirilecektir. Bununla birlikte, çekirdeklere harici bir manyetik alan uygulandığında, birçok atom çekirdeği küçük birer mıknatıs gibi davranmaktadır. Bir manyetik alan tarafından yönlendirilmiş çekirdeklere elektromanyetik radyasyon uygulanırsa, α-spin durumundaki bir çekirdek, radyasyonu absorblayabilir, dönüşünü ters çevirebilir ve β-spin durumuna girebilir. Bu spinlerin arasındaki enerji farkı, belli radyo frekanslarda yayılır ve bu absorbsiyon dedektör ile tespit edilir ve NMR spektrumunda bir sinyal ile sonuçlanır (175-178).

Tek boyutlu deneylerde, sinyal tek bir parametrenin, genellikle kimyasal kaymanın bir fonksiyonu olarak sunulur. Bu tekniğe “tek boyutlu nükleer manyetik

rezonans spektroskopisi” denmektedir. İki boyutlu bir deneyde ise iki koordinat ekseni vardır; bu eksenler ayrıca kimyasal kayma aralıklarını temsil eder. Bu tekniğe ise “iki boyutlu nükleer manyetik rezonans spektroskopisi” denmektedir.

NMR spektroskopisi uygulanacak numunenin cihaz için uygun olan bir çözücü içerinde çözünmesi gerekmektedir. Çözücü olarak dötörolanmış çözücüler kullanılmaktadır. Molekülün polaritesi düşük ise dötörokloroform ($CDCl_3$) tercih edilmektedir. Yüksek polariteye sahip bileşikler için ise genelde dötörometanol (CD_3OD) tercih edilirken, metanolün yetersiz kaldığı durumlarda dötoro-su (D_2O) kullanılabilir. Ayrıca piridin-d_5, dimetil sülfoksit-d_6, dötöroaseton gibi çözücüler de kullanılabilmektedir.

Tek Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans (1D NMR) Spektroskopisi

Tek Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans (1D NMR) teknikleri, bir moleküldeki proton sayısı ve türü hakkında bilgi sağlayan Tek boyutlu ^{1}H Nükleer Manyetik Rezonans (1D ^{1}H-NMR) Spektroskopisi ve bir bileşiğin karbon iskeleti hakkında bilgi sağlayan Tek boyutlu ^{13}C Nükleer Manyetik Rezonans (1D ^{13}C-NMR) Spektroskopisi olmak üzere iki teknik mevcuttur. Bilinmeyen bir bileşiğin yapısını belirlemek için ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR teknikleri birlikte kullanılır. ^{13}C-NMR spektrumunun kimyasal kaymaları (0 ila 220 ppm), ^{1}H-NMR için gözlemlenenden (0 ila 14 ppm) çok daha geniş bir aralıkta görünür.

^{1}H-NMR Spektroskopisi

^{1}H-NMR spektroskopisi, bir moleküle ait protonların türü, sayısı ve komşuda bulunan gruplar hakkında bilgi vermektedir. Hidrojen atomunun dışarıdan uygulanan manyetik alanda rezonansa gelmesiyle spektrumlar oluşur. ^{1}H-NMR spektroskopisinde moleküle ait proton sinyallerinin kimyasal kayması, 0-14 ppm’lik bir aralıkta gözlenmektedir. Doymuş hidrokarbon protonları ($-CH_3$) 1.0 ppm civarında gözlenirken, olefinik protonlara ($-C=CH_2$) ait sinyaller 4.5-5.5 ppm aralığında, aromatik halka protonları (Ar-H) ise 6.0-9.0 ppm aralığında sinyal vermektedir (177).

^{13}C-NMR Spektroskopisi

Karbon-13 atomuna dışarıdan uygulunan manyetik alanın etkisiyle, rezonans durumu meydana gelmektedir ve bu çekirdeklerin manyetik alanda yaydığı enerjiler sinyal olarak kaydedilmektedir. Sinyallerin gözlendiği spektrum aralığı 0-250 ppm aralığındadır. ^{13}C-NMR spektrumunda; doymuş hidrokarbonlara ait karbon sinyalleri 5-50 ppm civarında gözlenirken, vinilik karbonlara ait sinyaller 100-150 ppm, aromatik karbon sinyalleri 120-145 ppm, karbonil karbonlarına ait sinyaller ise karbonil türüne bağlı olarak 165-220 ppm aralığında gözlenmektedir.

^{13}C-NMR spektrumuyla birlikte, ^{1}H-NMR spektrumları kullanılarak moleküllerin yapı karakterizasyonu sağlanmaktadır. Ancak daha kompleks yapıya sahip moleküllerin yapısını aydınlatmak için tek boyutlu teknikler yetersiz kalmaktadır, bu durumlarda iki boyutlu (2D) NMR tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır (179).

APT (Attached Proton Test) Ölçümleri

APT teknikleri ile bir karbon atomuna bağlı proton sayısı ve karbon türü belirlenebilir. Bir molekül ışınlama ile uyarılır ve rezonansa uğramaktadır. Bu ışınlama sonucunda, moleküldeki karbon atomlarının ^{13}C sinyalleri, her bir karbona bağlı hidrojenlerin sayısına bağlı olarak farklı davranış sergilemektedir. CH ve CH_3 gruplarından kaynaklanan sinyaller negatif pikler (taban çizgisinin alt yönünde) verirken, Kuvarterner karbon (qC) ve CH_2 gruplarından kaynaklanan sinyaller (CH ve CH_3 piklerinin zıt yönü) pozitif pikler verecektir. APT tekniği ile kuvarterner karbonlar da dahil olmak üzere toplam karbon sayısı ve türü belirlenmektedir (177).

İki Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans (2D NMR) Spektroskopisi

İki boyutlu bir deneyde iki parametre ve iki koordinat ekseni vardır; bu eksenler ayrıca kimyasal kayma aralıklarını temsil eder. İki boyutlu NMR tekniklerinde spektrumlar uzaysaldır. Yatay düzlemdeki iki eksende frekans, bunlara dik olan üçüncü eksende ise pik şiddeti gösterilir. İki boyutlu NMR teknikleri ile ^{1}H-^{1}H korelasyonu ve ^{1}H-^{13}C korelasyonu belirlenmektedir. Her iki eksende ^{1}H atomuna ait

NMR spektrumunun kimyasal kayma değerlerinin görüldüğü ^{1}H-^{1}H korelasyon spektroskopi teknikleri COSY ve NOESY, bir eksen üzerinde ^{1}H diğer eksen üzerinde ^{13}C atomuna ait kimyasal kayma aralığının çizildiği spektroskopi teknikleri ise HSQC ve HMBC'dir (176-178).

Çapraz-pik ilişkilendirme tekniği (COSY)

En önemli 2D-NMR deneylerinden biri COSY'dir. ^{1}H-^{1}H-COSY tekniğiyle, iki proton arasında bir bağlantı olup olmadığı kolayca belirlenebilir. Spektrum, 1D spektrumların görüntülendiği (^{1}H-NMR) iki frekans ekseninden oluşur. COSY tekniği ile yalnızca iki veya üç bağ uzaklıktaki ^{1}H atomları birbiriyle eşleşerek korelasyon yapar. COSY spektrum sayesinde molekülün karbon iskeletinin takibi yapılabilir böylece komşu atom hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (176-178).

Nükleer Overhauser Etki Spektroskopisi (NOESY)

NOESY deneyleri, molekülün konfigürasyonu hakkında bilgi sağlamaktadır. Molekülün göreli stereokimyasını belirlemek için kullanılabilmektedir (176,177). NOESY spektrumlarında, molekülün stereokimyasına göre uzayda aynı bölgede bulunan ^{1}H atomları birbiriyle atomlarının uzaysal mesafeye göre korelasyon göstermektedir. NOESY spektrumu, sonuç olarak uzayda aynı düzlemde bulunan ^{1}H korelasyonlarını dolayısıyla molekülün göreli stereokimyasını vermektedir.

Heteronükleer Çoklu Kuantum Korelasyonu (HMQC) ve Heteronükleer Tekli Kuantum Korelasyonu (HSQC)

HMQC ve HSQC birer heteronükleer korelasyon teknikleridir (HETCOR), hetero-nükleer (^{13}C ve ^{1}H çekirdekleri) atomlar arasındaki etkileşimi göstermektedir. Molekülde bulunan bir ^{13}C atomuna bağlı olan ^{1}H çekirdeği hakkında bilgi vermektedir (176-178). Yalnızca doğrudan bağlı hidrojen ve karbonlar korelasyon verebilir. HMQC/HSQC spektrumunda kuarterner karbonlar görülmemektedir. Bu teknik, protonların bağlı olduğu karbon türlerinin belirlenmesi ve molekülün yapısının

çözülmesinde önemli bir rol almaktadır.

Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu (HMBC)

HMBC bir molekülde tespit edilmiş proton ve karbon atomlarının birbirleriyle iki-üç bağ uzaklıktaki mesafeye kadar olan etkileşimlerin korelasyonunu gösteren ölçüm tekniğidir. Molekülün yapısını çözmek için başvurulan çok önemli bir tekniktir. Bu çoklu bağ korelasyon spektrumları, yapı hakkında çok faydalı bilgiler sağlar. Karbon bağlantıları hakkında dolaylı yoldan bilgi elde edilebilir. Ayrıca, kuarterner karbon atomları ile yakındaki protonlar arasındaki korelasyonlar gözlemlenebilir, böylece kuarterner karbon atomlarının konumları belirlenebilir. HMBC spektrumu ile kuarterner karbon ve diğer hetero-atomlarla, bu atomlara iki-üç bağ uzaklıktaki proton taşıyan karbonların korelasyonu belirlenebilmektedir (176-178).

Optik Çevirme

Optik çevirme bir kiral molekülün düzlem polarize ışık düzlemini çevirme yeteneğidir. Bir ışık kaynağı, polarize lens, numune tüpü ve analiz lensinden oluşan bir polarimetre kullanılarak ölçülür. Çevirme miktarı, analiz merceğinin ışıkta herhangi bir karartma meydana gelmemiş gibi görünmesi için çevrilmesi gereken derece sayısı olarak ölçülür. Stereokimyada, bir kimyasal bileşiğin özgül çevirme açısı [a], düzlem polarize ışık, yol uzunluğu 1 dm (10 cm) olan bir numuneden geçirildiğinde gözlenen optik çevirme açısı α olarak tanımlanır (g/mL). Saf bir malzemenin optik çevrilme açısı, belirli bir dalga boyunda ve sıcaklıkta o malzemenin içsel bir özelliğidir. Spesifik rotasyon kaynama noktası gibi fiziksel bir özelliktir (179).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN CİHAZLAR

- Binoküler Işık Mikroskobu (Leica)
- Buzdolabı (Vestel, Eko NF480)
- Densitometre
- Derin Dondurucu (Arçelik, 2081 NFD)
- Dönerbuharlaştırıcı (Heidolph, Hei-VAP HL Adv/Pre EU)
- Etüv (Daihan Scientific Wisd, WON-105)
- Hassas Terazi (Shimadzu, ATX324)
- Isıtıcı Tabla (Daihan Scientific HPLP-C-P)
- Isıtmalı Çalkalamalı İnkübatör (Daihan Scientific, ThermoStable IS-20R)
- IR (Perkin Elmer)
- İnkübatör (Daihan Scientific)
- LC-Q-TOF-MS
- Liyofilizatör (HyperCOOL, Cooling Trap HC3110)
- Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı
- NMR (Bruker 500 MHz)
- Otoklav (Maxtrelie Dikey Tip)
- Otomatik pipet
- Pastör Fırını (Daihan Scientific)
- Preperatif HPLC (Waters; Autosampler 2707, Binary HLPC Pump 1525,

Photodiode Array Detector 2998, Fraction Collector III)

- Santrifüj (Gyrozen 1248)
- Sepet ısıtıcı (Isotex 98-I-B)
- Sınıf II Mikrobiyolojik Emniyet Kabini (Alpina)
- Soğutucu Banyo (Daihan Scientific, Wisd, WiseCircu WCR)
- Sonikatör (Daihan Scientific, Wisd, WUC-D06H)
- Ultra Saf Su Cihazı (Purelab Option-Q, Elga DV 25)
- UV Lamba (UVP, UVGL-58)
- Vakum Kontrollü Dönerbuharlaştırıcı (Buchi V-700 R-3)
- Vorteks

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- Agar (Sigma)
- Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) (Sigma)
- Aseton (Tekkim)
- Bütanol (Sigma)
- C-18 Dolgu Maddesi (Kromasil)
- Çinko sülfat hepta hidrat ($ZnSO_4x7\ H_2O$) (Sigma)
- Çözünebilir Nişasta (Sigma)
- Demir sülfat hepta hidrat ($FeSO_4x7H_2O$) (Sigma)
- Diklorometan (DCM) (Tekkim)
- Dötero dimetilsülfoksit ($DMSO\text{-}d_6$) (Merck)
- Dötero kloroform ($CDCl_3$) (Merck)
- Dötero metanol (CD_3OD) (Merck)
- Et ekstresi (Beef Ekstrakt) (Merck)
- Etanol (Tekkim)
- Etil asetat (Tekkim)
- Glukoz Monohidrat (Tekkim)
- Hekzan (Tekkim)

- HPLC Grade Metanol (İsolab)
- HPLC Kolonu (Kromasil C-18 (21.2x250mm))
- Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) (Sigma)
- Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2x2H_2O$) (Sigma)
- Kazein (Sigma)
- Magnezyum sülfat penta hidrat ($MgSO_4x7H_2O$) (Sigma)
- Malt özütü (Merck)
- Mangan klorür tetra hidrat ($MnCl_2x4H_2O$) (Sigma)
- Maya özütü (Yeast Ekstrakt) (Merck)
- Metanol (Tekkim)
- N-Z Amin (Sigma)
- Potasyum nitrat (KNO_3) (Sigma)
- Reçine (Amberlite XAD16N) (Sigma)
- Reçine (Amberlite XAD4) (Sigma)
- Silikajel Hazır Plakalar (Merck ITK Silica gel 60 F254)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
- Susuz Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4) (susuz) (Sigma)
- Yulaf (CityFarm)

KULLANILAN BESİ YERLERİ

NZ-Amin Besi Yeri

Glukoz	10 g
Nişasta	20 g
Maya özütü	5 g
N-Z-Amin	5 g
$CaCO_3$	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

pH 7.2

GPHF Besi Yeri

Glukoz	10 g
Maya özütü	5 g
Et ekstresi	5 g
Kazein	5 g
$CaCl_2x2H_2O$	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

pH 7.2

ISP-2 Besi Yeri

Glukoz	4 g
Maya özütü	4 g
Malt özütü	10 g
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

pH 7.2

ISP-3 Besi Yeri

Yulaf 20 g

Agar 18 g

Eser element çözeltisi 1 mL

Distile su 1000 mL

pH 7.2

Eser element çözeltisi

$FeSO_4$ x 7 H_2O	0.1 g
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0.1 g
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0.1 g
Distile su	100 mL

ISP-4 Besi Yeri

Nişasta 10 g

$CaCO_3$ 2 g

K_2HPO_4 1 g

$MgSO_4$ x 7 H_2O	1 g
NaCl	1 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
Agar	20 g

Eser element çözeltisi 1 mL

Distile su 1000 mL

pH 7.2

Eser element çözeltisi

$FeSO_4$ x 7 H_2O	0.1 g
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0.1 g
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0.1 g
Distile su	100 mL

Nişasta-Kazein Agar Besi Yeri

Nişasta	10 g
Kazein	0.3 g
KNO_3	2 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0.05 g
K_2HPO_4	2 g
NaCl	2 g
$CaCO_3$	0.02 g
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0.01 g
Agar	18 g
Distile su	1000 mL
pH 7.0	

KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

Streptomyces hoynatensis

Çalışmada kullanılan DSM 42069 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

Streptomyces klenkii

Çalışmada kullanılan DSM 42104 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

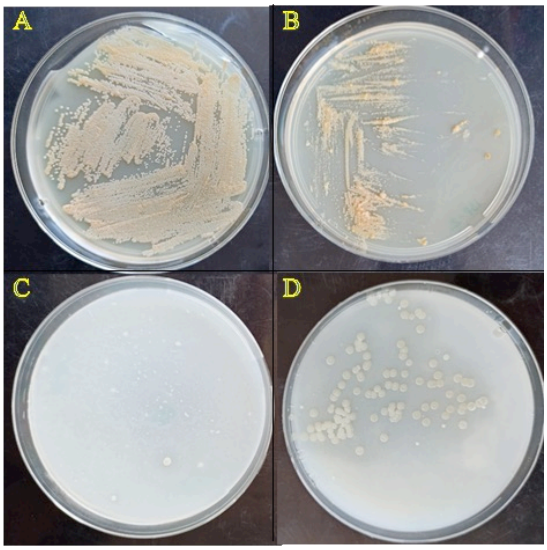
Streptomyces smyrnaeus

Çalışmada kullanılan DSM 42105 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

KULLANILAN YÖNTEMLER

S. hoynatensis Mikroorganizmasının Küçük ve Orta Ölçekte Üretimi

Liyofilize *S. hoynatensis* mikroorganizması izotonik çözeltide çözündürülerek katı ISP-2, ISP-3, ISP-4 ve NZ-Amin besi yerlerine pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de 28 günlük inkübasyon sonunda farklı besi yerlerinde görülen üreme Şekil 21'de verilmiştir.

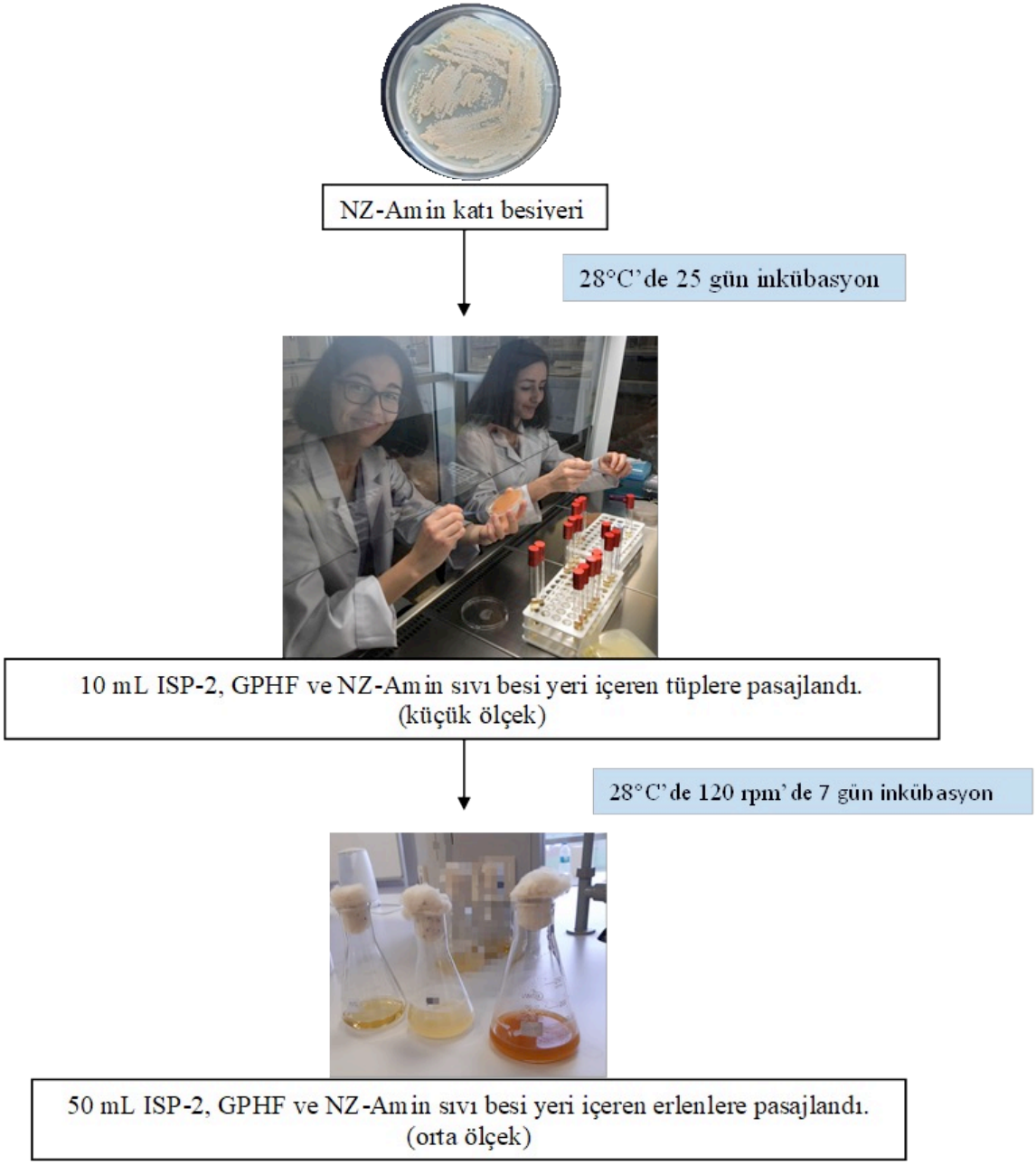


Şekil 21. Farklı katı besi yerlerinde *S. hoynatensis'in* görüntüsü (A. NZ-Amin, B. ISP-2, C. ISP-3, D. ISP-4).

28 günlük inkübasyon sonunda üreme görülen N-Z Amin plağından alınan saf koloni N-Z Amin plaklarına pasajlanarak çoğaltıldı. Üretilen kolonilerden öze dolusu alınarak, 10 mL ISP-2, GPHF ve NZ-Amin sıvı besi yeri içeren tüplere pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 7 gün inkübe edildi. İnkübasyonu takiben en yoğun üreme NZ-Amin besi yerinde gözlenirken, en zayıf üreme ISP-2 besi yerinde gözlenmiştir.

Bu tüplerden 1 mL alınarak 50 mL ISP-2, GPHF ve NZ-Amin besi yeri içeren 250 mL'lik erlenlere (her birinden üçer erlen olmak üzere toplam 9 erlen) pasaj yapıldı (Şekil 22). 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 14 günlük inkübasyon sonunda sentezlenen sekonder metabolitlerin incelenmesi amacıyla her bir besi yerinden birer örnek alınarak 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Hücre kalıntıları dekantasyon ile uzaklaştırıldı ve besi yerine XAD-4 (20 g/L) reçinesi eklendi. 4 saat boyunca

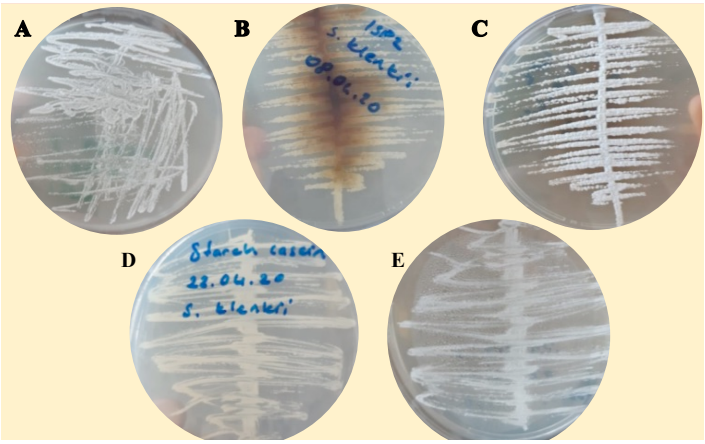
çalkalanarak bekletildi ve ardından süzülerek besi yerinden ayrıldı. Sekonder metabolitleri absorblayan reçine öncelikle ultra saf su ile 2 kez yıkandı. Ardından diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde çalkalanarak bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen ekstreler LC-MS analizine tabi tutuldu. Elde edilen ekstrelerin miktarları ISP-2 ekstresi 1.5 mg, GPHF ekstresi 20.1 mg ve N-Z Amin ekstresi 27.8 mg'dır.



Şekil 22. *S.hoynatensis* organizmasının orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir.

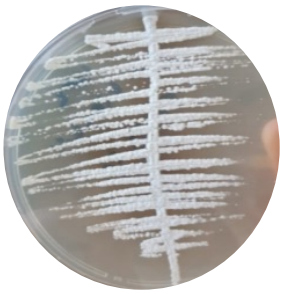
S. klenkii Mikroorganizmasının Küçük ve Orta Ölçekte Üretimi

Liyofilize *S. klenkii* mikroorganizması canlandırma işlemi için izotonik çözeltide çözündürülerek katı ISP-2, ISP-3, ISP-4, Nişasta-Kazein Agar ve NZ-Amin besi yerlerine pasajlandı, 28°C'de 14 günlük inkübasyon sonunda en iyi üreme Nişasta-Kazein Agar, en zayıf üreme ise ISP-4 besi yerinde gözlendi (Şekil 23).



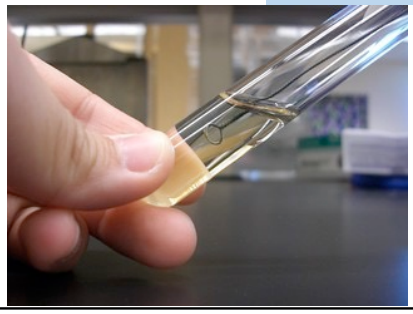
Şekil 23. Farklı katı besi yerlerinde *S. klenkii*'nin görüntüsü (A. ISP-3, B. ISP-2, C. NZ-Amin, D. ve E. Nişasta-Kazein).

Katı besi yerinde üreyen mikroorganizma kolonilerinden öze dolusu alınarak, 10 mL ISP-2, NZ-Amin ve GPHF besi yeri içeren tüplere pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 14 gün inkübe edildi. İnkübasyonu takiben en yoğun üreme NZ-Amin besi yerinde gözlenirken, en zayıf üreme ISP-2 besi yerinde gözlendiği için orta ölçekte bu besi yeri kullanılmamış, bunun yerine Nişasta-Kazein sıvı besi yeri kullanılmıştır. Tüplerden 5 mL alınarak 50 mL NZ-Amin, GPHF ve Nişasta-Kazein sıvı besi yeri içeren erlenlere pasaj yapıldı (Şekil 24). 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 16 günlük inkübasyon sonunda 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Hücre kalıntıları dekantasyon ile uzaklaştırıldı ve besi yerine XAD-16 (20 g/L) reçinesi eklendi. 4 saat boyunca çalkalanarak bekletildi ardından süzülerek besi yerinden ayrıldı. Sekonder metabolitleri absorblayan reçine önce ultrasaf su ile iki kez yıkandı. Sonrasında 50 mL diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde çalkalanarak bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek dönerbuharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen ekstrelerin miktarları Nişasta-Kazein ekstresi 24 mg, GPHF ekstresi 37.6 mg ve N-Z Amin ekstresi 6 mg'dır.



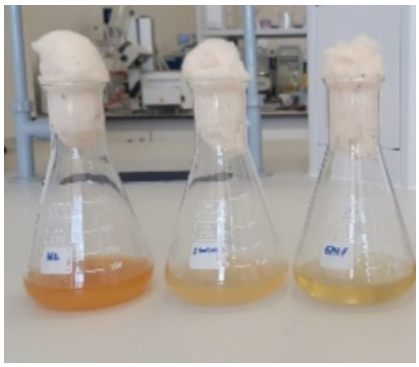
ISP-2 katı besiyeri

28°C'de 14 gün inkübasyon



10 mL ISP-2, GPHF ve NZ-Amin sıvı besi yeri içeren tüplere pasajlandı. (küçük ölçek)

28°C'de 150 rpm'de 14 gün inkübasyon

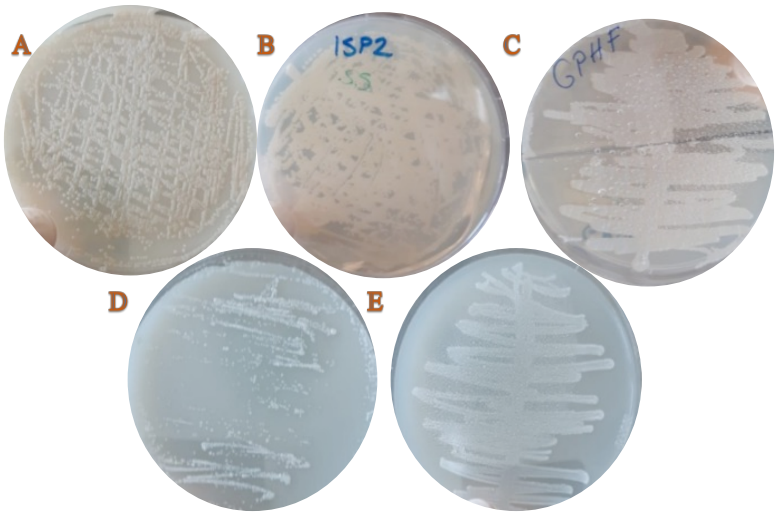


50 mL Nişasta-Kazein, GPHF ve NZ-Amin sıvı besi yeri içeren erlenlere pasajlandı. (orta ölçek)

Şekil 24. *S. klenkii* organizmasının orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir

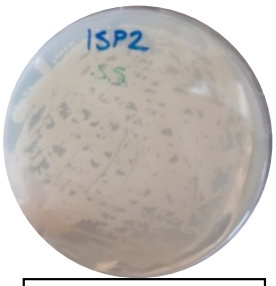
S. smyrnaeus Mikroorganizmasının Küçük ve Orta Ölçekte Üretimi

Liyofilize *S. smyrnaeus* izotonik çözeltide çözündürülerek katı ISP-2, ISP-3, Nişasta-Kazein ve GPHF besi yerlerine pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de inkübasyona bırakıldı. 9 günlük inkübasyon esnasında tüm besi yerlerinde üreme gözlendi (Şekil 25).



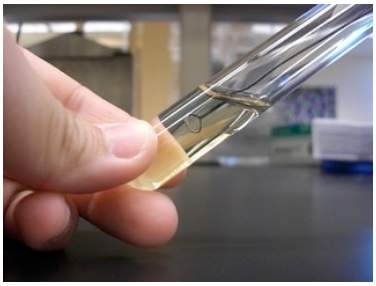
Şekil 25. Farklı katı besi yerlerinde *S. smyrnaeus'un* görüntüsü (A. NZ-Amin, B. ISP-2, C. GPHF, D. ISP-4 ve E. ISP-3).

9 günlük inkübasyon sonunda katı besi yerlerindeki kolonilerden öze dolusu alınarak, 10 mL ISP-2, GPHF ve N-Z Amin sıvı besi yeri içeren tüplere pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 12 gün inkübe edildi. İnkübasyonu takiben en yoğun üreme GPHF besi yerinde gözlenirken, en zayıf üreme ISP-2 besi yerinde gözlenmiştir. Bu tüplerden 5 mL alınarak 50 mL ISP-2, GPHF ve N-Z Amin besi yeri içeren erlenlere pasajlandı (Şekil 26). 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 10 günlük inkübasyon sonunda sentezlenen sekonder metabolitlerin incelenmesi amacıyla 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Hücre kalıntıları dekantasyon ile uzaklaştırıldı ve besi yerine XAD-16 (20 g/L) reçinesi eklendi. 4 saat boyunca çalkalanarak bekletildi ve ardından süzülerek besi yerinden ayrıldı. Sekonder metabolitleri absorblayan reçine öncelikle ultra saf su ile 2 kez yıkandı. Ardından DCM:MeOH (1:1) içeren çözücüde çalkalanarak bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen ekstreler ISP-2 ekstresi 2.7 mg, GPHF ekstresi 1.7 mg ve N-Z Amin ekstresi 2.8 mg'dır.



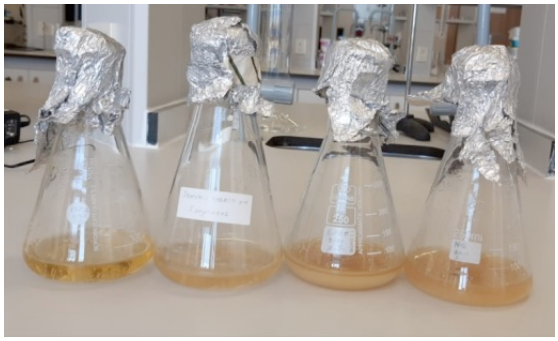
ISP-2 katı besiyeri

28°C'de 6 gün inkübasyon



10 mL ISP-2, GPHF ve NZ-Amin sıvı besi yeri içeren tüplere pasajlandı. (küçük ölçek)

28°C'de 120 rpm'de 12 gün inkübasyon



50 mL ISP-2, Nişasta-Kazein, GPHF ve NZ-Amin sıvı besi yeri içeren erlenlere pasajlandı. (orta ölçek)

28°C'de 120 rpm'de 10gün inkübasyon

Şekil 26. *S.smyrnaeus* organizmasınn orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir

EKSTRELERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Her bir mikroorganizmanın orta ölçekte üretildikleri besi elde edilen ekstreler antimikrobiyal etkileri açısından değerlendirildi. Antimikrobiyal aktivite testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M100-S28 ve M27A3 önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (180). Ancak antimikrobiyal aktivitesi ölçülecek madde; tek ve saf bir madde olmadığı zaman, birden fazla maddenin meydana getirdiği solüsyon veya çözelti olması durumunda, test sonucunu değerlendirirken Minimum İnhibitör Dilüsyon (MID) değeri şeklinde ifade edilmesi gerektiğinden, çalışmanın bu aşamasında yalnızca antimikrobiyal bir etki görülüp görülmediği şeklinde değerlendirildi.

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji A.D.'dan temin edilen *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları kullanılmıştır.

Çalışmada mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck), Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck), Sabouraud Liquid Medium (SLM) (Merck) ve MOPS ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besi yeri (Sigma) kullanılmıştır. MHA, MHB, SDA ve SLM 121ºC'de 15-20 dakika otoklavlanarak, RPMI besi yeri ise milipor (0.22 µm) filtreden süzülerek steril edilmiştir.

Bakteriler için MHA, mayalar için SDA kültür plaklarında üretilmiş olan kolonilerden sırasıyla MHB ve SLM besi yerlerine aktarılmıştır. Sıvı besi yerlerindeki kültürler inkübe edilip, kültürün bulanıklığı, 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ulaşıncaya kadar üzerine sıvı besi yeri eklenerek yoğunluk ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonu densitometre kullanılarak McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek 10^5 CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır. Maya süspansiyonu ise densitometre kullanılarak McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra, önce 1:100 sonra 1:20 oranında sulandırarak $2.5x10^3$ CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır. Ayarlanan bu süspansiyonlar inokulum olarak kullanılmıştır. Bakteri inokülasyonu yapılacak olan mikrodilüsyon plaklarının her kuyucuğuna 100µL MHB, maya inokülasyonu yapılacak olan mikrodilüsyon

plaklarının her kuyucuğuna 100µL MOPS ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besi yeri eklenmiştir. Tüm ekstreler DMSO ile çözülmüştür ve DMSO tek başına kontrol olarak da kullanılmıştır. Ekstreler ve DMSO, mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µL hacimde eklenmiştir. Böylece stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmış olur. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10 µL inokülasyon yapılmıştır. Her mikrodilüsyon plağında sadece besi yeri ve mikroorganizma içeren ve sadece besi yeri içeren kontrol kuyucukları eklenmiştir. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37ºC'de 16–20 saat, maya inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 35ºC'de 24–48 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde DMSO'nun aktivite gösterdiği kuyucukla aynı etkiyi gösteren ekstre dilüsyonu göz ardı edilmiştir. Bu durumda DMSO'nun etkisinden bağımsız olarak daha düşük dilüsyonlarda da antimikrobiyal aktivite saptanan örnekler etkili olarak değerlendirilmiştir.

Aşağıdaki tablolarda (Tablo 2-4) farklı besi yerlerinde üretilen mikro-organizmaların antimikrobiyal aktivite sonuçları verilmiştir.

Tablo 2. *S. hoynatensis'ten* elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri

	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. faecalis*	*C. albicans*
N-Z Amin	+	+	++	++	*
ISP-2	-	-	-	+	*
GPHF	+	+	-	+	*

*Ekstre miktarının az olması nedeniyle değerlendirilemedi.

S. hoynatensis'in kültüre edildiği besi yerleri arasında en güçlü ve tüm bakterilere karşı etkili olan ekstrenin N-Z-Amin besi yerinden reçine ile çekilen ekstre olduğu görülmektedir. Diğer ekstrelerde görülen antimikrobiyal aktivite tüm bakterilere karşı, DMSO ile kıyaslandığında yalnızca bir kuyucuk fazla iken, bu ekstrede görülen aktivite Gram pozitif bakterilere karşı DMSO'ya kıyasla 2-3 kat daha fazladır.

Tablo 3. *S. klenkii'*den elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri

	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. faecalis*	*C. albicans*
GPHF	-	-	-	+	-
N-Z Amin	-	-	-	++	+
Nişasta-Kazein	-	-	-	+	+

Aktivite çalışmalarının sonucuna bakıldığında, N-Z Amin besi yerinde fermantasyonu gerçekleşen *S. klenkii* organizmasının ürettiği ekstre *E. faecalis'*e ve *C. albicans'*a karşı aktivite göstermiştir. Bu ekstrenin *E. faecalis'e* karşı göstermiş olduğu aktivite, diğer besi yerlerinden elde edilen ekstrelere kıyasla daha yüksektir. En zayıf aktivite ise GPHF besi yerinde fermantasyonu sonucunda elde edilen ekstreye ait olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4. *S. smyrnaeus*'tan elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri

	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. faecalis*	*C. albicans*
GPHF	-	+	+	++	+++
N-Z Amin	-	+	-	+	+
ISP-2	-	+	-	+	+++

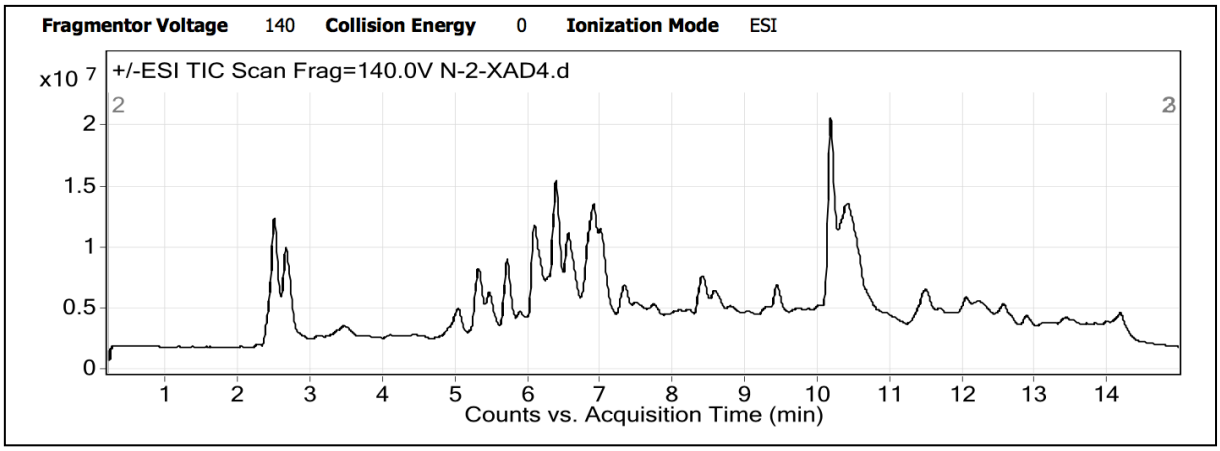
Tablo 4 incelendiğinde, GPHF besi yerinden elde edilen ekstre, aktivite çalışmasında kullanılan her iki Gram pozitif bakteriye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. *S. aureus'*a karşı tek antimikrobiyal etki gösteren ekstre olması *ve E. faecalis'e* karşı gösterdiği aktivitenin diğer ekstrelere oranla fazla olması önemlidir.

EKSTRELERİN LC-MS ANALİZİ

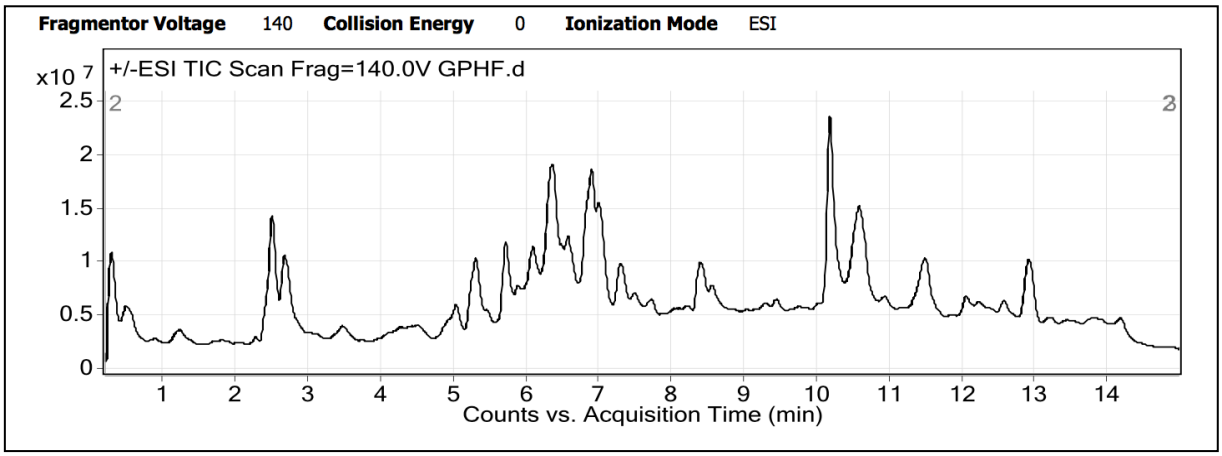
Büyük ölçekte kullanılacak besi yeri seçimi için, orta ölçekte fermantasyona tabi tutulan mikroorganizmaların optimum üreme gösterdiği besi yerini tespit etmek amacıyla LC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir**.** Elde edilen ekstreler 100 ppm konsantrasyonunda LC-MS kolonuna gönderildi ve ekstrelerin içeriğindeki bileşiklerin bolluğu kıyaslandı. LC-MS analizleri Agilent 6460 LC-MS cihazında gerçekleştirildi. Kapiler voltaj 3500 (+) 4000 (-) Volt; kolon Agilent Poroshell EC-C18, 2.7 µm, 4.6 mmx150 mm; kolon sıcaklığı 40 °C; akış hızı 0.6 mL/dk olarak ayarlandı. Yürütücü sistem olarak %90 H_2O %10 MeOH (%1 HCOOH) ile başlandı ve 7. dakikaya kadar %2 H_2O-%98 MeOH (%1 HCOOH) olacak şekilde gradient sistem kullanıldı. 7-10 dk arası sabit %2 H_2O-%98 MeOH (%1 HCOOH) ile devam edildi ve 16. dk'ya dek başlangıç sistemine dönüş yapıldı.

S. hoynatensis Organizmasından Elde Edilen Ekstrelerin LC-MS Analizi

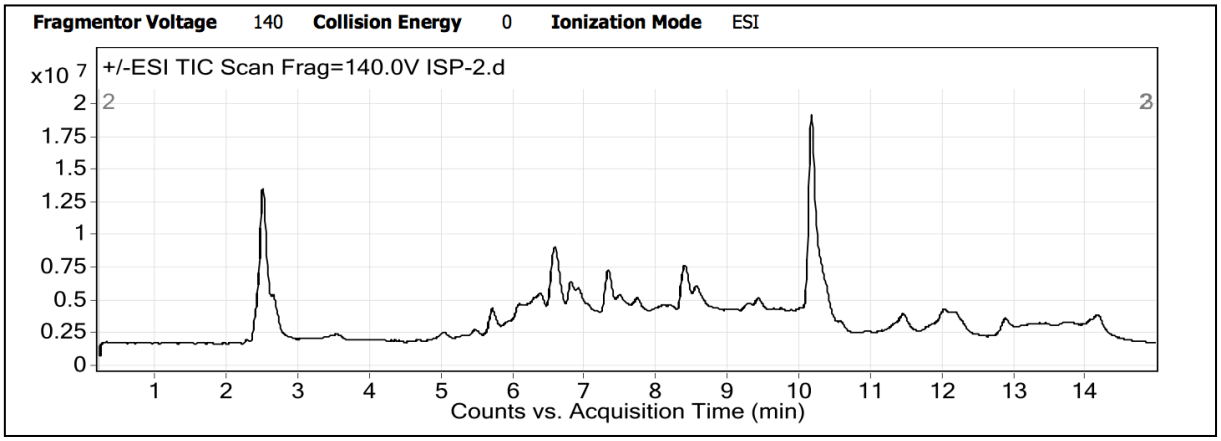
Orta ölçekteki GPHF, N-Z Amin ve ISP-2 besi yerlerinden (50 mL) elde edilen ekstrelerin LC-MS kromatogramları kıyaslandığında, GPHF ve N-Z Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitlerin içerik olarak hemen hemen aynı olduğu ve kromatogramda gözlenen piklerin benzer bollukta olması eşit miktarda numunede (100 ppm) bulunan sekonder metabolitlerin miktarının da aşağı yukarı eşit olduğu gözlenmektedir. Ancak orta ölçekte N-Z Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin miktarca fazla olması (Şekil 27, 28 ve 29) izolasyon çalışmalarında kolaylık sağlayacağından ve ayrıca N-Z Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin antimikrobiyal aktivitesinin diğer ekstrelere göre daha yüksek olması nedeniyle N-Z Amin besi yerinde büyük ölçekte fermantasyona karar verilmiştir.



Şekil 27. N-Z Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı



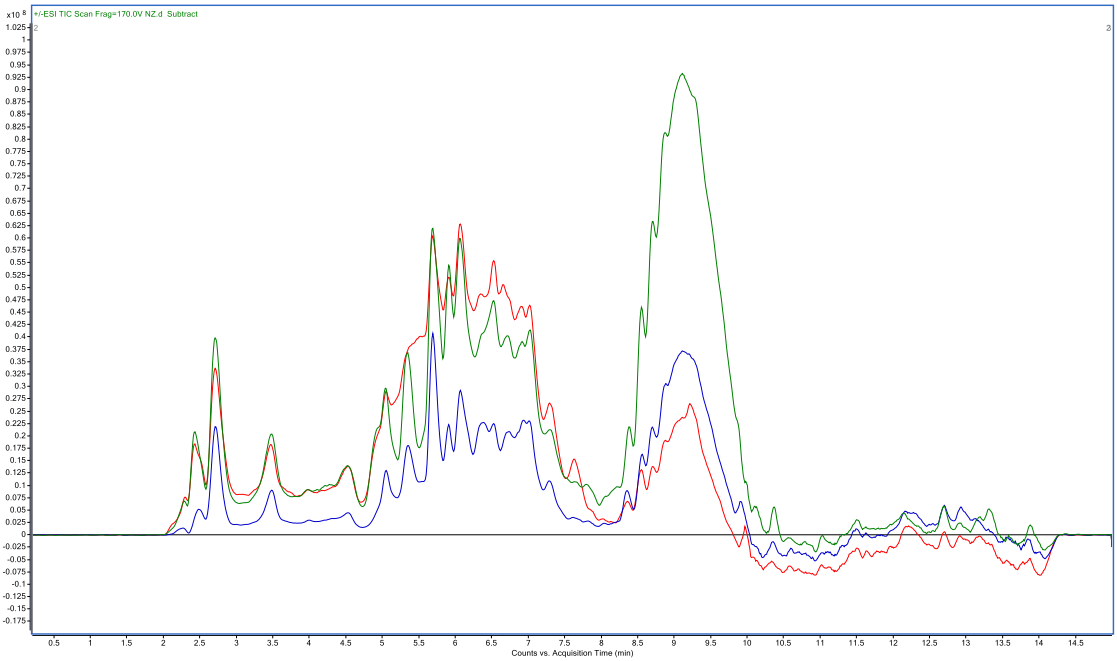
Şekil 28. GPHF besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı



Şekil 29. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı

S. klenkii Organizmasından Elde Edilen Ekstrelerin LC-MS Analizi

Orta ölçekteki GPHF, N-Z Amin ve Nişasta-Kazein besi yerlerinden (50 mL) elde edilen ekstrelerin LC-MS kromatogramları kıyaslandığında; Nişasta-Kazein, GPHF ve N-Z Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitlerin içerik olarak benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak bu kromatogramlar çakıştırıldığında N-Z Amin besi yerinde bulunan metabolitlerin miktarca üstünlüğü göze çarpmaktadır* (Şekil 30).



