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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

GÖL AKTİNOMİSETLERİNDEN YENİ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aslı Esra YALÇIN

Referans no: 10529692

EDİRNE-2023

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

GÖL AKTİNOMİSETLERİNDEN YENİ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aslı Esra YALÇIN

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021-45
TÜBAP 2020-20

EDİRNE-2023

TEŞEKKÜR

Derin denizlerin keşfedilmemiş zenginliğini görmemi sağlayan, başımı suyun altına sokma cesareti veren, sonsuz desteği ve bilgisiyle bana ışık tutan kıymetli hocam Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirdiğim çalışmalarımda tecrübe ve yardımlarından faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ'a ve Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel katkılarından dolayı arkadaşlarım Elif COŞKUN'a ve Tuğba TUNCELİ'ye sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmama 2020-20 ve 2021-45 nolu proje destekleri için Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....1

GENEL BİLGİLER.....3

İLAÇ KEŞFİNDE DOĞAL ÜRÜNLER.....3

SEKONDER METABOLİTLER..... 4

MİKROBİYAL METABOLİTLER..... 5

AKTİNOMİSETLER..... 7

AKTİNOMİSETLERDEN ANTİMİKROBİYAL METABOLİTLER..... 9

AKTİNOMİSETLERDEN ANTİPROLİFERATİF METABOLİTLER..... 19

TEZ KAPSAMINDA KULLANILAN AKTİNOMİSETLER..... 27

AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI..... 31

YAPI AÇIKLAMA METODLARI..... 37

GEREÇ VE YÖNTEMLER..... 41

BULGULAR..... 73

TARTIŞMA..... 83

SONUÇLAR..... 171

ÖZET..... 178

SUMMARY..... 180

KAYNAKLAR..... 182

ŞEKİLLER LİSTESİ..... 196

ÖZGEÇMİŞ..... 202

SİMGE VE KISALTMALAR

Ala : Alanin

APT : Doğrudan Bağlı Proton Testi (Attached Proton Test)

Ara-A : 9-*β*-D-arabinofuranozil adenin (Vidarabin)

ATP : Adenozin trifosfat

BuOH : Bütanol

C-18 : Karbon-18

CD_3OD : Döterometanol

$CDCl_3$: Döterokloroform

CFU : Koloni oluşturan birim (colony forming units)

COSY : Korelasyon Spektroskopisi (Correlation Spectroscopy)

DCM : Diklorometan

DMSO : Dimetilsülfoksit

DMSO-d_6 : Döterodimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DSMZ : Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu

EtOAc : Etil asetat

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

GYM : Glukoz-Yeast (Maya)-Malt

HeLa : Rahim ağzı kanseri hücre hattı

HETCOR : Heteronükleer Korelasyon Spektroskopisi

HMBC : Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyon Spektroskopisi

HMQC : Heteronükleer Çoklu Kuantum Korelasyon Spektroskopisi

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HSQC : Heteronükleer tek kuantum korelasyonu

IC_{50} : %50 inhibisyon gözlenen konsantrasyon

Ile : İzolösin

IR : Infrared Spektroskopi

ISP : Uluslararası *Streptomyces* Projesi (International *Streptomyces* Project)

LC-MS : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

MCF-7 : Meme kanseri hücre hattı

MEF : Fare embriyo fibroblast hücre hattı

MeOH : Metanol

MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

MS : Kütle Spektrometresi

MTT : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür

MurA : Üridin difosfat N-asetil glukozamin enol pirüvil transferaz

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NOESY : Nükleer Overhauser Etki Spektroskopisi

NRPS : Non-ribozomal Peptit Sentetaz

Phe : Fenilalanin

Pro : Prolin

RNA : Ribonükleik Asit

rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asit

Ser : Serin

SPE : Katı Faz Ekstraksiyonu

UV : Ultra viyole (mor ötesi)