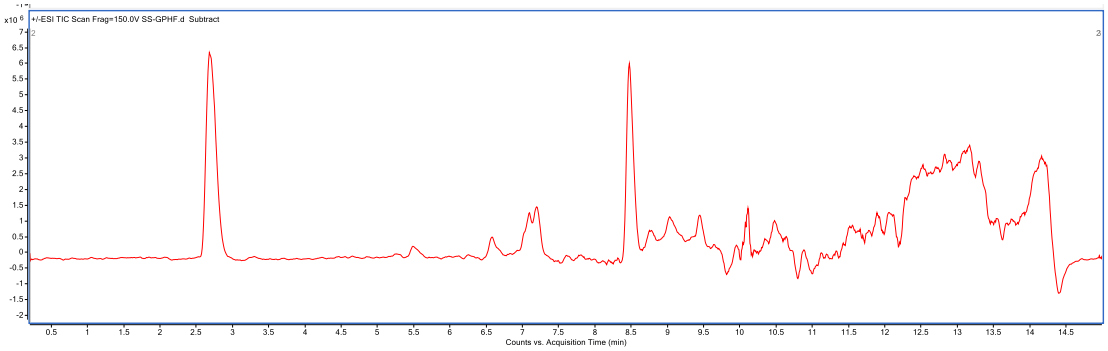
Şekil 30. N-Z Amin, GPHF ve Nişasta-Kazein besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstrelerin çakıştırılmış LC-MS kromatogramları.

**Yeşil renk ile gösterilen kromatogram N-Z Amin, kırmızı renk ile gösterilen kromatogram GPHF ve mavi renk ile gösterilen kromatogram Nişasta-Kazein besi yerinden elde edilen ekstreye aittir.

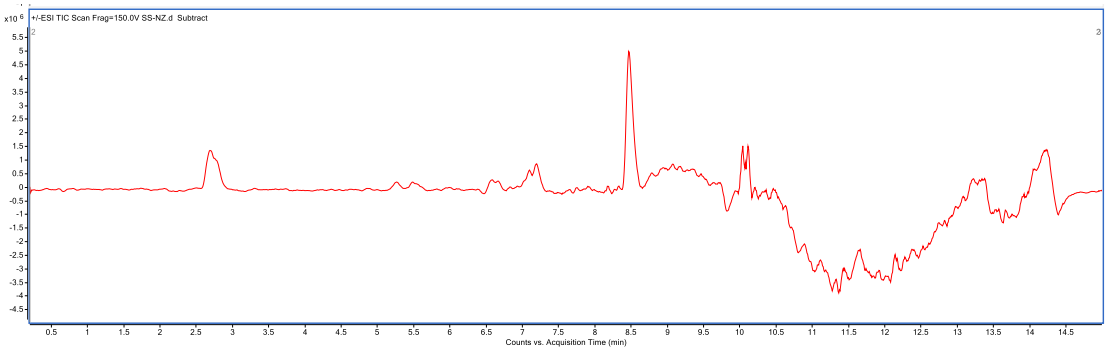
Aynı zamanda aktivite çalışmaları sonucuna bakıldığında N-Z Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin diğer besi yerlerinden elde edilen ekstrelere kıyasla daha aktif olduğu görülmüştür. LC-MS analiz sonuçları ile aktivite çalışmaları sonuçlarının uyumlu olması nedeniyle mikroorganizmanın büyük ölçekte fermantasyonu için N-Z Amin besi yeri seçilmiştir.

S. smyrneaus Organizmasından Elde Edilen Ekstrelerin LC-MS Analizi

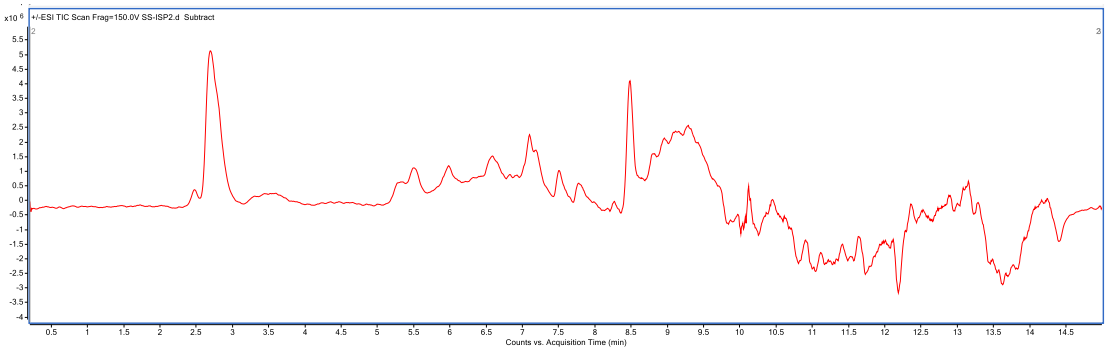
S. smyrneaus mikroorganizmasının üretildiği orta ölçekteki GPHF, N-Z Amin ve ISP-2 besi yerlerinden (50 mL) elde edilen ekstrelerden alınan LC-MS kromatogramları kıyaslandığında (Şekil 31, 32 ve 33) her bir besi yerinden elde edilen ekstrelere ait kromatogramda gözlenen piklerin 10^6 bollukta olduğu ve sekonder metabolit içeriklerinin benzer olduğu görülmektedir.



Şekil 31. GPHF besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı.



Şekil 32. N-Z Amin besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı.



Şekil 33. ISP-2 besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı.

Büyük ölçekte fermantasyon için besi yeri seçimi, LC-MS analizinden elde edilen sonuçlar benzer olduğu için antimikrobiyal aktivite çalışması sonucu göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Orta ölçekte GPHF besi yerinde çoğalan mikroorganizmadan elde edilen ekstrenin düşük konsantrasyonda diğer ekstrelere kıyasla daha aktif olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple büyük ölçekte fermantasyon için GPHF besi yeri seçilmiştir.

BÜYÜK ÖLÇEKTE FERMANTASYON

Orta ölçekte 50 mL besi yerinde üretilmiş mikroorganizmalardan belli miktarda çekilerek büyük ölçekteki 1.5-2 L besi yeri içeren erlenlere aktarılması ile büyük ölçekte fermantasyon gerçekleştirilmiştir. İşlemin basamakları Şekil 34'te sunulmuştur.

S. hoynatensis Organizmasının Büyük Ölçekte Fermantasyonu

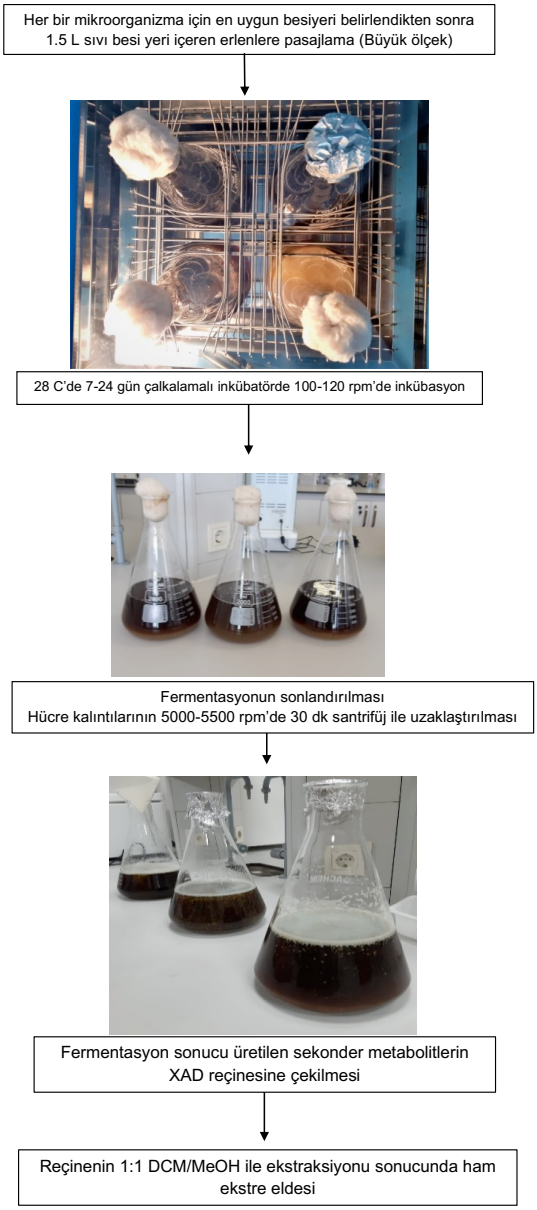
Orta ölçekte (50 mL) N-Z Amin besi yerindeki mikroorganizmalardan 15 mL çekilerek 1.5 L besi yeri içeren 4 adet 2 L lik erlene alınmış, çalkalamalı inkübatörde 21 gün boyunca 28°C'de 100 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Ekstre miktarını arttırmak için *S. hoynatensis* mikroorganizması, orta ölçekte üretilmiş olan (50 mL) N-Z Amin besi yerindeki mikroorganizmalardan 15 mL çekilerek 1.5 L besi yeri içeren 6 adet 2 L lik erlene alınmış, çalkalamalı inkübatörde 18 gün boyunca 28 °C'de 120 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir.

S. klenkii Organizmasının Büyük Ölçekte Fermantasyonu

Orta ölçekte (50 mL) NZ-Amin besi yerindeki mikroorganizmalardan 11 mL çekilerek 1.5 L NZ-Amin besi yeri içeren 4 adet 2 L lik erlene alınmış, çalkalamalı inkübatörde 24 gün boyunca 28 °C'de 120 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir.

S. smyrnaeus Organizmasının Büyük Ölçekte Fermantasyonu

Orta ölçekte (50 mL) GPHF besi yerindeki mikroorganizmalardan 15 mL çekilerek 1.5 L GPHF besi yeri içeren 4 adet 2 L lik erlene alınmış, çalkalamalı inkübatörde 7 gün boyunca 28 °C'de 120 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Ekstre miktarını arttırmak amacıyla *S. smyrnaeus* ikinci kez canlandırılıp çoğaltılmış ve fermantasyonu aynı koşularda gerçekleştirilmiştir. 2. fermantasyonda toplam 4 L besi yerinde aynı işlemler (Şekil 34) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 34. Mikroorganizmaların büyük ölçekte fermantasyonu ve besi yerinin reçine ile ekstraksiyonu ile ilgili çalışmaların akış şeması.

EKSTRAKSİYON VE FRAKSİYONLANDIRMA

S. hoynatensis'ten Ham Ekstre Eldesi

21 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen toplam 6 L besi yeri hücre kalıntılarından kurtarılmak için 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Dekante edilerek besiyerleri birleştirildi ve XAD-4 (20 g/L) eklenip 16 saat bekletildi. Süzülerek besi yerinden uzaklaştırılan XAD-4 reçinesi önce iki kez ultra saf su ile yıkandı, daha sonra diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde 100 rpm 'de çalkalanarak 5-6 saat bekletildi. İşlem üç kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen toplam ham ekstre 10.5 g olarak tartılmıştır.

Ekstre miktarını arttırmak için fermantasyon işlemi tekrarlanmıştır. 18 günlük inkübasyon süresi sonunda toplam kontamine olmayan 3 L besiyeri (Diğer erlenlerde kontaminasyon gözlendi) hücre kalıntılarından kurtarılmak için 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Dekante edilerek besi yerleri birleştirildi ve XAD-16 (20 g/L) eklenip 16 saat bekletildi. Süzülerek besi yerinden uzaklaştırılan XAD-16 reçinesi önce iki kez ultra saf su ile yıkandı, daha sonra diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde 120 rpm'de çalkalanarak 5-6 saat bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Daha önce 6 L'lik besi yerinden elde ettiğimiz 10.5 g lık ekstre (1. Fermantasyon) ve 3 L lik besi yerinden elde ettiğimiz ekstreler (2.2 g) birleştirilerek elde edilen toplam ham ekstre 12.7 g olarak tartıldı.

S. hoynatensis'ten elde edilen toplam ham ekstre (12.7 g) su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, diklorometan, etil asetat ve bütanol çözücüleri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan: 20.0 mg
DCM: 1.3 g
EtOAc: 440.0 mg
BuOH: 3.92 g

*S. klenkii'*den Ham Ekstre Eldesi

24 günlük inkübasyon süresi sonunda toplam 6 L besiyeri, hücre kalıntılarından kurtarılmak için 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Dekante edilerek besi yerleri birleştirildi ve XAD-16 (20 g/L) eklenip 20 saat bekletildi. Böylece sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu sağlandı. Süzülerek besi yerinden uzaklaştırılan XAD-16 reçinesi önce iki kez ultra saf su ile yıkandı, daha sonra diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde 120 rpm 'de çalkalanarak 5-6 saat bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen toplam ham ekstre 2.1 g olarak tartılmıştır.

S. klenkii'den elde edilen ham ekstre su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, diklorometan, etil asetat ve butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan: 21.5 mg
DCM: 319.6 mg
EtOAc: 52.1 mg
BuOH: 539.8 mg

S*. smyrnaeus*'tan Ham Ekstre Eldesi

Gerçekleştirilen iki fermantasyon işleminin 7 günlük inkübasyon süresi sonunda toplam 6+4 L besi yeri, hücre kalıntılarından kurtarılmak için 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Dekante edilerek besi yerleri birleştirildi ve XAD-16 (20 g/L) eklenip 20 saat bekletildi. Böylece sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu sağlandı. Süzülerek besiyerinden uzaklaştırılan XAD-16 reçinesi önce iki kez ultra saf su ile yıkandı, daha sonra diklormetan:metanol (1:1) içeren çözücüde 120 rpm 'de çalkalanarak 5-6 saat bekletildi. İşlem iki kez tekrarlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. 1. fermantasyon sonucunda 1.54 g ham ekstre elde edilirken 2. fermantasyondan 1.01 g ham ekstre elde edilmiştir. Elde edilen toplam ham ekstre 2.55 g olarak tartılmıştır.

S. smyrnaeus mikroorganizmasının büyük ölçekte fermantasyonunun ardından elde edilen ham ekstre su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, diklorometan, etil asetat ve butanol çözücüleri ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan: 47.5 mg

DCM: 458.7 mg

EtOAc: 92.9 mg

BuOH: 246.9 mg

İZOLASYON VE SAFLAŞTIRMA

Mikroorganizmaların fermantasyon süreci sonunda reçine ile ekstrakte edilen besi yerlerinden elde edilen ham ekstrelerin hekzan, diklorometan, etil asetat ve butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonlar izolasyona tabi tutulmuştur.

Elde edilen bu fraksiyonlar HPLC'de ayrıma tabi tutulmadan önce H_2O'dan CH_3OH'e doğru azalan polaritede gradient çözücü sistemi kullanarak çeşitli profil denemeleri yapıldı ve uygun metotların geliştirilmesi sağlandı. Saflaştırmalar Water HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmaların saflaştırılmasında Kromasil C-18 kolon (21.2x250 mm) kullanılmıştır. Her bir metotta akış hızı 9 mL/dk olarak tatbik edilmiştir. Her bir fraksiyon için uygulanan izolasyon koşulları ve preperatif HPLC kromatogramları sunularak ve maddelerin retensiyon zamanları da verilerek **Bulgular** bölümünde açık bir şekilde sunulmuştur. Belirtilen retensiyon sürelerinde maddeler toplanmış ve çözücüleri uçurularak saf halde elde edilmişlerdir.

KULLANILAN SPEKTROSKOPİK TEKNİKLER

İzole edilen saf bileşiklerin yapıları başta ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve APT gibi 1D-NMR teknikleri olmak üzere, HSQC, HMBC, COSY ve NOESY gibi 2D-NMR teknikleri ve LC-Q-TOF-MS kullanılarak açıklanmıştır.

SAF BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

İzole edilen saf bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları antimikrobiyal ve antiproliferatif aktivite testleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Ekstrelere de uygulandığı şekilde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsünün CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (180).

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları ve bu türlere ait antibiyotiklere dirençli izolatlar kullanıldı. Bakteriler Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

- *Staphylococcus aureus* izolatı MRSA (Metisiline Dirençli *S. aureus*) olduğu için tüm beta laktam antibiyotiklere dirençlidir. Ayrıca gentamisine ve siprofloksasine dirençlidir.
- *Enterococcus faecalis* izolatı vankomisine dirençli (VRE)'dir.
- *E. coli* izolatı, Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz Enzimi (ESBL) içerir ve bu nedenle tüm oksiiminobetalaktam antibiyotiklere dirençlidir. Ayrıca siprofloksasine dirençlidir.
- *Pseudomonas aeruginosa* izolatı siprofloksasine ve gentamisine dirençlidir.
- *C. albicans* izolatı flukonazole dirençlidir.

Meropenem (Sigma), imipenem (Sigma), siprofloksasin (Sigma), vankomisin (Mayne Pharma), ampisilin (Sigma), gentamisin (Sigma), seftazidim (TÜM Ekip İlaç), flukonazol (Sigma) saf olarak kullanıldı ve stok çözeltileri CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda uygun çözücülerde çözülüp stok solüsyonları hazırlanarak mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları araştırıldı. Çalışmada Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) ve Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck) ve 3-[N-morpholino]-

propansulfonic acid (MOPS) (Sigma) ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI-1640 (Sigma) besi yeri kullanıldı. RPMI-1640 besiyeri süzülerek, diğer besi yerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

MHA plaklarında üretilmiş olan kolonilerden steril serum fizyolojik içerisine süspanse edilerek bulanıklık 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ayarlandı. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı kullanılarak belirlendi. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek $5x10^5$ CFU/mL yoğunluğunda kullanıldı.

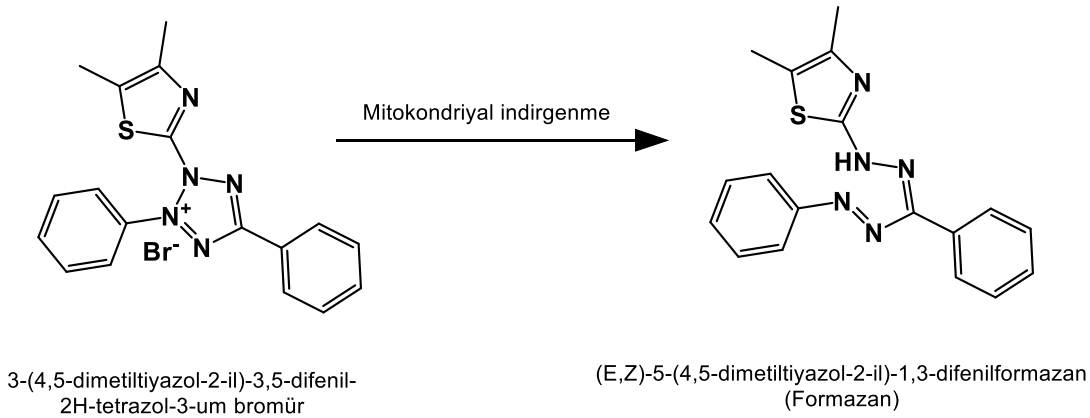
SDA plaklarında üretilmiş olan maya kolonilerinden steril serum fizyolojik içerisine süspanse edilerek bulanık 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ayarlandı. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı kullanılarak belirlendi. Maya süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra önce 1/100, sonra 1/20 oranında dilüe edilerek $2.5x10^3$ CFU/mL yoğunluğunda kullanıldı.

Mikrodilüsyon plaklarının tüm kuyularına 100 µL mikroorganizmaya uygun besi yeri eklendikten sonra, stok solüsyonları hazırlanan antimikrobiyal ajanlar, mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µL hacimde eklendi ve böylece stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmış oldu. Aktivitesi tespit edilecek olan maddeler DMSO içerisinde çözüldü ve mikroplaklarda dilüe edildi. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltıldı. Maddelerin 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/mL konsantrasyonları elde edilmiş oldu. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10µL inokülasyon yapıldı. Her mikrodilüsyon plağında sadece besi yeri+mikroorganizma içeren, sadece besi yeri içeren kontrol kuyucukları kullanıldı. Ayrıca kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkilerine bakıldı. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C'de 18-24 saat, maya inoküle edilmiş plaklar ise 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. MİK değerleri, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak saptandı.

Antiproliferatif Aktivite Testleri

Antiproliferatif ve sitotoksik etkinlik için HeLa, MCF-7 ve MEF hücre hatlarına karşı, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testi olarak bilinen MTT metodu uygulanmıştır. Sitotoksisite belirleme metodlarından biridir. Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları gerek uygulama kolaylığı gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir (181,182). Sitotoksisite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (183). Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır. Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksisite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan, çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir (184,185).

Sitotoksisite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (186-188). Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksi fenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfo fenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyolet, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır (188).



Şekil 35. MTT Testi reaksiyonu

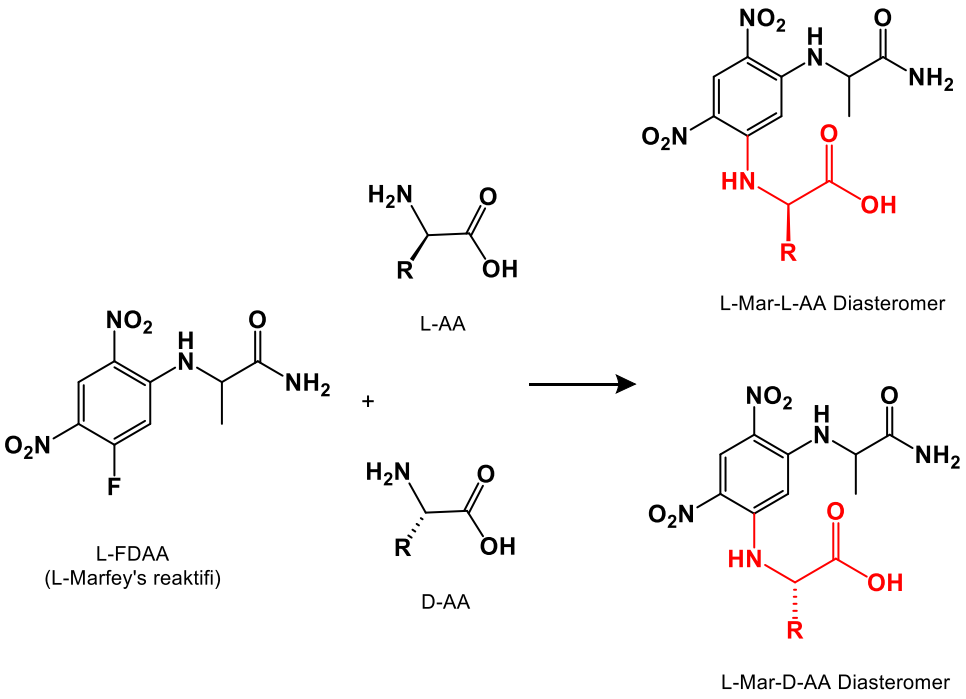
Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmesi, formazan denilen yapıya dönüşmesini sağlayarak renk değişikliğini beraberinde getirir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler (Şekil 35). Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Bu değişimin *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır. Hücre içine girebilen MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondri enzimleri tarafından indirgenen sarı renkli MTT maddesinin, mor renkli suda çözünmeyen kristallere dönüşmesi prensibine dayanmaktadır (189). Meydana gelen kristallerin üzerine DMSO eklenmekte ve 492 nm'de absorbansı belirlenmektedir. Belirlenen absorbanslara göre %hücre canlılıkları ve hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değerleri hesaplanmaktadır (182,189).

MTT yöntemi için hücreler pasajlama işlemine tabi tutulmuştur ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalara ekim yapılmış, (180 µL) ve 24 saat 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda saf bileşiklerden her bir kuyuya 20 µL eklenip ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 20 µL MTT boyası ilave edilerek (5 mg/mL suda hazırlanmış) 2-4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde plakadaki tüm sıvı uzaklaştırılmış ve plaka içerisine 200 µL DMSO ilave edilerek spektrofotometrede 492 nm'de absorbansları belirlenmiştir (190).

MARFEY'S ANALİZİ

Amino asitlerin D ve L- enantiyomerlerini kromatografik olarak ayırmanın iki yolu vardır: İlk yaklaşım D/L- amino asit enantiyomerlerini ayırmak için kiral sabit fazların kullanılmasıdır (191), diğer yaklaşım ise amino asitleri bir kiral türevlendirme maddesi ile türevlendirmek ve ardından elde edilen diastereomerlerin standart akiral kromatografi ortamında ayrılmasıdır (192).

Yapısı aydınlatılan dipeptit yapısındaki yeni moleküllerin mutlak konfigürasyonunu saptamak amacıyla Marfey's analizi uygulanmıştır. Marfey's yöntemi ilk olarak 1984'te (193) doğal ürünlerdeki hidrolitik olarak elde edilen amino asit kalıntılarının mutlak konfigürasyonlarını belirlemek için popüler ve etkili bir prosedür olarak ortaya çıkmıştır. Bu analizde kullanılan Marfey reaktifi, 1-floro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamid (L-Mar), yaygın bir kiral amino asit türevlendirme maddesidir. Bu reaktif, asidik çözücü sistemleri ile standart ters faz ortamında çoğu D/L-amino asit enantiyomerinin L-Mar türevi diastereomerlerine çevirerek iyi bir şekilde ayrılmasını sağlar (Şekil 36).



Şekil 36. Marfey's reaksiyonu

L-Marfey's reaktifi ile standart D/L- amino asidler ve izole edilen bileşikler Şekil 36'da gösterilen mekanizma gösterildiği şekilde (L-Mar-L/D-AA) diastereomerlerine dönüşmektedir. Diastereomerlerin fiziksel özelliklerinin farklı olması sebebiyle, oluşan standart amino asitlerin diastereomer türevlerinin (L-Mar-L/D-AA) kolonu terk etme süresi spesifiktir. Dolayısıyla peptitler hidrolize uğratıldıktan sonra elde edilen aminoasitlerin diastereomer türevlerinin retensiyon zamanı ile standart amino asit diastereomer türevlerinin retensiyon zamanı kıyaslanarak stereokimya aydınlatılmaktadır. Bu yöntemde aşağıda belirtilen adımlar kullanılmıştır:

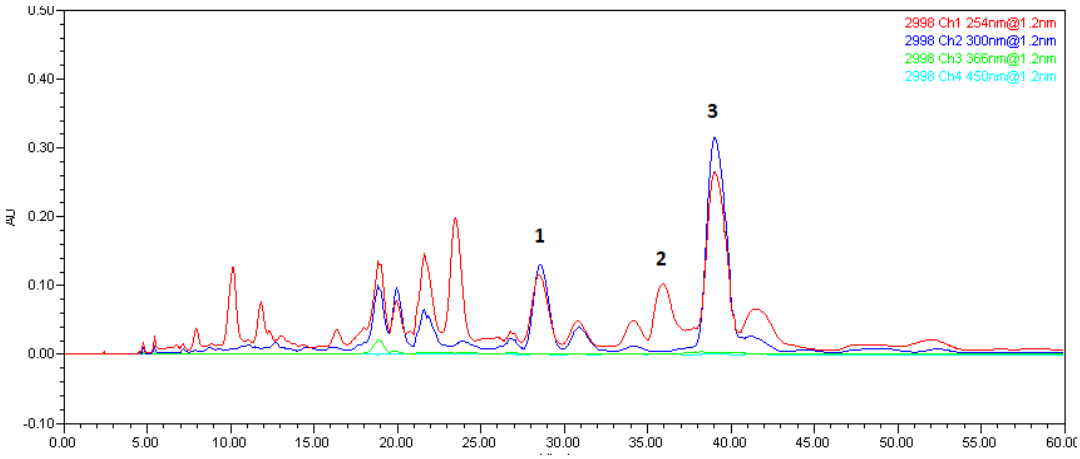
(i) Bileşikler (0.2 mg), amino asit kalıntılarını serbest bırakmak için 1 mL 6 M HCl asidi ile hidrolize tabi tutuldu.
(ii) 16 saat boyunca 110 °C'de reaksiyon gerçekleştirildi.
(iii) Oda sıcaklığına geldiğinde dönerbuharlaştırıcıda kurutuldu ve 100 µL H_2O eklendi.
(iv) Hidrolizat, 100 µL 1M $NaHCO_3$ eklenerek alkali koşullar altında %1 FDAA ((2,4-dinitro-5-florofenil)-1-alaninamid) ile 500 µL aseton içinde türevlendirildi.
(v) 40 °C'de 1 saat reaksiyon gerçekleştirildi.
(vi) Oda sıcaklığına geldikten sonra 2M HCl 50 µL eklenerek nötralize edildi (Şekil 36).
(vii) Türevlendirilmiş amino asitlerin HPLC alıkonma süreleri, türevlendirilmiş L ve D standart amino asitler ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

HPLC ANALİZ SONUÇLARI

S. hoynatensis'ten İzolasyon Çalışmaları

Diklorometan ekstresinin (1.3 g) saflaştırılmasında 60 dk boyunca %65 H_2O-%35 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılmıştır (Şekil 37).



Şekil 37. *S. hoynatensis* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı.

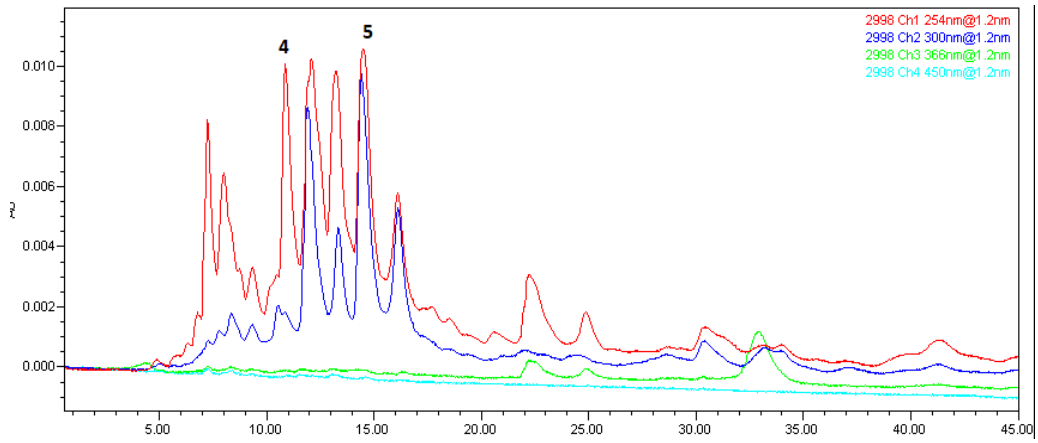
28-30 dk arasında toplanan **1** nolu maddenin miktarı 3.6 mg,

35-37 dk arasında toplanan **2** nolu maddenin miktarı 30.1 mg,

38-40 dk arasında toplanan **3** nolu maddenin miktarı 6.6 mg olarak tartılmıştır.

10. dakika ve 12. dakikada toplanan maddelerin miktarları çok düşük olduğu için ^{1}H-NMR alınamamıştır.

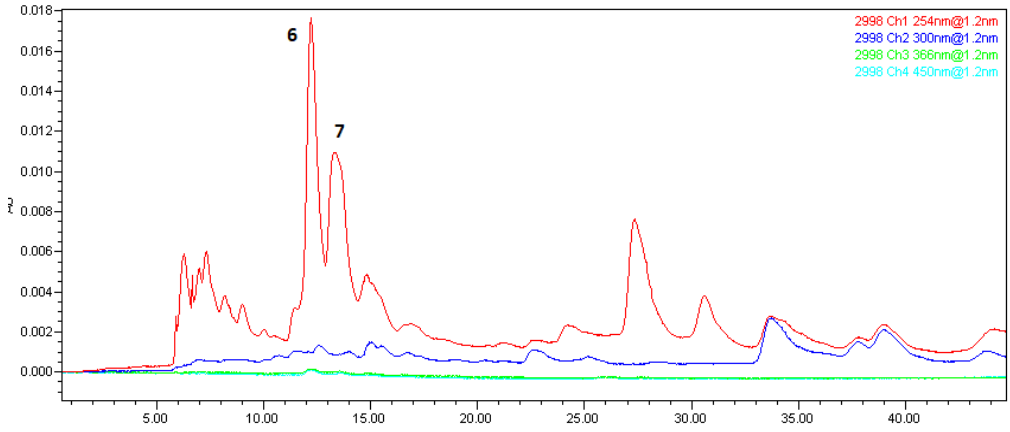
Ham ekstreden elde edilen kromatogramda (Şekil 37) 18-22 dk aralığında toplanan maddeler saf olmadıklarından birleştirilip 45 dk boyunca HPLC'de 1:1 H_2O/MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılarak tekrar saflaştırılmıştır (Şekil 38).



Şekil 38. 18-22 dk aralığında toplanan fraksiyonların yeniden saflaştırılması.

Yukarıdaki kromatogramda 11-12 dk aralığında toplanan **4** nolu madde 12.8 mg, 14-15 dk aralığında toplanan **5** nolu bileşik ise 6.6 mg olarak tartılmıştır.

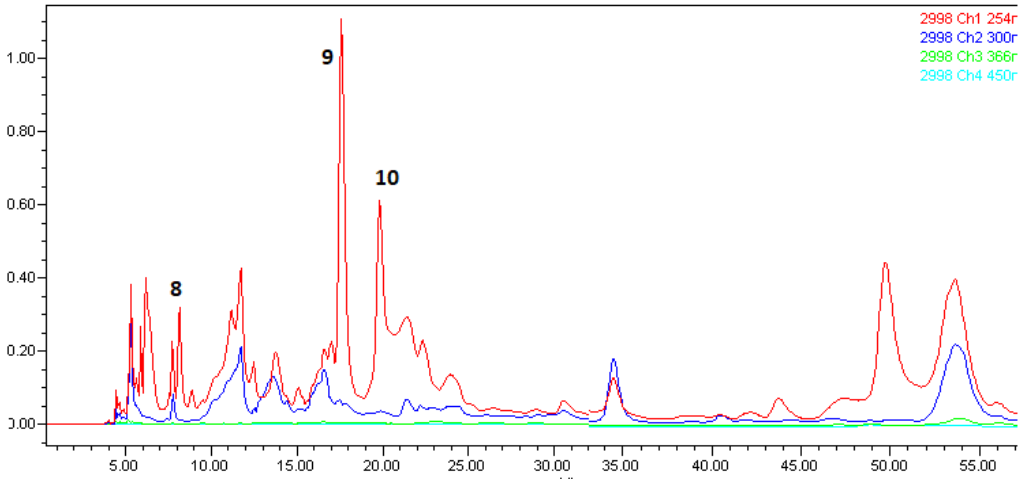
Ham ekstreden elde edilen kromatogramda (Şekil 37) 23-24 dk arasında toplanan fraksiyonun miktarı 31.7 mg olarak tartılmıştır. Ancak ^{1}H-NMR verileri incelendiğinde saf olmadığı anlaşılmış ve yeniden saflaştırılmıştır. 45 dk boyunca %45 H_2O-%55 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılmıştır (Şekil 39).



Şekil 39. 23-24 dk aralığında toplanan fraksiyonun yeniden saflaştırılması

Yukarıdaki kromatogram ile izolasyon çalışması tamamlanmış; 12. dakikada toplanan **6** nolu madde 15 mg ve 13-14 dakika aralığında toplanan **7** nolu madde 5 mg olarak tartılmıştır.

Etil asetat ekstresinin saflaştırılması 60 dk boyunca %75 H_2O-%25 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. *S. hoynatensis* organizmasından elde edilen etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı.

7.7-8. dk arasında toplanan fraksiyon 1.5 mg olarak tartılmıştır. Ancak miktarı az olduğundan yapı aydınlatma gerçekleştirilememiştir.

8-8.5. dk arasında toplanan **8** nolu maddenin miktarı 1.7 mg,

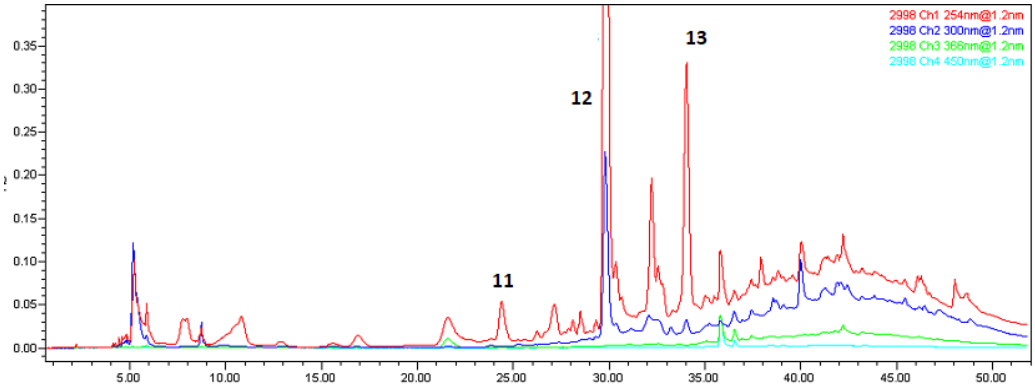
17-18 dk arasında toplanan **9** nolu maddenin miktarı 2.8 mg,

20-21 dk arasında toplanan **10** nolu maddenin miktarı 4.8 mg olarak tartılmıştır.

35-36 dk arasında toplanan fraksiyon 6.8 mg olarak tartılmıştır. Ancak alınan NMR spektrumları incelendiğinde karışım olduğu anlaşılmıştır ve başarılı bir şekilde tekrar saflaştırılamamıştır.

Bütanol ekstresinin saflaştırılmasında kullanılan yöntem şu şekildedir (Şekil 41):

- 0-15 dk %95 H_2O- %5 MeOH çözücü sistemi
- 15-45 dk %5 MeOH'den %100 MeOH'e varan gradient çözücü sistemi,
- 45-52 dk %100 MeOH çözücüsü kullanılarak izolasyon çalışmaları yapılmıştır



Şekil 41. *S. hoynatensis* bütanol ekstresine ait HPLC kromatogramı.

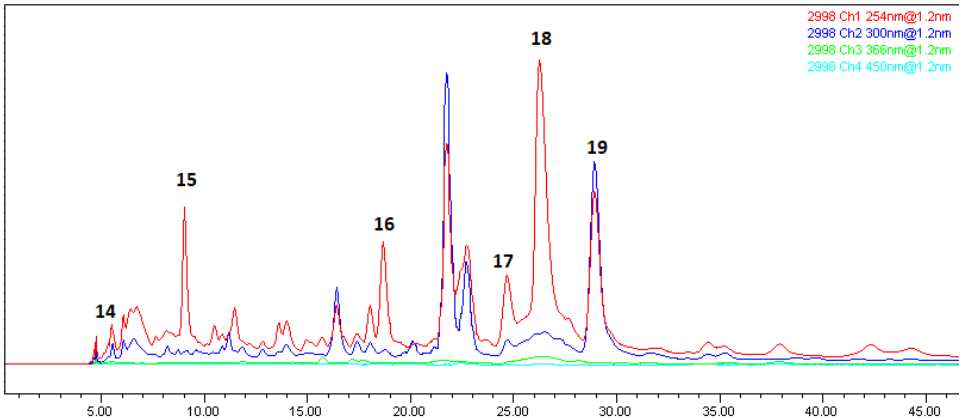
24-25 dk arasında toplanan **11** nolu maddenin miktarı 3.4 mg,

29.5-30 dk arasında toplanan **12** nolu maddenin miktarı 4.8 mg,

34. dakikada toplanan **13** nolu maddenin miktarı 6.1 mg olarak tartılmıştır.

S. klenkii'den İzolasyon Çalışmaları

Diklorometan ekstresinin saflaştırılmasında 45 dk boyunca %60 H_2O-%40 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılmıştır (Şekil 42).



Şekil 42. *S. klenkii* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı.

6. dk da toplanan **14** nolu maddenin miktarı 3.1 mg,

9. dk'da toplanan **15** nolu maddenin miktarı 2 mg,

18.5 dk'da toplanan **16** nolu maddenin miktarı 10.0 mg,

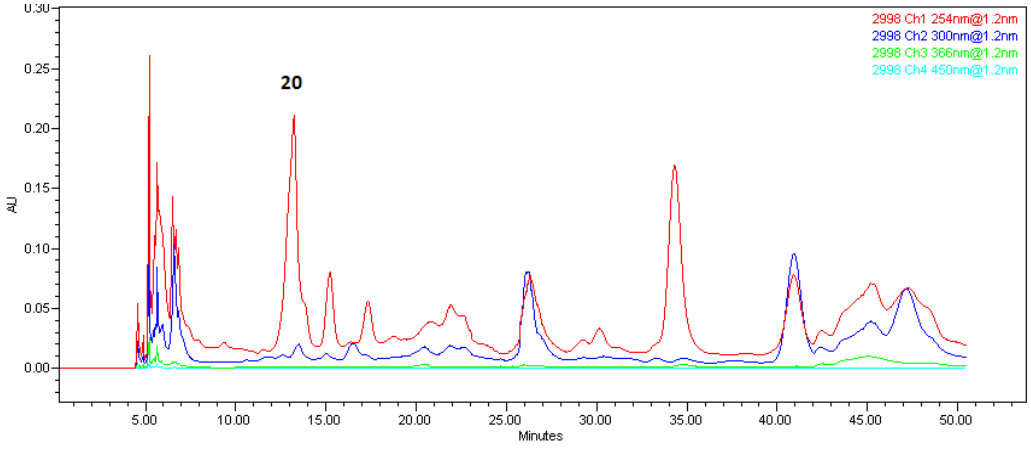
24. dk'da toplanan **17** nolu maddenin miktarı 24.2 mg,

26. dk'da toplanan **18** nolu maddenin miktarı 24.2 mg,

28. dk'da toplanan **19** nolu maddenin miktarı 2.0 mg olarak tartılmıştır.

16. dk'da toplanan fraksiyonun miktarı 5.0 mg olarak ve 21.5 dk'da toplanan fraksiyonun miktarı 14.3 mg olarak tartılmıştır. Ancak alınan NMR spektrumundan her iki bileşiğin de saf olmadığı görülmüştür.

Etil asetat ekstresinin saflaştırılması 45 dk boyunca %70 H_2O-%30 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 43).



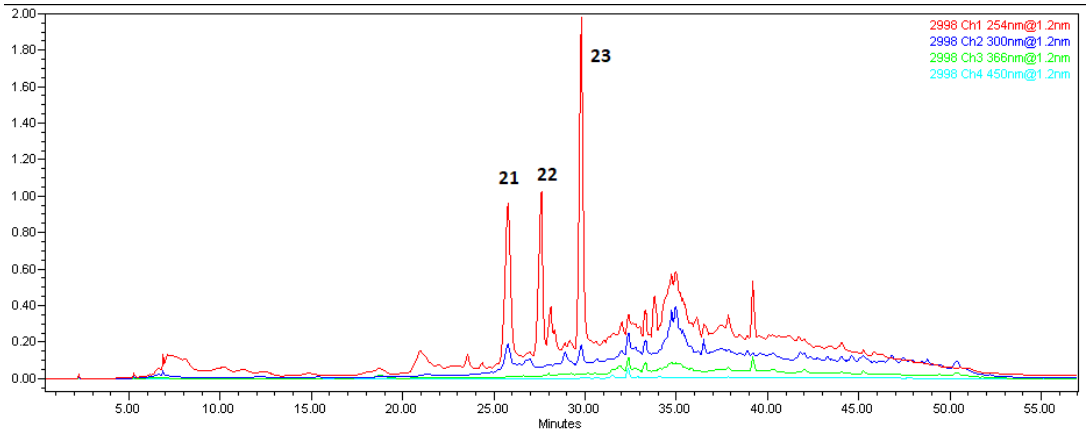
Şekil 43. *S. klenkii* organizmasının etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı.

13. dakikada toplanan **20** nolu maddenin miktarı 3.5 mg olarak tartılmıştır.

34-35. dakika arasında toplanan maddenin miktarı 1.0 mg olarak ve 41-42 dakika arasında toplanan maddenin miktarı 1.7 mg olarak tartılmıştır. Miktarları az olduğu için yapı aydınlatma çalışmaları gerçekleştirilememiştir.

Bütanol ekstresinin saflaştırılmasında kullanılan yöntem şu şekildedir:

- 0-10 dk %90 H_2O-%10 MeOH çözücü sistemi
- 10-45 dk %10 MeOH'den %100 MeOH'e varan gradient çözücü sistemi kolondan geçirilmiştir. HPLC kromatogramı Şekil 44'te sunulmuştur.



Şekil 44. *S. klenkii* organizmasının bütanol ekstresine ait HPLC kromatogramı.

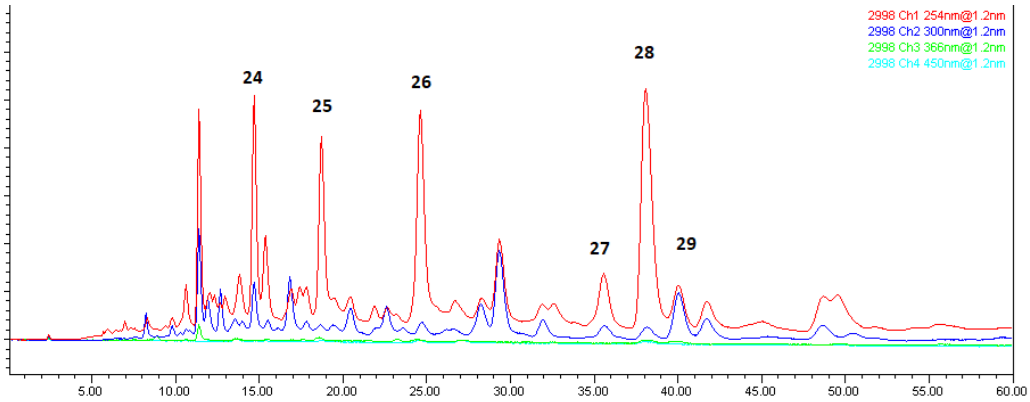
22-23 dk arasında toplanan **21** nolu maddenin miktarı 4.7 mg,

25.5-26 dk arasında toplanan **22** nolu maddenin miktarı 2.4 mg,

27.5-28.dk arasında toplanan **23** nolu maddenin miktarı 3.2 mg olarak tartılmıştır.

S. smyrneaus'tan İzolasyon Çalışmaları

Diklorometan ekstresinin saflaştırılmasında 60 dk boyunca %65 H_2O-%35 MeOH izokratik çözücü sistemi kullanılmıştır (Şekil 45).



Şekil 45. *S. smyrnaeus* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı

14. dakikada toplanan **24** nolu madde miktarı 3.2 mg,

18-19 dakika arasında toplanan **25** nolu maddenin miktarı 5 mg,

24-25. dakika arasında toplanan **26** nolu maddenin miktarı 4.5 mg,

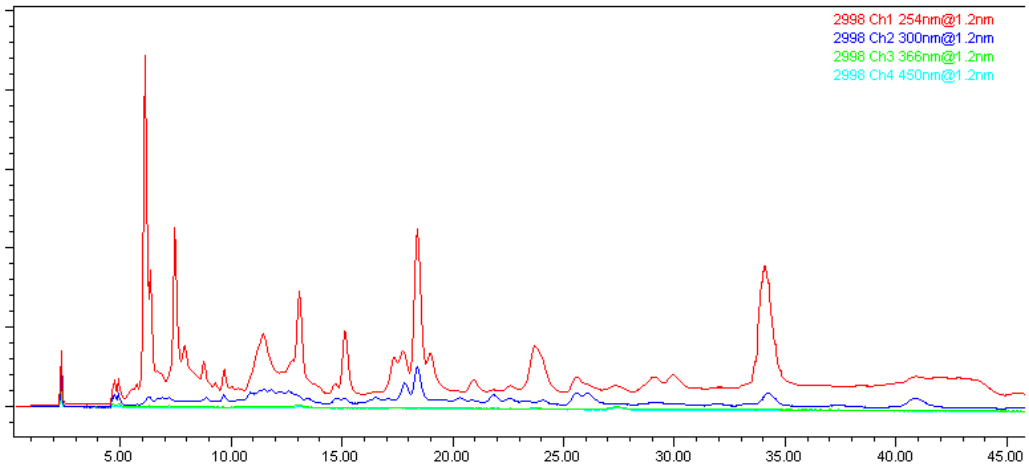
36. dakikada toplanan **27** nolu madde 3.5 mg,

37-39 dakika arasında toplanan **28** nolu madde 4.6 mg,

40. dakikada toplanan **29** nolu madde 7.8 mg olarak tartılmıştır.

Etil asetat ekstresinin saflaştırılmasında kullanılan yöntem şu şekildedir:

- 0-35 dk %70 H_2O-%30 MeOH izokratik çözücü sistemi,
- 35-40 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e varan gradient çözücü sistemi,
- 40- 45 dk %100 MeOH çözücüsü kullanılmıştır (Şekil 46).



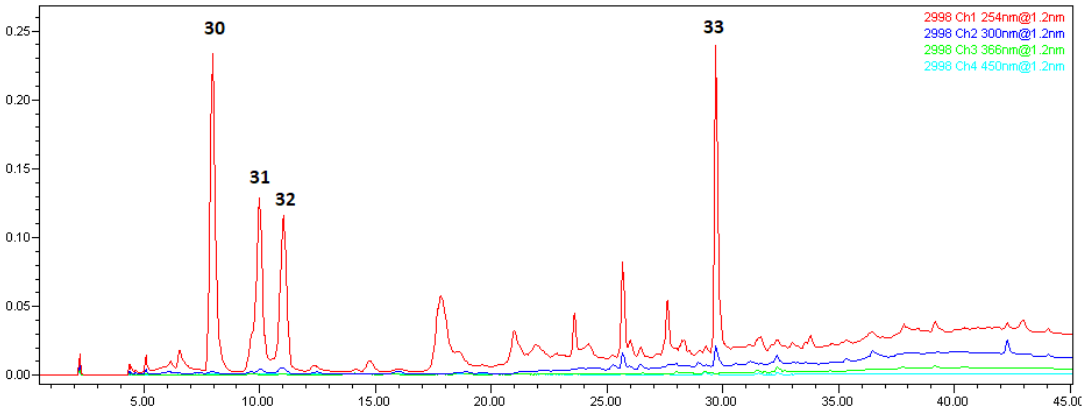
Şekil 46. *S. smyrnaeus* organizmasının etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı

18-19 dakika arasında toplanan madde 2.4 mg, 23-24 dakika arasında toplanan madde 3.6 mg ve 33.5-35 dakika arasında toplanan madde miktarı 2.7 mg olarak tartılmıştır.

Etil asetat fazından elde edilen bu bileşiklerin ^{1}H-NMR spektrumları alındıktan sonra yeterince saf olmadıkları anlaşılmıştır. Miktarları çok az olduğundan tekrar izolasyon gerçekleştirilmemiştir.

Bütanol ekstresinin saflaştırılmasında kullanılan yöntem şu şekildedir:

- 0-10 dk %90 H_2O-%10 MeOH,
- 10-45 dk %10 MeOH'den %100 MeOH'e varan gradient çözücü sistemi kullanılarak izolasyon çalışmaları yapılmıştır (Şekil 47).



Şekil 47. *S. smyrnaeus* organizmasının BuOH ekstresine ait HPLC kromatogramı

7.5-8 dakika arasında toplanan **30** nolu maddenin miktarı 2.8 mg,

10. dakikada toplanan **31** nolu maddenin miktarı 2.6 mg,

11. dakikada toplanan **32** nolu maddenin miktarı 2.9 mg,

30. dakikada toplanan **33** nolu maddenin miktarı 3.2 mg olarak tartılmıştır.

TARTIŞMA

İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLERİN SPEKTRAL ÖZELLİKLERİ

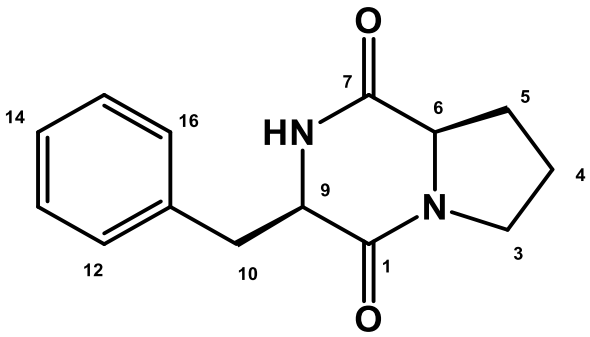
S. hoynatensis'ten İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

Diklorometan ekstresinden (1.3 g) **Siklo-L-prolin-L-fenil alanin (1)**, **Siklo-L-prolin-D-valin (2)**, **Siklo-D-prolin-L-fenil alanin (3)**, **Siklo-L-prolin-L-tirozin (4)**, **Hoynatenamit (5)**, **Siklo-L-prolin-L-izolösin (6)** ve **Siklo-L-prolin-D-lösin (7)** olmak üzere 7 bileşik saflaştırılmıştır.

Etil asetat ekstresinden (440 mg) **Meletamid (8)**, **Siklo-L-prolin-L-tirozin (9)** ve **L-lösin (10)** olmak üzere 3 bileşik saflaştırılmıştır.

Bütanol ekstresinden (3.92 g) **Meletamid (11)**, **L-Triptofan (12)** ve **Siklo-L-prolin-L-tirozin (13)** olmak üzere 3 bileşik saflaştırılmıştır.

Siklo-L-prolin-L-fenil alanin (1)



Şekil 48. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin

Bileşiğin görünüşü beyaz-krem toz şeklindedir.

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ –74° (c. 0.1, 20 °C, metanolde) olarak ölçülmüştür ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (194).

UV (MeOH) λ_{max} nm: 218, 280 nm

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3225 (NH gerilmesi), 2957 (C-H gerilmesi), 1651 (Amit C=O), 1452 (CH_2 eğilmeleri), 750 (Ar-H eğilmesi)

Bileşiğin yapısı yapılan 1D, 2D NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri (Şekil 49-53) sayesinde, Siklo-L-prolin-L-Fenil alanin (siklo-S-prolin-S-fenil alanin) olarak belirlenmiştir (Şekil 48) (194). NMR değerleri Tablo 5'te sunulmuştur.

^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde amino asitler için spesifik alfa hidrojen bölgesinde 2 adet sinyal olduğu görülmüştür. Böylece molekülün dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

^{1}H NMR spektrumunda 4.07 ppm'de sinyal veren α-hidrojenin bağlı olduğu karbon değeri, HSQC spektrumundan (Şekil 51) 60.4 ppm (C-6) olarak belirlenmiştir.

HMBC korelasyonları incelendiğinde (Şekil 52) bu α-hidrojenin 29.7 ppm'de C-3 ve 171.5 ppm'de C-7 ile korelasyon verdiği gözlenmiştir. H-3 protonu 3.35-3.54 ppm'de sinyal vermiş, HMBC spektrumu incelendiğinde komşu karbonlar 23.1 ppm (C-4) ve 29.7 ppm'de (C-5) ile sinyal verdiği görülmüştür. Prolin amino asidi için karakteristik proton sinyalleri 3.35 ve 3.54 ppm (H-3), 1.79 ppm (H-4) ve 2.08 ppm ve 1.22 ppm'de (H-5) görülmüştür. Böylece amino asitlerden birisinin prolin olduğu anlaşılmıştır.

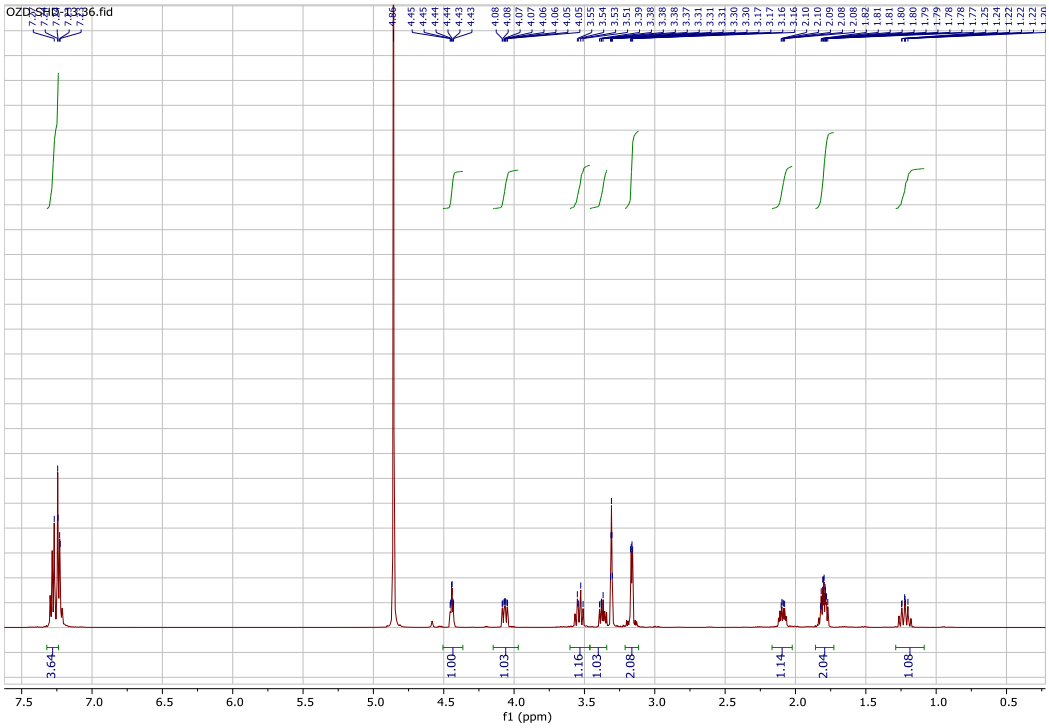
Diğer α-hidrojen ise 4.44 ppm'de sinyal vermiş, bağlı olduğu karbonun değeri HSQC spektrumunda 58.0 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. HMBC spektrumu incelendiğinde komşu karbon C-10 ile 38.5 ppm'de korelasyon verdiği gözlenmiştir. 7.20-7.27 ppm aralığında aromatik halkaya ait proton sinyalleri gözlenmiş, bu protonların 5H integral değerine sahip olması ve multiplet olarak gözlenmesi sebebiyle non-sübstitüe benzen halkası olduğu anlaşılmıştır. Böylece bu amino asidin fenil alanin olduğu anlaşılmış ve siklodipeptit yapısının siklo-L-prolin-L-fenilalanin olduğu sonucuna varılmıştır.

Bileşiğe ait LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{14}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 245.1282 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. Hesaplanan değer $C_{14}H_{17}N_2O_4$ için 245.1290 olarak bulunmuştur (Şekil 53).

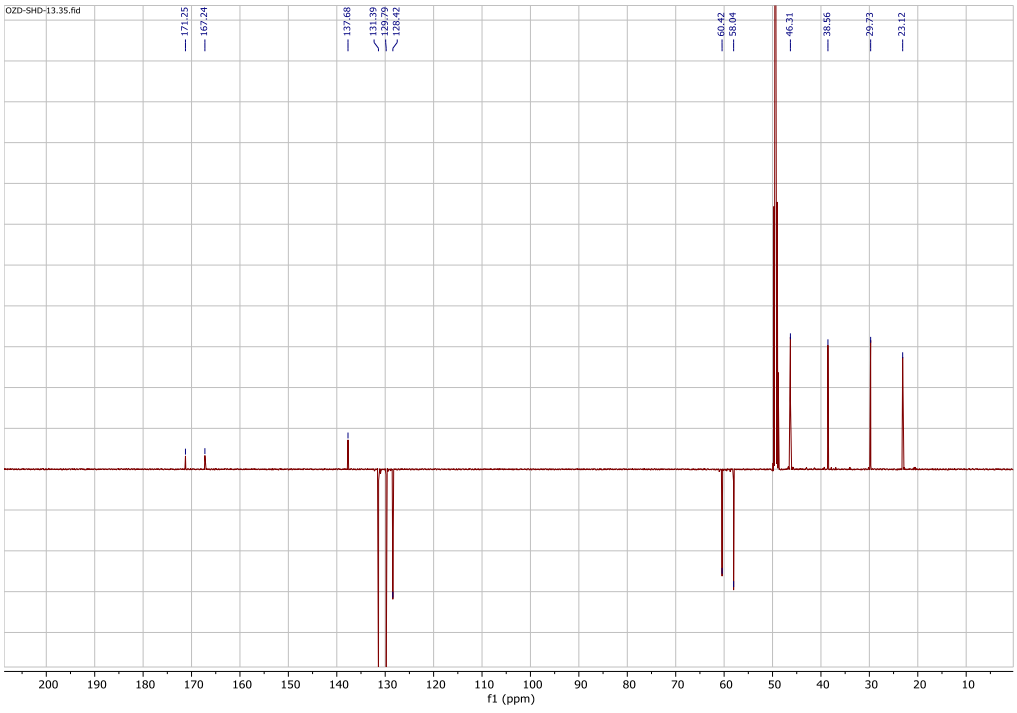
Tablo 5. Siklo- L-Prolin-L-Fenil alanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz)

Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	167.2	**-**
3	3.35 (m, 1H) 3.54 (m, 1H)	46.2	C-4, C-5
4	1.79 (m, 2H)	23.1	C-3, C-5
5	2.08 (m, 1H) 1.22 (m, 1H)	29.7	C-3, C-6, C-7
6	4.06 (ddd, *J* = 10.8, 6.3, 1.9 Hz, 1H)	60.4	C-1, C-5, C-7
7	-	171.5	-
9	4.44 (td, *J*= 5.0, 1.9 Hz, 1H)	58.0	C-10
10	3.16 (m, 2H)	38.5	C-1, C-11, C-16, C-9
11	-	137.7	-
12	7.20-7.27 (m, 5H)	129.8	C-10, C-11
13		140.2*	-
14		127.1*	-
15		131.4	C-11, C-16
16		128.4	C-10, C-11, C-12

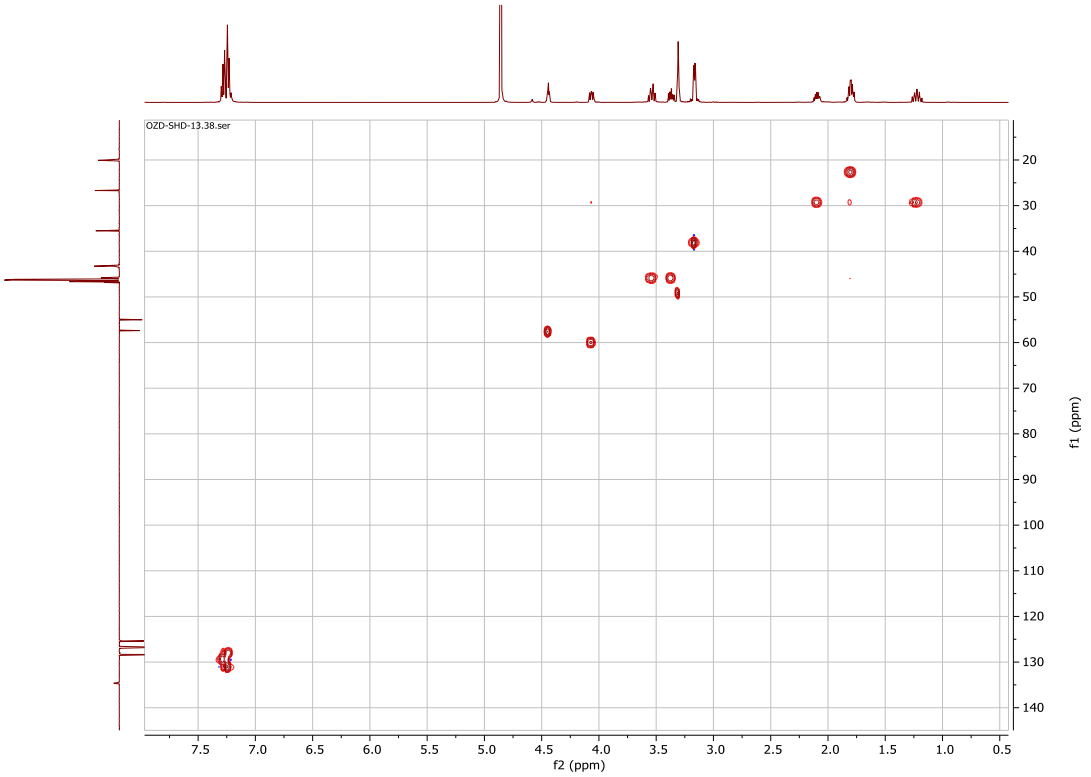
*İşaret ile belirtilen kuaterner karbonlar HMBC'den belirlenmiştir.



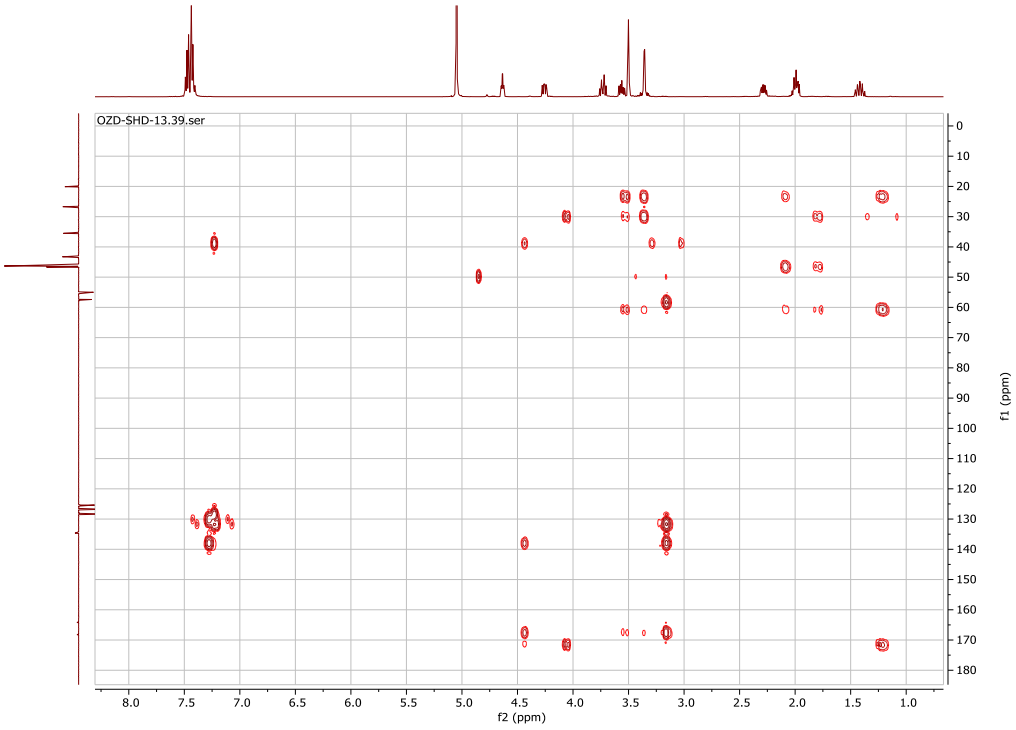
Şekil 49. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



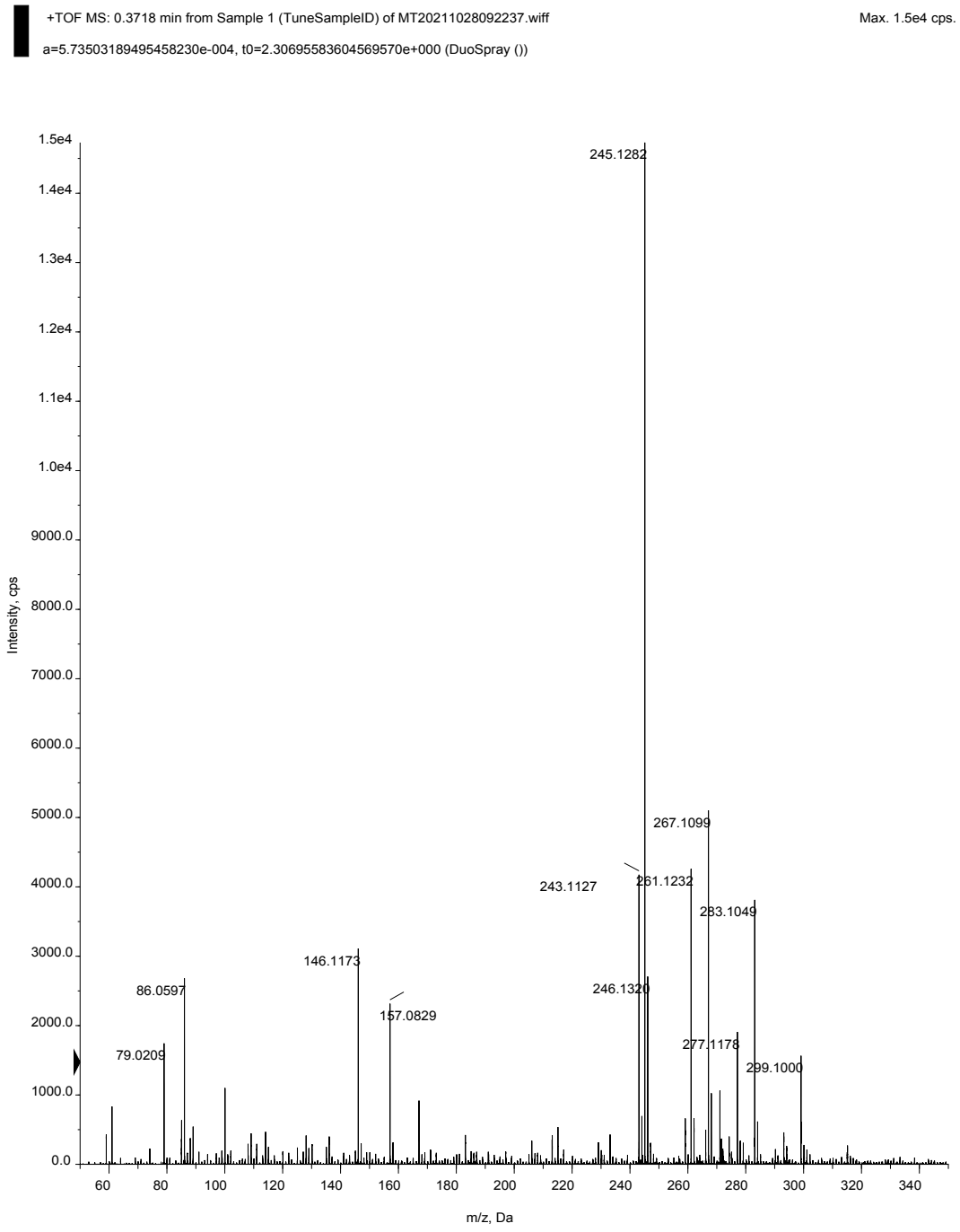
Şekil 50. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 51. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HSQC spektrumu

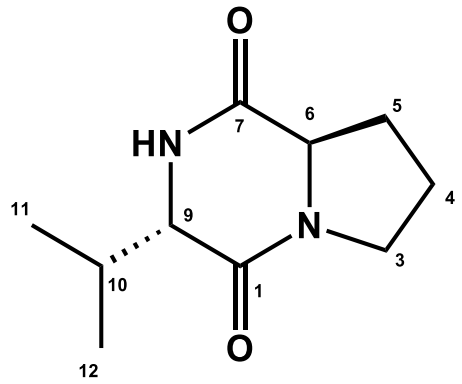


Şekil 52. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 53. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF- kütle spektrumu

Siklo-L-Prolin-D-Valin (2)



Şekil 54. Siklo-L-Prolin-D-Valin

Bileşiğin görünümü beyaz kristal şeklindedir. Bileşiğin yapısı 1D-, 2D-NMR ve LC-Q-TOF-MS verileri kullanılarak çözülmüştür (Şekil 55-60). NMR değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Molekülün yapısı Siklo-L-prolin-D-valin (Siklo-S-prolin-R-Valin) olarak belirlenmiştir (Şekil 54). Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ –70° (c. 0.1, 20 °C, Metanol) olarak ölçülmüştür (195). NMR değerleri Tablo 6'da sunulmuştur.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205

IR (ATR) v_{max} (cm^{-1}) 3225 (NH gerilmesi), 2958 (C-H gerilmesi), 1638 (Amit C=O), 1445 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde amino asitler için spesifik alfa hidrojen bölgesinde 2 adet sinyal olduğu görülmüştür. Böylece molekülün dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

^{1}H NMR spektrumundan (Şekil 55) α-hidrojenlerden birisinin 4.07 ppm'de (H-6) sinyal verdiği, bu protonun bağlı olduğu karbon değerinin HSQC'den (Şekil 57) 59.6 ppm (C-6) olduğu bulunmuştur. ^{1}H NMR spektrumunda 2.25-2.40 ppm (H-5), 2.01-1.89 ppm (H-4) ve 3.61-3.52 ppm'de (H-3) görülen sinyallerin prolin amino asidi için karakteristik olması, amino asitlerden birisinin prolin olduğunu göstermiştir.

Diğer amino asidin α-hidrojeni 3.94 ppm'de (H-9) sinyal vermiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 61.2 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir.

HMBC spektrumu incelendiğinde H-9 α-hidrojeninin, 29.2 ppm (C-10), 20.0

ppm (C-11, -CH_3), 16.8 ppm (C-12, -CH_3) ile korelasyonu bu amino asidin valin olduğunu düşündürmektedir ve 165.7 ppm'de (C-1) gözlenen karbon atomu ile korelasyon verdiği görülmüştür.

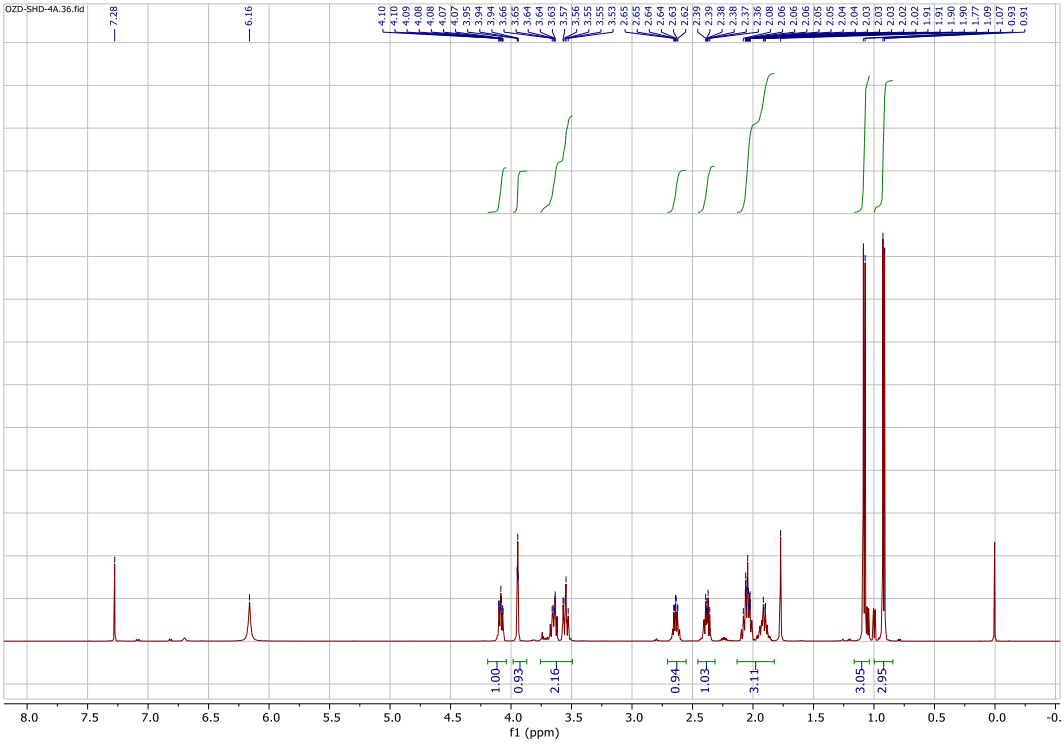
COSY spektrumuna bakıldığında (Şekil 59), 1.06 (H-11) ve 0.91 ppm'de (H-12) sinyal veren valin amino asidinin uç metillerinin 2.60 ppm'deki proton (H-10) ile korelasyon verdiği görülmüştür. 3.94 ppm'de (H-9) sinyal veren α-hidrojen de 2.60 ppm'deki proton (H-10) ile korelasyon vermiştir.

COSY spektrumuna bakıldığında (Şekil 59), 2.25 ve 2.40 ppm'de sinyal veren protonlar (H-5), 4.09 ppm'de (H-6) sinyal sinyal veren α-hidrojen ile korelasyon yapmaktadır. 4.09 ppm'de (H-6) sinyal sinyal veren α-hidrojen ise 2.01 ve 1.89 ppm'deki (H-4) protonlar, 2.25 ve 2.40 ppm'deki (H-5) protonları ile korelasyon verdiği görülmüştür. Böylece molekülün yapısı Siklo-prolin-valin olarak belirlenmiştir.

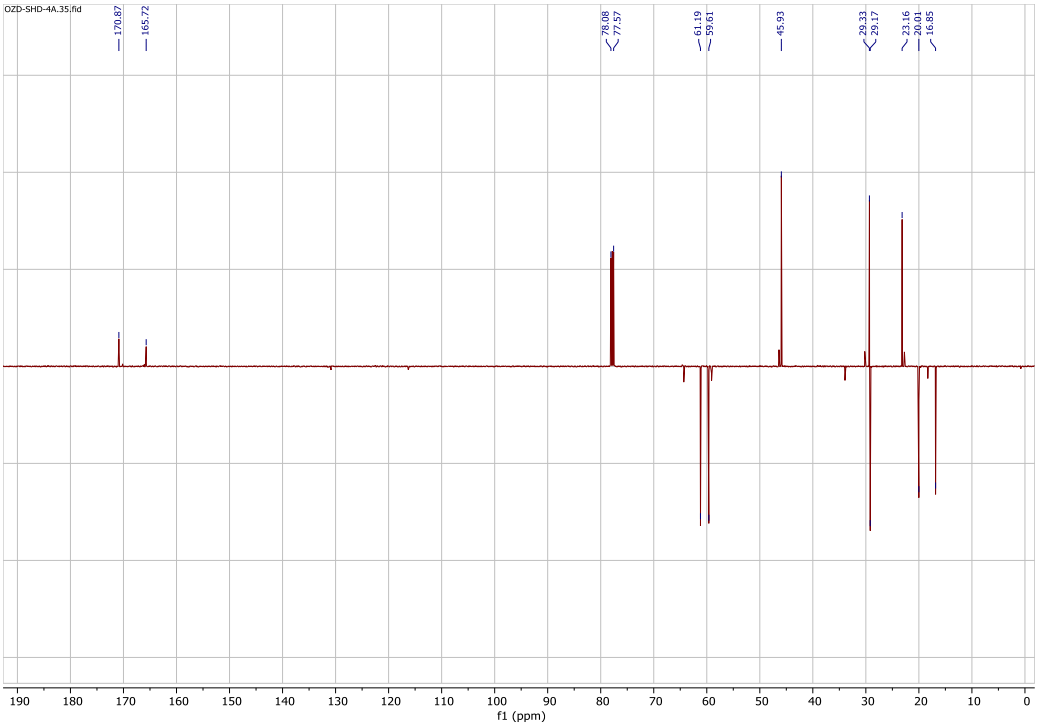
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{10}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 197.1297 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. Hesaplanan değer $C_{10}H_{17}N_2O_2$ için 197.1290 olarak bulunmuştur (Şekil 60).

Tablo 6. Siklo-L-prolin-D-valin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri ($CDCl_3$, 500 MHz)

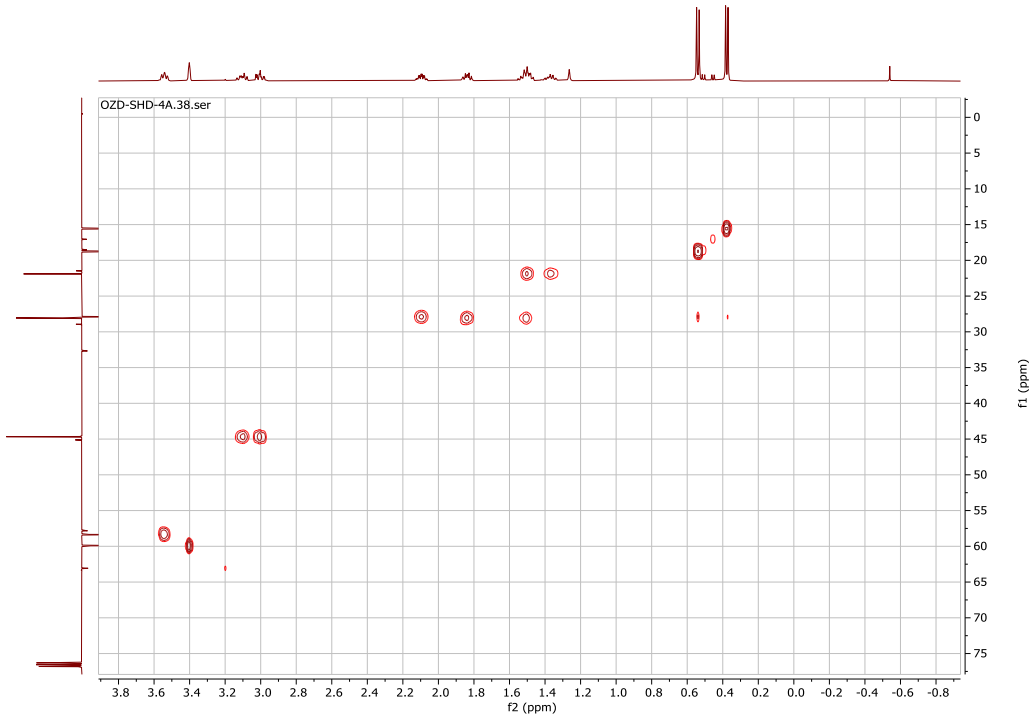
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC	COSY
1	-	170.8	-	-
2	-	-	-	-
3	3.61 (m, 1H) 3.52 (m, 1H)	45.9	C-4, C-5	H-4, H-5
4	2.01(m, 1H) 1.89 (m, 1H)	23.1	C-3, C-5, C-6	H-3
5	2.25 (m, 1H) 2.40 (m, 1H)	29.1	C-4, C-6, C-7	H-6
6	4.09 (m, 1H)	59.6	C-4, C-1	H-4, H-5
7	-	165.7	-	-
9	3.94 (m, 1H)	61.2	C-1, C-7, C-10, C-11, C-12	H-10
10	2.60 (m, 1H)	29.0	C-9, C-11, C-12	H-11, H-12
11	1.06 (d, *J*=6.5, 3H)	20.0	C-1, C-7, C-10, C-9, C-12	H-10
12	0.91 (d, *J*=6.5, 3H)	16.8	C-1, C-7, C-10, C-9, C-11	H-10



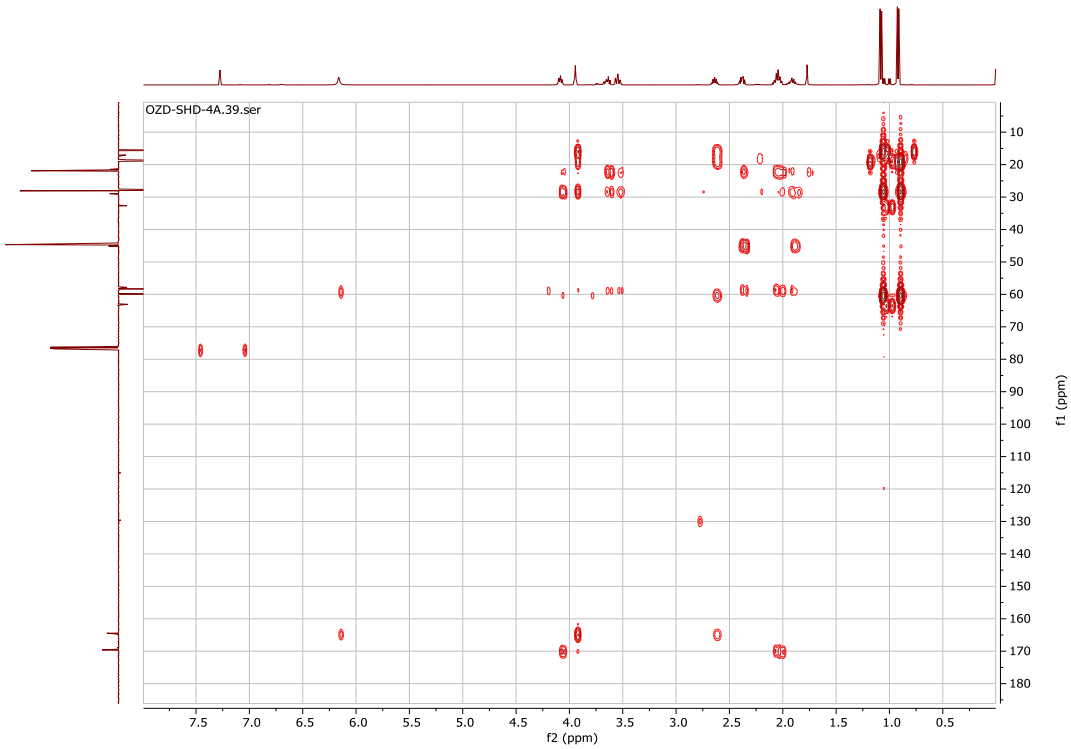
Şekil 55. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



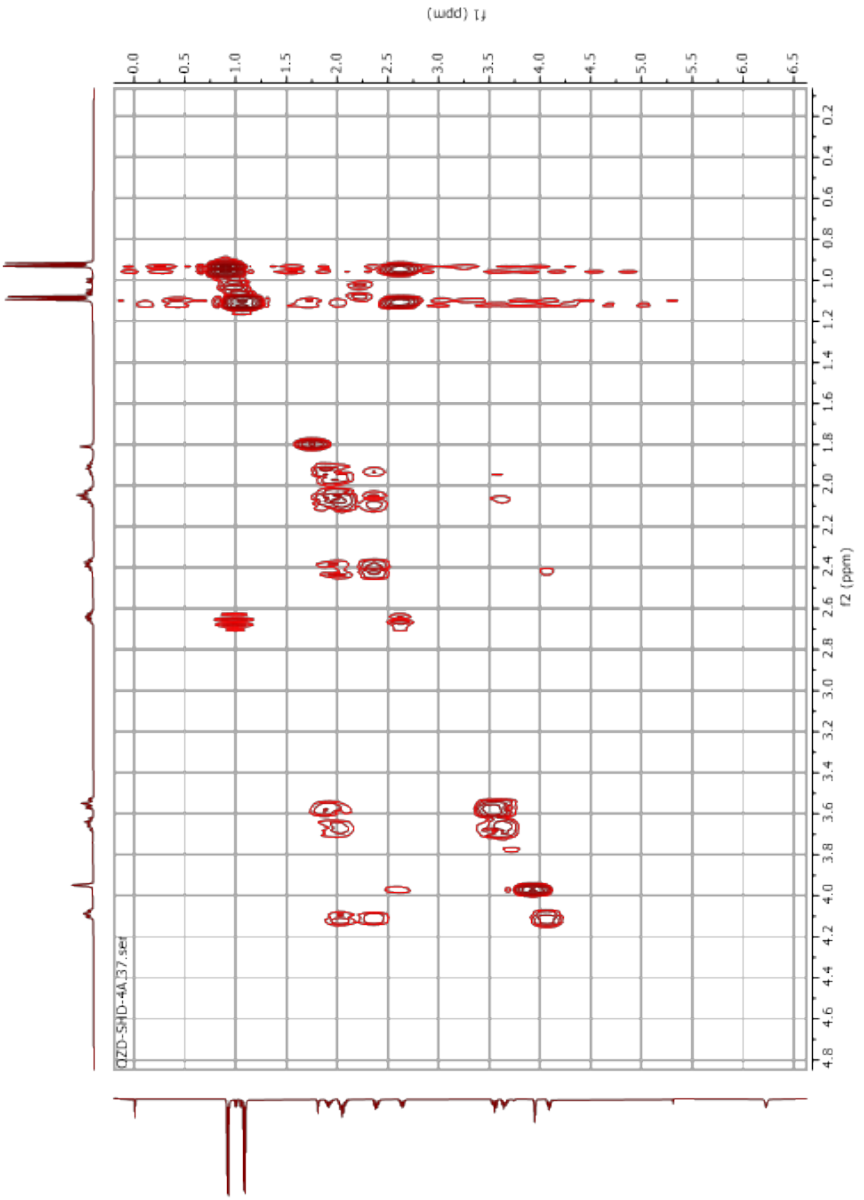
Şekil 56. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



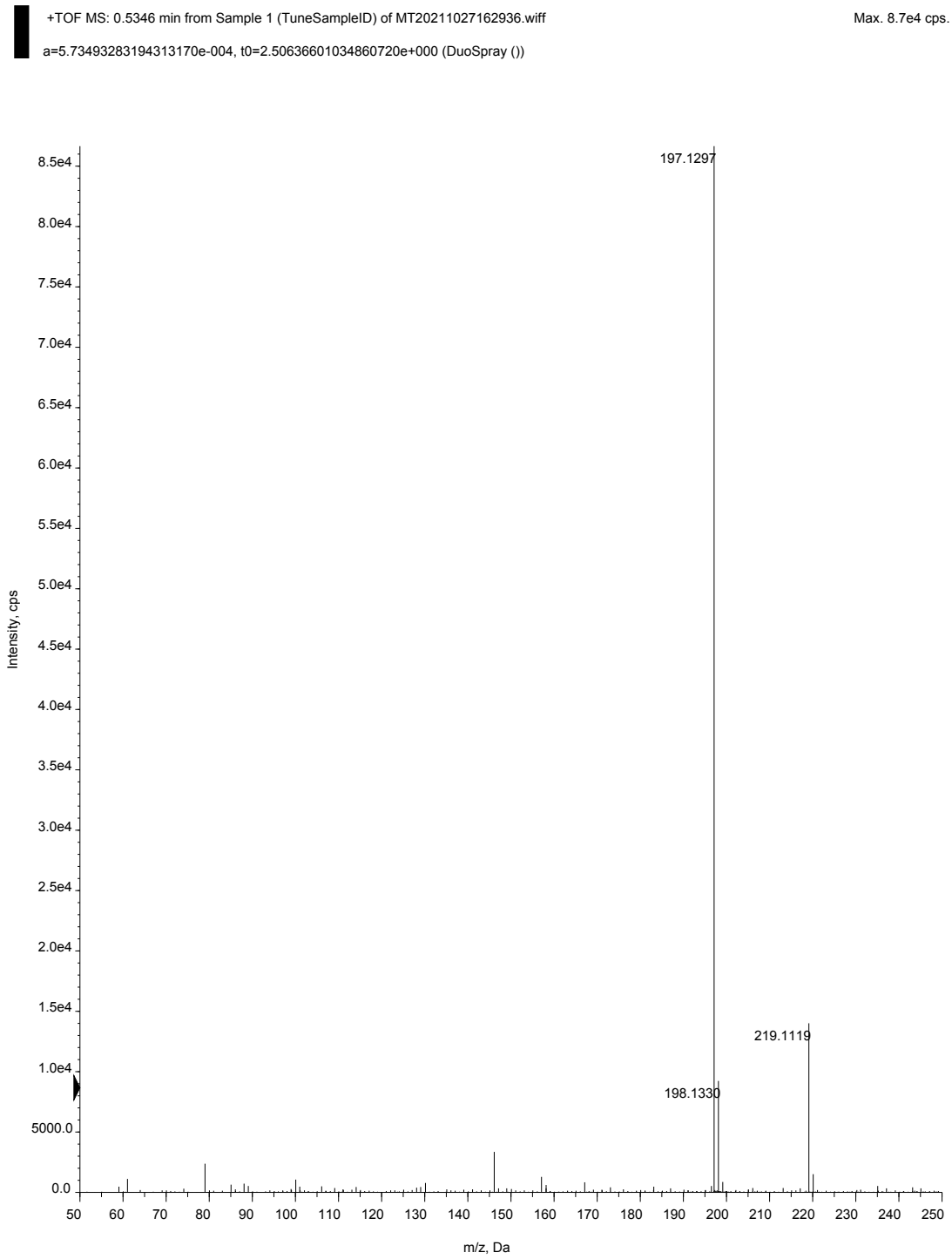
Şekil 57. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait HSQC spektrumu



Şekil 58. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait HMBC spektrumu

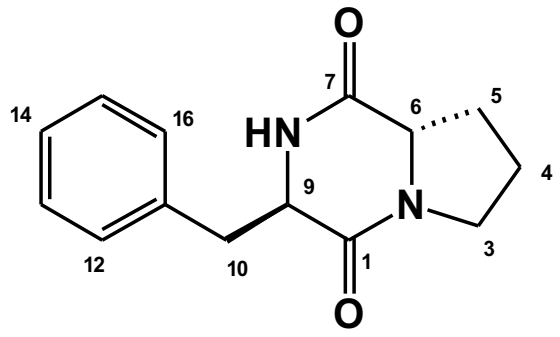


Şekil 59. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 60. Siklo-L-Prolin-D-Valin bileşiğine ait LC-Q-TOF- kütle spektrumu

Siklo-D-prolin-L-fenil alanin (3)



Şekil 61. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin

Bileşik krem toz formunda elde edilmiştir. Bileşiğin yapısı 1D-, 2D-NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda (Şekil 62-66) Siklo-D-prolin-L-fenil alanin (siklo-R-Prolin-S-fenil alanin) (Şekil 61) olarak belirlenmiştir.

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ +65° (c. 0.1, 20 °C, Metanol) olarak ölçülmüştür (194). NMR değerleri Tablo 7'de sunulmuştur.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 211 nm

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3300 (NH gerilmesi), 3064 (=C-H gerilmesi), 2930 (-C-H gerilmesi), 1640 (Amit C=O), 1500 (C=C), 1455 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 62), amino asitler için spesifik α-hidrojen bölgesinde iki adet sinyal olduğu görülmüştür. Böylece molekülün dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

^{1}H NMR spektrumundan α-hidrojenlerden biri 2.63 ppm'de (H-6) sinyal verdiği görülmüş, bu protonun bağlı olduğu karbon değerinin HSQC'den (Şekil 64) 58.7 ppm (C-6) olduğu bulunmuştur. Prolin amino asidi için karakteristik proton sinyalleri 2.04-1.66 ppm (H-5), 1.66-1.93 ppm (H-4) ve 3.35-3.54 ppm'de (H-3) görülmüştür.

Diğer amino asidin α-hidrojeni 4.22 ppm'de (H-9) sinyal vermiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 59.4 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. HMBC korelasyonları incelendiğinde komşu karbon C-10 ile 40.2 ppm'de korelasyon vermektedir. 7.17-7.32 ppm aralığında aromatik halkaya ait proton sinyalleri görülmüştür, bu protonların 5H integraline sahip olması ve multiplet sinyal vermesi

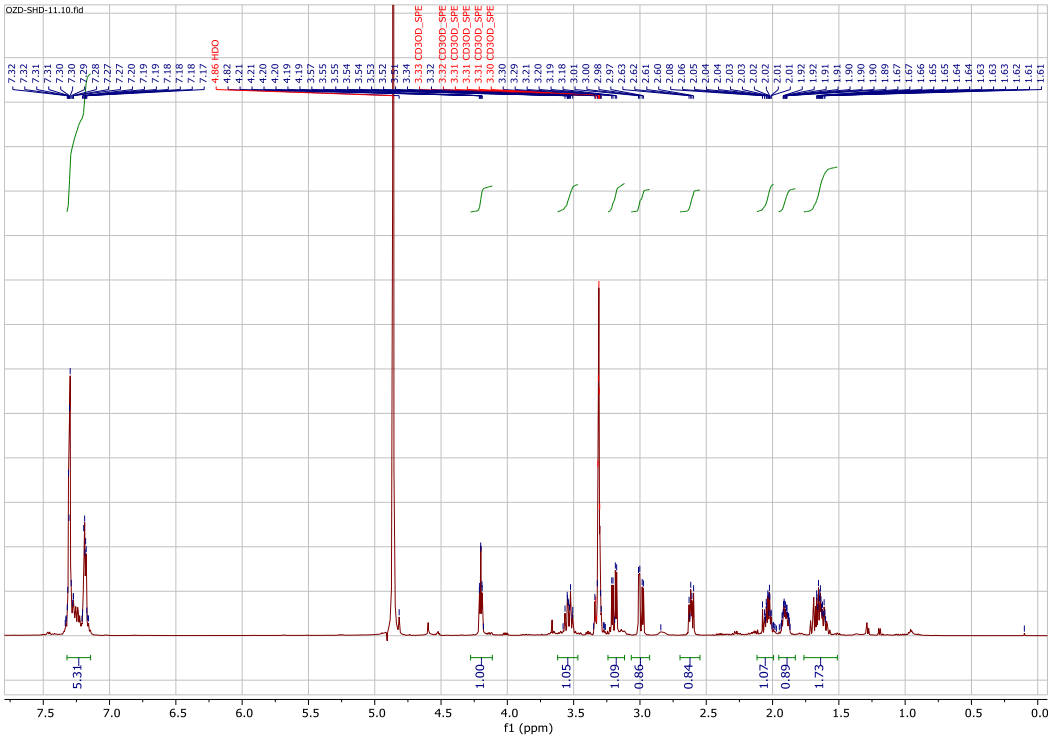
sebebiyle non-sübstitüe benzen halkası oluğu anlaşılmıştır. Bu amino asidin fenil alanin amino asidi olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen veriler literatür ile kıyaslandığında, bileşiğin Siklo-D-prolin-L-fenil alanin (siklo-R-Prolin-S-fenil alanin) olduğu doğrulanmıştır (270).