Val : Valin

α : Alfa

β : Beta

1D NMR : Tek boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans

^{1}H-NMR : Proton Nükleer Manyetik Rezonans

2D NMR : İki boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans

^{13}C-NMR : Karbon Nükleer Manyetik Rezonans

GİRİŞ VE AMAÇ

Sahip olduğumuz teknoloji ve bilgiye rağmen ortaya çıkan hastalıklarla mücadele etmek ve hastalıkların üstesinden gelmek üzere yeni ilaç moleküllerinin keşfi icin sınırsız sayıdaki doğal kaynakların araştırılmasına ihtiyacimiz gitgide artmaktadir. Dahası, antibiyotiğe dirençli patojenlerin ortaya çıkışı, dünya çapında halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Sürekli kendini yenileyen bu güçlü düşmanlarla savaşmak için yeni, etkili ilaçların keşfedilmemiş başka kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duymaktayız. Bu konuda en umut verici kaynak mikroorganizmalardır (1).

Doğal ürünlerden yaklaşık yarım milyon kadar bileşik keşfedilmiş olup 60-80 bin kadarı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiştir. Tüm biyoaktif doğal ürünlerin 60 bin kadar olduğu düşünülmektedir. Biyoaktif doğal ürünlerin %47'sini (yaklaşık 33 bin) biyolojik etkilere sahip olan mikrobiyal metabolitler oluşturmaktadır. Bunun yanında bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin %7'si ve hayvan kaynaklı doğal ürünlerin sadece %3'ü biyolojik olarak aktiftir (2). Mikrobiyal biyoaktif bileşiklerin %45'i (~10.000 bileşik) aktinomiset kaynaklıdır. Tek başına *Streptomyces* cinsi, bilinen biyoaktif aktinomiset kaynaklı doğal ürünlerinin %75'ini oluşturmaktadır (3). Keşfedilen tüm doğal ürünlerin yaklaşık %10'luk kısmının sadece *Streptomyces* sp. kaynaklı olması dikkat çekmektedir (4).

Streptomyces türü mikroorganizmalar yüksek adaptasyon yetenekleri ile var olan en zorlu koşullara bile uyum göstererek hayatta kalabilen canlılardır. Derin

denizler ve sedimentleri, volkanik ortamlar, çöller, hiper asidik göller, hipersalin göller ve hatta asitli sanayi atıkları gibi zorlu habitatlar bu koşullara örnek olarak verilebilir (5). Özellikle, daha önce araştırılmamış kaynaklardan elde edilen ve yeni keşfedilmiş *Streptomyces* suşları yeni biyoaktif bileşikler ve yeni kimyasal yapı çeşitleri arayışımızda önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızda daha önce çalışılmamış ve ülkemiz sularından izole edilmiş *Streptomyces* orjinli biyoaktif özelliklere sahip yeni bileşiklerin keşfedilmesiyle bilime katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bu çalışmada, Konya Tuz Gölü sediment örneklerinden izole edilen *Streptomyces iconiensis*, Seymenli Gölü sediment örneklerinden izole edilen *S. seymenliensis* ve Samsun ili açıklarında Karadeniz sediment örneklerinden izole edilen *S. ovatisporus* biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır. Bahsedilen mikroorganizmalar optimum şartlar altında fermante edilerek metabolit üretmeleri sağlanmıştır. Besi yerlerinden XAD-16 reçinesi ile çekilen ham ekstreler su ile seyreltilerek *n*-hekzan, diklorometan, etil asetat ve bütanol ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Elde edilen bu fraksiyonlar katı faz ekstraksiyonu ile alt fraksiyonlara ayrılıp preperatif HPLC ile saflaştırılmıştır. İzole edilen metabolitlerin kimyasal yapıları spektroskopik yöntemler (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, APT-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, UV, IR, LC-Q-TOF-MS) kullanılarak aydınlatılmış, antimikrobiyal ve antiproliferatif aktiviteleri araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

İLAÇ KEŞFİNDE DOĞAL ÜRÜNLER

Uluslararası farmakopenin dokuzuncu baskısında yer alan 371 farmasötik madde, doğal ürünler veya doğal ürünlerin türevleridir (6). 1981 ile 2014 yılları arasında kullanımı onaylanan toplam 1562 yeni ilacın %70'i doğal kaynaklıdır (7).