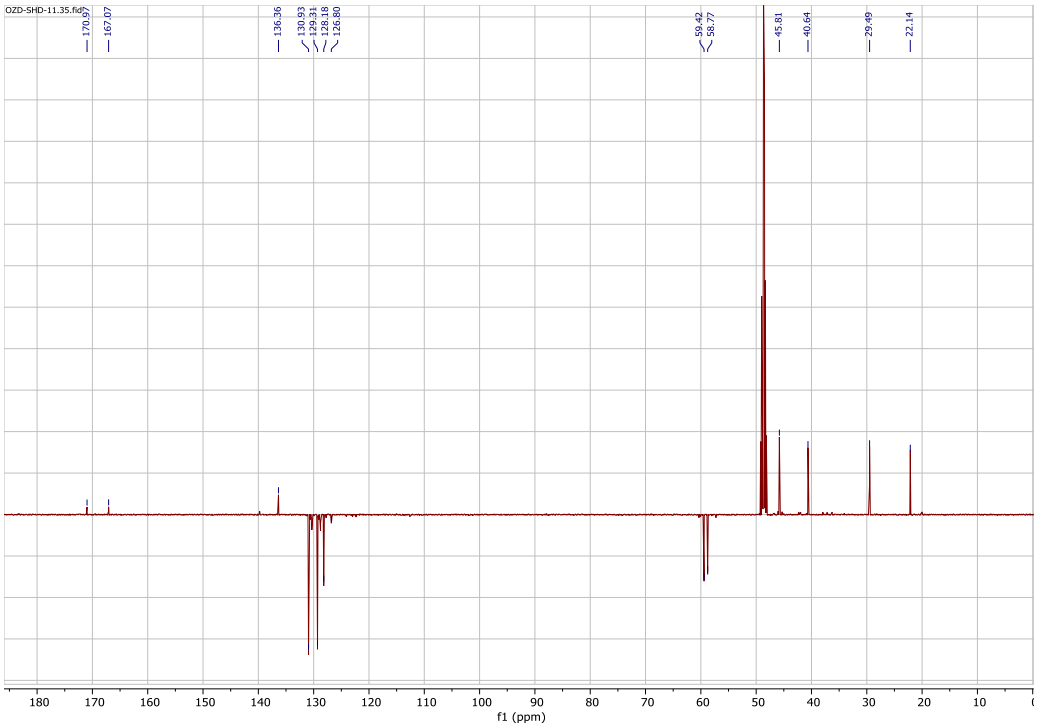
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{14}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 245.1306 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. Hesaplanan değer $C_{14}H_{17}N_2O_2$ için 245.1290 olarak bulunmuştur (Şekil 66).

Tablo 7. Siklo-D- prolin -L- fenil alanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz)

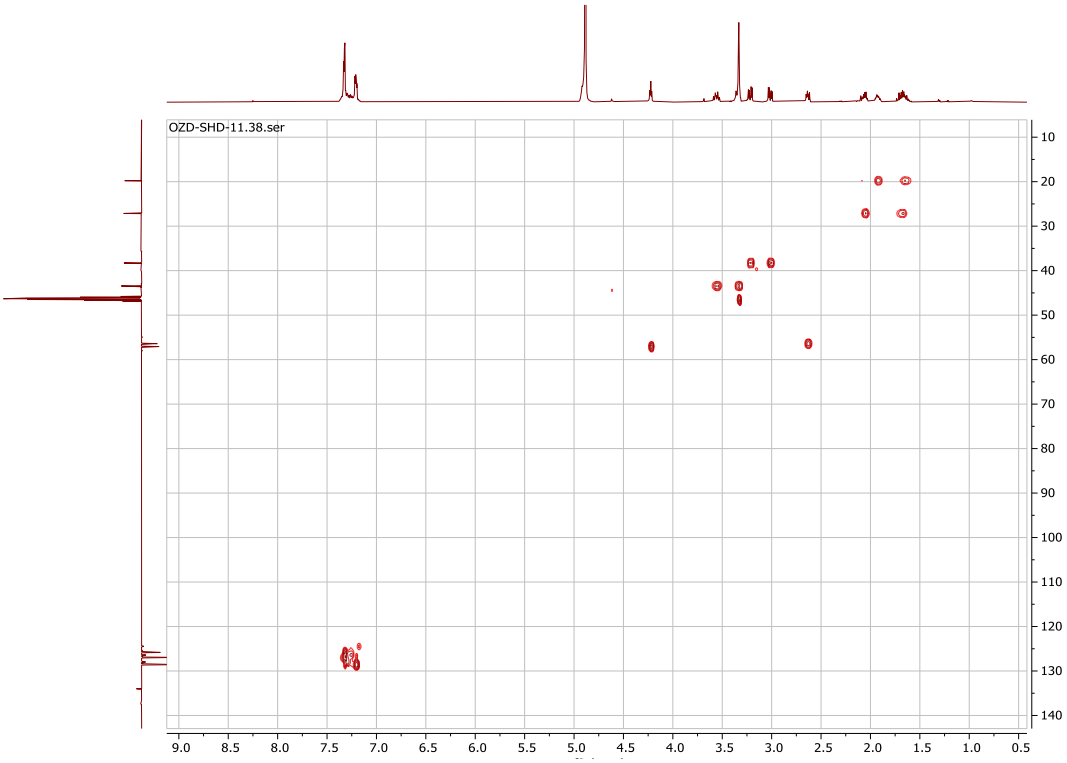
Atom No	**δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)**	**δ ^{13}C (ppm)**	**HMBC**
1	-	167.0	**-**
2 (N)	-	-	**-**
3	3.35 (m, 1H) 3.54 (m, 1H)	45.8	C-4, C-5
4	1.66 (m, 1H) 1.93 (m, 1H)	22.1	C-5, C-3, C-6
5	2.04 (m, 1H) 1.66 (m, 1H)	29.4	C-4, C-3, C-6, C-7
6	2.63 (dd, *J*= 6.4, 2.8 1H)	58.7	C-5, C-1, C-7
7	-	170.9	-
8 (NH)	-	-	-
9	4.22 (t, *J*= 4.8 Hz, 1H)	59.4	C-10
10	3.01 (dd, *J*=11.0, 4.8, 1H) 3.21 (dd, *J*= 11.0, 4.8, 1H)	40.6	C-1, C-9, C-11, C-12, C-16
11	-	136.8	-
12	7.17-7.32 (m, 5H)	129.3	C-10, C-11, C-12
13		128.1	C-12, C-14
14		126.8	C-13, C-15
15		128.1	C-11, C-16
16		129.3	C-10, C-12, C-11



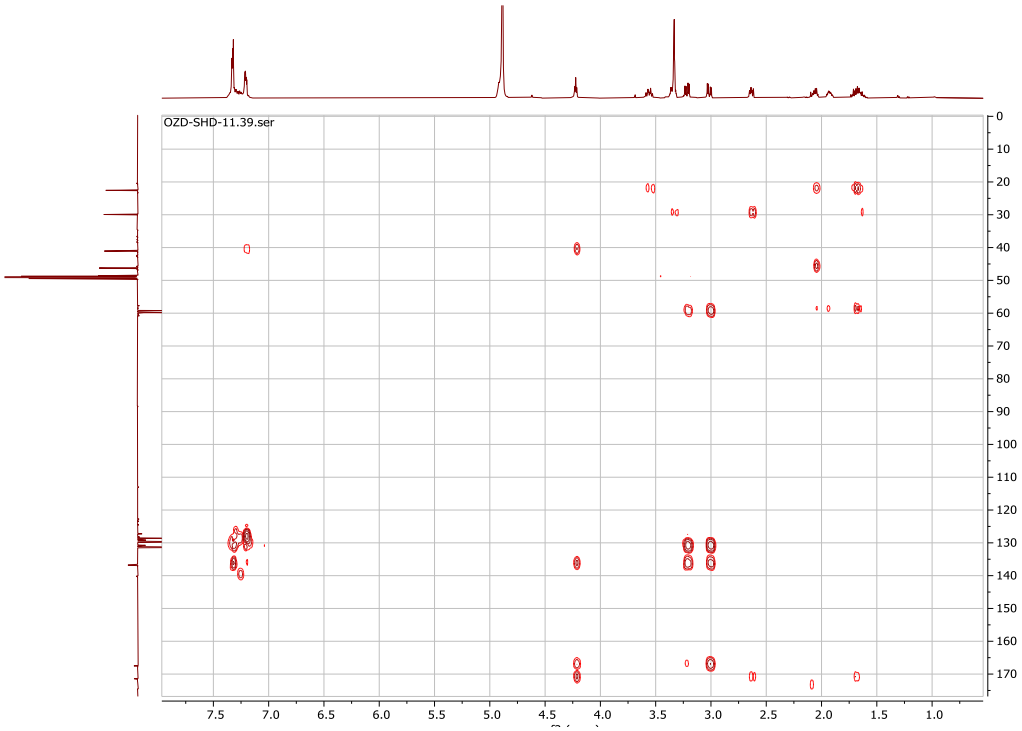
Şekil 62. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



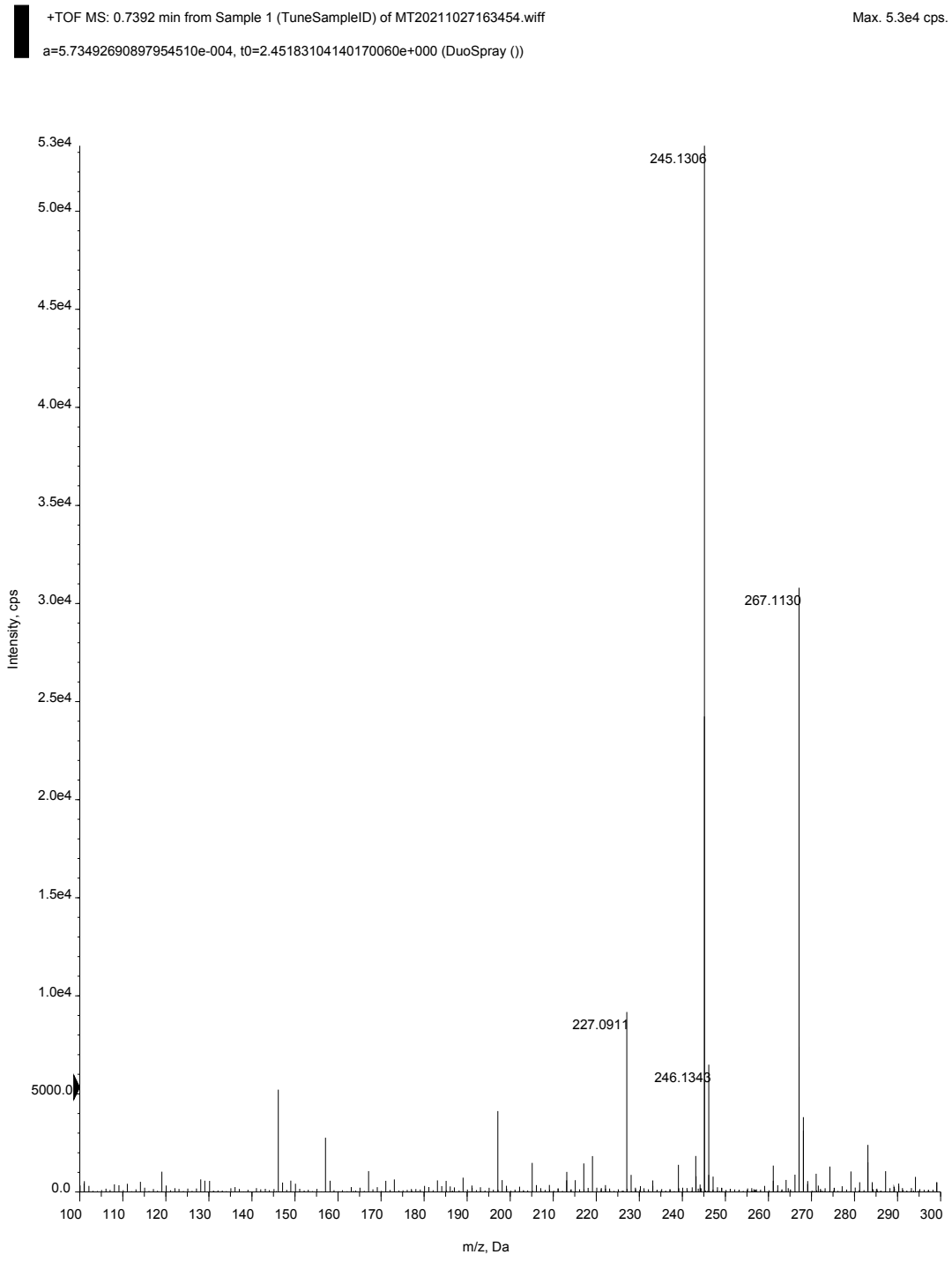
Şekil 63. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 64. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HSQC spektrumu

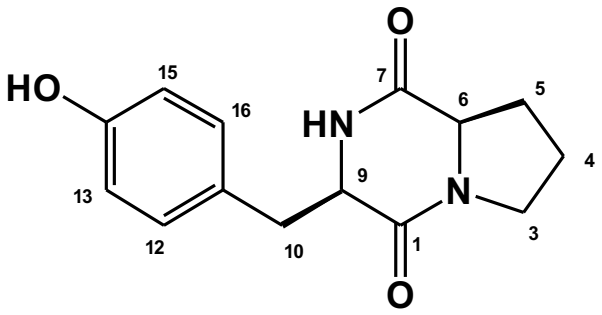


Şekil 65. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 66. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

Siklo-L-prolin-L-tirozin (4)



Şekil 67. Siklo-L-prolin-L-tirozin

Görünüşü açık sarı renkli toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı Şekil 68-72 arasında verilen 1D, 2D NMR ve LC-Q-TOF MS spektrumları incelenerek çözülmüştür. 1D ve 2D NMR spektrumlarında gözlenen veriler Tablo 8'de sunulmuştur. Bu veriler ışığında molekülün yapısı aydınlatılmış ve Siklo-L-prolin-L-tirozin olarak belirlenmiştir (Şekil 67) (196).

Optik çevirme açısı, literatür ile uyumlu bir şekilde $[\alpha]^{20}_{D}$ -131° (*c.* 0.2, Metanol) olarak ölçüldü (196).

UV (MeOH) λ_{max} nm: 213

IR (ATR) v_{max} (cm^{-1}) 3280 (yayvan OH), 3050 (=C-H gerilmesi), 2958 (-C-H gerilmesi), 1638 (Amit C=O), 1514 (C=C).

^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 68), amino asitler için spesifik α-hidrojen bölgesinde (3-4 ppm) iki adet sinyal olduğu görülmüştür. Böylece molekülün dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

^{1}H NMR spektrumundan α-hidrojenlerden biri 4.35 ppm'de (H-6) sinyal verdiği görülmüş, bu protonun bağlı olduğu karbon değerinin HSQC'den (Şekil 70) 57.8 ppm (C-6) olduğu bulunmuştur. Prolin amino asidi için karakteristik proton sinyalleri 2.07-1.21 ppm (H-5), 1.80 ppm (H-4) ve 3.35-3.54 ppm'de (H-3) görülmüştür.

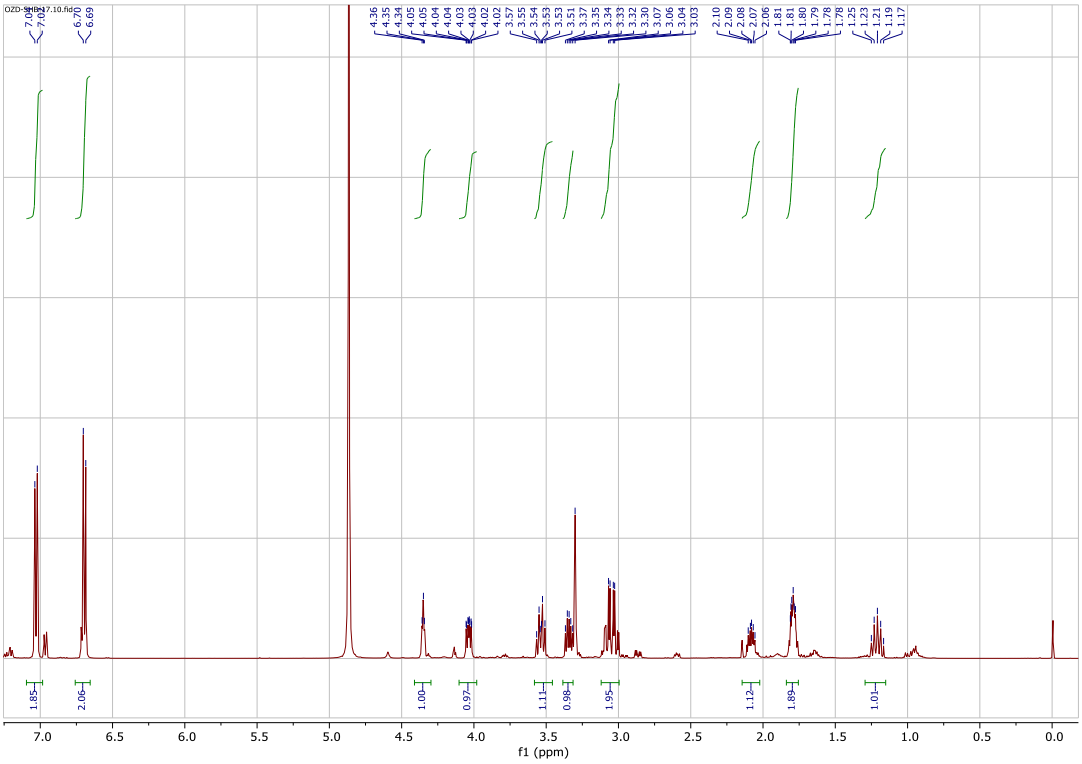
Diğer amino asidin α-hidrojeni 4.04 ppm'de (H-9) sinyal vermiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 60.1 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. HMBC spektrumu incelendiğinde, 37.8 ppm'deki metilen karbonu (C-10) ile korelasyon verdiği görülmüştür.

^{1}H NMR spektrumunda düşük manyetik alanda, 7.03 ppm'de (d, *J*=8.2 Hz, 2H) ve 6.70 ppm'de (d, *J*=8.2 Hz, 2H) aromatik halkaya ait proton sinyalleri görülmüştür. Aromatik protonların *J*=8.2 Hz'lik yarılması *orto* etkileşimi işaret ederken, 2H integraline sahip olması aromatik halkada simetri olduğunu ve *para* pozisyonunda bir fonksiyonel grup bağlı olduğunu göstermiştir ve bu amino asidin tirozin olduğu anlaşılmıştır. Böylece molekülün yapısı Siklo-L-prolin-L-tirozin olarak aydınlatılmıştır.

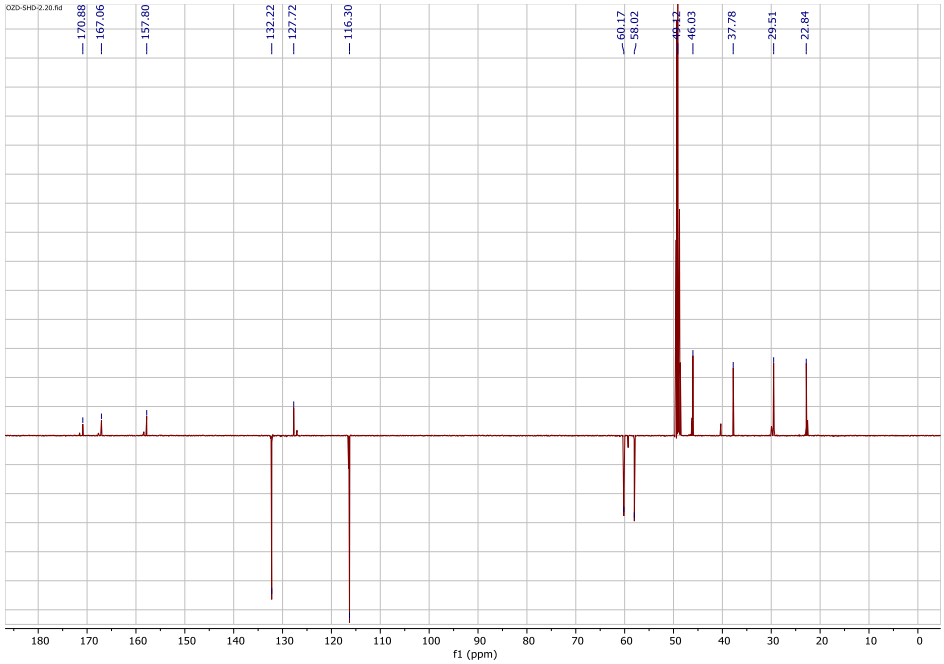
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{14}H_{16}N_2O_3$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 261.1218 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{14}H_{16}N_2O_4$ için 261.1239 olarak bulunmuştur (Şekil 72).

Tablo 8. Siklo-L-prolin-L-tirozine ait 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz)

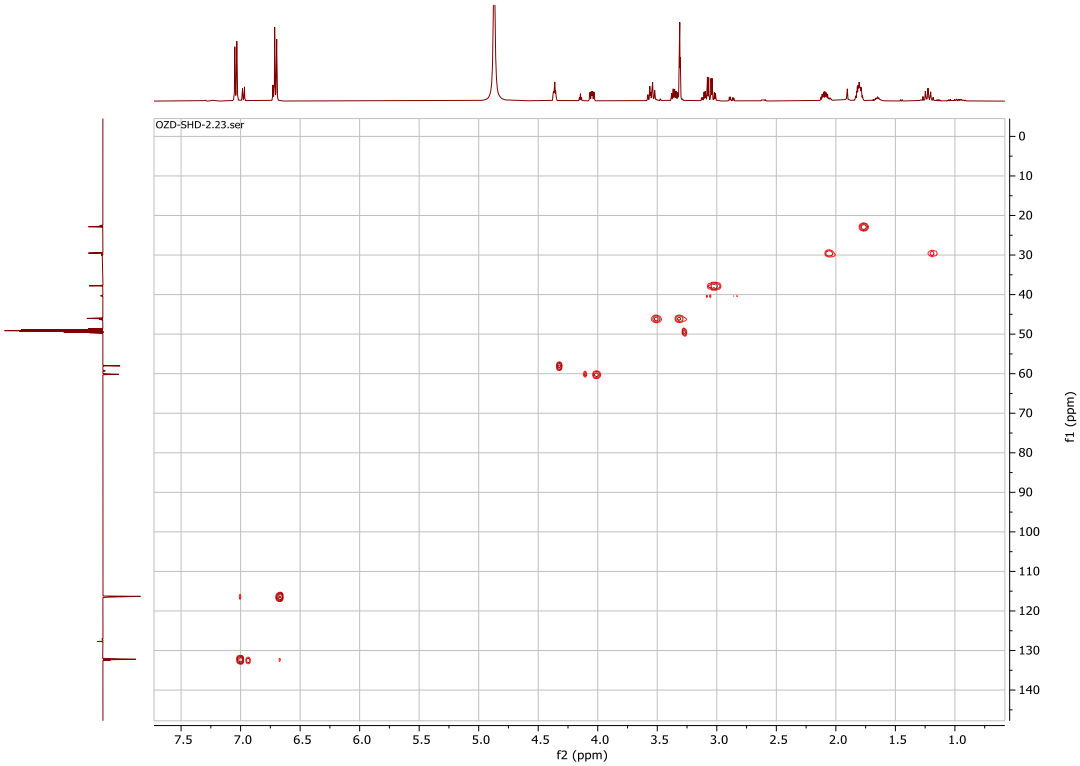
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm, C türü)	HMBC
1	-	170.9	-
2 (N)	-	-	-
3	3.54 (m, 1H) 3.35 (m, 1H)	46.0	C-4, C-5
4	1.80 (m, 2H)	22.8	C-3, C-5
5	2.07 (m, 1H) 1.21 (m, 1H)	29.5	C-3, C-4, C-6, C-7
6	4.35 (t, *J*=4.6 Hz, 1H)	57.8	C-1, C-5, C-7
7	**-**	167.1	-
8 (NH)	-	-	-
9	4.04 (ddd, *J*=10.8, 6.3, 1.4, 1H)	60.1	C-10
10	3.05 (dd, *J*=14.1, 4.5, 1H)	37.8	C-9, C-11
11	-	127.7	-
12, 16	7.03 ppm (d, *J*=8.2, 2H)	132.2	C-10, C-13, C-14
13, 15	6.70 ppm (d, *J*=8.2, 2H)	116.3	C-14, C-11
14	-	157.8	-



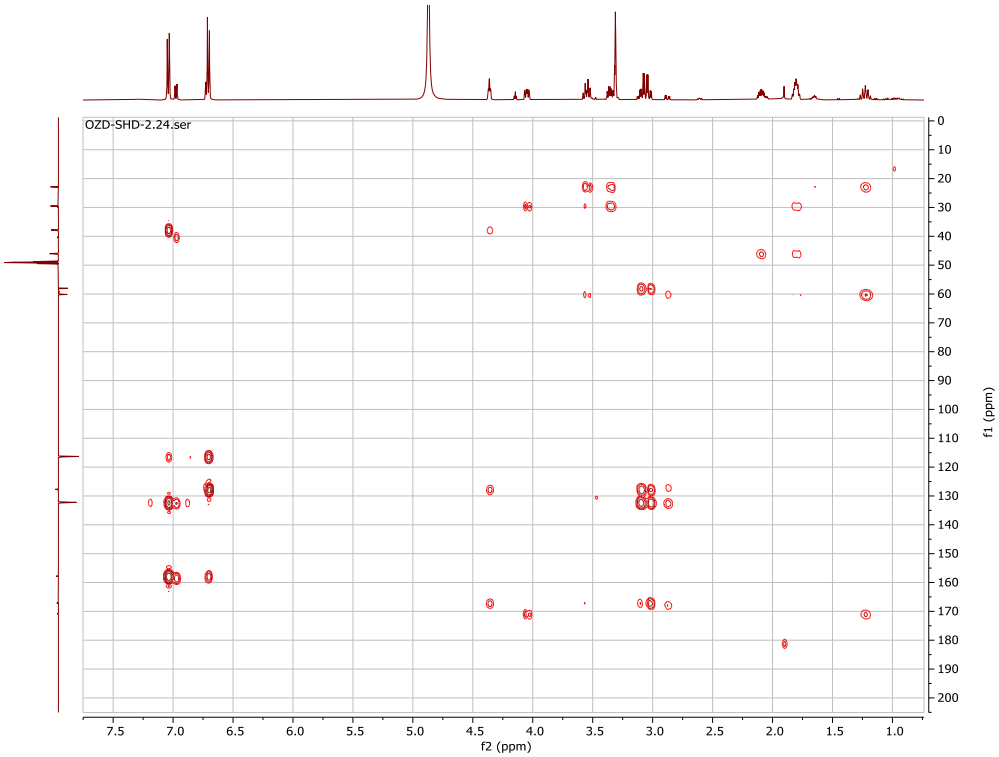
Şekil 68. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



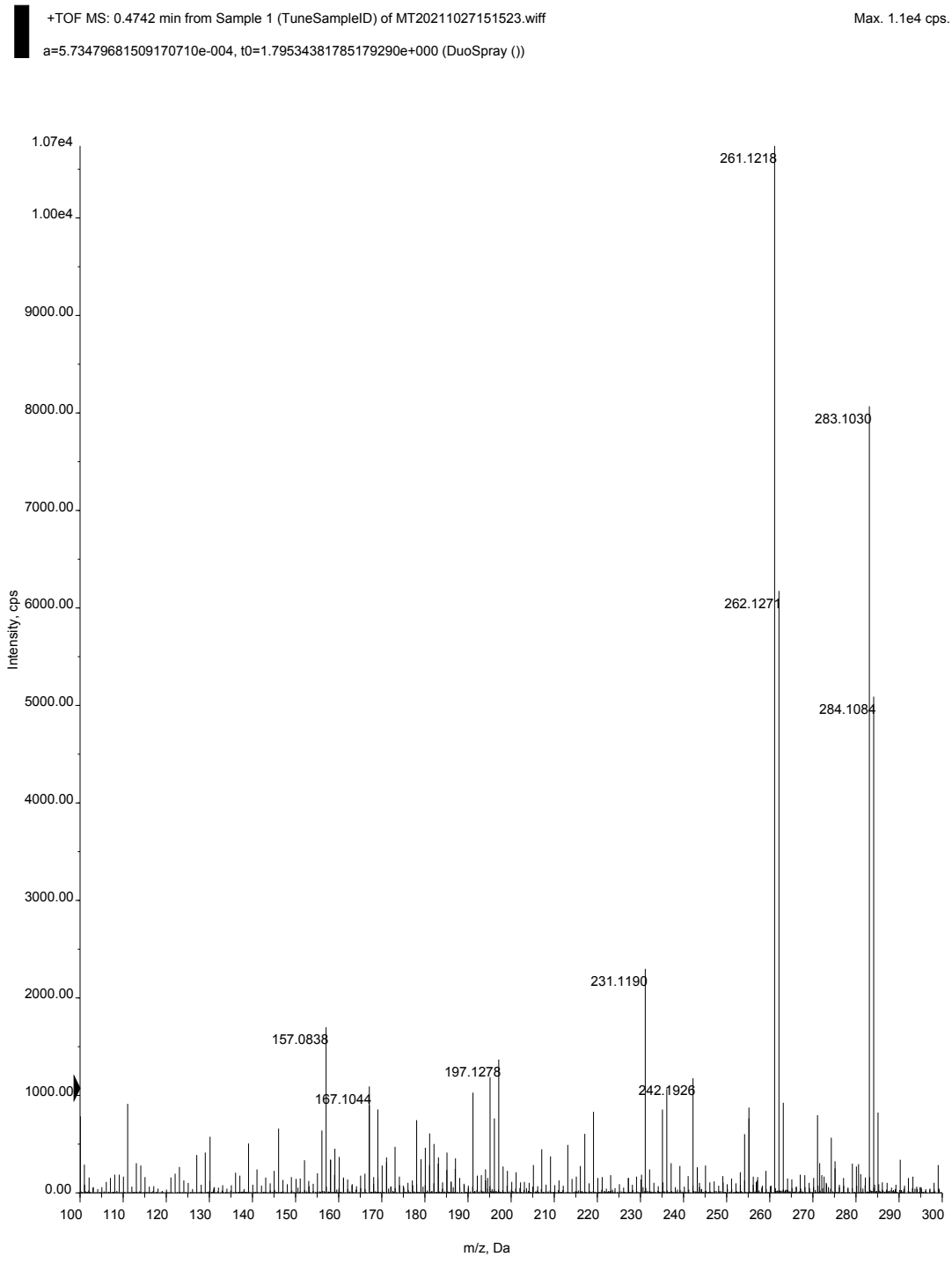
Şekil 69. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 70. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait HSQC spektrumu

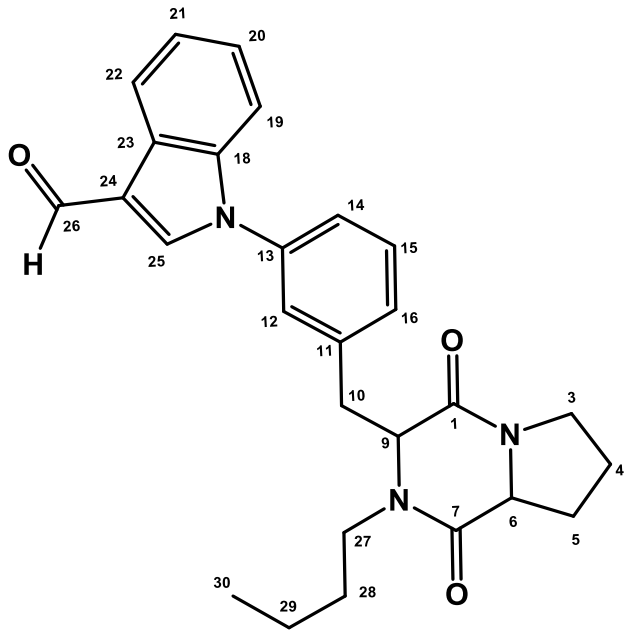


Şekil 71. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 72. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

Hoynatenamit (5)



Şekil 73. Hoynatenamit

İzole edilen 5 nolu bileşiğin görünüşü krem rengi toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı alınan 1D, 2D NMR ve LC-Q-TOF MS spektroskopik teknikleri (Şekil 74-83) sayesinde aydınlatılmıştır. Gerçekleştirilen literatür taraması sonucunda (SciFinder) bileşiğin yeni olduğu anlaşılmıştır ve Hoynatenamit olarak adlandırılmıştır (Şekil 73). Tablo 9'da bileşiğin 1D ve 2D NMR değerleri sunulmuştur.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 211, 284

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3050 (=C-H gerilmesi), 2950 (-CH gerilmesi), 2715 (aldehit), 1639 (Amit C=O), 1490 (C=C), 750 (Ar-H eğilmesi)

^{1}H-NMR spektrumunda proline ait karakteristik sinyaller gözlenmiştir. Prolin'e ait α-hidrojeni 4.09 ppm'de ddd (*J*= 10.6, 6.4, 1.68 Hz) (H-6) olarak gözlenirken, bu protona ait karbon değeri HSQC'den 60.2 olarak bulunmuştur. H-6 protonunun HMBC'de C-7 (171.0) ile korelasyonu gözlenmiştir. Diğer bir α-hidrojeni 4.43 ppm'de td (*J*=5.05 ve 1.75 Hz) (H-9) olarak gözlenmiş ve karbon değeri 57.8 olarak bulunmuştur. H-9 protonunun 38.4 ppm'de (C-10, -CH_2-) gözlenen metilen karbonu ve 167 ppm'de (C-1) karbonil karbonu ile HMBC korelasyonu gözlenmiştir. Diğer sinyallerin düşük manyetik alanda aromatik bölgede yoğunlaştığı görülmüştür. 7.5-

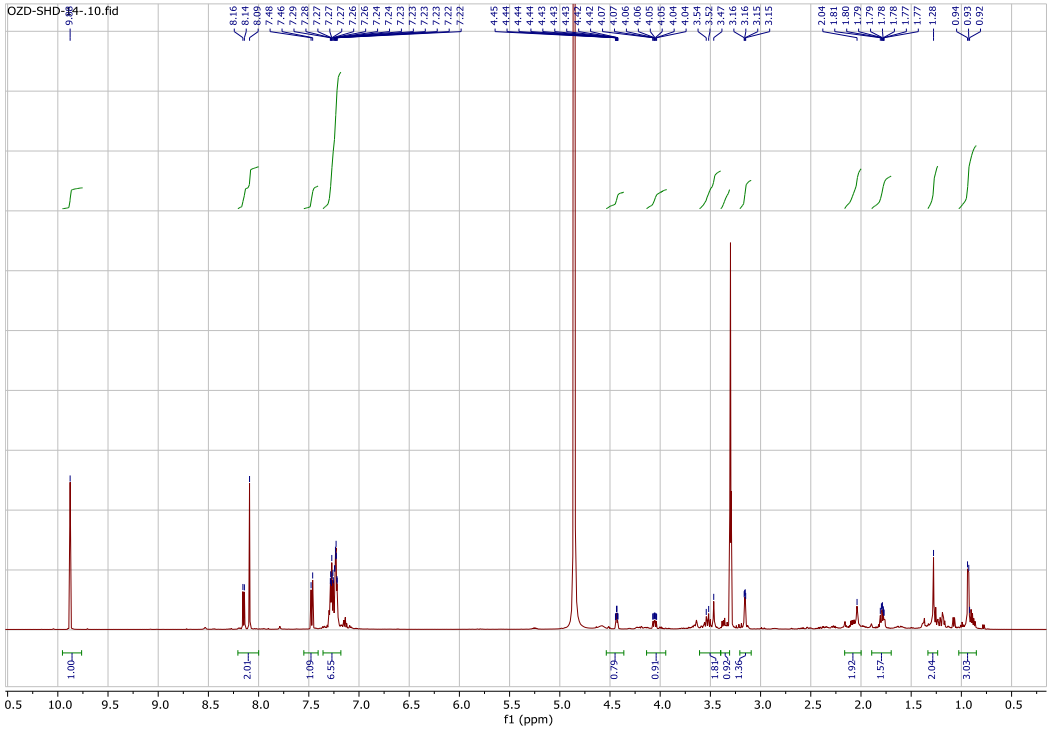
8.2 ppm aralığında, 8.15 ppm'de gözlenen singlet (H-25) protonunun varlığı ve 8.18 (d, *J*= 7.7 Hz, H-22) ve 7.50 (d, *J*= 7.7 Hz, H-19) ppm'de gözlenen dubletler indol halkasındaki AA'BB' sistemindeki protonları işaret etmiştir. H-20 ve 21 protonları ise fenil alanine ait aromatik proton sinyalleri ile örtüşmüştür. 9.88 ppm'de gözlenen aldehit protonuna ait sinyalin C-23, C-24 ve C-25 ile gösterdiği HMBC korelasyonları aldehit grubunun C-24'te konumlandırılmasına neden olmuştur.

NOESY deneyleri indol halkasının fenil alaninin C-13 karbonuna bağlandığını kanıtlamıştır. 8.09 ppm'de gözlenen H-25 protonunun 7.25 ppm'deki H-12 protonu ile ve ayrıca H-12 protonunun H-10 metilen protonları ile NOESY korelasyonu gözlenmiştir. Molekülün enerji minimizasyonu yapılarak elde edilen üç boyutlu yapısında, bahsedilen NOESY korelasyonları gösterilmiştir (Şekil 83).

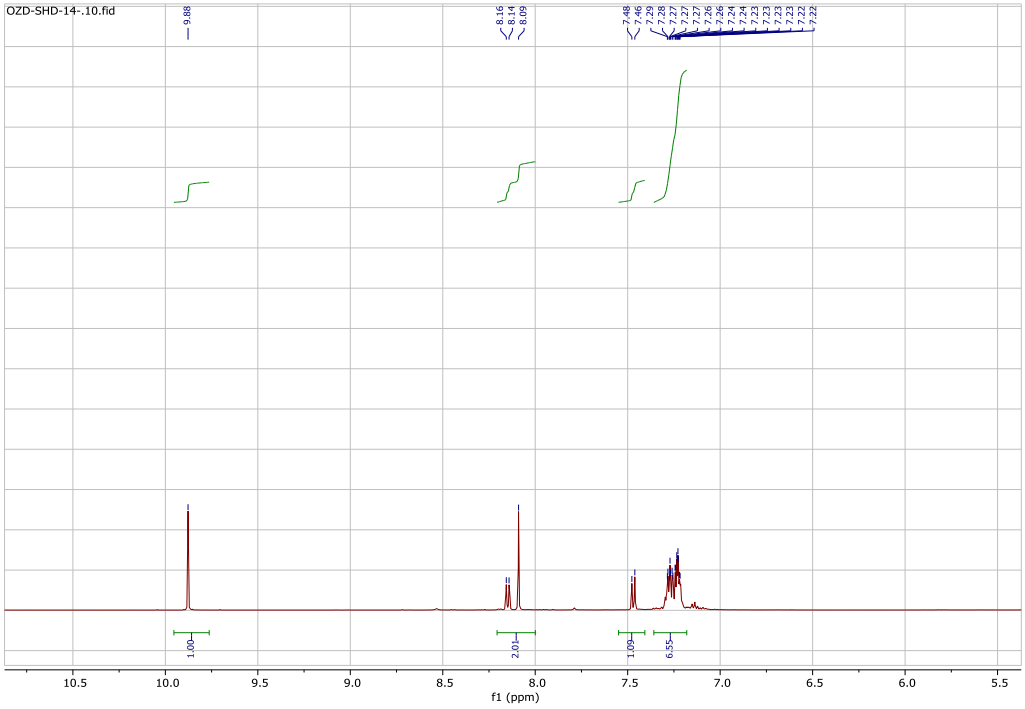
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{27}H_{29}N_3O_3$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 443.2335 $[M]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{27}H_{29}N_3O_3$ için 443.2208 olarak bulunmuştur. Kütle spektrumunda gözlenen fragmanların kütle değerleri Şekil 81'de sunulmuştur.

Tablo 9. Hoynatenamit bileşiğinin 1D ve 2D NMR değerleri NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz)

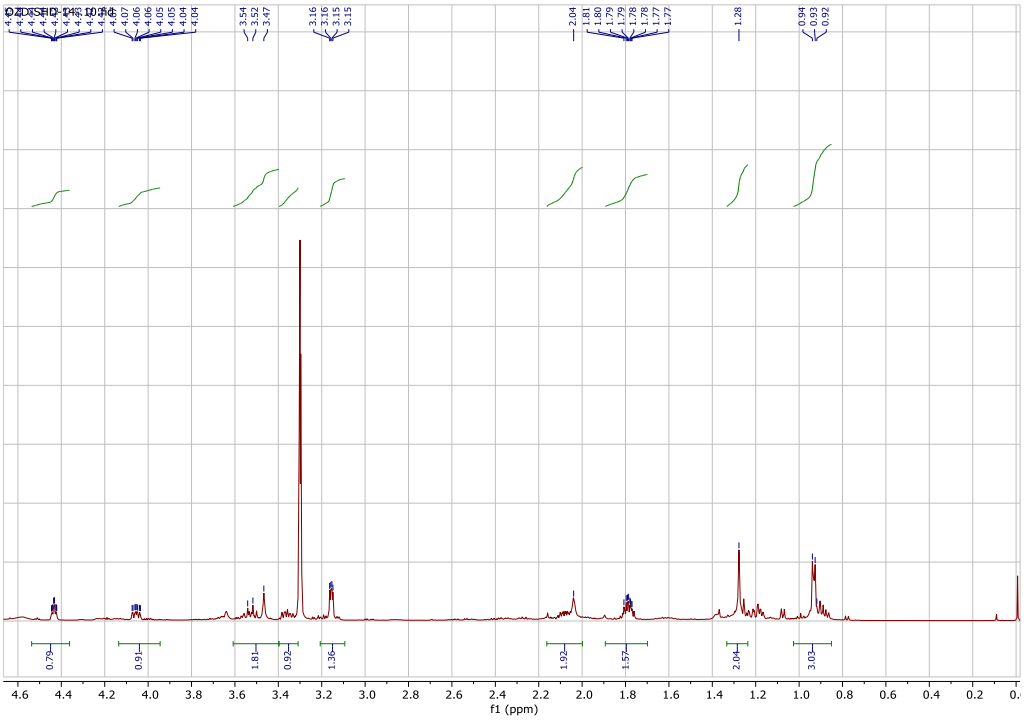
Atom No	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC	NOESY
1	-	167.0	-	-
2 (N)	-	-	-	-
3	3.39 (m, 1H) 3.52 (m, 1H)	45.90	-	-
4	1.83 (m, 2H)	22.74	-	-
5	2.11 (m, 1H) 1.28 (m, 1H)	29.34		-
6	4.09 (ddd, *J*= 10.6, 6.4, 1.68 Hz, 1H)	60.2	C-7	-
7	-	171.0	-	-
8 (N)	-	-	-	-
9	4.43 (td, *J*= 5.05, 1.75 Hz, 1H)	57.8	C-1	-
10	3.18 (dd, *J*= 5.17, 2.45 Hz, 2H)	38.4	C-1, C-11, C-12	-
11	-	137.5	-	-
12	7.25 (s)	131.2	C-10, C-11, C-14	H-10, H-25
13	-	138.2	-	-
14	7.22 (m, örtüşme)	127.0	C-12, C-13	
15-16	7.20-7.30 (m)	örtüşme		
17 (N)	-	-	-	-
18	-	örtüşme	-	-
19	7.50 (d, *J*= 7.7,1H)	113.3		H-14
20	7.24-7.30 (örtüşme)	örtüşme	C-19, C-22	
21	7.24-7.30 (örtüşme)	örtüşme	C-19, C-22	-
22	8.18 (d, *J*=7.7 Hz, 1H)	122.5	C-20, C-23, C-24	-
23	-	125.8	-	-
24	-	120.1	-	-
25	8.09	139.7	C-23, C-24, C-26	H-12
26	9.88	187.5	C-23, C-24, C -25	-
27	3.48 (brs)	46.1		-
28-29	1.30 (örtüşme)	30.5	C-27, C-30	-
30	0.93 (t, *J*=6.5, 3H)	23.3	C-29	-



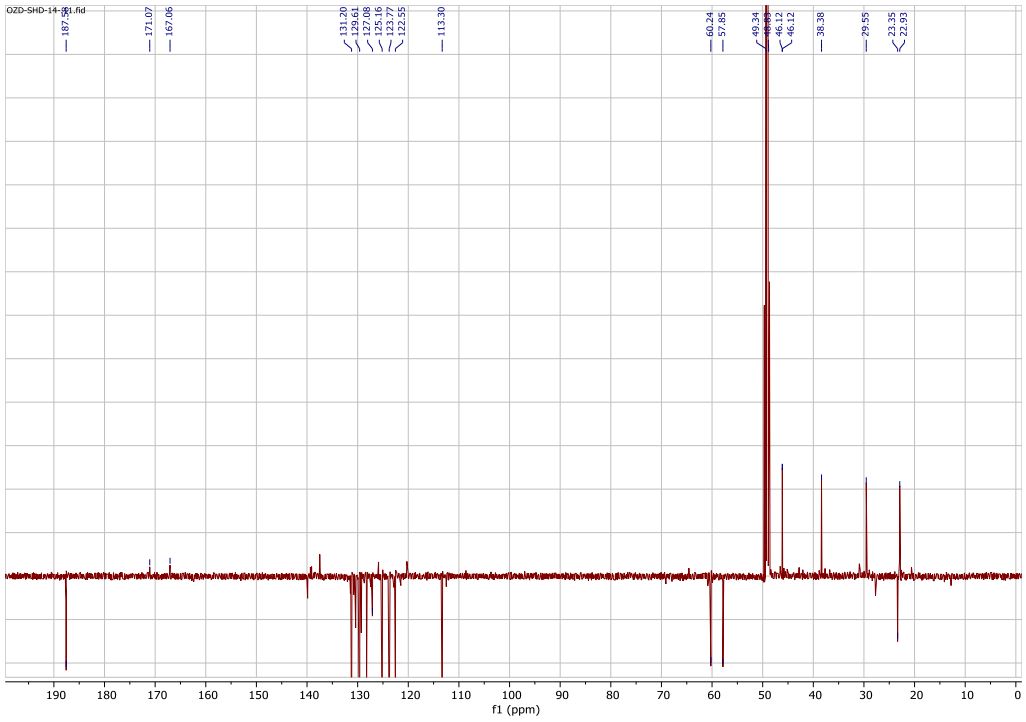
Şekil 74. Hoynatenamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



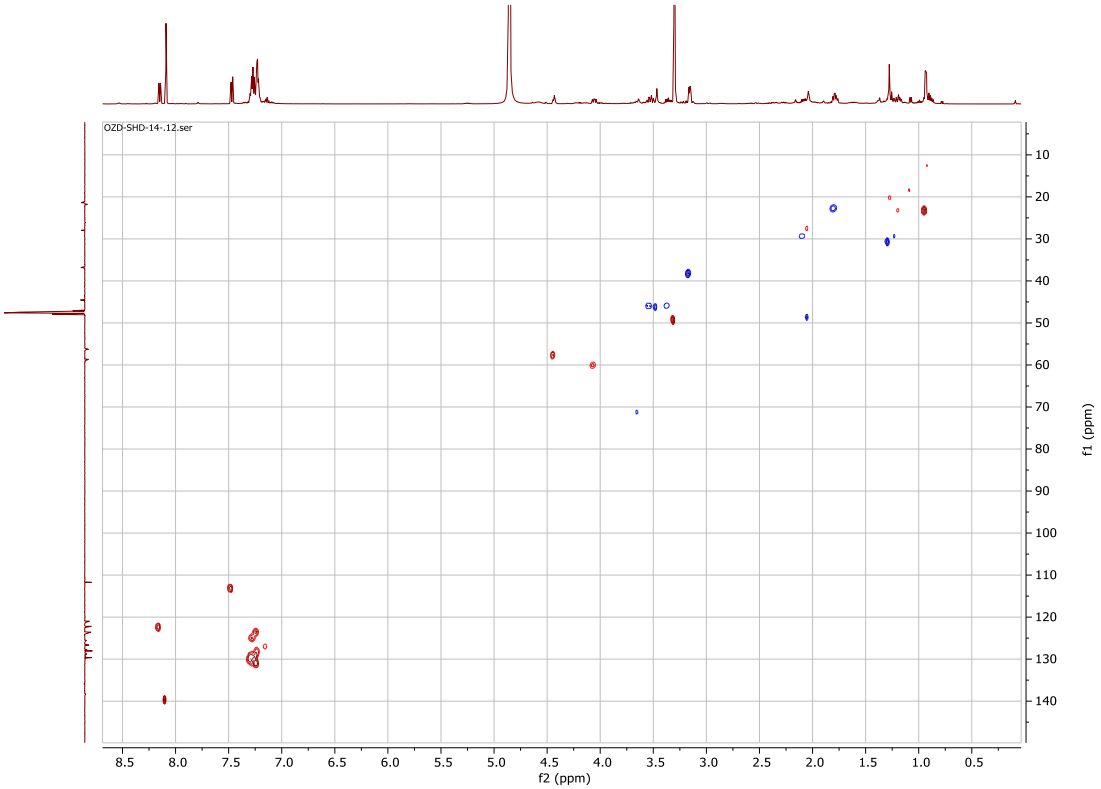
Şekil 75. Hoynatenamit bileşiğine 5.5-10.5 ppm arası genişletilmiş ^{1}H-NMR spektrumu



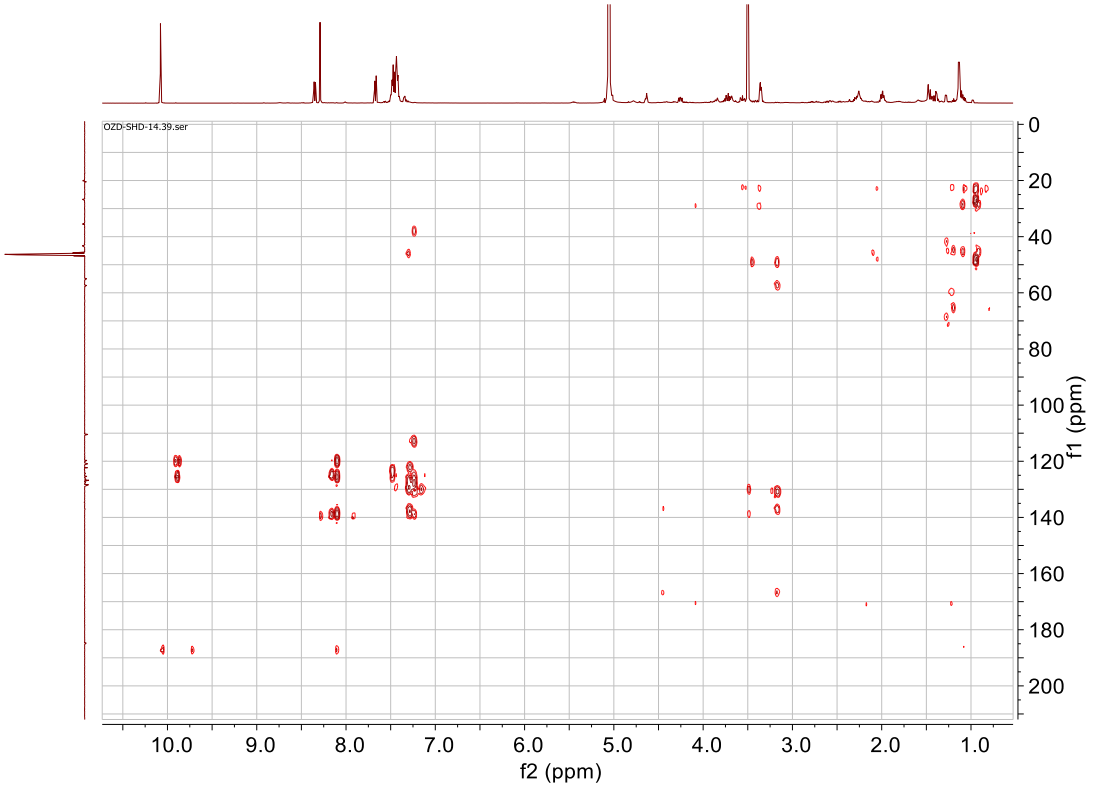
Şekil 76. Hoynatenamit bileşiğinin 0-4.6 ppm arası genişletilmiş ^{1}H-NMR spektrumu



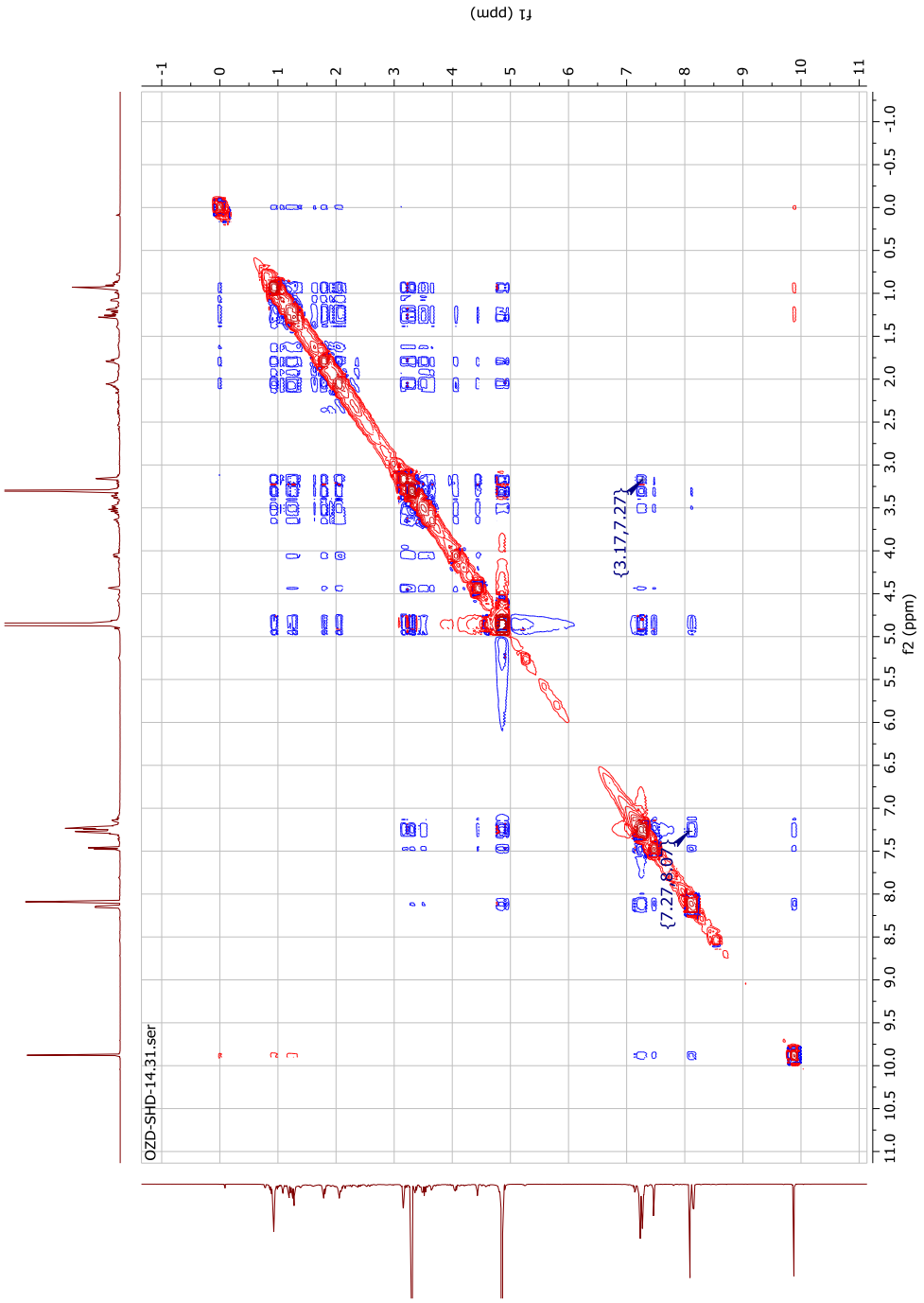
Şekil 77. Hoynatenamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



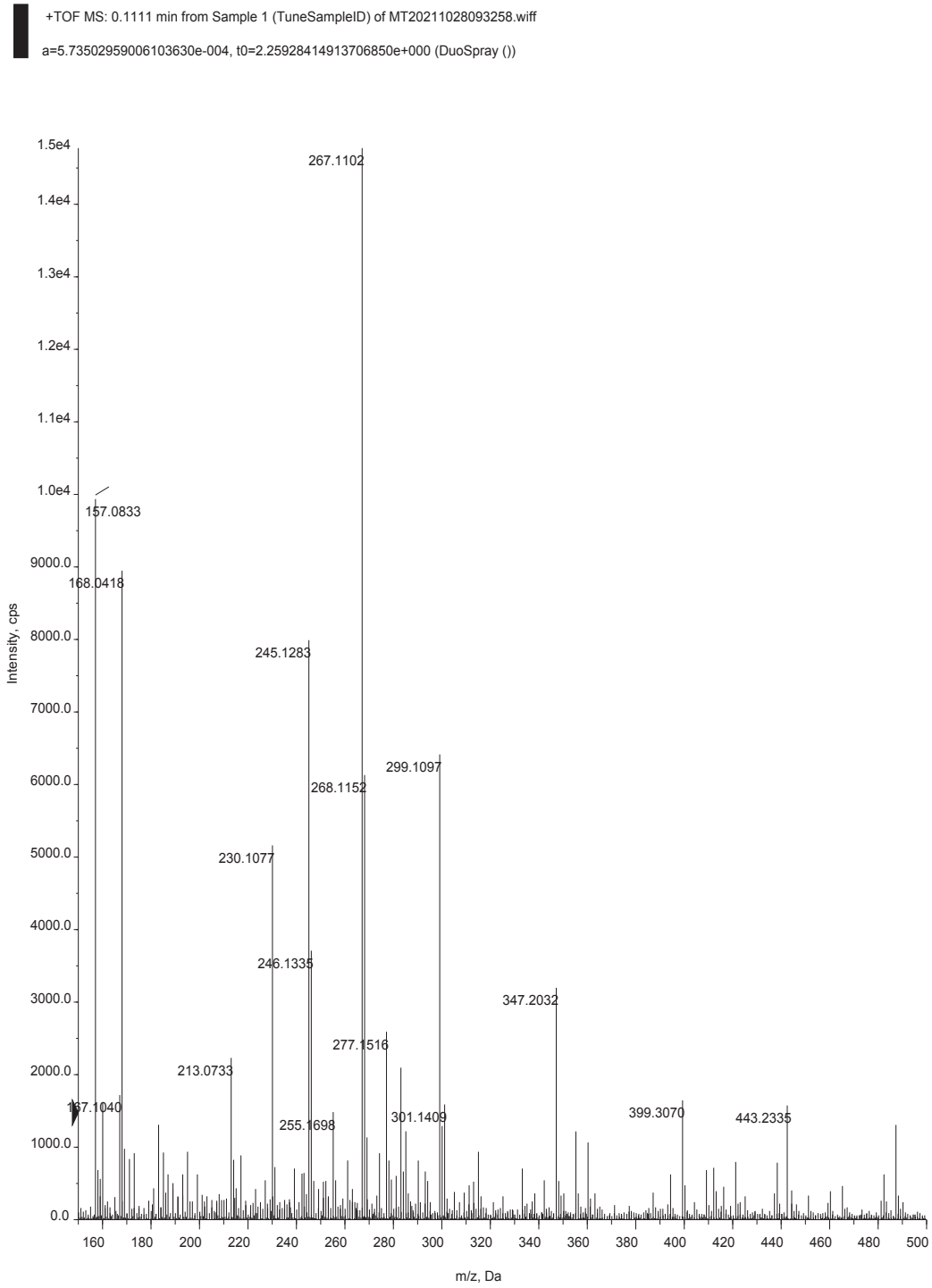
Şekil 78. Hoynatenamit bileşiğine ait HSQC spektrumu



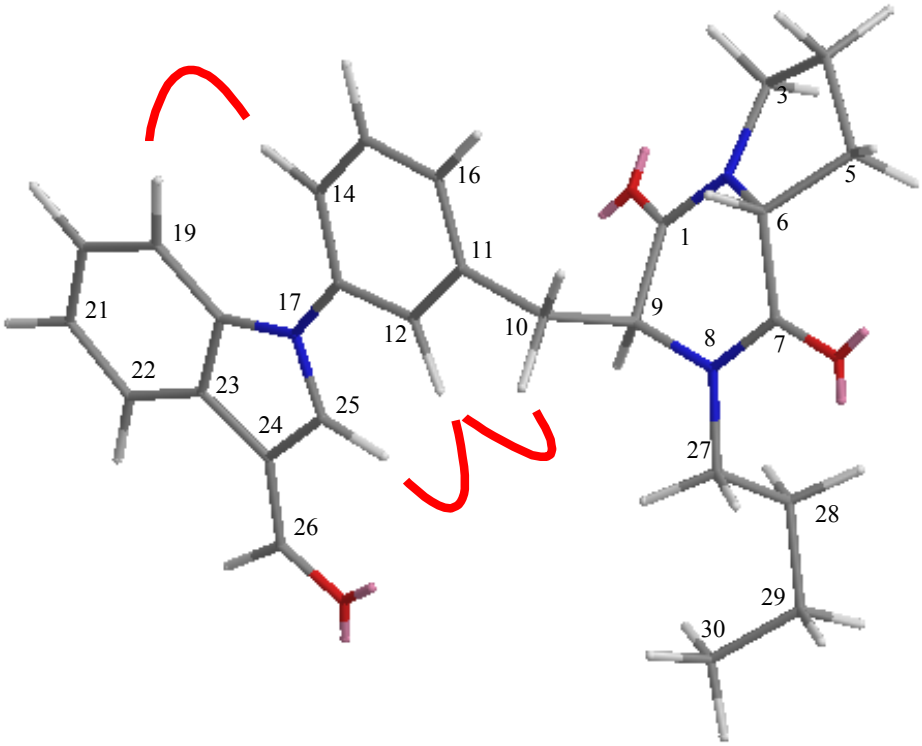
Şekil 79. Hoynatenamit bileşiğine ait HMBC spektrumu



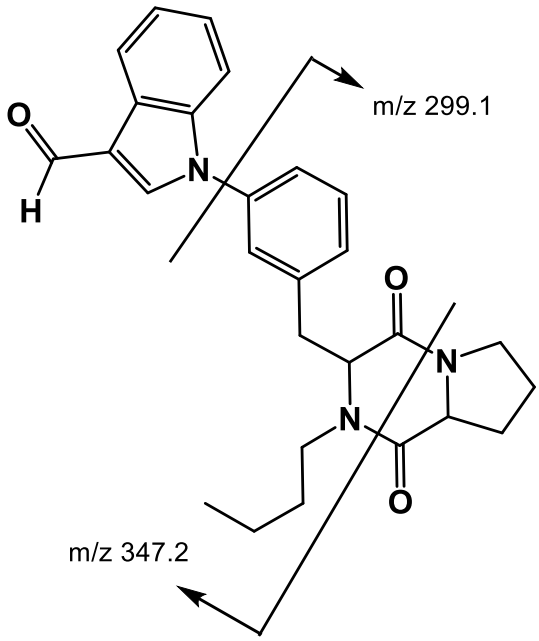
Şekil 80. Hoynatenamit bileşiğine ait NOESY spektrumu



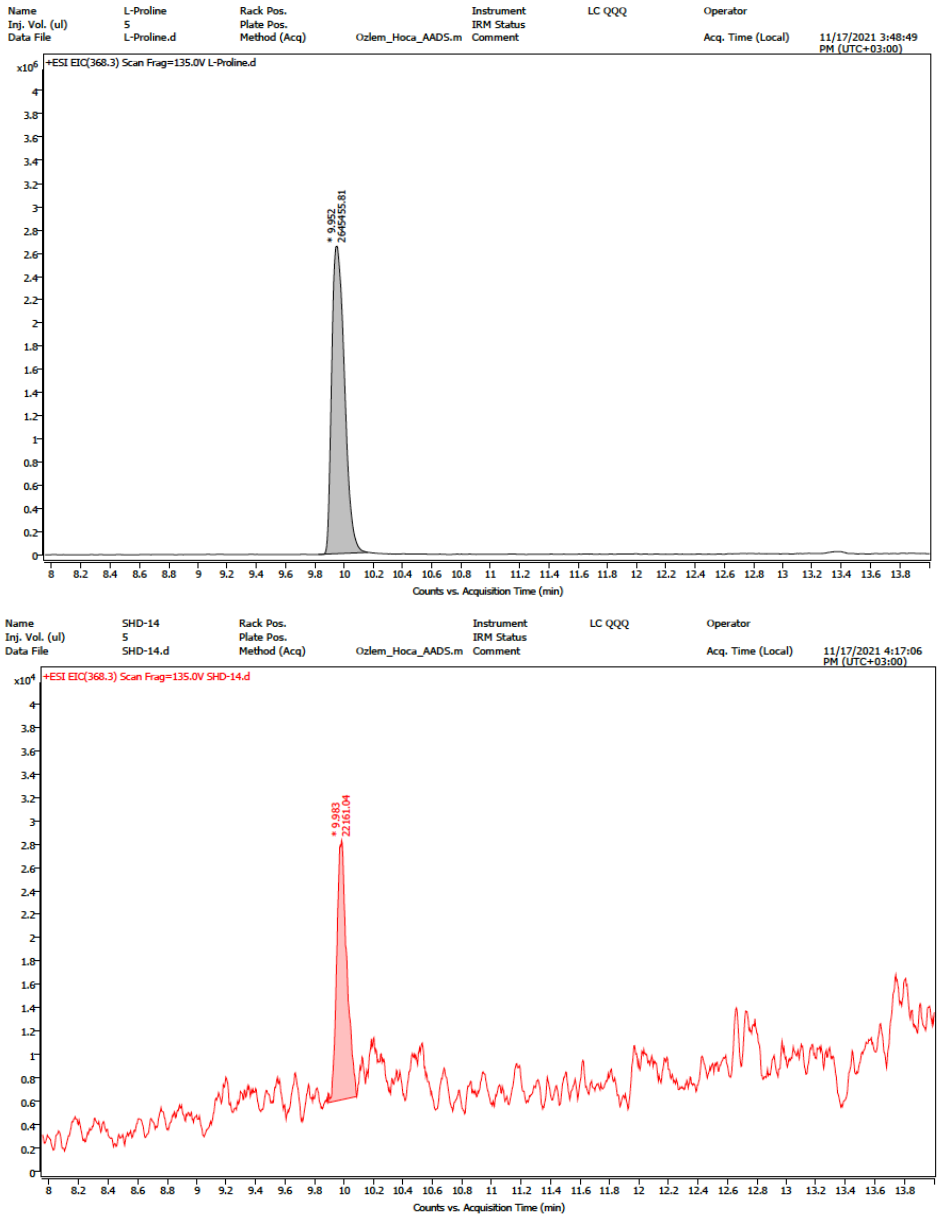
Şekil 81. Hoynatenamit bileşiğinin LC-Q-TOF kütle spektrumu



Şekil 82. Bağlanma düzeninin doğrulanmasında kullanılan NOESY korelasyonları. (Üç boyutlu model, molekülün MM2 enerji minimizasyonu gerçekleştirilerek çizilmiştir)



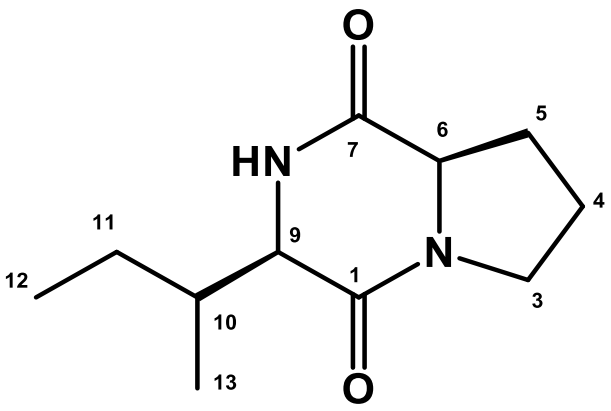
Şekil 83. LC-Q-TOF kütle spektrumunda gözlenen kütle parçalanmaları ve gözlenen *m/z* değerleri.



Şekil 84. Standart L-prolin ve Hoynatenamit bileşiğinin Marfey's analizi sonucu

Hoynatenamit'in yapısında prolin olduğu NMR verileri ile bulunmuş, stereokimyasını belirlemek amacıyla Marfey's reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Hoynatenamit molekülü öncelikle hidroliz edilmiş, hidroliz ürünü ve standard L-prolin amino asidi FDAA reaktifiyle diastereomerlerine dönüştürülmüştür (Şekil 32'deki reaksiyon). Oluşan ürünler LC-MS metodu ile kıyaslanmış, retensiyon süreleri karşılaştırılmıştır (Şekil 84). Her iki molekülün de kolonu 10. dakikada terk etmesi Hoynatenamit bileşiğinde bulunan prolin kısmının L-prolin olduğunu göstermiştir.

Siklo-L-Prolin-L-İzolösin (6)



Şekil 85. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin

Bileşiğin görünümü krem rengi amorf toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H NMR, HSQC ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda, siklo-L-Prolin-L-İzolösin (Şekil 85) olarak belirlenmiştir (Şekil 86-88).

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -191° (c. 0.1, EtOH) literatür ile uyumlu olarak ölçülmüştür (195).

UV (MeOH) λ_{max} (nm): 204

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3298 (NH gerilmesi), 3071(C=C), 2878 (C-H gerilmesi), 1667 (C=O), 1659 (C=O), 1427 (CH_2, CH_3 eğilmesi).

^{1}H-NMR, δ (ppm, CD_3OD, 500 MHz) 4.20 (ddd, *J*=9.8, 6.5, 2.1 Hz, 1H, H-6), 4.06 (t, *J*=6.7 Hz, 1H, H-9), 3.51-3.58 (m, 2H, H-3), 2.34 (m, 1H, H-5a), 2.16 (m, 1H, H-10), 1.94 (m, 1H, H-5b), 1.90-2.07 ppm (H-4a ve H-4b), 1.42 (m, 1H, H-11a), 1.33 (m, 1H, H-11b), 1.08 (d, *J*=7.2 Hz, 3H, H-13), 0.94 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, H-12).

^{13}C-NMR, δ (ppm, CD_3OD, 500 MHz) 170.1 (C-1), 166.3 (C-7), 61.3 (C-9), 59.9 (C-6), 46.2 (C-3), 37.2 (C-10), 29.1 (C-5), 25.2 (C-11), 23.3 (C-4), 15.1 (C-13), 12.3 (C-12).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde amino asitler için spesifik α-hidrojen bölgesinde (3-4 ppm) iki adet sinyal olduğu görülmüştür. Bu nedenle molekülün

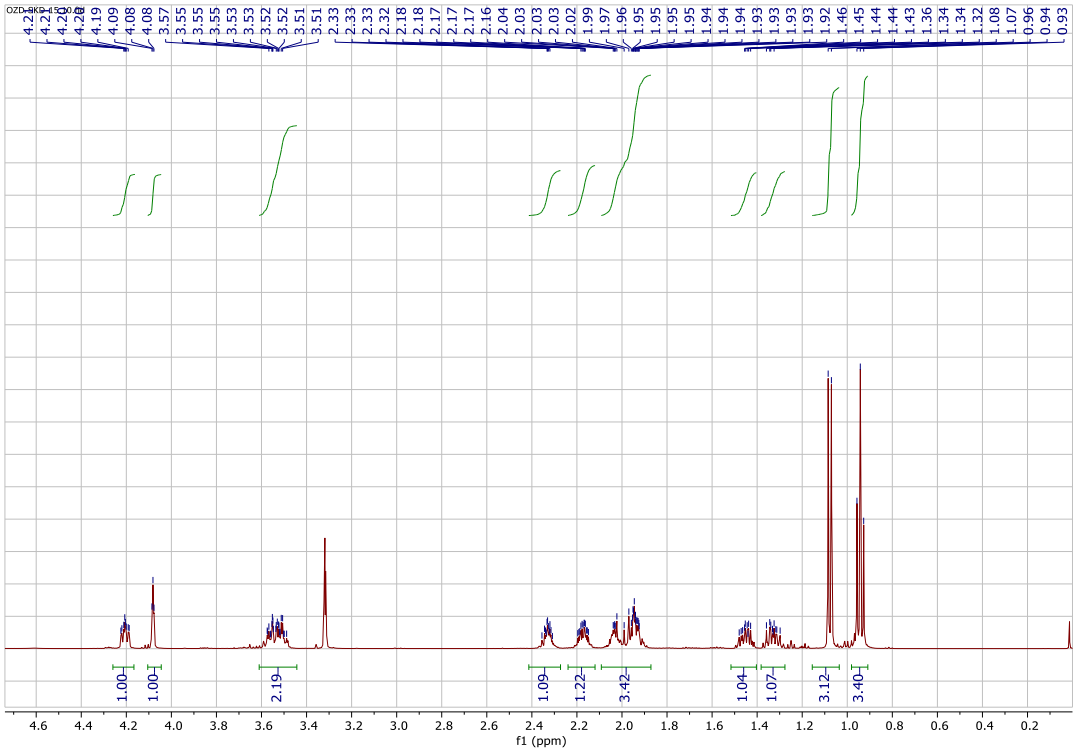
dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

^{1}H NMR spektrumundan (Şekil 86) α-hidrojenlerden birisinin 4.0 ppm'de (H-6) sinyal verdiği, bu protonun bağlı olduğu karbon değerinin HSQC'den (Şekil 87) 59.9 ppm (C-6) olduğu bulunmuştur. ^{1}H NMR spektrumunda 1.94-2.34 ppm (H-5b ve H-5a), 1.90-2.07 ppm (H-4a ve H-4b) ve 3.51-3.58 ppm'de (H-3a ve H-3b) görülen sinyallerin prolin amino asidi için karakteristik olması, amino asitlerden birisinin prolin olduğunu göstermiştir.

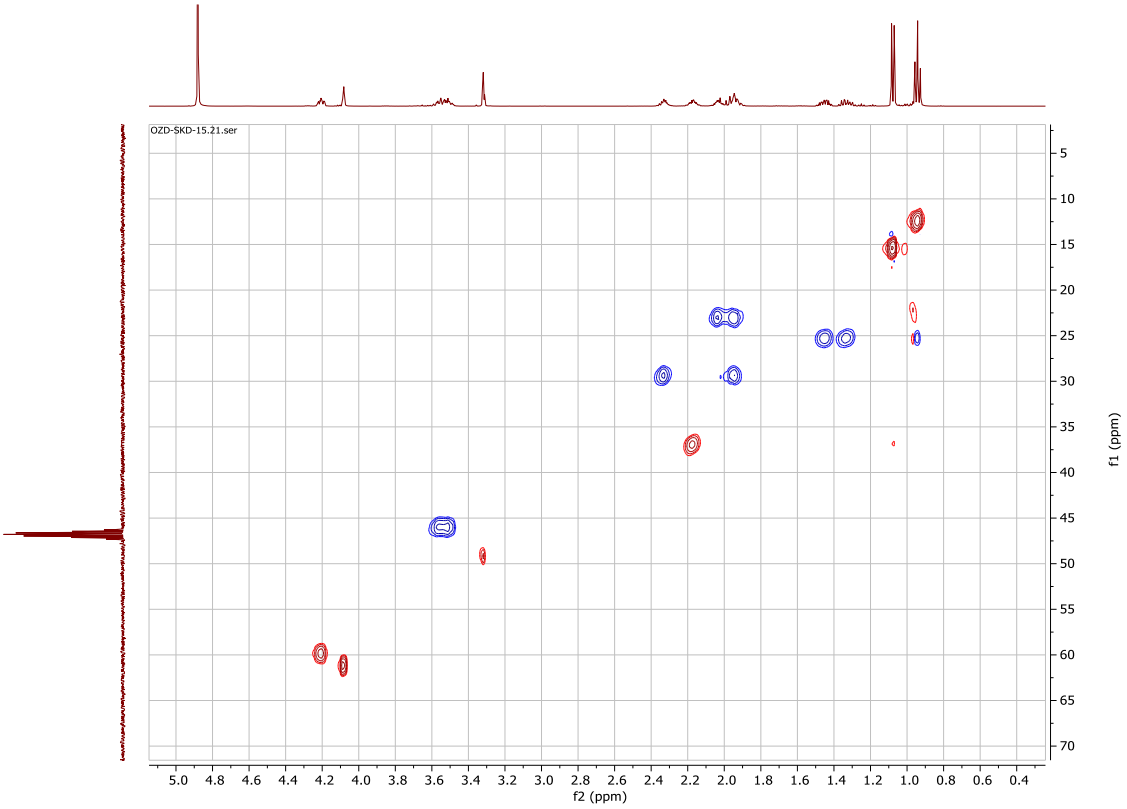
Diğer amino asidin α-hidrojeni 4.06 ppm'de (H-9) sinyal vermiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 61.3 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. 2.16 ppm'de (H-10) sinyal veren protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 37.1 ppm (C-10), 1.33-1.42 ppm'de (H-11) sinyal veren protonun bağlı olduğu karbon değeri ise 25.2 ppm (C-11) olarak belirlenmiştir.

Bileşikte 0.94 ppm'de (H-12) sinyal veren metil ($-CH_3$) protonun bağlı olduğu karbonun sinyali 12.3 ppm (C-12) olarak, diğer metil protonu 1.08 ppm'de (H-13) sinyal verirken C-13'ün karbon değeri 15.1 ppm olarak belirlenmiştir. H-12 protonu triplet yarılma verirken H-13 protonu dublet yarılma vermesi, uçtaki metillerin sırasıyla $-CH_2CH_3$ ve $-CHCH_3$ olarak bağlandığını göstermektedir. Bu amino asidin izolösin olduğu anlaşılmış ve böylece molekülün yapısı siklo-L-Prolin-L-İzolösin olarak belirlenmiştir.

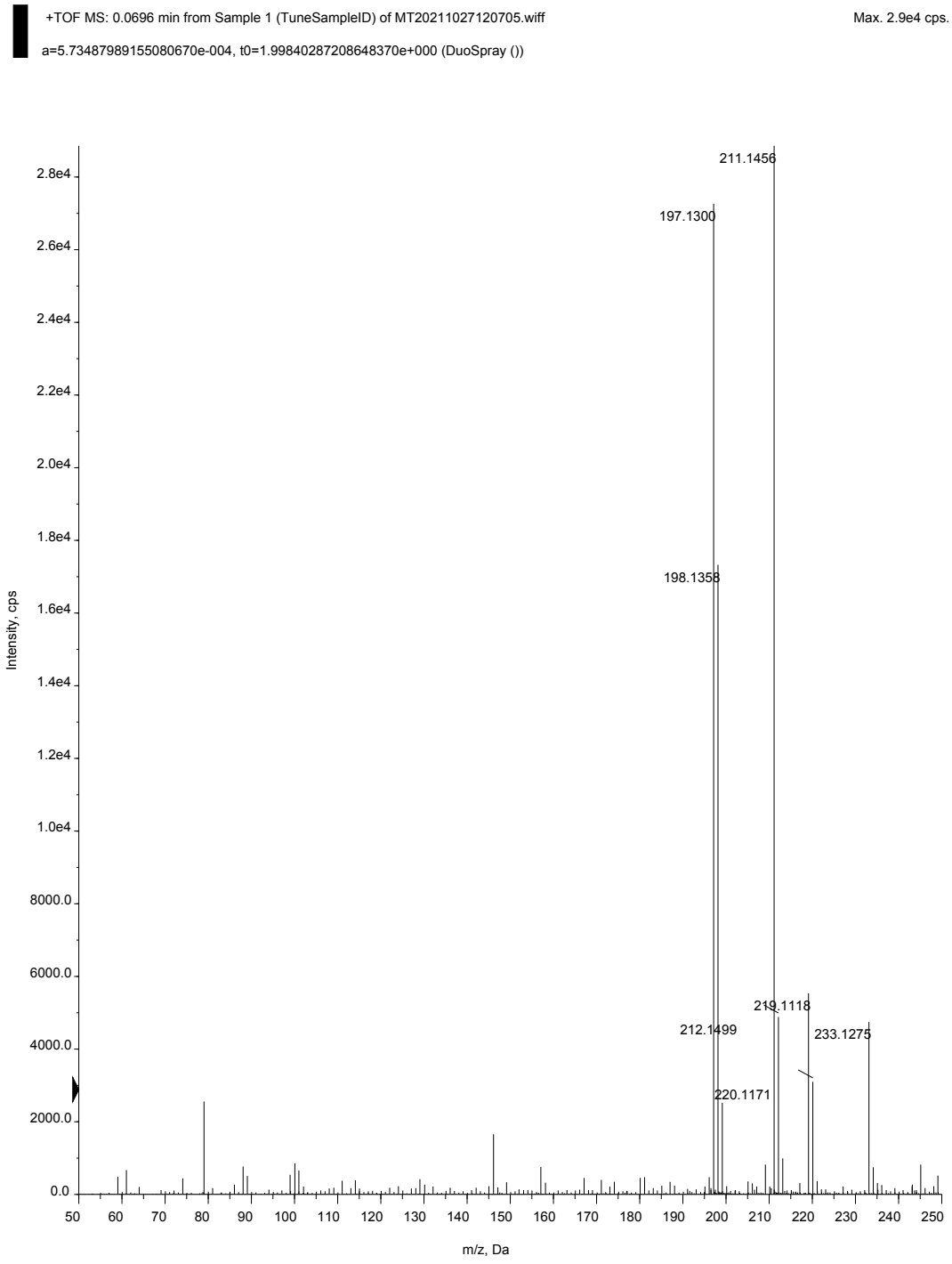
Bileşiğe ait LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{11}H_{18}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 211.1456 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{11}H_{18}N_2O_2$ için 211.1402 olarak bulunmuştur (Şekil 88).



Şekil 86. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu

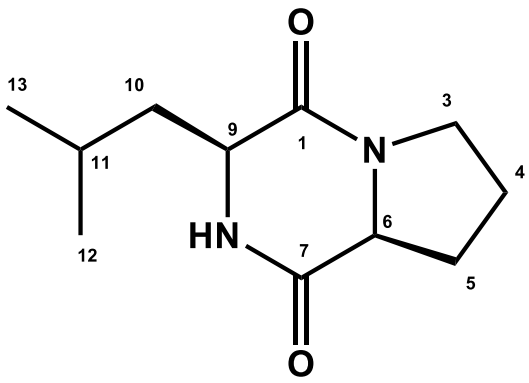


Şekil 87. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait HSQC spektrumu



Şekil 88. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait LC-Q-TOF-MS analizi

Siklo-L-Prolin-D-Lösin (7)



Şekil 89. Siklo-L-Prolin-D-Lösin

Bileşiğin görünümü krem rengi toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı yapılan ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda, siklo-L-Prolin-D-Lösin (siklo-S-Prolin-R-Lösin) (Şekil 89) olarak belirlenmiştir (Şekil 90-93).

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -88° (c. 0.2, 20°C, EtOH) olarak ölçülmüştür (195).

UV (MeOH) λ_{max} nm: 204

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3284 (NH gerilmesi), 2950, 2876 (C-H gerilmesi), 1650 (C=O), 1470, 1430 (C-H eğilmesi).

^{1}H-NMR, δ (ppm, CD_3OD, 500 MHz) 4.25 (ddd, *J*=9.3, 6.9, 1.9 Hz, 1H, H-6), 4.12 (m, 1H, H-9), 3.49-3.52 (m, 2H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-5a), 2.05 (m, 1H, H-5b), 2.01 (m, 1H, H-4a), 1.95 (m, 1H, H-4b), 1.92 (m, 1H, H-10a), 1.89 (m, 1H, H-11), 1.53 (m, 1H, H-10b), 0.98 (d, *J*=7.5 Hz, 6H, H-12,13).

^{13}C-NMR, δ (ppm, CD_3OD, 500 MHz) 171.4 (C-1), 167.5 (C-7), 58.9 (C-6), 53.2 (C-9), 45.0 (C-3), 38.0 (C-10), 27.7 (C-5), 24.4 (C-11), 22.3 (C-4), 20.8 (C-12,13).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde amino asitler için spesifik alfa hidrojen bölgesinde 2 adet sinyal olduğu görülmüştür. Böylece molekülün dipeptit yapısına sahip olduğu anlaşılmıştır.

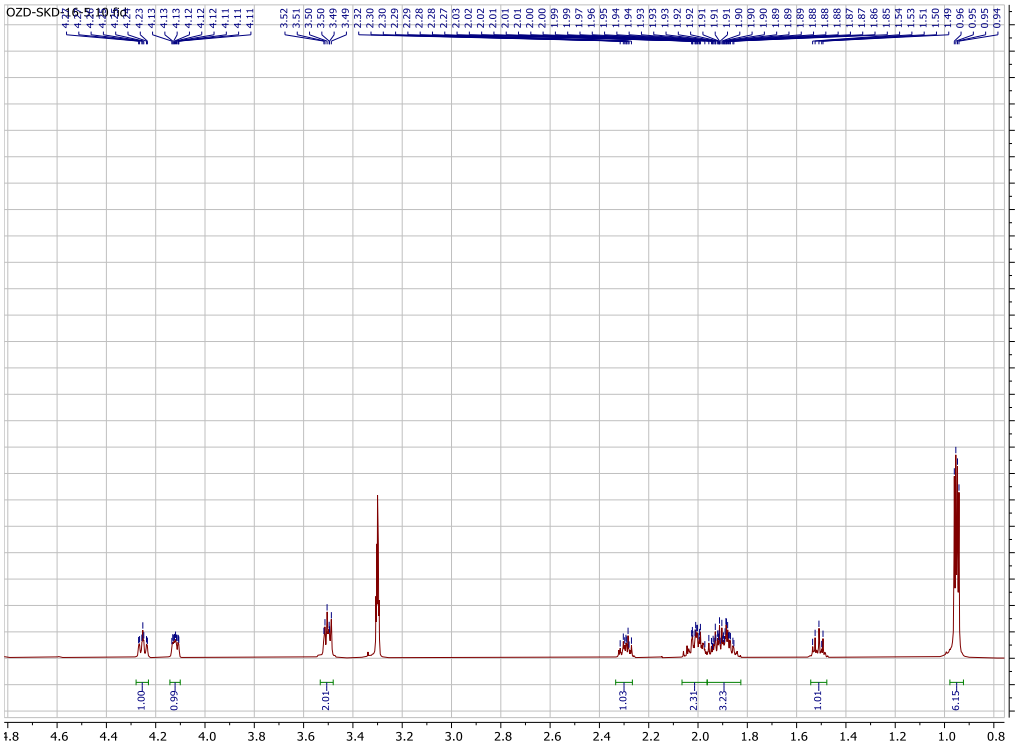
^{1}H-NMR spektrumundan (Şekil 90) α-hidrojenlerden birisinin 4.25 ppm'de (H-

6) sinyal verdiği, bu protonun bağlı olduğu karbon değerinin HSQC'den (Şekil 92) 58.9 ppm (C-6) olduğu bulunmuştur. ^{1}H-NMR spektrumunda 2.05-2.33 ppm (H-5), 1.95-2.01 ppm (H-4) ve 3.49-3.52 ppm'de (H-3) görülen sinyallerin prolin amino asidi için karakteristik olması, amino asitlerden birisinin prolin olduğunu göstermiştir.

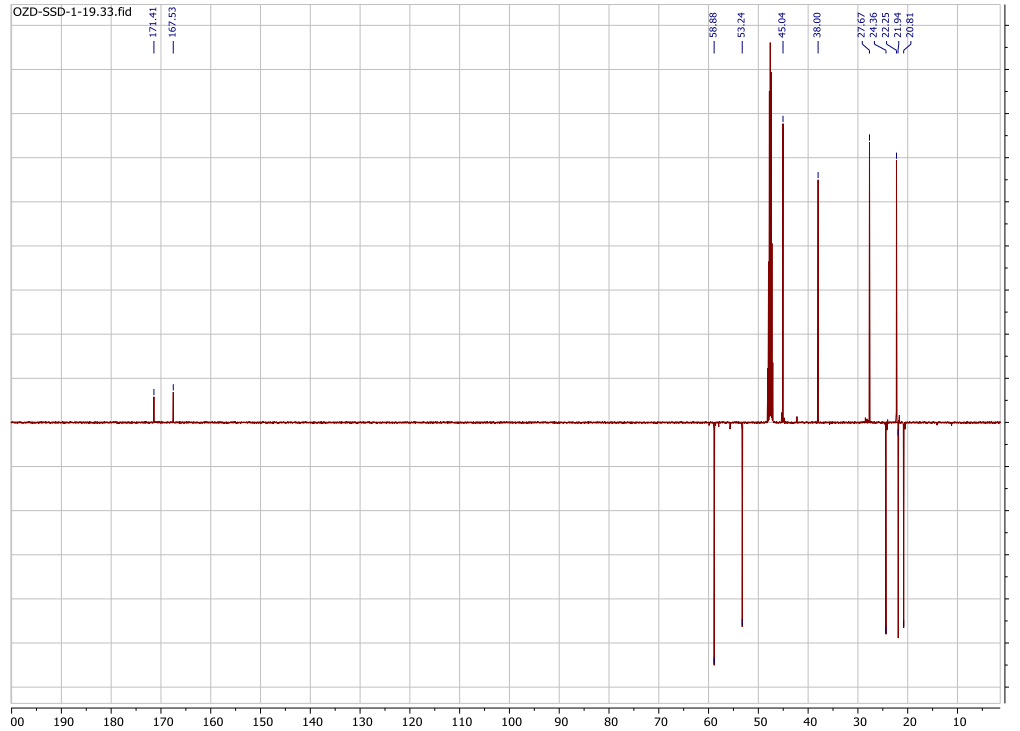
Diğer amino asidin α-hidrojeni 4.12 ppm'de (H-9) sinyal vermiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 53.2 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. 1.92 ve 1.53 ppm'de (H-10) sinyal veren protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 38.0 ppm'de metilen karbonu (-CH_2, C-10) olarak tespit edilirken, 1.88 ppm'de (H-11) sinyal veren protonun bağlı olduğu karbon değeri ise 24.4 ppm'de metin karbonu (-CH, C-11) olarak belirlenmiştir.

Bileşikte 0.98 ppm'de (H-12 ve H-13) örtüşen metil (-CH_3) protonlarının karbon değerleri HSQC spektrumundan 20.8 ve 21.9 ppm olarak belirlenmiş, APT spektrumu ile doğrulanmıştır. Bu protonların integralinin 6H olarak hesaplanmış olması ve örtüşen iki dublet vermesi $CH(CH_3)_2$ olarak bağlandığını göstermektedir. Bu amino asidin lösin olduğu anlaşılmıştır. Böylece bileşiğin yapısı Siklo-L-Prolin-D-Lösin olarak aydınlatılmıştır (195).

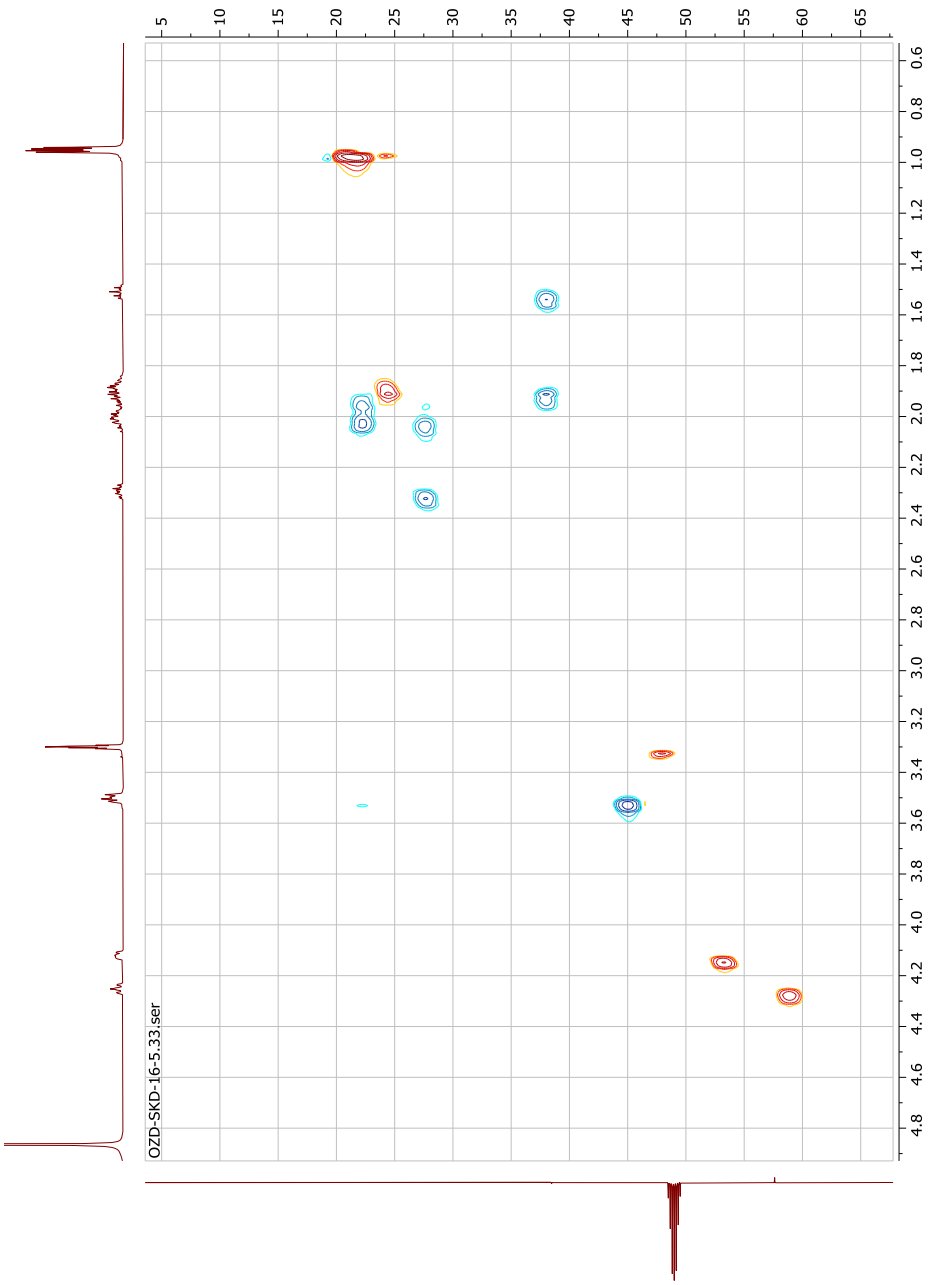
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{11}H_{18}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 211.1481 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{11}H_{18}N_2O_2$ için 211.1402 olarak bulunmuştur (Şekil 93).