Doğal ürünler, bitkiler, hayvanlar, deniz organizmaları, mikroorganizmalar dahil olmak üzere sayısız biyolojik kaynaktan elde edilen metabolitlerdir (8). Doğal ürünler ilk olarak bitkilerden izole edilerek terapötik amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Doğal ürünler ve doğal ürünlerden elde edilen türevleri, yeni terapötiklerin keşfinde öncü moleküller olmaya devam etmektedir (9).

1929 yılında penisilinin keşfedilmesiyle mikroorganizmaların da doğal ürün kaynağı olabileceği anlaşılınca mikroorganizmalar doğal ürün kaynağı olarak araştırılmaya başlanmıştır (10). Bunun sonucunda mikroorganizmalar özellikle enfeksiyonlar ve kanser gibi hastalıkların tedavisi için vazgeçilmez olan doğal ilaçların en zengin kaynakları haline gelmiştir. 1950'li yıllarda deniz süngerlerinden sıra dışı nükleozidlerin izole edilmesiyle deniz organizmalarının da biyolojik aktivite yönünden geniş potansiyelleri olduğu görülmüştür. Bu önemli keşif, günümüzde tedavide kullanılan önemli antiviral ilaçların geliştirilmesinde öncülük etmiştir (11). Benzer çalışmalarla süngerler, tunikatlar, mercanlar ve algler gibi çok hücreli deniz organizmalarından birçok yeni biyoaktif metabolit bildirilmiştir. Ancak çok hücreli canlılardan izole edilmiş gibi görülen bu yeni bileşiklerin birçoğunun, çok hücrelinin

sahip olduğu mikrobiyota (bakteri ve siyanobakteriler gibi) tarafından üretildiği fark edilmiştir. Böylece mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal metabolitler hakkında çalışmalar hız kazanmıştır (12).

Mikrobiyal biyocoğrafya ve diğer faktörler, suşların biyoçeşitliliğini artırmada önemli rol oynamaktadır. Biyolojik olarak aktif yeni yapısal çeşitlilikte metabolitler için çalışmaların odak noktası ekolojik ve çevresel güçlerin yönlendirdiği, mikrobiyal çeşitlilik taşıyan çevrelere doğru kaymaktadır (13). Mikroorganizmaların zorlu çevre koşulları altında fizyolojik veya biyokimyasal stres unsurlarının etki etmesiyle yeni doğal bileşiklerin üretmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Çünkü, dış etkilerden kendilerini korumaları sadece ürettikleri kimyasal moleküllere bağlıdır. Bu nedenle, benzersiz çevrelerde ve aşırı ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar yeni doğal ürünlerin keşfi için cazip hale gelmektedir. Dolayısıyla her geçen gün mikroorganizmalardan yeni ilaç moleküllerinin keşfi ilgi odağı olmaya devam etmektedir.

Aktinomisetler, antimikrobiyal, antitümör ve immünosüpresan gibi biyolojik aktivitelere sahip, keşfedilen biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık yarısının üreticisi olan ipliksi bakterilerdir. Aşırı koşullara yüksek uyum sağlama yeteneklerine sahip aktinomisetler çok çeşitli kimyasal yapılarda ve farklı biyoaktivitelere sahip sekonder metabolitler üretmektedirler. Aktinomisetlerin üyelerinden *Streptomyces* sp. en fazla antibiyotik üreten tür olarak bilinmektedir. Pek çok yeni tür aktinomiset tanımlanmış olmasına rağmen, aktinomiset türlerinin sadece %0.1-1'inin izole edildiği ve araştırıldığı tahmin edilmektedir (14). Bu nedenle aktinomisetler henüz keşfedilmemiş yönleriyle araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