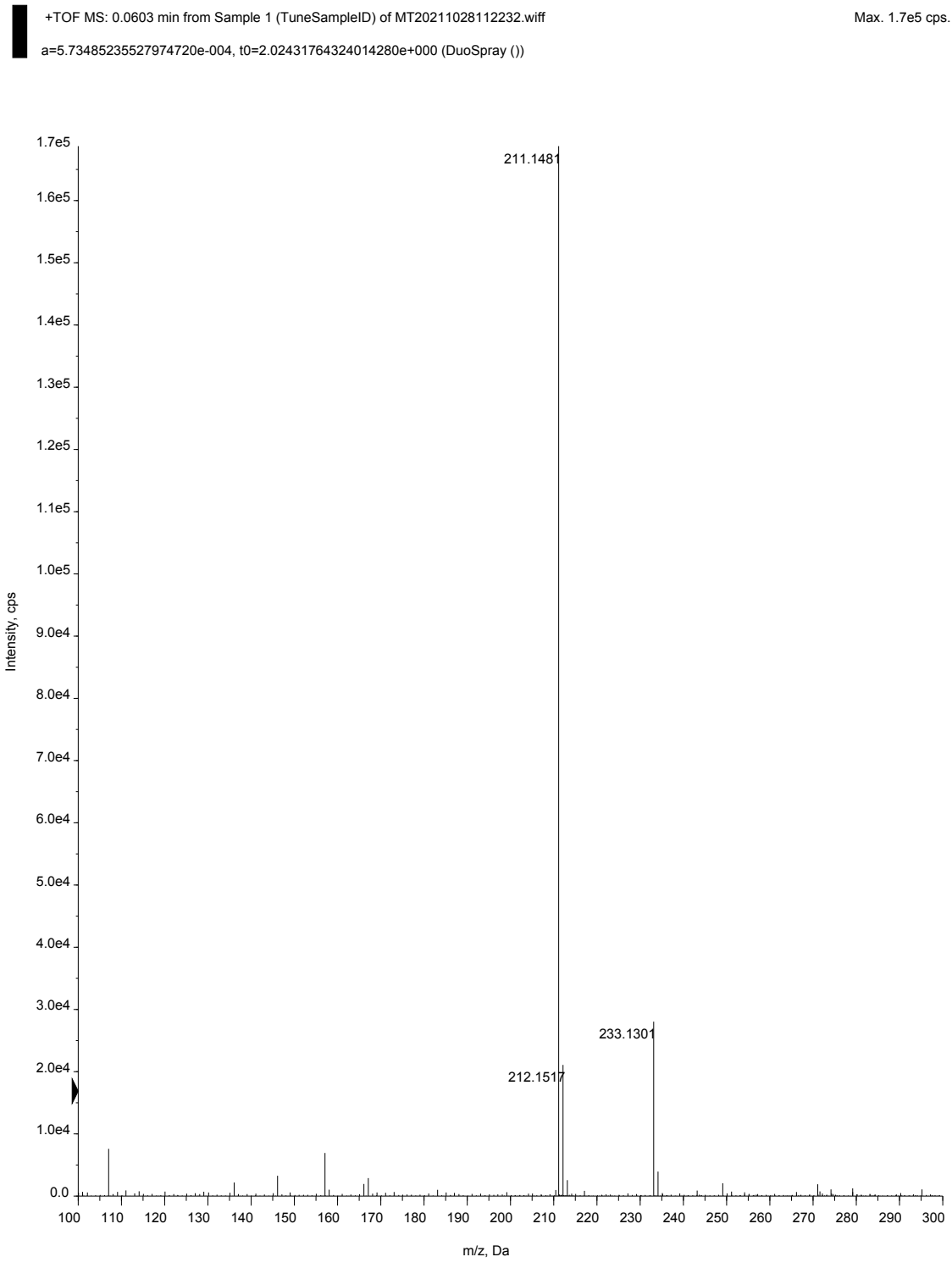
Şekil 90. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 91. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu

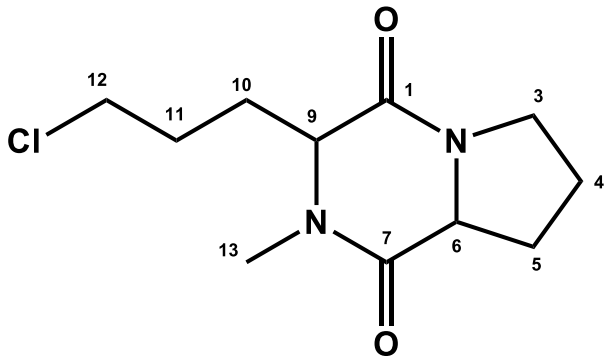


Şekil 92. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait HSQC spektrumu



Şekil 93. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

Meletamit (8)



Şekil 94. Meletamit

Görünüşü kristalimsi-toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı alınan 1D, 2D NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda çözülmüştür (Şekil 95-98) ve yeni bir molekül olduğu bulunmuştur (Şekil 94). NMR verileri Tablo 10'da verilmiştir.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 212

^{1}H-NMR spektrumunda aminoasitler için karakteristik α-hidrojenlerinin gözlendiği 3.5-4 ppm civarında iki adet α proton gözlenmesi bileşiğin bir siklodipeptit olabileceğini düşündürmüştür. Önceki bileşiklerde karşılaştığımız proline ait sinyaller karakteristik kimyasal kayma değerlerinde, karakteristik yarılmalarını göstermişlerdir (Tablo 10).

Proline ait α-hidrojeni 4.09 ppm'de t (*J*= 8.5 Hz) (H-6) olarak gözlenirken, bu protona ait karbon değeri HSQC'den 59.3 ppm olarak bulunmuştur. Prolin'e ait diğer protonlar karakteristik bölgede 2.85-3.02 ppm (H-3), 2.03-1.93 ppm (H-4) ve 1.99-2.33 ppm'de (H-5) gözlenirken, bu protonların bağlı olduğu karbon sinyalleri sırasıyla 49.0 ppm (C-3), 23.6 ppm (C-4), 29.3 ppm (C-5) olarak gözlenmiştir.

^{13}C-APT spektrumunda diketo- yapısına ait iki adet karbonil karbonu sinyali 165.1 ppm (C-1) ve 172 ppm'de (C-7) görülmektedir.

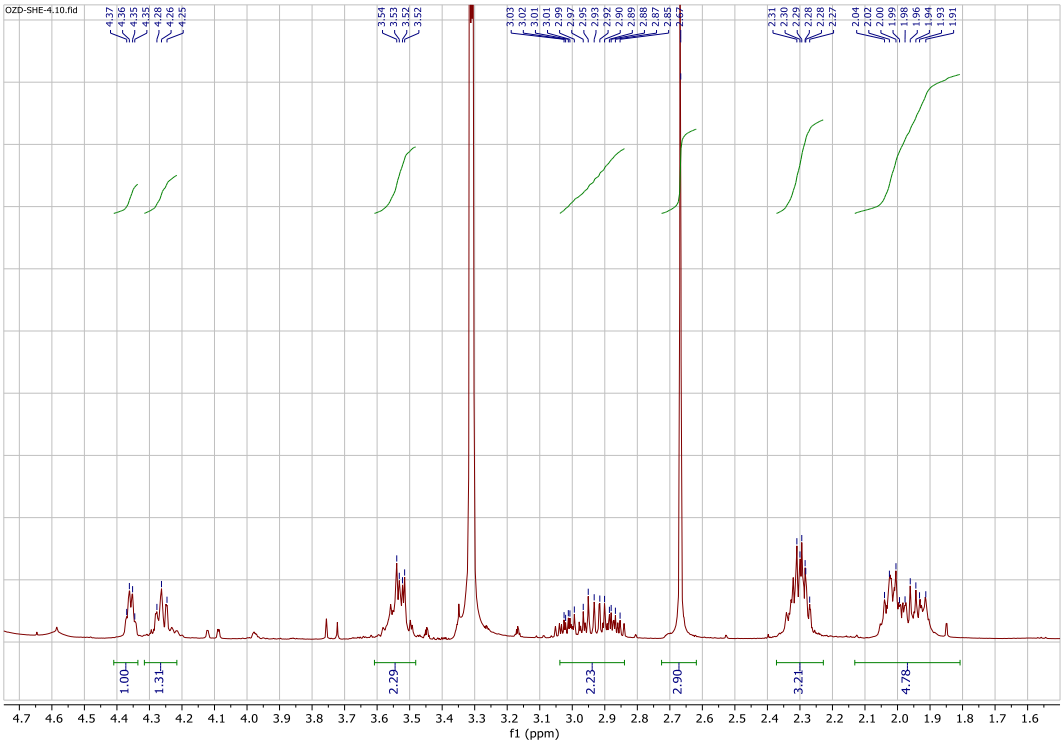
Molekülün yapısındaki diğer α-proton sinyali 4.36 ppm'de gözlenmiştir. Bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 55.2 ppm (C-9) olarak bulunmuştur. HSQC spektrumuna bakıldığında molekülün bu kısmına ait üç adet -CH_2 sinyali (mavi renk metilen proton sinyalini işaret etmektedir) görülmektedir. 3.54 ppm'de dd (*J*= 8.5, 3.6 Hz) -CH_2 sinyali görülmüş, HSQC'den protonların bağlı olduğu karbon değeri

46.5 ppm (C-12) olarak gözlenmiştir. Bu karbonun -Cl atomuna komşu olduğu anlaşılmaktadır. Diğer -CH_2 sinyalleri ise; proton sinyali 2.30-2.25 ppm'de, karbon sinyali ise 24.0 ppm'de (C-10); proton sinyali 2.05-1.91 ppm'de, karbon sinyali ise 29.3 ppm'de (C-11) gözlenmiştir. Son olarak azot atomuna bağlı -N-CH_3'ün proton değeri 2.67 ppm'de gözlenirken, bu protonların bağlı olduğu karbon sinyali 38.0 ppm'de (C-13) gözlenmiştir. Yeni olan bu bileşik Meletamid olarak adlandırılmıştır.

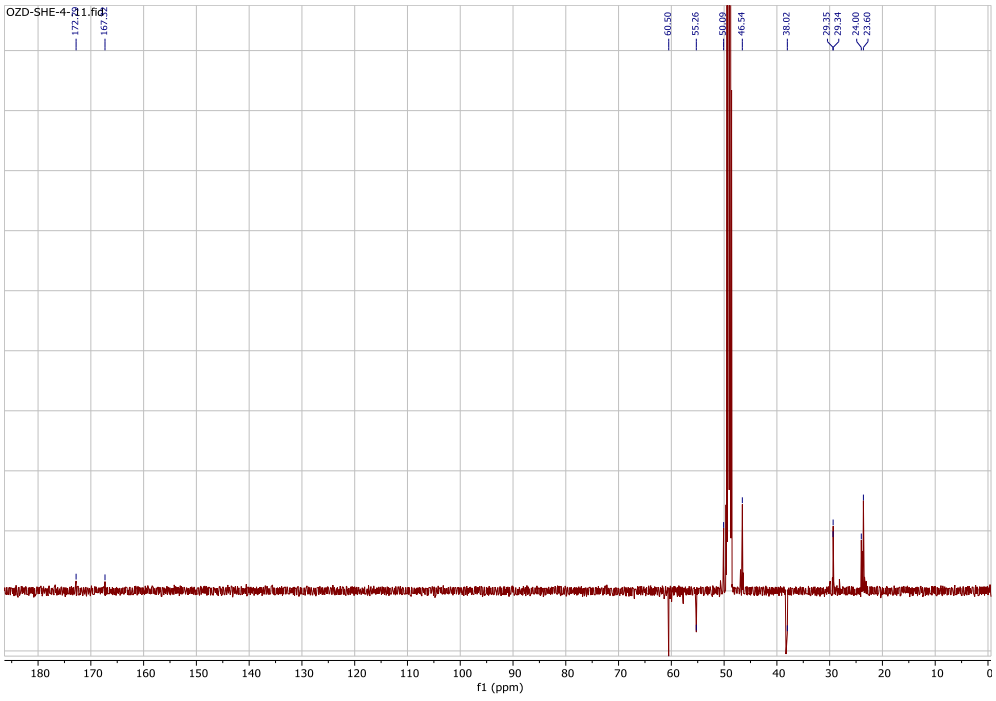
Bileşiğe ait LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{11}H_{16}N_2O_2Cl$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 245.0960 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{11}H_{17}N_2O_2Cl$ için 245.1056 olarak bulunmuştur. Ayrıca $[M+Na]^+$ iyon piki *m/z* 267.0778 olarak gözlenmiştir (Şekil 98).

Tablo 10. Meletamit bileşiğinin 1D ve 2D NMR değerleri (500 MHz, CD_3OD)

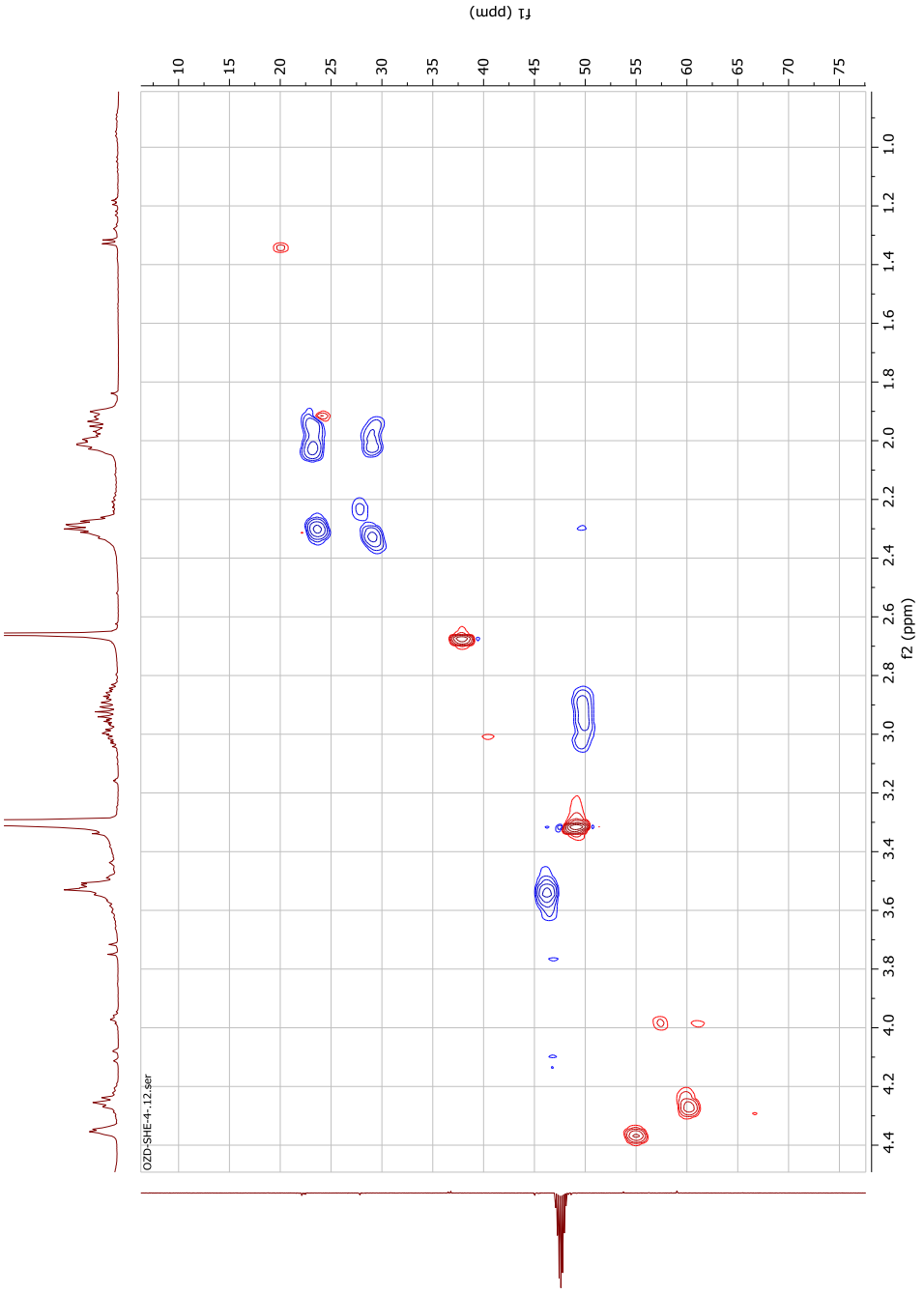
Atom No	**δ ^{1}H (ppm, Hz, İntegral)**	**δ ^{13}C (ppm, C türü)**
1	-	167.1 (CO)
2	-	-
3	2.85-3.02 (m, 2H)	49.0 (CH_2)
4	2.03 (m,1H) 1.93 (m,1H)	23.6 (CH_2)
5	2.33 (m, 1H) 1.99 (m, 1H)	29.3 (CH_2)
6	4.26 (t, *J*= 8.5 Hz, 1H)	60.5 (CH)
7	-	172.3 (CO)
8 (N)	-	-
9	4.36 (m, 1H)	55.2 (CH)
10	2.25-2.30 (m, 2H)	24.0
11	1.91-2.05 (m, 2H)	29.3
12	3.54 (dd, *J*= 8.5, 3.6 Hz, 2H)	46.5 (CH_2)
13	2.67 (s, 3H)	38.0 (-NCH_3)



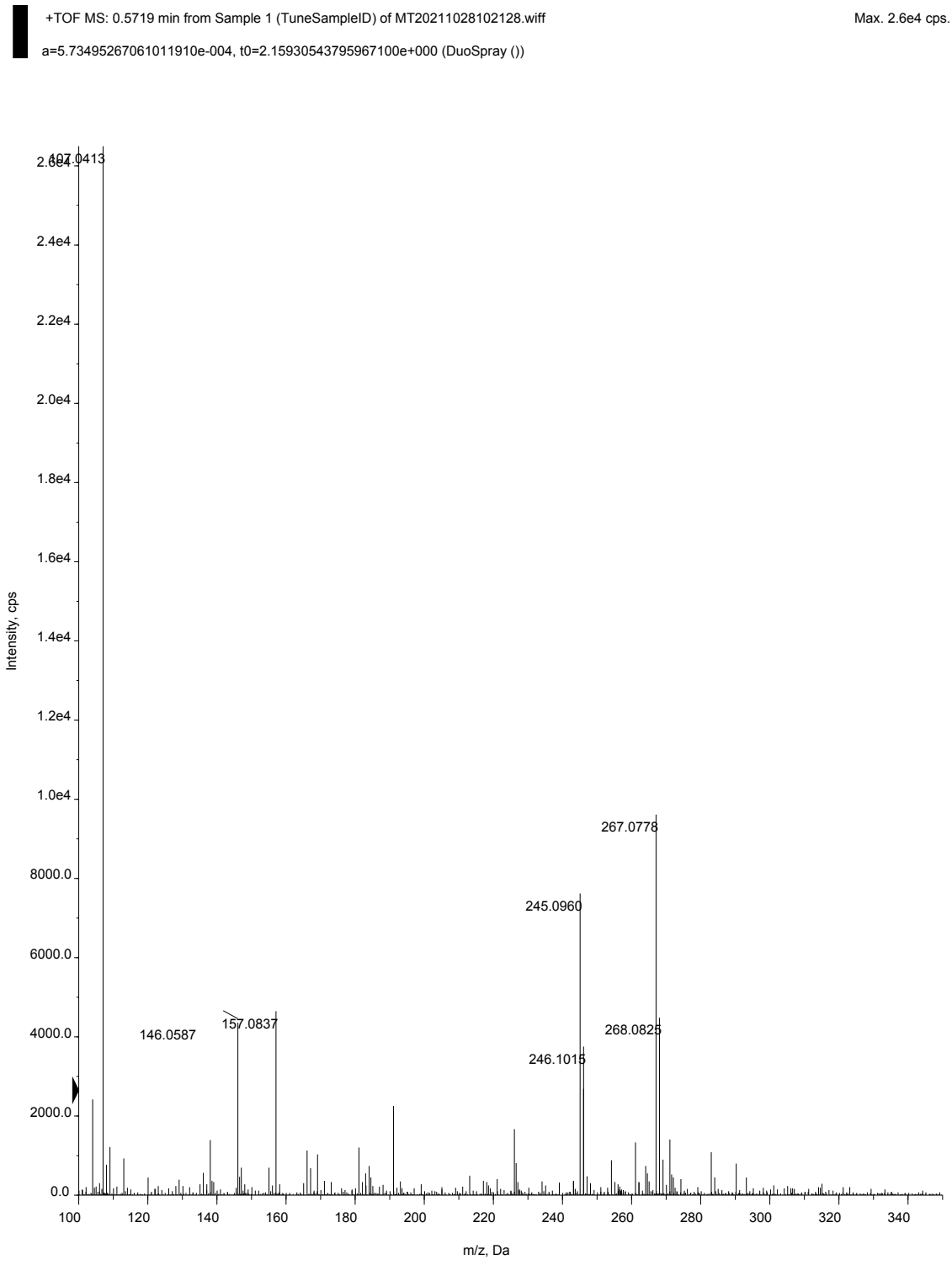
Şekil 95. Meletamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 96. Meletamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu

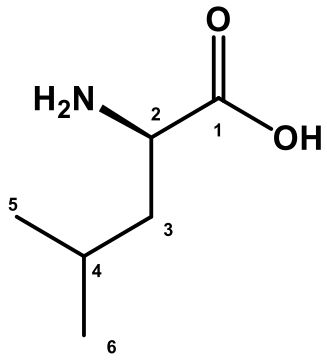


Şekil 97. Meletamit bileşiğine ait HSQC spektrumu



Şekil 98. Meletamit bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

L-Lösin (10)



Şekil 99. L-Lösin

İzole edilen bileşiğin görünüşü beyaz toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı yapılan ^{1}H NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda, L-Lösin (S-Lösin) (Şekil 99) olarak belirlenmiştir (Şekil 100,101).

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -18° (c. 0.2, 20°C, MeOH) literatür ile uyumlu bulunmuştur (197).

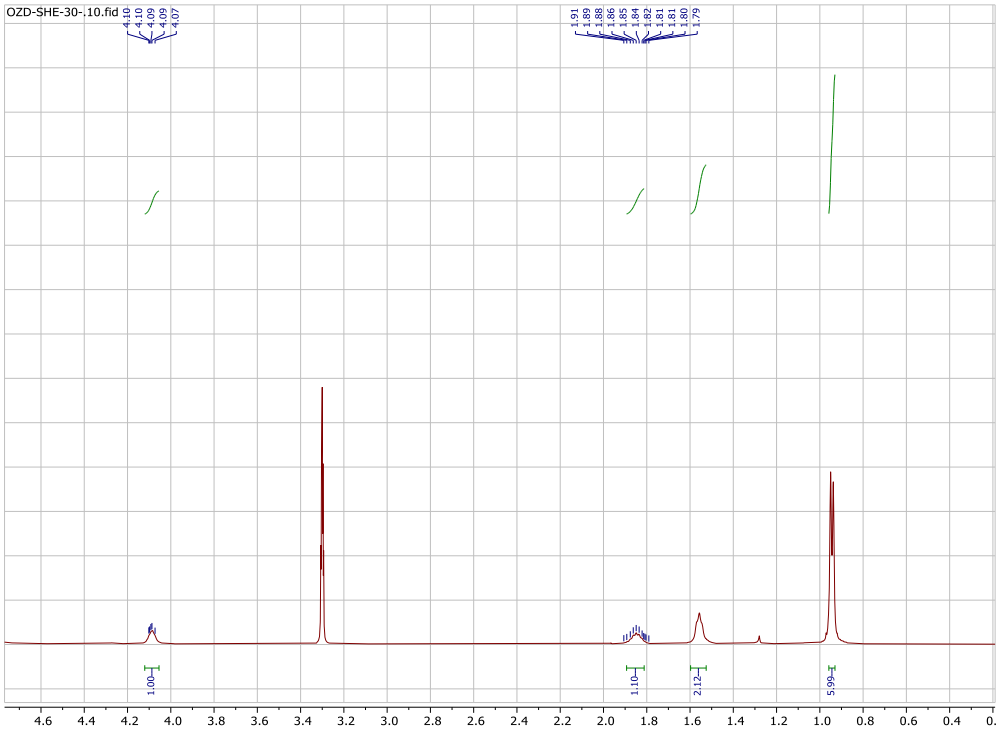
UV (MeOH) λ_{max} nm: 209

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3490 (O-H gerilmesi), 3198 (NH gerilmesi), 2955, 2936, 2870 (C-H gerilmesi), 1717 (C=O), 1150 (C-O gerilmesi).

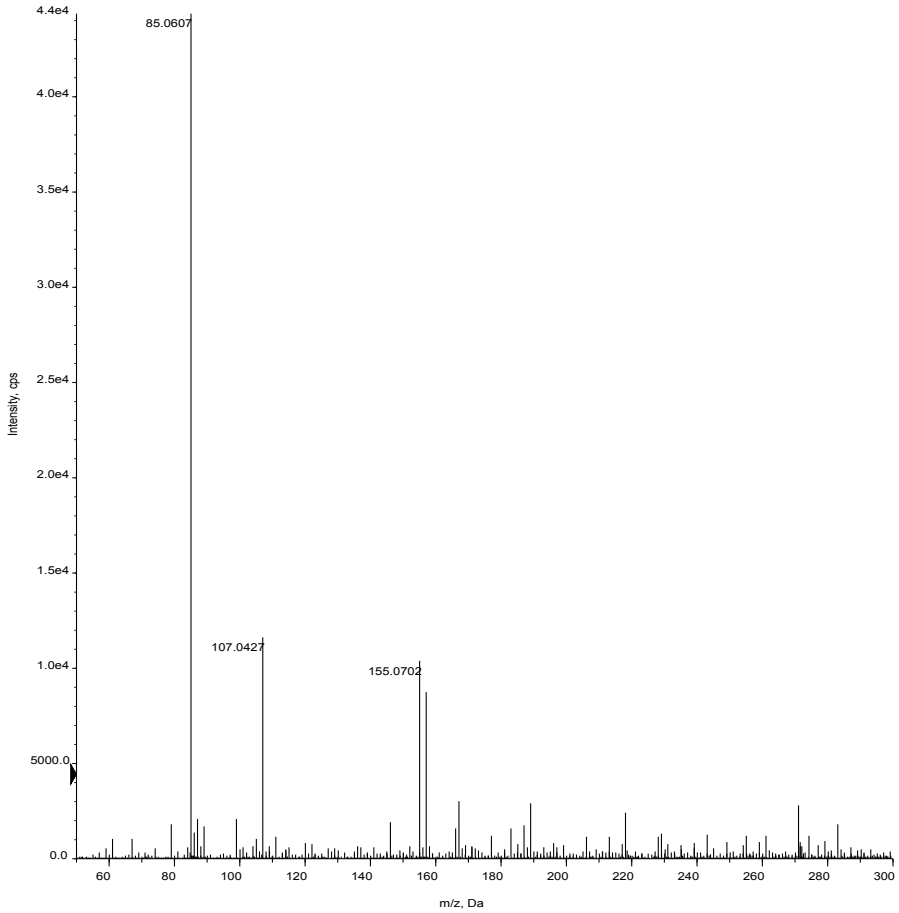
^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 4.09 (m, 1H, H-2), 1.81–1.89 (m, 1H, H-4), 1.52-1.58 (m, 2H, H-3), 0.94 (d, *J*=6.6 Hz, 6H, H-5 ve H-6).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde, bir adet α-hidrojen olduğu 4.09 (1H, H-2) anlaşılmıştır. 0.94 ppm'de altı adet hidrojen integrali gözlenmesi örtüşmüş iki metil (CH_3-5 ve CH_3-6) grubu olduğunu, dublet yarılma göstermesi ise komşuda metin protonu varlığını (-CH, H-4) göstermektedir. Ayrıca bir adet metilen (-CH_2) (1.52-1.58 ppm) olduğu da görülmektedir. Verilere göre bu amino asidin Lösin olduğu tespit edilmiştir.

Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_6H_{13}NO_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki $[M+H+Na]^+$ *m/z* 155.0702 olarak gözlenmiştir. Hesaplanan değer $C_6H_{14}NO_2Na$ için 155.0844 olarak bulunmuştur (Şekil 100).

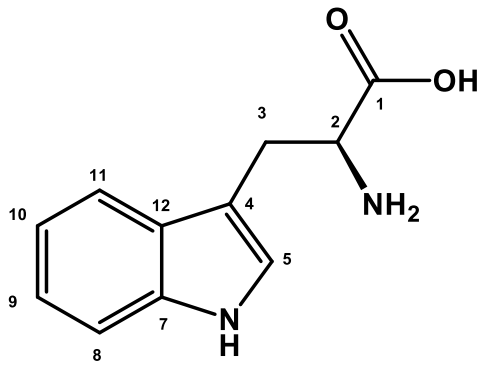


Şekil 100. L-lösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 101. L-lösin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

L-Triptofan (12)



Şekil 102. L-Triptofan

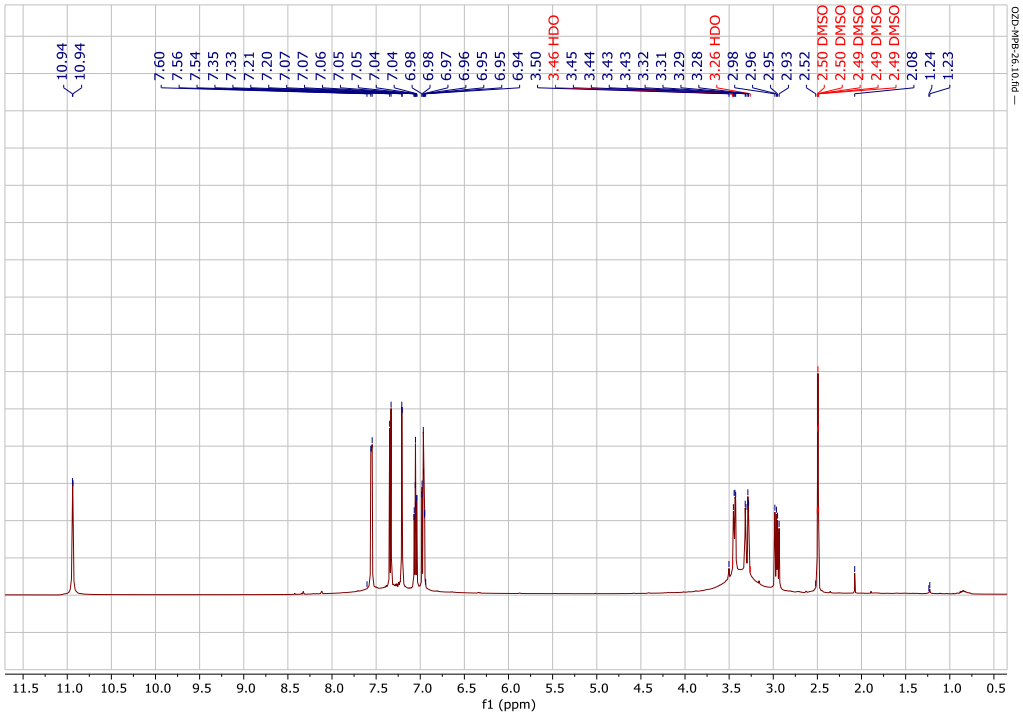
Bileşiğin görünümü beyaz-krem toz formundadır. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda, L-Triptofan (Şekil 102) olarak belirlenmiştir (Şekil 103-105). Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -34° (c. 0.2, H_2O) olarak ölçülmüştür (198).

^{1}H-NMR, δ (ppm, DMSO-d_6, 500 MHz) 3.47 (dd, *J*=8.9, 4.1 Hz, 1H, H-2), 3.30 (dd, *J*=15.1, 4.1 Hz, 1H, H-3a), 2.96 (dd, *J*=15.1, 8.9 Hz, 1H, H-3b), 7.21 (s, 1H, H-5), 7.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, H-8), 7.06 (ddd, *J*=8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H-9), 6.97 (ddd, *J*=8.0, 6.9, 1.0 Hz, 1H, H-10), 7.56 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, H-11). 10.94 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, NH_2).

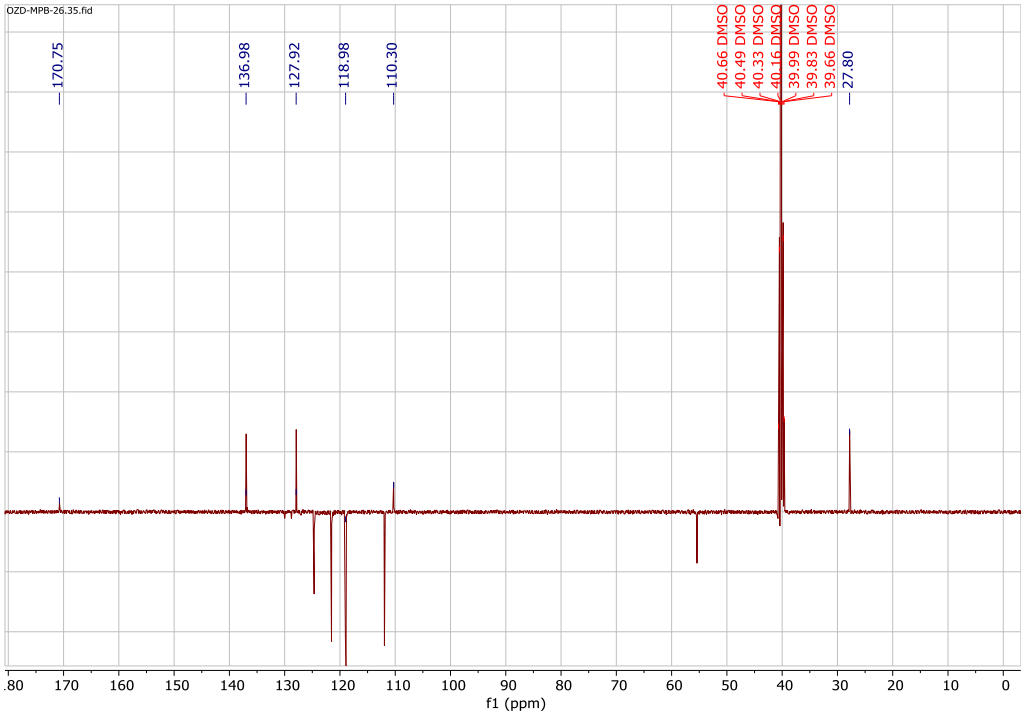
^{13}C-NMR, δ (ppm, DMSO-d_6, 500 MHz) 170.1 (C-1), 54.7 (C-2), 27.1 (C-3), 109.6 (C-4), 124.0 (C-5), 136.3 (C-7), 111.3 (C-8), 124.0 (C-9), 118.2 (C-10), 118.3 (C-11), 127.2 (C-12).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 103) 3.47 ppm'de (H-2) α-hidrojen sinyali görülmektedir, bu protonun bağlı olduğu karbon ise 54.7 ppm'de sinyal vermiştir. Aromatik bölgede sinyal veren protonların integralinin 5H olması (Şekil 103), ^{13}C-APT spektrumu incelendiğinde 5 adet -CH sinyali [124.0 (C-5), 111.3 (C-8), 124.0 (C-9), 118.2 (C-10), 118.3 (C-11)], 3 adet qC sinyali [109.6 (C-4), 136.3 (C-7), 127.2 (C-12)] gözlenmesi indol halkası varlığını göstermiştir. Ayrıca molekülde 1 adet -CH_2 proton sinyali 3.30 ve 2.96 ppm'de (H-3), karbon sinyali ise 27.1 ppm'de (C-3) gözlenmiştir. Bu veriler ışığında molekülün triptofan amino asidi olduğu anlaşılmıştır.

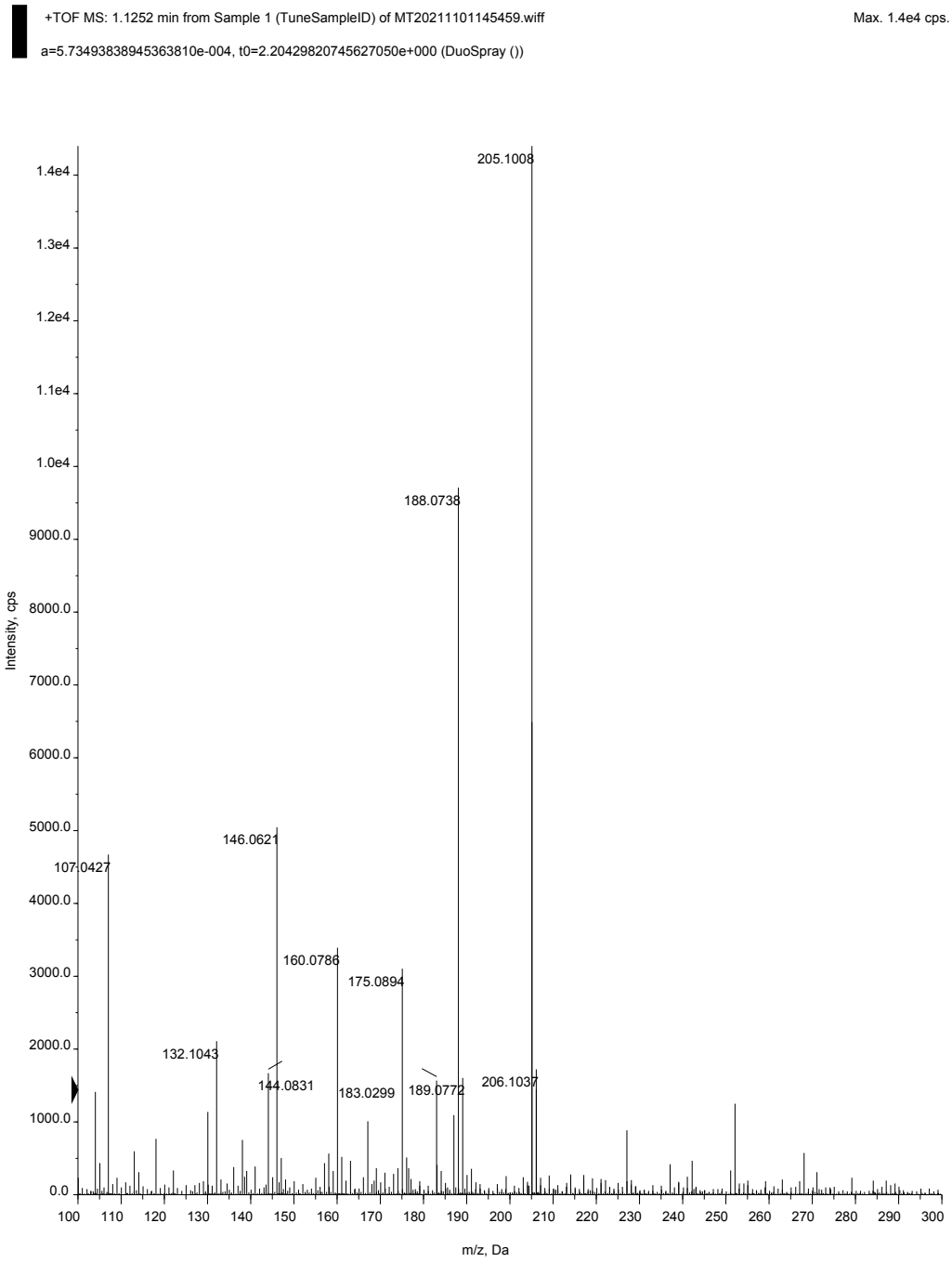
Triptofan, LC-Q-TOF kütle spektroskopisinde $C_{11}H_{12}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 205.1008 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{11}H_{13}N_2O_2$ için 205.0977 olarak bulunmuştur (Şekil 105).



Şekil 103. L-Triptofan bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu.



Şekil 104. L-Triptofan bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu.



Şekil 105. L-Triptofana ait LC-Q-TOF MS analizi

S. *klenkii*'den İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

Diklorometan ekstresinden (319.6 mg) **Meletamid (14), Siklo-L-prolin-L-tirozin (15), Siklo-L-prolin-D-valin (16), Siklo-L-prolin-L-izolösin (17)**, **Siklo-L-prolin-D-lösin (18)** ve **Siklo-D-prolin-L-fenil alanin (19)** olmak üzere 6 adet bileşik saflaştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerin yapıları olarak aydınlatılmıştır. İzole edilen bu bileşikler daha önce *S. hoynatensis*'ten izole edildiği için 1D- ve 2D- NMR spektrumları tekrar sunulmamıştır.

Etil asetat ekstresinden (52.1 mg) **Siklo-L-prolin-L-tirozin (20)** olmak üzere bir adet bileşik saflaştırılmıştır. İzole edilen bu bileşik daha önce *S. hoynatensis*'ten izole edildiği için 1D- ve 2D- NMR spektrumları tekrar sunulmamıştır.

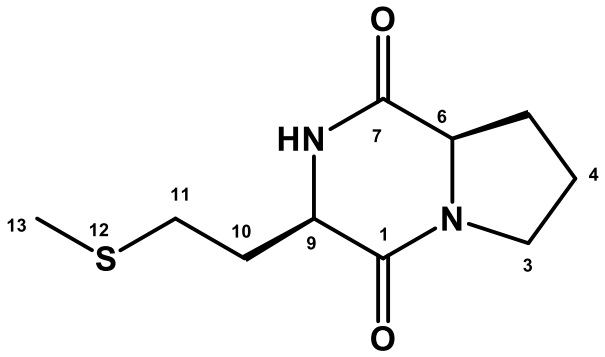
Bütanol ekstresinden (539.8 mg) **Meletamid (21)**, **Siklo-L-prolin-L-tirozin (22)** ve **Siklo-L-prolin-D-valin (23)** olmak üzere 3 adet bileşik saflaştırılmıştır. Bu bileşikler daha önce *S. hoynatensis*'ten izole edildiği için 1D- ve 2D- NMR spektrumları tekrar sunulmamıştır.

S. *smyrnaeus*'tan İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

Diklorometan ekstresinden (458.7 mg) **Siklo-L-prolin-D-valin** (**24**), **Siklo-L-prolin-L-metiyonin (25)**, **2-fenilasetamid** (**26**), **Siklo-L-prolin-L-izolösin** (**27**), **Siklo-L-prolin-D-lösin** (**28**) ve **Siklo-D-prolin-L-fenil alanin** (**29**) olmak üzere 6 adet bileşik saflaştırılmıştır.

Bütanol ekstresinden (246.9 mg) **L-Lösin (30), L-Fenil alanin (31)**, **L-Triptofan (32)** ve **Siklo-L-prolin-L-tirozin (33)** olmak üzere 4 adet madde saflaştırılmıştır. Daha önce *S. hoynatensis*'ten izole edilen bileşiklere ait 1D ve 2D-NMR spektrumları tekrar sunulmamış, sadece *S. smyrnaeus*'tan izole edilen **25**, **26** ve **31** nolu bileşiklere ait spektrumlar Şekil 106-121 arasında verilmiştir.

Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin (25)



Şekil 106. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin

Renksiz amorf görünümdedir. Bileşiğin yapısı 1D, 2D NMR ve LC-Q-TOF-MS teknikleri yardımıyla çözülmüş ve siklo-L-Prolin-L-Metiyonin (Şekil 106) olarak aydınlatılmıştır (Şekil 107-111).

Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -81° (c. 0.2, Etanol) olarak ölçülmüştür (199). NMR verileri Tablo 11'de verilmiştir.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205 nm

IR V_{max} (cm^{-1}): 3350 (N-H), 2853 (S-H gerilmesi), 2995 (C-H gerilmeleri). 1640 ve 1682 (C=O), 1480 (CH_2 eğilmeleri).

Proline ait α-hidrojeni 4.26 ppm'de t (*J*= 8.5 Hz, H-6) olarak gözlenirken, bu protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 60.6 ppm (C-6) olarak bulunmuştur. Prolin'e ait diğer protonlar karakteristik bölgede 3.54 ppm (H-3), 2.04-1.96 ppm (H-4) ve 2.00-2.32 ppm'de (H-5) gözlenirken, bu protonların bağlı olduğu karbon sinyalleri sırasıyla 46.7 ppm (C-3), 23.7 ppm (C-4), 29.5 ppm (C-5) olarak gözlenmiştir. HMBC'den H-6 protonunun korelasyon yaptığı amit karbonil sinyali 168.2 ppm'de (C-1) görülmüştür.

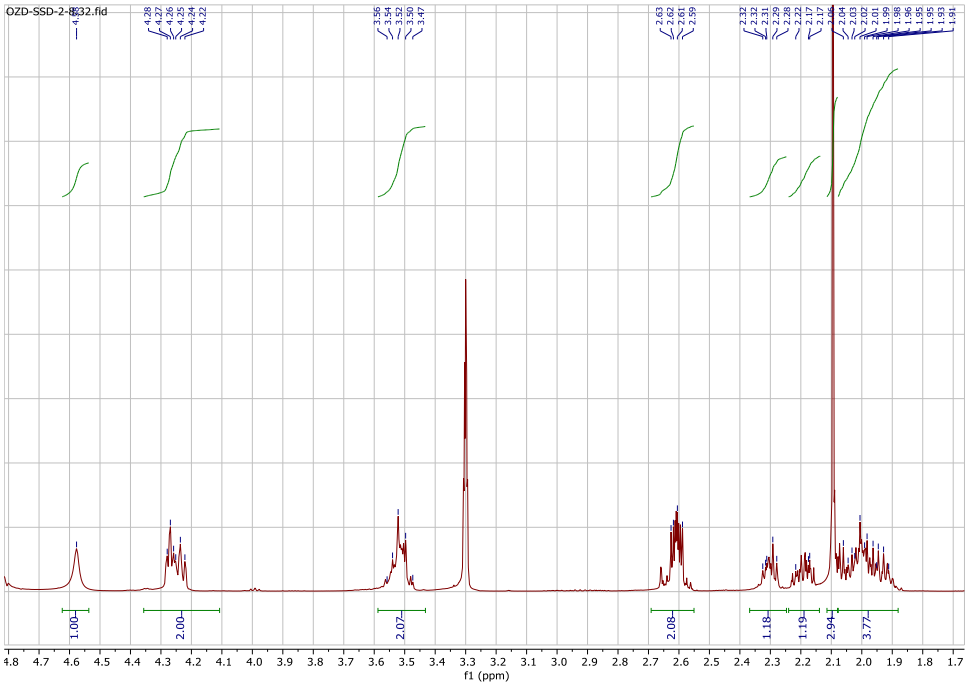
Metiyonin'e ait α-hidrojeni 4.29 ppm'de (m,1H, H-9) gözlenirken, bu protona ait karbon değeri HSQC'den 55.6 ppm olarak bulunmuştur. Metiyonine ait diğer protonlar 2.21-2.08 ppm (H-10), 2.60-2.63 ppm (H-11) ve 2.10 ppm s (3H) (H-13) olarak gözlenirken, bu protonların bağlı olduğu karbon sinyalleri sırasıyla 30.5 ppm (C-10), 30.6 ppm (C-11) ve 15.3 (C-13, $-SCH_3$) olarak gözlenmiştir. HMBC'den H-9

protonunun korelasyon yaptığı amit karbonil sinyali 172.8 ppm'de (C-7) görülmüştür.

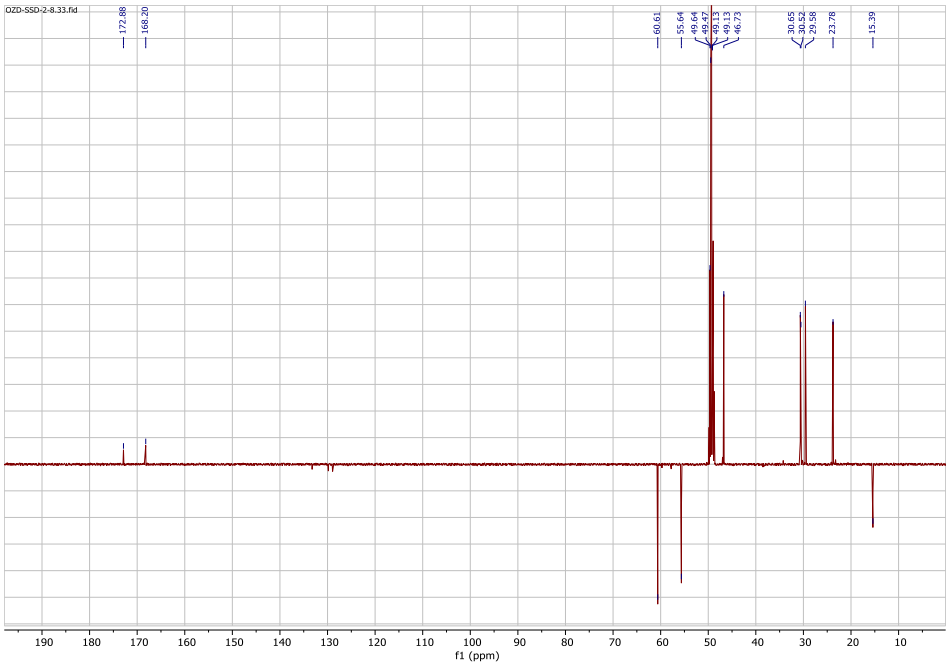
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_{10}H_{16}N_2O_2S$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 229.1019 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{10}H_{17}N_2O_2S$ için 229.1010 olarak bulunmuştur. $-SCH_3$ kopuşu *m/z* 181.09 olarak gözlenmiştir (Şekil 111).

Tablo 11. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz)

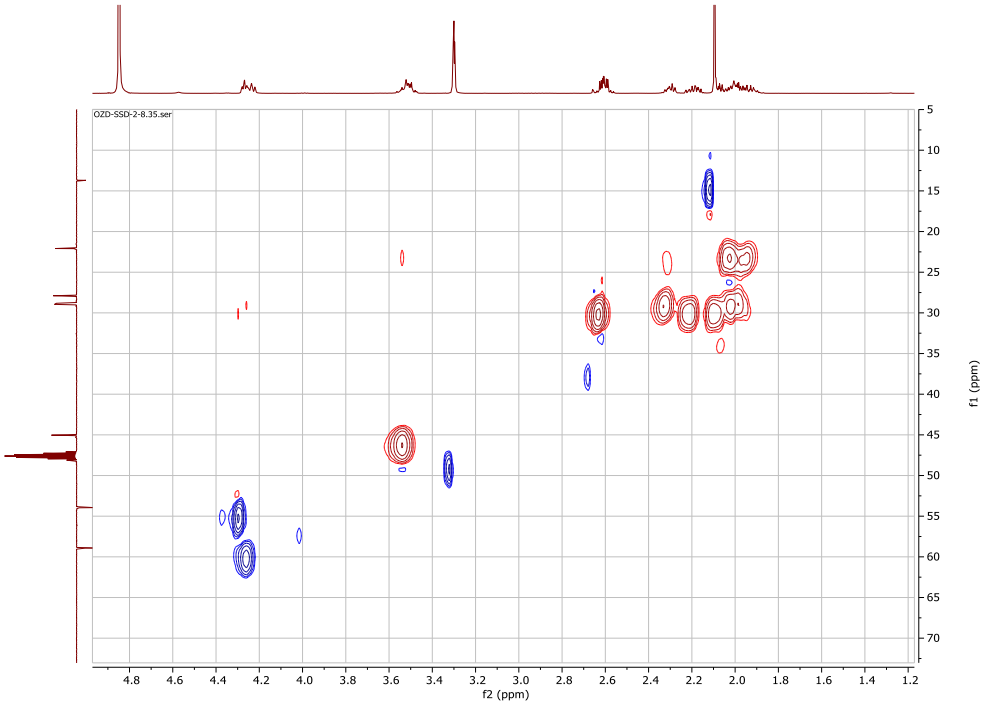
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, İntegral)	δ ^{13}C (ppm, C türü)	HMBC
1	-	168.2 (CO)	-
2	-	-	-
3	3.54 (m, 2H)	46.7 ($-CH_2$)	C-5, C-4
4	2.04 (m,1H) 1.96 (m,1H)	23.7 ($-CH_2$)	C-6, C-5, C-3
5	2.32 (m, 1H) 2.00 (m, 1H)	29.5 ($-CH_2$)	C-3, C-6 C-1, C-6, C-4
6	4.26 (t, *J*=8.5 Hz, 1H)	60.6 (-CH)	C-5, C-7
7	-	172.8 (CO)	-
8 (NH)	4.58 (brs, 1H)	-	-
9	4.29 (m, 1H)	55.6 (CH)	C-11, C-10, C-1
10	2.21 (m, 1H) 2.08 (m, 1H)	30.5 (CH_2)	C-11, C-9, C-1
11	2.60-2.63 (m, 2H)	30.6 (CH_2)	C-13, C-10, C-9
12 (S)	-	-	-
13	2.10 (s, 3H)	15.3 (CH_3)	C-11



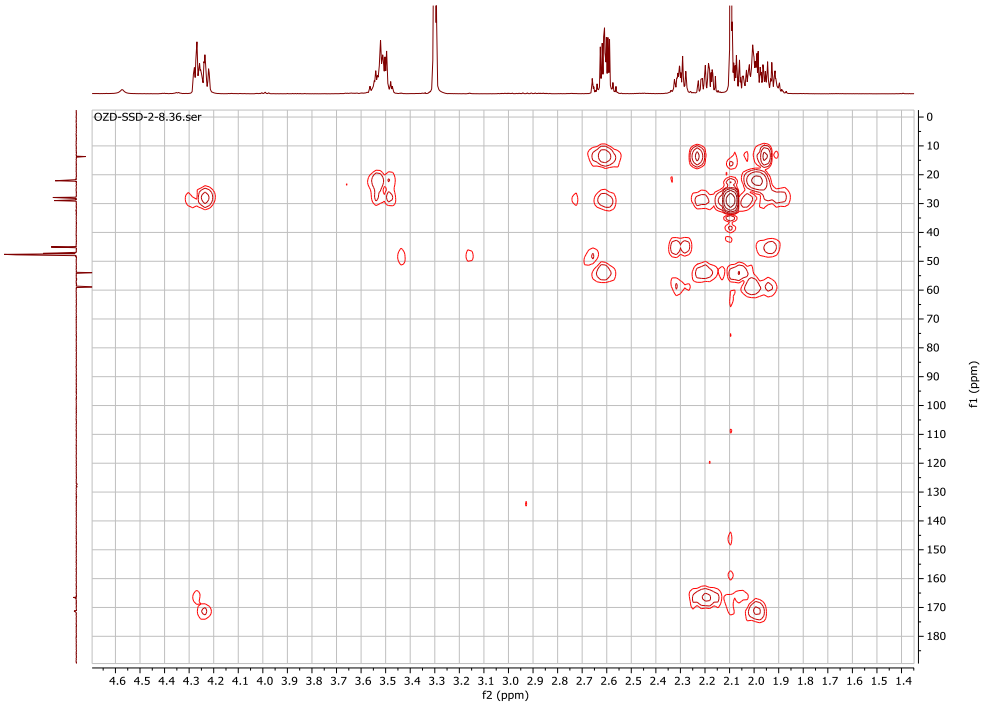
Şekil 107. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



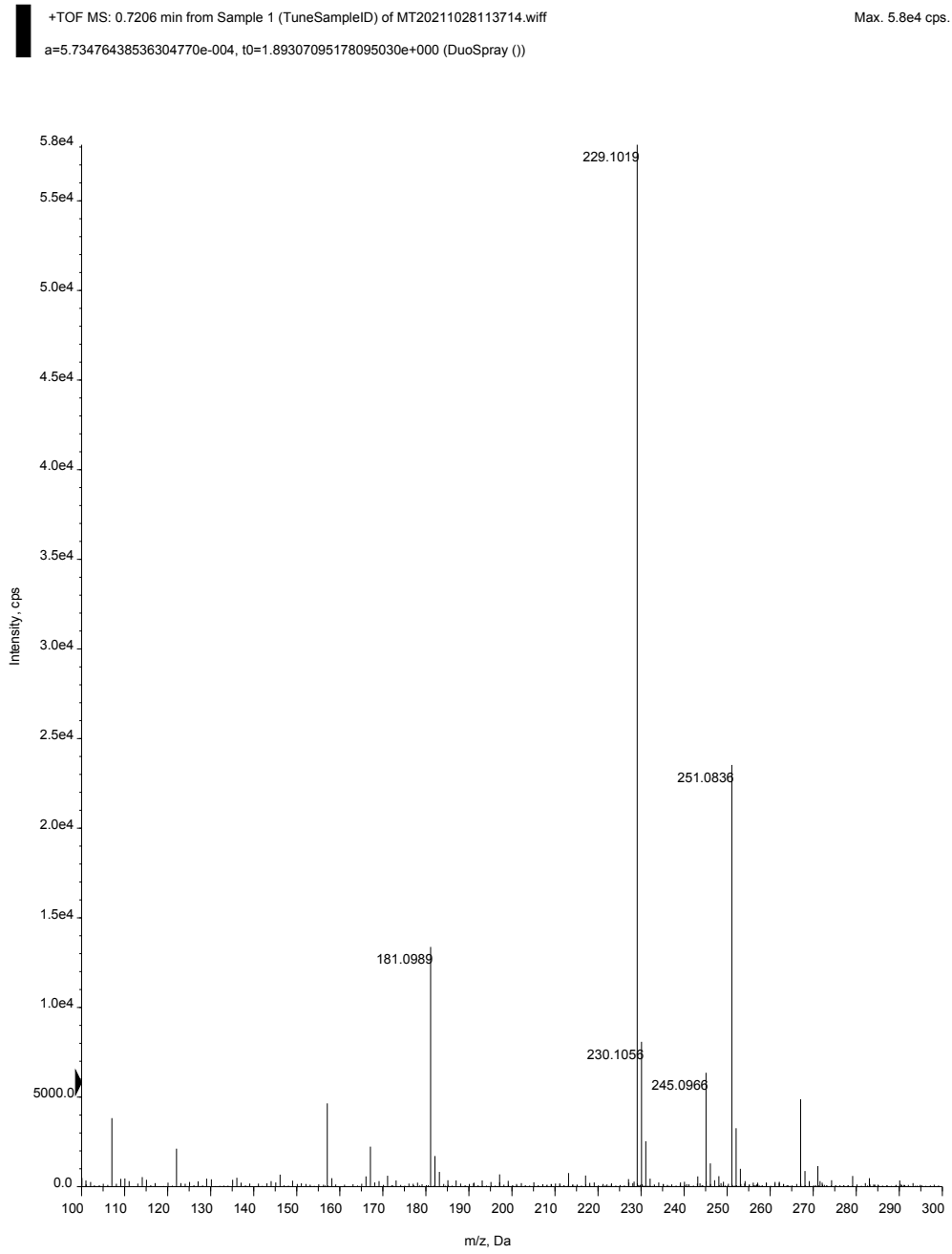
Şekil 108. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 109. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait HSQC spektrumu

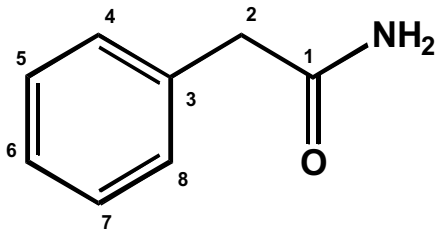


Şekil 110. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 111. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

2-fenil asetamit (26)



Şekil 112. 2-fenil asetamit

Bileşiğin görünüşü beyaz toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı 1D-, 2D-NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri (Şekil 113-117) sonucunda, 2-fenil asetamid (Şekil 112) olarak belirlenmiştir (200). Tablo 12'de bileşiğe ait 1D ve 2D NMR değerleri verilmiştir.

UV (MeOH) λ_{max} nm: 215 (201)

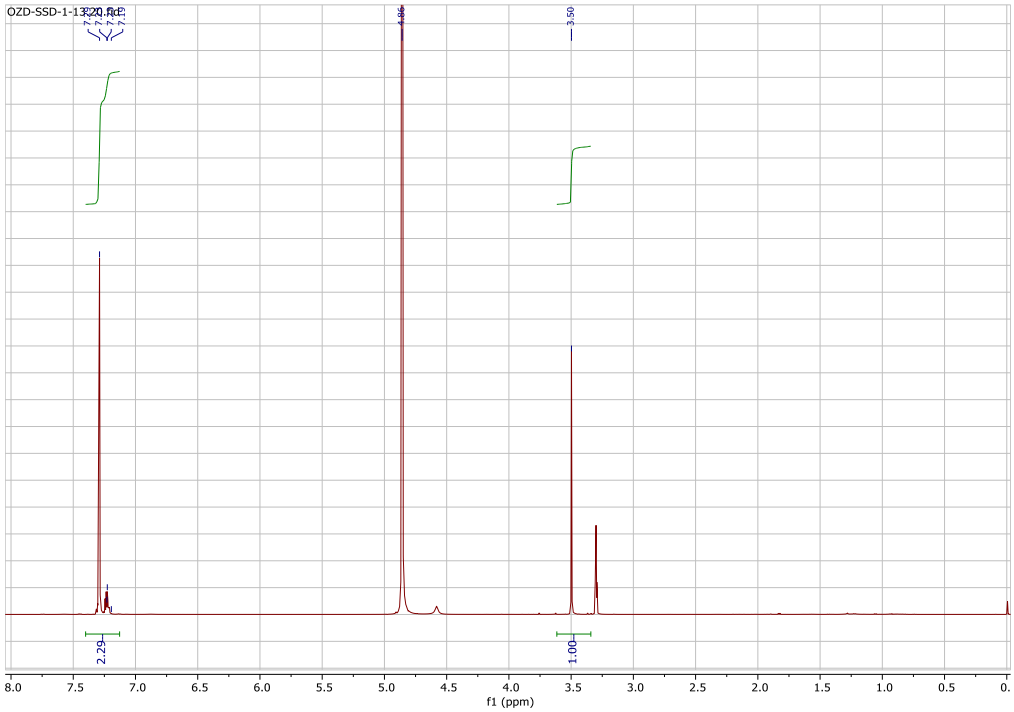
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3360 (N-H gerilmesi), 2958 (C-H gerilmesi), 1600 (C=O), 1558 (C-N gerilmesi), 1436, 1265 (Aromatik C-C gerilmesi), 968 (Aromatik C-H eğilmesi) (202).

^{1}H-NMR spektrumunda 3.50 ppm'de (s, H-2) görülen protonun bağlı olduğu karbon sinyali HSQC spektrumundan 43.9 ppm (C-2) olarak belirlenmiş ve metilen (-CH_2) protonu olduğu APT spektrumundan da doğrulanmıştır. Aromatik bölgede 7.29-7.35 ppm aralığında sinyal veren protonların (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8) bağlı olduğu karbon sinyalleri sırasıyla 130.6 ppm (C-4,8), 129.5 ppm (C-5,7) ve 128.4 ppm (C-6), olarak HSQC ve APT spektrumlarından belirlenmiştir. Ayrıca 177.5 ppm'de amit karbonil sinyali de görülmüştür ve molekülün yapısı 2-fenil asetamit olarak aydınlatılmıştır.

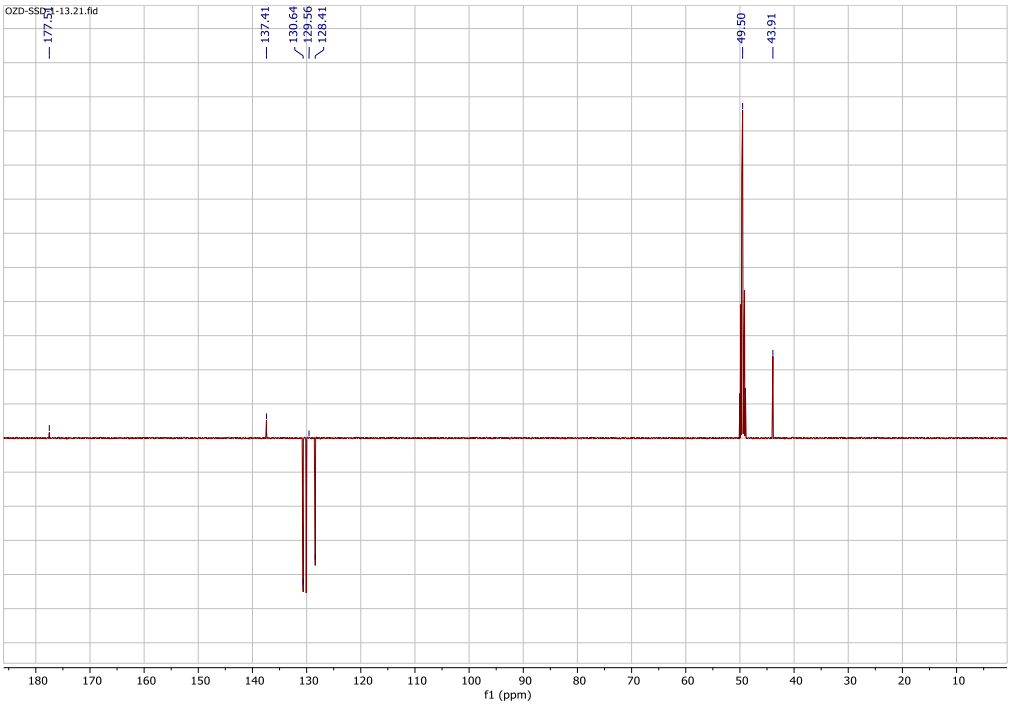
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda C_8H_9NO kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 136.0773 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. Hesaplanan değer C_8H_9NO için 136.0718 olarak bulunmuştur (Şekil 117).

Tablo 12. 2-fenil asetamidin 1D ve 2D NMR degerleri (CD_3OD, 500 MHz)

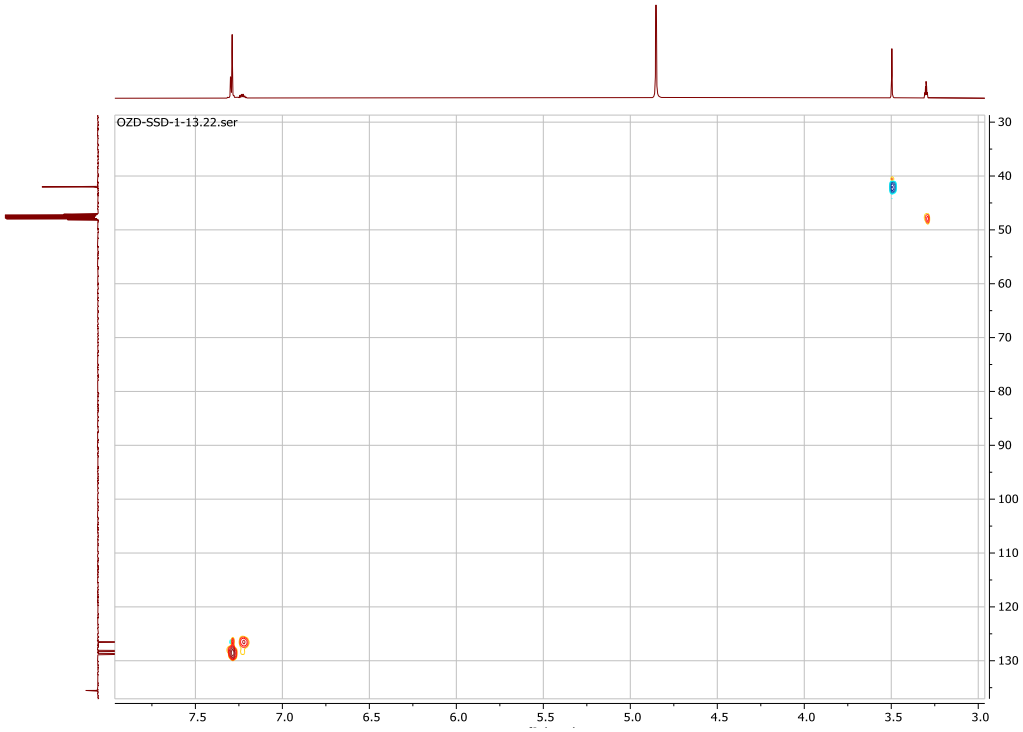
Atom No	**δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)**	**δ ^{13}C (ppm)**	**HMBC**
1	-	177.5	**-**
2	3.50 (s, 2H)	43.9	C-1, C-3, C-4, C-8
3	-	137.4	-
4	7.29-7.35 (m, 5H)	130.6	C-2, C-3, C-5, C-6
5		129.5	C-3, C-4, C-6
6		128.4	C-4,8, C-5,7
7		129.5	C-3, C-6, C-8
8		130.6	C-2, C-3, C-7, C-8
-NH_2	7.23 (s)	-	C-2



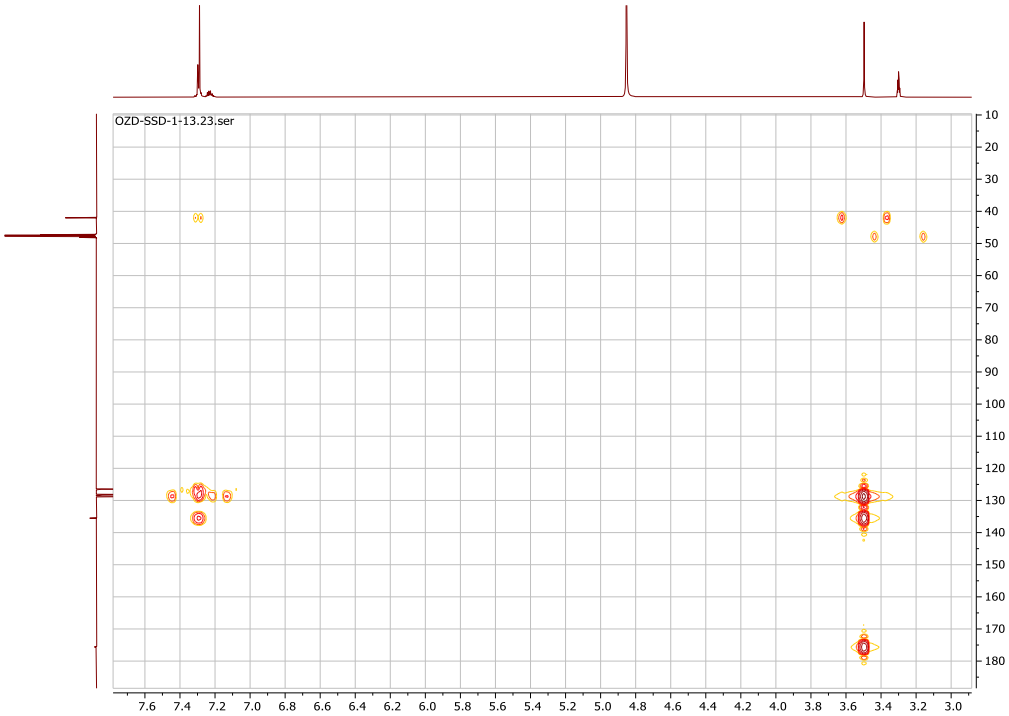
Şekil 113. Fenil asetamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



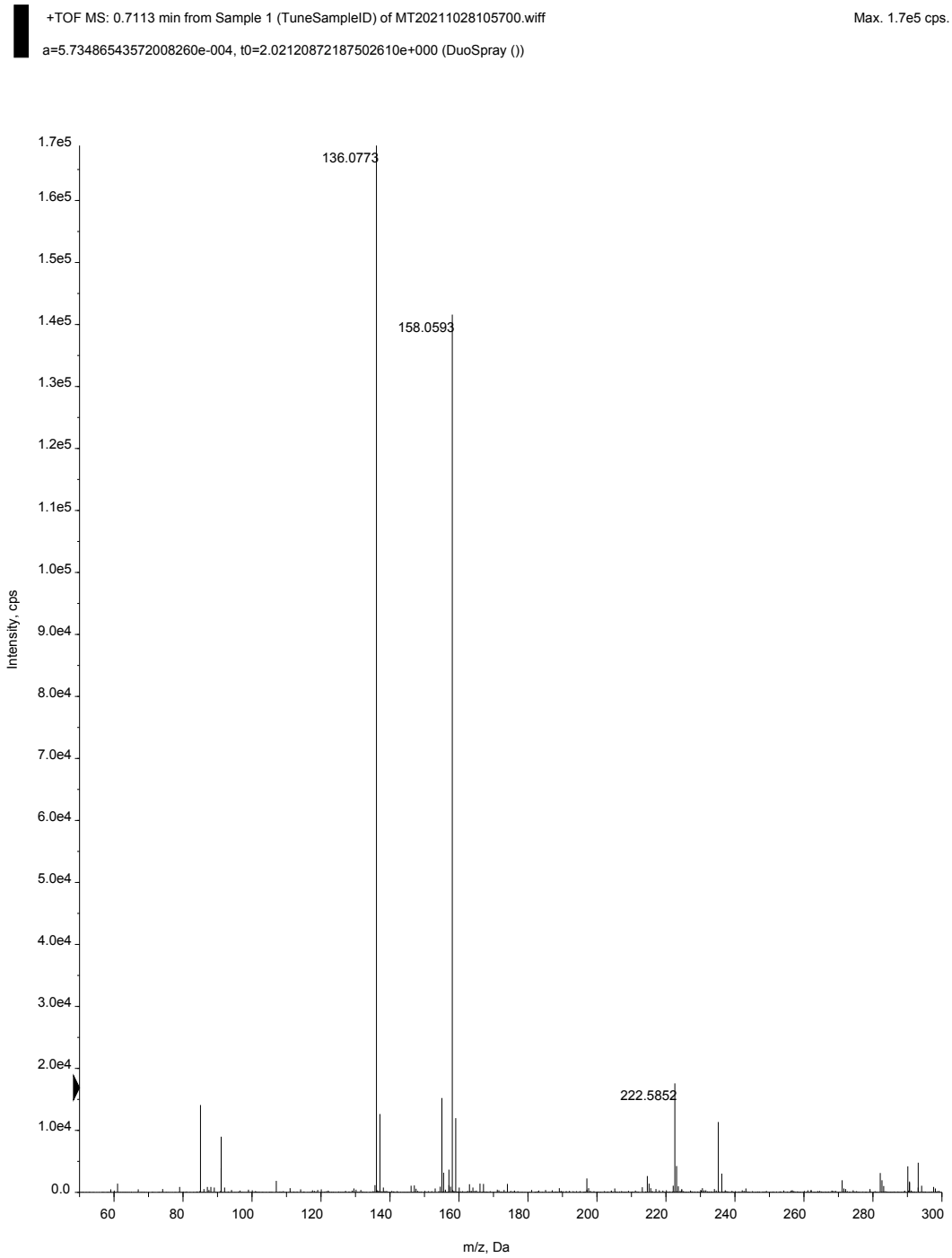
Şekil 114. 2-fenil asetamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 115. 2-fenil asetamit bileşiğine ait HSQC spektrumu

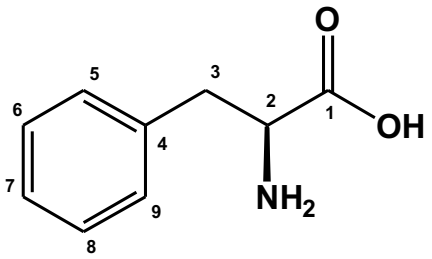


Şekil 116.2 – 2-fenil asetamit bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 117. 2-fenil asetamit bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

L-fenil alanin (31)



Şekil 118. L-fenil alanin

Görünüşü beyaz toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı yapılan 1D- NMR ve LC-Q-TOF-MS spektroskopik teknikleri sonucunda (Şekil 119-121), L-fenil alanin olarak belirlenmiştir (Şekil 118). Optik çevirme açısı $[\alpha]_D$ -34° (c. 2, H_2O) olarak ölçülmüştür (203).

UV (MeOH) λ_{max} nm: 257 (204).

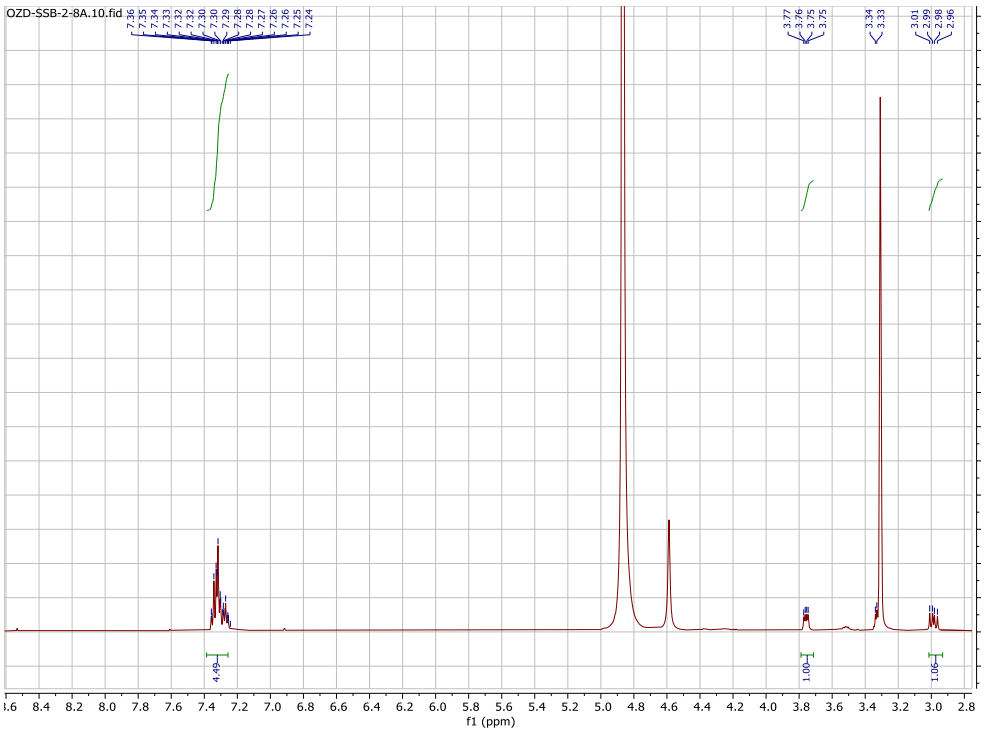
IR (ATR) v_{max} (cm^{-1}) 3346 (O-H gerilmesi), 3163 (NH gerilmesi), 3063, 3030, 2803 (C-H gerilmesi), 1633 (C=O), 745 (Ar C-H eğilmesi).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.38-7.24 (m, 5H, Ar-H), 3.76 (dd, *J* = 9.0, 4.4 Hz, 1H, H**2**), 3.33 (ddd, *J* =14.6, 8.9, 4.4 Hz, 1H, H**3a**), 2.99 (dd, *J* = 14.6, 8.9 Hz, 1H, H**3b**).

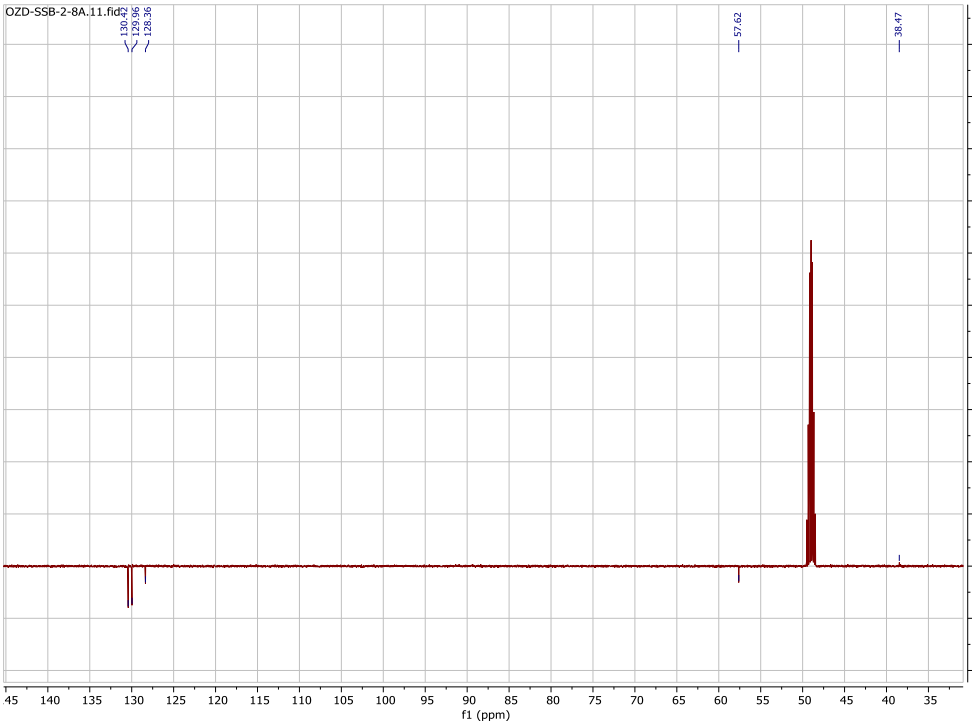
^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 180.1(C-1), 137.4 (C-4), 130.4 (C-5), 130.1 (C-6), 128.4 (C-7), 57.6 (C-2), 38.5 (C-3) (280).

Fenil alanine ait α-hidrojen 3.76 ppm'de (H-2) sinyal verirken, bu protonun bağlı olduğu karbon sinyali 57.6 ppm'de (C-2) görülmüştür. Metilen protonu sinyalleri 3.33 ppm (H-3a, 1H), 2.99 ppm (H-3b, 1H) olarak gözlenirken karbonu 38.5 ppm'de (C-3) gözlenmiştir. Aromatik halka protonları 7.24-7.38 ppm'de (m, 5H) olarak sinyal vermiş, bu protonların bağlı olduğu karbonlar sırasıyla 130.4 ppm (C-5,9), 130.1 ppm (C-6,8), 128.4 ppm (C-7) olarak belirlenmiştir. Bu amino asidin yapısı fenil alanin olarak aydınlatılmıştır.

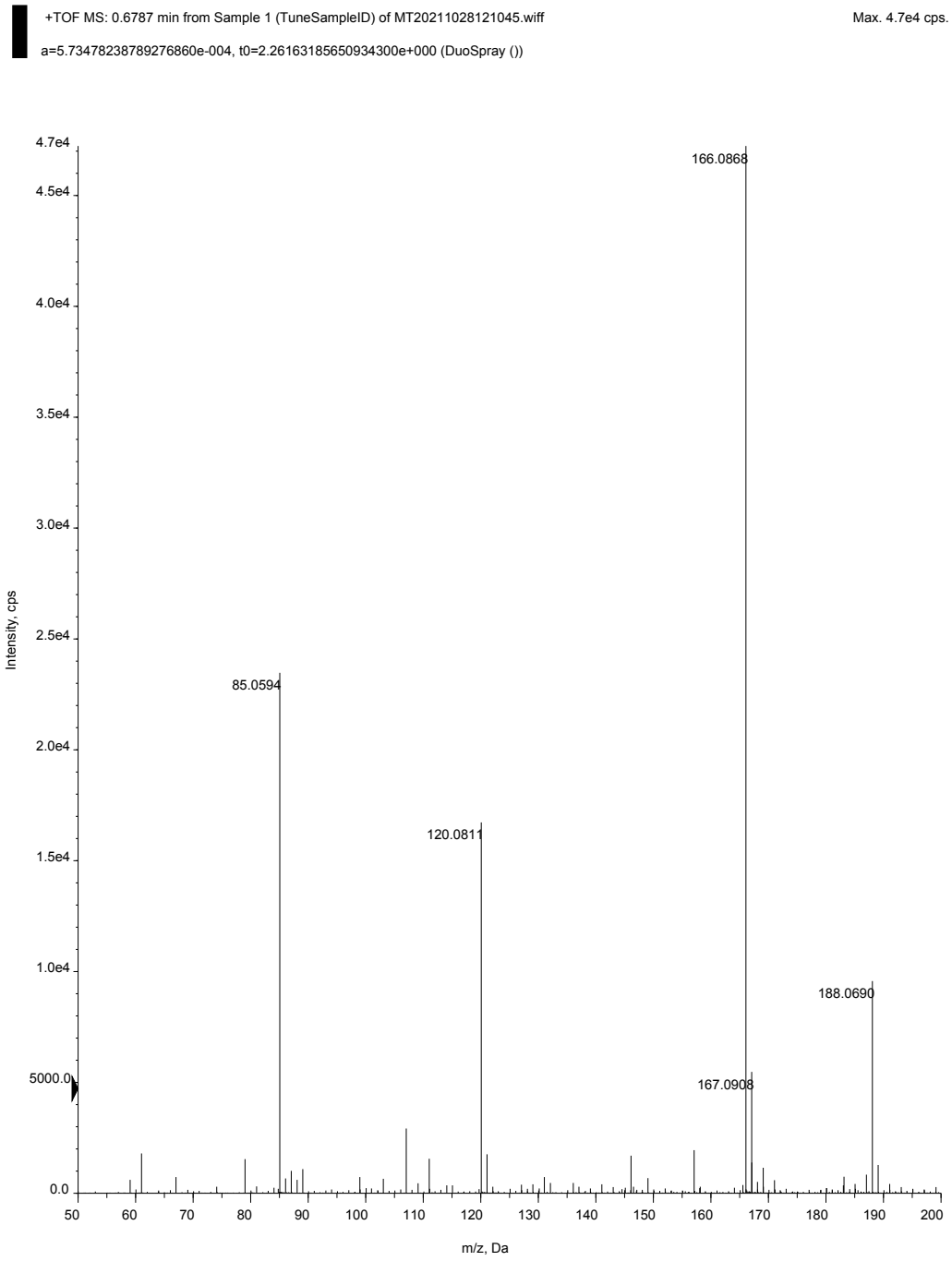
Bileşiğe ait LC-Q-TOF- kütle spektrumunda $C_9H_{11}NO_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 166.0866 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_9H_{12}NO_2$ için 166.0823 olarak bulunmuştur (Şekil 120).



Şekil 119. L-Fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 120. L-Fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu



Şekil 121. L-Fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu

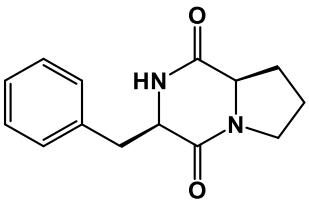
SONUÇLAR

İzole Edilen Bileşikler

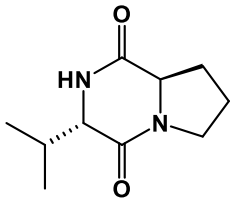
S. hoynatensis, *S. klenkii* ve *S. smyrneaus* mikroorganizmalarından izole edilen bileşiklerin 1D NMR (^{1}H-NMR, ^{13}C-APT), 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) spektrumları ve LC-Q-TOF kütle spektrumları başta olmak üzere tüm spektral özellikleri incelenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Bazı metabolitlerin birden fazla organizmadan ve ekstreden elde edildiği, izole edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ile anlaşılmıştır. İzole edilen tüm bileşiklerin elde edildiği organizmalar ve fraksiyonları Tablo 13'te sunulmuştur. Sonuç olarak *S. hoynatensis*'ten 13, *S. klenkii*'den 10 ve *S. smyrneaus*'tan 10 bileşik izole edilmiştir. Ortak olanlar elimine edildiğinde toplam 13 farklı metabolitin yapısı aydınlatılmıştır, bu bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 122'de verilmiştir.

Tablo 13. Yapısı aydınlatılan bileşiklerin elde edildiği mikroorganizmalar ve fraksiyonlar

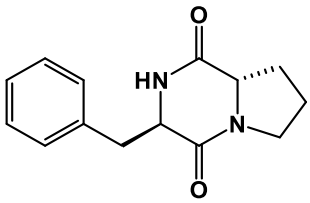
	S. hoynatensis			***S. klenkii***			***S. smyrnaeus***		
İzole Edilen Bileşik İsmi	**DCM**	**EtOAc**	**BuOH**	**DCM**	**EtOAc**	**BuOH**	**DCM**	**EtOAc**	**BuOH**
Siklo-L-prolin-L-fenil alanin **(1)**	✓ (1)								
Siklo-L-Prolin-D-Valin **(2)**	✓ (2)			✓(16)		✓ (23)	✓(24)		
Siklo-D-prolin-L-fenil alanin **(3)**	✓ (3)			✓(19)			✓(29)		
Siklo-L-prolin-L-tirozin **(4)**	✓ (4)	✓ (9)	✓ (13)	✓(15)	✓ (20)	✓ (22)			✓ (33)
Hoynatenamide **(5)**	✓ (5)								
Siklo-L-Prolin-L-İzolösin **(6)**	✓ (6)			✓(17)			✓ (27)		
Siklo-L-Prolin-D-Lösin **(7)**	✓ (7)			✓(18)			✓ (28)		
Meletamid **(8)**		✓ (8)	✓ (11)	✓(14)		✓ (21)			
L-Lösin **(10)**		✓ (10)							✓ (30)
L-Triptofan **(12)**			✓(12)						✓ (32)
Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin **(25)**							✓ (25)		
2-fenilasetamide **(26)**							✓ (26)		
L-Fenilalanin **(31)**									✓ (31)



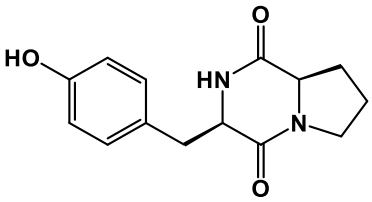
Siklo-L-prolin-L-fenil alanin



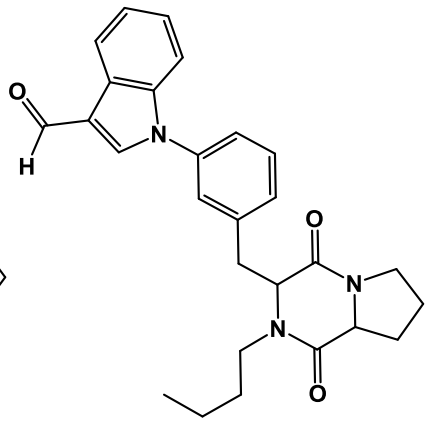
Siklo-L-Prolin-D-Valin



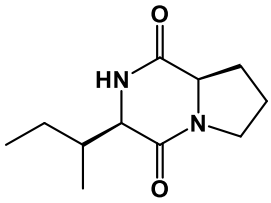
Siklo-D-prolin-L-fenil alanin



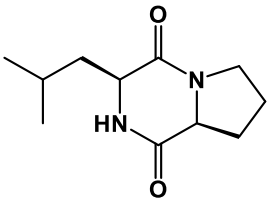
Siklo-L-prolin-L-tirozin



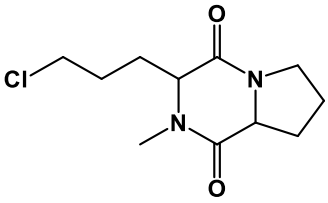
Hoynatenamit



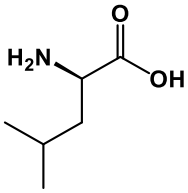
Siklo-L-Prolin-L-Izolösin



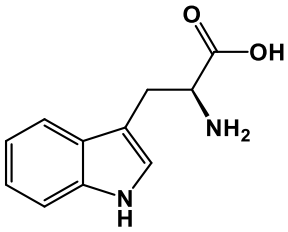
Siklo-L-Prolin-D-Lösin



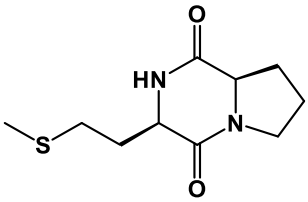
Meletamit



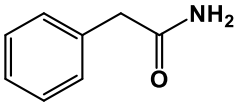
L-Lösin



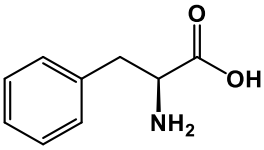
L-Triptofan



Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin



2-fenil asetamit



L-Fenil alanin

Şekil 122. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları

İzole Edilen Bileşiklerin Biyoaktif Özellikleri

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

İzole edilen bileşiklere uygulanan antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 14'te verilmiştir. Tabloda belirtilen maddelerin hepsi *E. coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etki gösterirken, Siklo-L-Prolin-D-Valin, Siklo-L-Prolin-L-izolösin, Siklo-L-prolin-L-fenil alanin, Siklo-L-prolin-L-tirozin aynı zamanda *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerine de etkilidir. Siklo-L-Prolin-D-Lösin, Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşikleri de *C. albicans* ATCC 10231 üzerine etkili olduğu görülmüştür. ESBL pozitif ve çok ilaca dirençli *E. coli* izolatına, siprofloksasin ve gentamisine dirençli *P. aeruginosa* izolatına ve flukonazole dirençli *C. albicans* izolatına karşı antimikrobiyal etki saptanmamıştır.

Tablo 14. İzole edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktivite sonuçları

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Bileşikler	MİK (µg/mL)									
Fenilasetamid	*	*	*	*	128	*	*	*	*	*
Siklo-L-Prolin-D-Lösin Siklo-D-prolin-L-fenilalanin	*	*	*	*	128	*	*	*	64	*
Siklo-L-Prolin-D-Valin Siklo-L-Prolin-L-İzolösin Siklo-L-prolin-L-fenilalanin Siklo-L-prolin-L-tirozin	*	*	*	*	128	*	64	*	64	*
Meropenem	0,015	-	0,5	-	0,0625	0,0078	0,25	0,25	-	-
İmipenem	<0,125	>16	1	>16	0,25	0,25	1	>16	-	-
Seftazidim	2	>16	-	-	0,125	>16	8	>16	-	-
Ampisilin	0,25	>16	0,125	>16	8	>16	-	-	-	-
Vankomisin	0,5	2	2	> 8	-	-	-	-	-	-
Gentamisin	0,25	>16	4	>8	0,5	>8	0,5	>8	-	-
Siprofloksasin	0,5	>16	2	>4	0,0156	>2	0,125	>2	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,125	>16

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, B: MRSA izolat, C: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, D: VRE izolat, E: *E.coli* ATCC 25922, F: *E.coli* izolat, G: *P. aeruginosa* ATCC 27853, H: *P. aeruginosa* izolat, I: *Candida albicans* ATCC 10231, J: *Candida albicans* izolat. *: DMSO'nun etkisi dışında antimikrobiyal bir etki gözlenmemiştir.

Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

İzole edilen bileşiklerin antiproliferatif etkinlikleri HeLa (Rahim ağzı), MCF-7 (Meme kanseri) hücre hatlarının yanı sıra MEF (fare embriyo fibroblast) gibi sağlıklı hücre hatlarına karşı test edilmiştir.

Antiproliferatif aktivite sonuçları incelendiğinde kayda değer bir antiproliferatif aktivite gözlenmemiştir. Sadece siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiği MCF-7 hücre hattına karşı belli bir etkinlik sergileyebilmiştir. 0.15 mM konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinin %44.1'i canlılık gösterebilmiştir. Ancak elde edilen sonuçlar GraphPad Prism version 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, California, ABD) uygulaması ile IC_{50} değerlerini hesaplamak üzere değerlendirildiğinde bileşikler yeterince aktivite sergileyemediklerinden (En yüksek konsantrasyonlarda dahi yaklaşık %50 canlılık gözlendiğinden) yazılımda IC_{50} değerleri veremedikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle bileşiklerin kayda değer bir ölçüde hücre ölümü sergileyebildikleri minimum konsantrasyonları tablolarda sunulmuştur (Tablo 15, 16). Bileşiklerin sağlıklı hücre hatlarına karşı da önemli toksik etkileri olmadığı görülmektedir (Tablo 17). Yine MEF hücre hatlarınının Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiği ve Meletamid bileşiklerine (uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 10 mM konsantrasyonda) karşı sırasıyla %44.2 ve %47.7 oranında canlılık gösterebildiği görülmektedir.

Tablo 15. Saflaştırılan moleküllerin MCF hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları

MCF-7 HÜCRE HATTI	**24 SAAT**		**48 SAAT**	
	Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**Konsantrasyon**	**Canlılık (%)**
Siklo-D-prolin-L-fenil alanin	0,625 mM	89,5	5 mM	49,5
Siklo-L-Prolin-D-Valin	0,625 mM	88,5	0,15 mM	48,5
Siklo-L-prolin-L-fenil alanin	0,625 mM	90,0	0,625 mM	67
Siklo-L-prolin-L-tirozin (Makulosin)	10 mM	84,7	0,15 mM	41
Siklo-L-Prolin-L-İzolösin	1,25 mM	65,2	1,25 mM	52.1
Siklo-L-Prolin-D-Lösin	0,625 mM	91,1	2,5 mM	65.9
Meletamid	10 mM	90,4	0,3125 mM	50

Tablo 16. Saflaştırılan moleküllerin HeLa hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları

HeLa HÜCRE HATTI	**24 SAAT**		**48 SAAT**	
	Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**Konsantrasyon**	**Canlılık (%)**
Meletamid	0,3125 mM	97,2	0,3125 mM	74,5
Siklo-L-prolin-L-tirozin (Makulosin)	1,25 mM	89,3	0,15 mM	72,8
Siklo-L-Prolin-D-Valin	0,3125 mM	89,7	1,25 mM	44,1
Siklo-D-prolin-L-fenil alanin	0,3125 mM	96,85	0,625 mM	62,2
Siklo-L-Prolin-D-Losin	0,3125 mM	96,23	1,25 mM	63,5
Siklo-L-prolin-L-fenil alanin	0,625 mM	86,0	0,625 mM	86,0
Siklo-L-Prolin-L-İzolösin	0,3125 mM	90,3	0,3125 mM	62,6

Tablo 17. Saflaştırılan moleküllerin MEF hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları

MEF HÜCRE HATTI	**24 SAAT**		**48 SAAT**	
	Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**Konsantrasyon**	**Canlılık (%)**
Meletamid	10 mM	66,5	10 mM	44,2
Siklo-L-prolin-L-tirozin (Makulosin)	10 mM	72,4	10 mM	47,7
Siklo-L-Prolin-D-Valin	10 mM	41,2	10 mM	98
Siklo-D-prolin-L-fenil alanin	10 mM	81,2	10 mM	100
Siklo-L-Prolin-D-Lösin	10 mM	82,4	10 mM	100
Siklo-L-prolin-L-fenil alanin	10 mM	89	10 mM	100
Siklo-L-Prolin-L-İzolösin	10 mM	70,9	10 mM	100

Tez çalışmasında, ağırlıklı olarak en basit yapılı peptidleri temsil eden 2,5-diketopiperazinler (DKP'ler) izole edilmişlerdir. DKP'ler, reaksiyonların kiral seçimini katalize edebilirler ve peptid öncüleri olarak kabul edilirler. Biyokimyasal kiralitenin kökeni ve peptidlerin sentezi, yaşamın kökeni için gerekli önkoşul olduğuna inanılan

karmaşık bir problemdir. Bu nedenle DKP'lerin yaşamın kökeninde kilit bir rol oynamış olabileceğine inanılmaktadır (205).

Gerçekleştirilen tez kapsamında 2 adet yeni bileşik izole edilmiştir. Ancak biyoaktivite çalışmaları sonucunda özellikle antiproliferatif aktivite açısından kayda değer bir aktivite sergileyen bileşikler bulunamamıştır. Literatür taraması yapıldığında, DKP'lerin hücreler arası sinyalleşmede önemli rolleri olduğu önerilmiştir. Siklo(L-Pro-L-Val), siklo(L-Pro-L-Phe) ve siklo(L-Pro-L-Tyr) gibi üç siklik dipeptidin çoğunluğu algılama (Quarum sensing-QS) ile bitki büyümesinin teşvikinde yer aldığı bulunmuştur (206). Ayrıca, Wu ve ark. siklo(L-Pro-L-Pro) ve siklo(D-Pro-D-Pro) siklik dipeptitlerinin, salisilik aside bağımlı bir savunmayı aktive ederek *Nicotiana benthamiana*'da *Phytophthora nicotianae* enfeksiyonlarına karşı sistemik hastalık direncini indüklediğini bulmuşlardır (207).

Yine benzer bir çalışmada deniz fungusu *P. chrysogenum* DXY-1 suşundan izole edilen L-Prolin-L-Tirozin siklik dipeptidinin, bakterilerde QS ile meydana gelen virülans üzerine inhibe edici etkisi olduğunu gösterilmiştir. Araştırmacılar, QS inhibisyonu çalışmalarında model olarak kullanılan *C. violaceum* CV026 ve *P. aeruginosa* PA01 mutant suşlarını kullanarak, bakterilerdeki pigment oluşumunun engellenmesi esasına dayanan konvansiyonel yöntemin yanı sıra, izole edilen dipeptidin, kullanılan bu iki indikatör mikroorganizmada, virülans faktörlerinin ifadesi için gerekli olan gen bölgesini bloke ettiğini de moleküler yöntemlerle göstermişlerdir (208). QS sistemi *P. aeruginosa'*nın da içerisinde yer aldığı birçok Gram negatif bakteride biyofilm oluşumu ve bazı virülans faktörlerinin sentezlenmesi için gerekli olan önemli bir sistemdir. L-Prolin-L-Tirozin molekülü ile QS mekanizmasının durdurularak biyofilm oluşumunun engellenmesi ve diğer birçok virülans faktörünün sentezlenmesinin önlenmesi ile, özellikle bu bakterilerle meydana gelen çok ilaca dirençli hastane enfeksiyonları gibi son yıllarda çok büyük bir problem olan enfeksiyonların tedavisinde önemli bir yol kat edilebilir.

ÖZET

Antibiyotiklerin tedavi amaçlı aşırı miktarda ve rastgele kullanımı birçok bakteri türünün mevcut ilaçlara karşı direnç kazanmasına yol açmıştır. Bu nedenle bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Benzer şekilde kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İstatistikler göstermektedir ki her geçen yıl kanser hastalarının sayısı artmaktadır.

Tez çalışmasında aktinomisetlerden yeni antiproliferatif ve antimikrobiyal bileşiklerin bulunması hedeflenmiştir. Türkiye sularından izole edilmiş, *Streptomyces* cinsine ait üç aktinomiset türü DSMZ firmasından satın alınmış, mikroorganizmalar canlandırıldıktan sonra farklı besi yerlerine pasajlanarak sırası ile küçük ve orta ölçekte üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından XAD reçinesi ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen fraksiyonlara LC-MS/MS analizi uygulanmıştır. Metabolit içerikleri kromatogramlardan incelenerek optimum üreme sağlanan besi yerlerinde büyük ölçekte fermente edilmişlerdir. Fermantasyon süreci sonunda biyosentezi gerçekleşen metabolitler XAD reçinesi ile ekstrakte edilmişlerdir. Elde edilen ham ekstreler su ile seyreldikten sonra hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH ile ekstrakte edilmişlerdir. Elde edilen tüm fraksiyonlara HPLC analizi uygulanmış ve izolasyona tabi tutulmuştur. İzole edilen bileşiklerin 1D (^{1}H-NMR, ^{13}C-APT), 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY ve NOESY) spektrumları ve LC-Q-TOF kütle spektrumları başta olmak üzere tüm spektral özellikleri incelenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. *S. hoynatensis'*ten 13, *S. klenkii'*den 10 ve *S. smyrneaus'tan* 10 bileşik izole edilmiştir. 2 yeni bileşik izole edilirken bileşiklerin tümü *E.coli* 'ye karşı aktivite göstermiştir. İzole edilen bileşikler belirgin bir antiproliferatif aktivite sergilememişlerdir.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, diketopiperazin, siklik dipeptit, antimikrobiyal aktivite, antiproliferatif aktivite.

SUMMARY

The excessive and random use of antibiotics for therapeutic purposes has led to the resistance of many bacterial species to existing drugs. Therefore, bacterial infections seriously threaten public health worldwide. Similarly, cancer is one of the most important health problems of our time. Statistics show that the number of cancer patients is increasing every year.

In the thesis study aimed to find new antiproliferative and antimicrobial compounds from actinomycetes. Three actinomycete species, which are *Streptomyces* isolated from Turkish waters, were purchased from the DSMZ company, and after the microorganisms were revived, they were passaged to different media, respectively, and produced in small and medium scales. Afterwards, extraction was performed with XAD resin and LC-MS/MS analysis was applied to the obtained fractions. Metabolite contents were examined from chromatograms and fermented on a large scale in media where optimum growth was achieved. At the end of the fermentation process, the biosynthesised metabolites were extracted with XAD resin. The crude extracts obtained were diluted with water and then extracted with hexane, DCM, EtOAc and BuOH. All obtained fractions were subjected to HPLC analysis and isolation. All spectral properties of the isolated compounds, especially 1D (^{1}H-NMR, ^{13}C-APT), 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY etc) spectra and LC-Q-TOF mass spectra, were examined and their structures were elucidated. 13 compounds from *S. hoynatensis*, 10 from S. klenkii and 10 from *S. smyrneaus* were isolated. While 2 new compounds were isolated, all of the compounds showed activity against *E. coli*. Isolated compounds did not exhibit significant antiproliferative activity.

Keywords: *Streptomyces*, diketopiperazine, cyclic dipeptide, antimicrobial activity, antiproliferative activity.

KAYNAKLAR

1. Solecki RS, Shanidar IV. a Neanderthal flower burial in northern Iraq. Science 1975;190(4217):880-1.
2. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bulletin of the world health organization 1985;63(6):965.
3. Newman DJ, Cragg G, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. Journal of Natural Product 2003;66:1022–37.
4. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery 2005;4(3):206-20.
5. Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nature Reviews Microbiology 2003;1(1):65-70.
6. Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V (Eds.). Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. Elsevier, 2013.
7. ZoBell CE. Marine microbiology; A monograph on hydrobacteriology. Marine microbiology, 1946.
8. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews, 1995;59(1):143-69.

9. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 2004;304(5667):66-74.

10. Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Current opinion in microbiology 2006;9(3):245-51.

11. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot 2005;58:1–26.

12. Bull AT, Stach JEM, Ward AC, Goodfellow M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie Van Leeuwenhoek 2005;87:65–79.

13. Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. Journal of Organic Chemistry 1951;16(6):981-7.

14. Bergmann W, Feeney RJ. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. J. Am. Chem. Soc. 1950;72:2809–10.

15. Donia M, Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. The Lancet infectious diseases 2003;3(6):338-48.

16. McConnell O, Longley RE, Koehn FE. The discovery of natural products with therapeutical potential. Boston (MA): ButterworthHeineman; 1994.

17. Saleem M. Bioactive natural products from marine-derived fungi-an update. In: Atta-ur-Rahaman FRS, editor. Studies in natural products chemistry. Amsterdam: Elsevier; 2015. p.297-361.

18. Ireland CM, Copp BR, Foster MP, McDonald LA, Radisky DC, Swersey JC. Biomedical potential of marine natural products. Boston, MA: Springer- In Pharmaceutical and bioactive natural products; 1993. p.1-43.

19. Chiba S, Saji Y, Takeo Y, Yui T, Aramaki Y. Nereistoxin and its derivatives, their neuromuscular blocking and convulsive actions. The Japanese Journal of Pharmacology 1967;17(3):491-2.

20. Teuber, L. Naturally occurring 1, 2-dithiolanes and 1, 2, 3-trithianes. Chemical and biological properties. Sulfur reports 1990;9(4):257-333.

21. Cheer CJ, Pickles FJ. The crystal and molecular structure of 1,3-bis (thiocarbamoyl)-2-NN-dimethylaminopropane hydrochloride (Cartap). J Chem Soc Perkin II 1980;2(12):1805-8.

22. Lee SJ, Caboni P, Tomizawa M, Casida JE. Cartap hydrolysis relative to Its action at the insect nicotinic channel. Journal of agricultural and food chemistry 2004;52(1):95-8.

23. Kumar ASP, Amalnath D, Dutta TK. Cartap poisoning: a rare case report. Indian J Crit Care Med 2011;15(4):233-5.

24. Van Soest RWM, Van Kempen TMG, Braekman JC, editors. Sponges in time and space: biology, chemistry, paleontology. Proceedings of the 4th International Porifera Congress; 1994 Apr 19-23; Amsterdam, Netherlands. Rotterdam: A.A. Balkema Publishers; 1994.

25. Moore RE, Scheuer PJ. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. Science 1971;172(3982):495-8.

26. Moore RE, Bartolini G. Structure of palytoxin. J Am Chem Soc 1981;103(9):2491-4.

27. Uemura D, Ueda K, Hirata Y. Further studies on palytoxin. II. structure of palytoxin. Tetrahedron Lett 1981;22(29):2781-4.

28. Ramos V, Vasconcelos V. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. Mar Drugs 2010; 8(7): 2021-37.

29. Kao CY. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. Pharmacol Rev 1966;18(2):997-1049.

30. Narahashi T. Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. Fed Proc 1972;31(3):1124-32.

31. Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Engen D, Clardy J, et al. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. J Am Chem Soc 1981;103(9):2469-71.

32. Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, et al. Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrheic shellfish poisoning. Bull Jpn Soc Sci Fish 1980;46:1405-11.

33. Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. Bull Jpn Soc Sci Fish 1978;44:1249-55.

34. Van Dolah FM. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ Health Perspect 2000;108(1):133-41.

35. Kacem I, Bouaïcha N, Hajjem B. Comparison of okadaic acid profiles in mussels and oysters collected in Mediterranean Lagoon, Tunisia. Int J Biol 2010;2(2):238-45.

36. Faber S. Saxitoxin and the induction of paralytic shellfish poisoning. J Young Invest 2012;23(1):1-7.

37. Cole JB, Heegaard WG, Deeds JR, McGrath SC, Handy SM. Tetrodotoxin poisoning outbreak from imported dried puffer fishMinnesota, Minneapolis, 2014. Morb Mortal Wkly Rep 2015;63(51):1222-5.

38. Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep 2006;23(1):26-78.

39. Hu Y, Chen J, Hu G, Yu J, Zhu X, Lin Y, et al. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. Mar Drugs 2015;13(1):202-21.

40. McCloud TG. High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. Molecules 2010;15(7):4526-63.

41. Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanebacteria for drug discovery. Phytochemistry 2007;68(7):954-79.

42. Manivasagan P, Kang KH, Sivakumar K, Li-Chan EC, Oh HM, Kim SK. Marine actinebacteria: an important source of bioactive natural products. Environ Toxicol Pharmacol 2014;38(1):172-88.

43. Liu QA, Zheng JJ, Gu YC, Wang CY, Shao CL. The chemistry and bioactivity of macrolides from marine microorganisms. In: Atta-urRahaman FRS, editor. Studies in natural products chemistry. Vol 44. Amsterdam: Elsevier; 2015, p. 353-401.

44. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep 2015;32(2):116-211.

45. Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep 2008;25(1):35-94.

46. Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nat Chem Biol 2006;2:666–73.

47. Jones JG. The effect of environmental factors on estimated viable and total popultioans of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. Freshw Biol 1977;7:67–91.

48. Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. Appl Environ Microbiol 1984;47: 49–55.

49. Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can J Microbiol 1979;25:415–20.

50. Kogure K, Simidu U, Taga N. Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. Can J Microbiol 1980;26:318–23.

51. Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL. High diversity of DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 1990;56:782–7.

52. Zahner H, Fiedler HP. Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. In: Hunter PA, Darby GK, Russell NJ, editors. The need for new antibiotics: possible ways forward. Fifty-third symposium of the society for general microbiology bath. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995. p. 67–84.

53. Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycetes diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environ Microbiol 2005b;7:1039–48.

54. Goodfellow M, Haynes JA. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-ortiz L, Bojalil LF, Yokoleff V, editors. Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Orlando: Academic press; 1984. p. 453–72.

55. Ramesh S, Jayaprakashvel M, Mathivanan N. Microbial status in seawater and coastal sediments during pre- and post-tsunami periods in the Bay of Bengal, India. Mar Ecol 2006;27:198–203.

56. Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World J Microbiol Biotechnol 2009;25:2103–11.

57. Castillo U, Myera S, Brown L, Strobel G, Hess WM, Hanks J, et al. Scanning electron microscopy of some endophytic *Streptomycetes* in snakevine-Kennedia nigricans. Scanning 2005;27:305–11.

58. Sun W, Dai S, Jiang S, Wang G, Liu G, Wu H, et al. Culture-dependent and culture independent diversity of actinobacteria associated with the marine sponge Hymeniacidon perleve from the south China sea. Antonie Van Leeuwenhoek 2010;98:65–75.

59. Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van Leeuwenhoek 2008;93:241–8.

60. Xiao J, Luo Y, Xie S, Xu J. Serinicoccus profundi sp. nov., a novel actinomycete isolated from deep-sea sediment and emended description of the genus *Serinicoccus*. Int J Syst Evol Microbiol 2011;61:16–9.

61. Thornburg CC, Mark ZT, McPhail KL. Deep-seahydrothermal vents:potential hot spots for natural products discovery? J Nat Prod 2010;73:489–99.

62. Das S, Lyla PS, Ajmal Khan S. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. Chin J Oceanol Limnol 2008;26:166–77.

63. Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Ward AC, et al. *Salinispora arenicola gen. nov., sp.* nov. and *Salinispora tropica sp. nov.,* obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 2005a;55:1759–66.

64. Jensen PR, Mafnas C. Biogeography of the marine actinomycetes *Salinispora*. Environ Microbiol 2006;8:1881–8.

65. Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. Trends Microbiol 2007;15:491–9.

66. Carte BK. Biomedical potential of marine natural products. Biosciences 1996;46:271–86.

67. Kijjoa A, Sawangwong P. Drugs and cosmetics from the sea. Mar Drugs 2004;2:73–82.

68. Ellaiah P, Reddy APC. Isolation of actinomycetes from marine sediments off Visakhapatnam, east coast of India. Indian J Mar Sci 1987;16:34–135.

69. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. SalinosporamideA: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. Angew Chem Int Ed Engl 2003;42:355–7

70. Jensen PR, Williams PG, Oh DC, Zeigler L, Fenical W. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. Appl Environ Microbiol 2007;73:1146–52.

71. Jensen PR. Linking species concepts tonaturalproductdiscovery inthepost-genomic era. J Ind Microbiol Biotechnol 2010;37:219–24.

72. Rath CM, Janto B, Earl J, Ahmed A, Hu FZ, Hiller L, et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. ACS Chem Biol 2011;6:1244–56.

73. Das S, Lyla PS, Khan SA. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. Curr Sci 2006;90:1325–35.

74. Abdel-Razek AS, El-Naggar ME, Allam A, Morsy OM, Othman SI. Microbial natural products in drug discovery. Processes 2020;8(4):470.

75. Adrio JL, Demain AL. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. Biomolecules 2014;4(1):117-39.

76. Qasim SZ. The Indian Ocean: images and realities. New Delhi: Oxford and IBH; 1999. p. 57–90.

77. Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64:573–606.

78. Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. Annu Rev Microbiol 1983;37:189–216.

79. Ward AC, Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. Curr Opin Microbiol 2006;9:279–86.

80. Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int J Syst Bacteriol 1970;20:435–43.

81. Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. Appl Environ Microbiol 2005;71:7019–28.

82. Rainey FA, Burghardt J, Kroppenstedt RM, Klatte S, Stackebrandt E. Phylogenetic analysis of the genera Rhodococcus and Nocardia and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. Microbiology (UK) 1995;141:523–8.

83. Heald SC, Brandao PFB, Hardicre R, Bull AT. Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains. Antonie Van Leeuwenhoek 2001;80:169–83.

84. Kim SB, Goodfellow M. Reclassification of Amycolatopsis rugosa Lechevalier et al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. now. Int J Syst Bacteriol 1999;49:507–12.

85. Yi H, Schumann P, Sohn K, Chun J. Serinicoccus marinus gen nov., sp. nov., a novel actinomycetes with 1-ornithin and 1-serine in the peptidoglycan. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:1585–9.

86. Fortman JL, Magarvey NA, Sherman DH. Something old, something new; ongoing studies of marine actinomycetes. Proc SIM 2005 Abstract P.86.

87. Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora.* J Am Chem Soc 2006;128:1622–32.

88. Bruns A, Philipp H, Cypionka H, Brinkhoff T. *Aeromicrobium marinum sp.* nov., an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden sea. Antonie Van Leeuwenhoek 2003;53:1917–23.

89. Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. Williamsia maris sp. nov., a novel actinomycete isolated from the sea of Japan. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:191–4.

90. Tian XP, Tang SK, Dong JD, Zhang YQ, Xu LH, Zhang S, et al. *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the Northern South China Sea. Int J Syst Evol Microbiol 2009b;59:948–52.

91. Tian XP, Zhi XY, Qiu YQ, Zhang YQ, Tang SK, Xu LH, et al. *Sciscionella marina gen.* nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. Int J Syst Evol Microbiol 2009a;59:222–8.

92. Kieser T, Bibb MJ, Butner MJ, Charter KF, Hopwood DA. Preparation and analysis of the genomic and plasmid DNA. In: Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: The John Innes Foundation; 2000. p. 162–170.

93. Okami Y, Hotta K. Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M, editors. Actinomycetes in biotechnology. London: Academic Press; 1988. p. 33–67.

94. Berdy J. Recent advances in and prospects for antibiotic research. Process Biochem 1980;15:28–35.

95. Prabavathy VR, Mathivanan N, Murugesan K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces sp.* PM5. Biol Control 2006;39:313–9.

96. Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Int J Biol Sci 2008;4:330–7.

97. Ebrahimi Zarandi M, Shahidi Bonjar GH, Padasht Dehkaei F, Ayatollahi Moosavi SA, Rashid Farokhi P, Aghighi S. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. Am J Appl Sci 2009;6:194–9.

98. Pimentel-Elardo SM, Kozytska S, Bugni TS, Ireland CM, Moll H, Hentschel U. Antiparasitic compounds from *Streptomyces sp.* strains isolated from Mediterranean sponges. Mar Drugs 2010;8:373–80.

99. Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. Mar Drugs 2009;7:24–44.

100. Renner MK, Shen YC, Cheng XC, Jensen PR, Frankmoelle W, Kauffman CA, et al. Cyclomarins A-C, new anti-inflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces sp.*). J Am Chem Soc 1999;121:11273–6.

101. Sacramento DR, Coelho RRR, Wigg MD, Linhares LFTL, Santos MGM, Semedo LTAS, et al. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete *(Streptomyces sp.)* isolated from a Brazilian tropical forest soil. World J Microbiol Biotechnol 2004;20:225–9.

102. Xu Y, He H, Schulz S, Liu X, Fusetani N, Xiong H, et al. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. Bioresour Technol 2010;101:1331–6.

103. Rahman H, Austin B, Mitchell WJ, Morris PC, Jamieson DJ, Adams DR, et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. Mar Drugs 2010;8:498–518.

104. Sousa CS, Soares ACF, Garrido MS. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. Sci Agric (Piracicaba, Braz) 2008;65:50.

105. Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. Mar Drugs 2009;7:24–44.

106. Atta HM. Production of vitamin B12 by *Streptomyces fulvissimus*. Egypt J Biomed Sci 2007;23:1–19.

107. Tamehiro N, Hosaka T, Xu J, Hu H, Otake N, Ochi K. Innovative approach for improvement of an antibiotic – overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. Appl Environ Microbiol 2003;69:6412–7.

108. Higginbotham SJ, Murphy CD. Identification and characterisation of a Streptomyces sp. isolate exhibiting activity againstmethicillin-*resistant Staphylococcus aureus*. Microbiol Res 2010;165:82–6.

109. Cal S, Aparicio JF, De Los Reyes-Gavilan CG, Nicieza J, Sanchez A. A novel exocytoplasmic endonuclease from *Streptomyces antibioticus*. J Biochem 1995;306:93–100.

110. Sanchez S, Demain AL. Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme Microb Technol 2002;31:895–906.

111. Sujatha P, Bapi Raju KVVSN, Ramana T. Studies on a new marine *Streptomycete* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Res 2005;160:119–26.

112. Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. Chem Biol Chem 2002;3:619–27.

113. Fourati BFL, Fotso S, Ben Ameur-Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces sp*. strain US80. Res Microbiol 2005;156:341–7.

114. Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. In: Vining LC, editor. Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. London: Addison-Wesley; 1983. p. 49–67.

115. Doull J, Vining L. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor A* (3) 2: suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl Microbiol Biotechnol 1990;32:449–54..

116. Sanchez S, Demain AL. Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme Microb Technol 2002;31:895–906.

117. Augustine SK, Bhavsar SP, Baserisalehi M, Kapadnis BP. Isolation and characterization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin. Indian J Exp Biol 2004;42:928–32.

118. Iwai Y, Omura S. Culture conditions for screening of new antibiotics. J Antibiot 1982;35:123–41.

119. Demain AL. Induction of microbial secondary metabolism. Int Microbiol 1998;1:259–64. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomycetes*. Curr Opin Microbiol 2005;8:208–15.

120. Augustine SK, Bhavsar SP, Baserisalehi M, Kapadnis BP. Isolation and characterization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin. Indian J Exp Biol 2004;42:928–32.

121. Fourati BFL, Fotso S, Ben Ameur-Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res Microbiol 2005;156:341–7.

122. Wang YH, Yang B, Ren J, Dong ML, Liang D, Xu AL. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. Process Biochem 2003;40:1116–66.

123. Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus.* Microbiol Res 2005;160:243–8.

124. Omura S, Tanaka Y.Macrolide antibiotics. In: Pape H, Rehn HJ, editors. Biotechnology, IV. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1986. p. 360–91.

125. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of fermentation technology. 2nd ed. New Delhi: Aditya Books (P) Ltd; 1997. p. 357.

126. Schiewe HJ, Zeeck A. Cineromycin, Y-butyrolactones and ansamycins by analysis of the secondary metabolite pattern created by a single strain of *Streptomyces*. J Antibiot 1999;52:635–42.

127. Kurtböke DI. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. Appl Microbiol Biotechnol 2012;93:1843–52.

128. Charoensopharat K, Thummbenjapone P, Sirithorn P, Thammasirirak S. Antibacterial substance produced by *Streptomyces sp*. No 87. Afr J Biotechnol 2008;7:1362–8.

129. Kimura K, Kanou F, Takahashi H, Esumi Y, Uramoto M, Yoshihama M. Propeptin, a new inhibitor of Prolyl endopeptidase produced by *Microbispora* I. Fermentation, isolation and biological properties. J Antibiot 1996;59:373–8.

130. Sun C, Wang Y, Wang Z, Zhou J, Jin W, You X, et al. Chemomicin A, a new Angucyclinone antibiotic produced by *Nocardia mediterranei subsp. kanglensis* 1747-64. J Antibiot 2007;60:211–5.

131. Hatsu M, Sasaki T, Watabe H, Miyadoh S, Nagasawa M, Shomura T, et al. A new tetracycline antibiotic with antitumor activity I. Taxonomy and fermentation of the producing strain, isolation and characterization of SF2575. J Antibiot 1992;45:320–4.

132. Tanaka Y, Komaki H, Yazawa K, Mikami Y. Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: producing strain, isolation and biological activity. J Antibiot 1997;50:1036–41.

133. Maeda A, Nagai H, Yazawa K, Tanaka Y, Imai T, Mikami Y, et al. Three new reducedanthracycline relatedcompounds frompathogenic *Nocardia brasiliensis*. J Antibiot 1994;47:976–81.

134. Aoki H, Sakai H, Koshaka M, Konomi T, Hosoda J, Kubochi Y, et al. Nocardicin A, a new monocyclin-lactam antibiotic: discovery, isolation and characterization. J Antibiot 1976;29:492–500.

135. Schultz M, Tsaklakidis C. Nachr Chem Tech Lab 1997;45:159–65.

136. Mendez B, Tachibana C, Levy SB. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. Plasmid 1980;3(1):99-108.

137. Omura S(ed.). Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice. Academic press, 2002.

138. Werth BJ, Shireman LM. Pharmacodynamics of ceftaroline plus ampicillin against *Enterococcus faecalis* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model of simulated endocardial vegetations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017;61(4): e2235-16.

139. Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB, Kruidering-Hall M. (2010). Pharmacology examination & board review. New York: McGraw-Hill Medical; 2010. pp. 121-32.

140. Bachur NR. (2002). Anthracyclines.in Encyclopedia of Cancer (Second Edition), 2002.

141. Fujiwara A, Hoshino T, Westley J. Anthracycline Antibiotics. Critical Reviews in Biotechnology. 1985;3(2):133–57.

142. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. Nature reviews Drug discovery, 2013;12(5),371-87.

143. Holten KB, Onusko EM. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. American family physician, 2000;62(3),611-20.

144. Macfarlane, G. Alexander Fleming, the man and the myth. Harvard University Press; 1984.

145. Welch TR, Williams RM. Epidithiodioxopiperazines. Occurrence, synthesis and biogenesis. Nat. Prod. Rep 2014;31:1376–404.

146. Witiak DT, Wei Y. Dioxopiperazines: Chemistry and biology. Prog. Drug Res. 1990;35:249–363.

147. De Carvalho MP, Abraham WR. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. Curr. Med. Chem 2012;19:3564–77.

148. Wang X, Li Y, Zhang X, Lai D, Zhou L. Structural diversity and biological activities of the cyclodipeptides from fungi. Molecules 2017;22(12):2026.

149. Ma YM, Liang XA, Kong Y, Jia B. Structural diversity and biological activities of indole diketopipezazine alkaloids from fungi. J. Agric. Food Chem 2016;64:6659–667.

150. Cui CB, Kakeya H, Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures. J. Antibiot. 1996;49:534–40.

151. Woehlecke H, Osada H, Herrmann A, Lage H. Reversal of breast cancer resistance protein-dediated drug resistance by tryprostatin A. Int. J. Cancer 2003;107:721–8.

152. Zhao S, Smith KS, Deveau AM, Dieckhaus CM, Johnson MA, Macdonald TL, et al. Biological activity of the tryprostatins and their diasteromers on human carcinoma cell lines. J. Med. Chem. 2002;45:1559–62.

153. Takase S, Kawai Y, Uchida I, Tanaka H, Aoki H. Structure of amauromine, a new hypotensive vasodilator produced by *Amauroascus sp.* Tetrahedron 1985;41:3037–48.

154. Shan WG, Wu ZY, Pang WW, Ma LF, Ying YM, Zhan ZJ. α-Glucosidase inhibitors from the fungus *Aspergillus terreus* 3.05358. Chem. Biodivers. 2015;12:1718–24.

155. Stierle AC, Cardellina JH, Strobel GA. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:8008–11.

156. Iimura K, Furukawa T, Yamamoto T, Negishi L, Suzuki M, Sakuda S. The mode of action of cyclo(L-Ala-L-Pro) in inhibiting aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. Toxins 2017;9:219.

157. Kimura Y, Sawada A, Kuramata M, Kusano M, Fujioka S, Kawano T, et al. Brevicompanine C, cyclo-(D-Ile-L-Trp), and cyclo-(D-Leu-L-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevi-compactum*. J. Nat. Prod. 2005:68, 237–9.

158. Wright GD, Sutherland AD. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. Trends Mol Med 2007;13:260–7.

159. Zhang L. Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural products. In: Zhang L, Demain A, editors. Natural products: drug discovery and therapeutics medicines. Totowa, NJ: Human Press; 2005. p. 33–56.

160. Chauhan D, Catley L, Li G, Podar K, Hideshima T, Velankar M, et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. Cancer Cell 2005;8:407–19.

161. Oh DC, Gontang EA, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinipyrones and pacificanones, mixed-precursor polyketides from the marine actinomycete *Salinispora pacifica.* J Nat Prod 2008;71:570–5.

162. Waksman SA, Henrici AT. The nomenclature and classification of the actinomycetes. Journal of bacteriology 1943;46(4);337-341.

163. Labeda DP. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012;101.1:73-104.

164. Khan ST, Komaki H, Motohashi K, Kozone I, Mukai A, Takagi M, et al. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona sp*. ; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. Environmental Microbiology. 2011;13(2):391-403.

165. Patzer SI, Braun V. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces sp.* ATCC 700974. Journal of bacteriology. 2010;192(2):426-35.

166. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. Journal of bacteriology. 2008;190(11):4050-60.

167. Veyısoglu A, Sahin N. *Streptomyces hoynatensis sp. nov.,* isolated from deep marine sediment. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2014;3:819826.

168. Veyisoglu A, Sahin N. *Streptomyces klenkii sp. nov.,* isolated from deep marine sediment. Antonie van Leeuwenhoek 2015;107(1):273-9.

169. Tatar D, Guven K, Spröer C, Klenk HP, Sahin N. *Streptomyces iconiensis sp. nov. and Streptomyces smyrnaeus sp. nov.,* two halotolerant actinomycetes

isolated from a salt lake and saltern. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2014;64(9);3126-33.

170. Schmidt-Traub H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents, 2005.

171. Wellings DA. A Practical Handbook of Preparative HPLC, 2006, Elsevier Ltd, Oxford.

172. Dong MW. Modern HPLC for practicing scientists, 2006, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

173. Niessen WMA. Liquid chromatography-mass spectrometry. Crc Press, 2006.

174. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction to Spectroscopy, Brooks. Cole Cengage Learning, 2009;381-417.

175. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. The Journal of chemical physics, 1968;49(5):2240-9.

176. Berger S, Braun S. 200 and more NMR experiments. Weinheim: Wiley-Vch, 2004.

177. Balcı M. Basic ^{1}H-and ^{13}C-NMR spectroscopy. Elsevier, 2005.

178. Clayden J. Electrophilic aromatic substitution. Organic chemistry, First. Oxford University Press, New York, 2001;547-579.

179. Stauffer Frederic R. 3. Optical Polarization. In: Methods in Experimental Physics. Academic Press, 1989. p. 107-166.

180. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Edition, 2015.

181. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. Assay Drug Dev Techn, 2004;2(1):51-62.

182. Galluzzi L. Guidelines for the use andinterpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ, 2009;16:1093-1107.

183. Riss TL, Moravec RA, O'brien MA, Hawkins EM, Niles A Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis, Handbook Of Assay Development In Drug Discovery. Editör: Minor, L. K. Florida, USA: CRC Press, 2006.

184. Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal Biochem, 2007;336(2):197-206.

185. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods, 1993;160:81-88.

186. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for highthroughput screening Assay. Drug Dev Techn, 2007;5(1):127-36.

187. Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR. Cytotoxicity and cell growth assays. Cell biology: a laboratory handbook. Ed; Celis JE. Burlington: Elseiver Academic Press. 2006.

188. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicoogy Letters, 1985;24(2):119-124.

189. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983;65:55-63.

190. Riss TL, Moravec RA. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture, Cell Biology. Ed; Celis JE. Burlington: Elseiver Academic Press. 2006.

191. Piovesana S, Samperi R, Laganà A, Bella M. Determination of enantioselectivity and enantiomeric excess by mass spectrometry in the absence of chiral chromatographic separation: an overview. Chem. Eur. J. 2013;19:11478–94.

192. Schurig V. Gas chromatographic enantioseparation of derivatized alpha-amino acids on chiral stationary phases—past and present. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2011;879: 3122–40.

193. Marfey P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. Carlsberg Research Comm, 1984;49(6):591-6.

194. Wang G, Dai S, Chen M, Wu H, Xie L, Luo X, et al. Two diketopiperazine cyclo (pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. Chemistry of natural compounds 2010;46(4):583-5.

195. Adamczeski M, Reed AR, Crews P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, Calyx cf. *Podatypa*. Journal of natural products, 1995;58(2):201-208.

196. Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, Grimwade JE, Baker BJ. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Natural Products, 1996;59(3), 293-296.

197. Nyman MA, Herbst RM. The Effect Of Alkali And Acid Upon The Rotatory Power Of Certain Dipeptides. The Journal Of Organic Chemistry, 1950;15(1)108-18.

198. Bradbury JH, Norton RS. Carbon-13 NMR spectra of tryptophan, tryptophan peptides and of native and denatured proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1973;328(1):10-19.

199. Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. ACS chemical biology, 2009;4(12):1051-9.

200. Andrews PR, Brinkworth RI, Partridge AC, Reiss JA. Synthesis and Biological Evaluation of a Series of Substituted 4, 5-Diphenylpyridine-2, 6 (1H, 5H)-diones. Australian Journal of Chemistry, 1988;41(11):1717-25.

201. Johnson EA. UV atlas of organic compounds. 1966;2(6):5.

202. Narsaiah AV, Nagaiah K. An efficient and improved method for the preparation of nitriles from primary amides and aldoximes. Advanced Synthesis & Catalysis, 2004;346(11):1271-4.

203. Huang HT, Niemann C. The Enzymatic Resolution of DL-Phenylalanine. Journal of the American Chemical Society, 1951;73(1):475-6.

204. Chen P, Li C, Liang S, Song G, Sun Y, Shi Y, et al. Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubers of *Pinellia ternata* and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang. Journal of Chromatography B, 2006;843(2):183-93.

205. Ying J, Lin R, Xu P, Wu Y, Liu Y, Zhao, Y. Prebiotic formation of cyclic dipeptides under potentially early Earth conditions. Scientific reports, 2018;*8*(1):1-8.

206. Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, Rosa E, Campos-García J, López-Bucio J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011;*108*(17):7253-8.

207. Wu B, Ding Y, Yao L, Liu K, Du B. Disease-preventing and growth-promoting effects of antifungal bacteria against *Phytophthora nicotianae* on tobacco. Plant Growth-Promotıng Rhızobacterıa (Pgpr) For Sustaınable Agrıculture, 2011;501.

208. Yu X, Li L, Sun S, Chang A, Dai X, Li H, et al. (). A cyclic dipeptide from marine fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 exhibits anti-quorum sensing activity. ACS omega, 2021;6(11):7693-700.

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilmiş bazı bileşik örnekleri.....7
Tablo 2. *S. hoynatensis'ten* elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri 48
Tablo 3. *S. klenkii'*den elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri 49
Tablo 4. *S. smyrnaeus*'tan elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkileri.....49
Tablo 5. Siklo-L-Prolin-L-Fenilalanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri 76
Tablo 6. Siklo-L-prolin-D-valin molekülünün 1D ve 2D NMR değerler.....82
Tablo 7. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri 89
Tablo 8. Siklo-L-prolin-L-tirozine ait 1D ve 2D NMR değerleri.....95
Tablo 9. Hoynatenamit bileşiğinin 1D ve 2D NMR değerleri NMR değerleri.....101
Tablo 10. Meletamit bileşiğinin 1D ve 2D NMR değerleri 120
Tablo 11. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait 1D ve 2D NMR değerleri.....132
Tablo 12. 2-fenil asetamidin 1D ve 2D NMR değerleri 137
Tablo 13. Yapısı aydınlatılan bileşiklerin elde edildiği mikroorganizmalar ve fraksiyonlar.....145
Tablo 14. İzole edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktivite sonuçları 147
Tablo 15. Saflaştırılan moleküllerin MCF hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları.....148
Tablo 16. Saflaştırılan moleküllerin HeLa hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları.....149
Tablo 17. Saflaştırılan moleküllerin MEF hücre hattına karşı sitotoksisite aktivite sonuçları.....149

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Doğal olarak oluşan Tetrasiklin örnekleri 11
Şekil 2. Doğal olarak oluşan Makrolid örnekleri 12
Şekil 3. Doğal olarak oluşan Aminoglikozit örnekleri 13
Şekil 4. Antrasiklin halkasının kimyasal yapısı 14
Şekil 5. Doğal olarak oluşan Antrasiklin örnekleri 14
Şekil 6. Beta-laktam antibiyotik sınıflarının genel kimyasal iskelet yapıları 15
Şekil 7. Bazı Triptofan-prolin siklodipeptitler 17
Şekil 8. Bazı Triptofan-triptofan siklodipeptitler 18
Şekil 9. Bazı Prolin siklodipeptitler 18
Şekil 10. Bazı Triptofan siklodipeptitler 19
Şekil 11. NonTriptofan -nonprolin Siklodipeptidler 20
Şekil 12. Tiyo- Siklodipeptidler 20
Şekil 13. *Streptomyces* türlerinden izole edilmiş yeni sekonder metabolitler 22
Şekil 14. 21 gün boyunca 28 °C'de ISP-4 besi yerinde büyütülen *S. hoynatensis* suşunun taramalı elektron mikrografı. Bar, 1µm'yi ifade etmektedir. 24
Şekil 15. 14 gün boyunca 28 °C'de ISP-4 besi yerinde büyütülen *S.klenkii* suşunun taramalı elektron mikrografı. Bar, 1µm'yi ifade etmektedir 25
Şekil 16. 21 gün boyunca 28 °C'de DSMZ 1240 besi yerinde *S.smyrnaeus'un* taramalı elektron mikrografı. Bar, 1µm ve 5 µm'yi ifade etmektedir. 25
Şekil 17. Sıvı Kromatografinin Prensibi 26
Şekil 18. İki temel ayırma modunun şematik diyagramı 27

Şekil 19. Bir HPLC sisteminin temel modüllerinin şematik diyagramı 28
Şekil 20. LC-MS analiz cihazının gösterimi 29
Şekil 21. Farklı katı besi yerlerinde *S. hoynatensis'in* görüntüsü (A. NZ-Amin, B. ISP-2, C. ISP-3, D. ISP-4). 41
Şekil 22. *S. hoynatensis* organizmasınn orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir. 42
Şekil 23. Farklı katı besi yerlerinde *S. klenkii'*nin görüntüsü (A. ISP-3, B. ISP-2, C. NZ-Amin, D. ve E. Nişasta-Kazein). 43
Şekil 24. *S. klenkii* organizmasınn orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir44
Şekil 25. Farklı katı besi yerlerinde *S. smyrnaeus'un* görüntüsü (A. NZ-Amin, B. ISP-2, C. GPHF, D. ISP-4 ve E. ISP-3). 45
Şekil 26. *S. smyrnaeus* organizmasınn orta ölçeğe geçiş işlem adımları gösterilmektedir 46
Şekil 27. N-Z Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı 51
Şekil 28. GPHF besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı 51
Şekil 29. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı 51
Şekil 30. N-Z Amin, GPHF ve Nişasta-Kazein besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstrelerin çakıştırılmış LC-MS kromatogramları. 52
Şekil 31. GPHF besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı. 53
Şekil 32. N-Z Amin besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı. 53
Şekil 33. ISP-2 besi yerinde çoğalan *S. smyrnaeus* organizmasından elde edilen ekstreye ait LC-MS kromatogramı. 53
Şekil 34. Mikroorganizmaların büyük ölçekte fermantasyonu ve besi yerinin reçine ile ekstraksiyonu ile ilgili çalışmaların akış şeması.....55
Şekil 35. MTT Testi reaksiyonu 62
Şekil 36. Marfey's reaksiyonu 63

Şekil 37. *S. hoynatensis* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı. 65
Şekil 38. 18-22 dk aralığında toplanan fraksiyonların yeniden saflaştırılması. 66
Şekil 39. 23-24 dk aralığında toplanan fraksiyonun yeniden saflaştırılması 66
Şekil 40. *S. hoynatensis* organizmasından elde edilen etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı. 67
Şekil 41. *S. hoynatensis* bütanol ekstresine ait HPLC kromatogramı. 68
Şekil 42. *S. klenkii* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı. 68
Şekil 43. S. klenkii organizmasının etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı. ...69
Şekil 44. *S. klenkii* organizmasının bütanol ekstresine ait HPLC kromatogramı.....70
Şekil 45. *S. smyrnaeus* organizmasının diklorometan ekstresine ait HPLC kromatogramı 70
Şekil 46. *S. smyrnaeus* organizmasının etil asetat ekstresine ait HPLC kromatogramı 71
Şekil 47. *S. smyrnaeus* organizmasının BuOH ekstresine ait HPLC kromatogramı ..72
Şekil 48. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin 74
Şekil 49. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu.....77
Şekil 50. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu.....77
Şekil 51. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HSQC spektrumu.....78
Şekil 52. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HMBC spektrumu 78
Şekil 53. Siklo-L-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF- kütle spektrumu 79
Şekil 54. Siklo-L-Prolin-D-Valin 80
Şekil 55. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu.....83
Şekil 56. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu.....83
Şekil 57. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait HSQC spektrumu.....84
Şekil 58. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait HMBC spektrumu.....84
Şekil 59. Siklo-L-prolin-D-valin bileşiğine ait COSY spektrumu 85
Şekil 60. Siklo-L-Prolin-D-Valin bileşiğine ait LC-Q-TOF- kütle spektrumu.....86
Şekil 61. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin.....87
Şekil 62. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 90
Şekil 63. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 90

Şekil 64. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HSQC spektrumu 91
Şekil 65. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait HMBC spektrumu 91
Şekil 66. Siklo-D-prolin-L-fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 92
Şekil 67. Siklo-L-prolin-L-tirozin 93
Şekil 68. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 96
Şekil 69. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 96
Şekil 70. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait HSQC spektrumu 97
Şekil 71. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait HMBC spektrumu 97
Şekil 72. Siklo-L-prolin-L-tirozin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 98
Şekil 73. Hoynatenamit 99
Şekil 74. Hoynatenamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 102
Şekil 75. Hoynatenamit bileşiğine ait 5.5-10.5 ppm arası genişletilmiş ^{1}H-NMR spektrumu 102
Şekil 76. Hoynatenamit bileşiğine ait 0-4.6 ppm arası genişletilmiş ^{1}H-NMR spektrumu 103
Şekil 77. Hoynatenamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 103
Şekil 78. Hoynatenamit bileşiğine ait HSQC spektrumu 104
Şekil 79. Hoynatenamit bileşiğine ait HMBC spektrumu 104
Şekil 80. Hoynatenamit bileşiğine ait NOESY spektrumu 105
Şekil 81. Hoynatenamit bileşiğinin LC-Q-TOF kütle spektrumu 106
Şekil 82. Bağlanma düzeninin doğrulanmasında kullanılan NOESY korelasyonları. (Üç boyutlu model, molekülün MM2 enerji minimizasyonu gerçekleştirilerek çizilmiştir) 107
Şekil 83. LC-Q-TOF kütle spektrumunda gözlenen kütle parçalanmaları ve gözlenen m/z değerleri 107
Şekil 84. Standart L-prolin ve Hoynatenamit bileşiğinin Marfey's analizi sonucu 108
Şekil 85. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin 109
Şekil 86. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 111
Şekil 87. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait HSQC spektrumu 111
Şekil 88. Siklo-L-Prolin-L-İzolösin bileşiğine ait LC-Q-TOF-MS analizi 112
Şekil 89. Siklo-L-Prolin-D-Lösin 113
Şekil 90. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 115

Şekil 91. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 115
Şekil 92. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait HSQC spektrumu 116
Şekil 93. Siklo-L-Prolin-D-Lösin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 117
Şekil 94. Meletamit 118
Şekil 95. Meletamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 121
Şekil 96. Meletamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 121
Şekil 97. Meletamit bileşiğine ait HSQC spektrumu 122
Şekil 98. Meletamit bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 123
Şekil 99. L-Lösin 124
Şekil100. L-lösin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 125
Şekil 101. L-lösin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 125
Şekil 102. L-Triptofan 126
Şekil 103. L-Triptofan bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu. 127
Şekil 104. L-Triptofan bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu. 127
Şekil 105. L-Triptofana ait LC-Q-TOF MS analizi 128
Şekil 106. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin 130
Şekil 107. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 133
Şekil 108. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 133
Şekil 109. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait HSQC spektrumu 134
Şekil 110. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait HMBC spektrumu 134
Şekil 111. Siklo-L-Prolin-L-Metiyonin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 135
Şekil 112. 2-fenil asetamit 136
Şekil 113. 2-fenil asetamit bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 138
Şekil 114. 2-fenil asetamit bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 138
Şekil 115. 2-fenil asetamit bileşiğine ait HSQC spektrumu 139
Şekil 116. 2-fenil asetamit bileşiğine ait HMBC spektrumu 139
Şekil 117. 2-fenil asetamit bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 140
Şekil 118. L-fenil alanin 141
Şekil 119. L-Fenil alanin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu 142
Şekil 120. L-Fenil alanin bileşiğine ait ^{13}C-APT spektrumu 142
Şekil 121. L-Fenil alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu 143
Şekil 122. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları 146