SEKONDER METABOLİTLER

Sekonder metabolitler, onları üreten organizmaların vejetatif büyümesi için gerekli olmayan metabolik ürünlerdir. Savunma bileşikleri, sinyal molekülleri olarak işlev görerek adaptif roller veren farklılaşma bileşikleri olarak kabul edilirler. Sentezleri büyük ölçüde büyüme koşullarına bağlı olan sekonder metabolitler üstel büyüme aşamasının sonunda üretilir. Genellikle büyümenin karbon veya azot gibi bir temel besin maddesinin tükenmesiyle sınırlandığı zaman aralıklarında üretilirler (15).

İkincil metabolitlerin biyosentezi, fotosentez, glikoliz ve Krebs döngüsünün temel süreçlerinden biyosentetik ara ürünler elde etmek için türetilir ve bu da nihayetinde doğal ürünler olarak da bilinen sekonder metabolitlerin oluşumuyla sonuçlanır (16). Yapısal olarak çeşitlilik gösteren sekonder metabolitler, organizmalar üzerinde belirgin bir biyolojik etkiye (antimikrobiyal ajanlar, toksinler, pestisitler, iyonoforlar, biyoregülatörler ve çekirdek sinyalleri gibi) sahiptir.

Sekonder metabolitler bazen bir cins veya türe bağlı olan bir dağılıma sahip olabilir. Organizmada yüksek konsantrasyonlarda (taze ağırlıkta %1-3) birikim gösterir. Yüksek toksisite gösterebilir. Sıklıkla farklı üretim ve birikimlere sahip olan sekonder metabolitler, bazen vakuollerde bazen de özel salgı yapılarında (trikomlar, kanallar, kanallar, latiferler gibi) glikozidik formda birikim yapabilir.

Sekonder metabolitler, organizmanın yaşamının devamı için elzem olmasalar da gösterdikleri biyoaktivitelerle daha önemli bir konum kazanmışlardır (17).

MİKROBİYAL METABOLİTLER

Geçmişten günümüze gerçekleştirilen çalışmalarla şu an mikrobiyal kaynaklardan elde edilen on binlerce doğal ürün bilinmektedir. Mikrobiyal metabolitler hızla değişen bir tarihsel gelişme göstermiştir.

Mikrobiyal metabolitlerin pek çoğu çeşitli biyoaktivitelere sahiptir. Tıpta, veterinerlik uygulamalarında, tarımda ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilinen metabolitlerin keşfedilen ve yayınlanan biyoaktiviteleri arasında en baskın aktiviteler sırasıyla antimikrobiyal aktivite, antiviral aktivite ve antitümör aktivitedir. Bugün mikrobiyal kökenli yaklaşık 14000 bileşiğin antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal ve antiprotozoal) aktivite sergilediği bilinmektedir. Bunların %66'sı Gram pozitif bakterilere, %30'u Gram negatif bakterilere ve %5'i mikobakterilere karşı aktivite göstermektedir. %34 oranında antifungal aktivite sergileyen bileşiklerin %21'i mayalara, %11'i fitopatojenik mantarlara ve %2'si diğer mantarlara karşı aktiviteye sahiptir (4).

2000 yılından bu yana Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) kullanımını onayladığı antibiyotiklerin %77'si mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal ürünlerdir (18). Bu onaylanan antibiyotikler arasında günümüzde antimikrobiyal tedavide sıklıkla başvurduğumuz amoksasilin, azitromisin, klindamisin gibi yarı

sentetik metabolitler de bulunmaktadır. Ancak mikroorganizmal kaynaklardan izole edilen metabolitler yalnızca antibakteriyel aktiviteye sahip değillerdir. Amfoterisin B gibi doğal metabolitler antifungal, ivermektin gibi yarı sentetik metabolitler antihelmintik, mitosin gibi doğal metabolitler antitümör, lovastatin gibi doğal metabolitler hipokolesterolemik etkiye sahiptir (19).

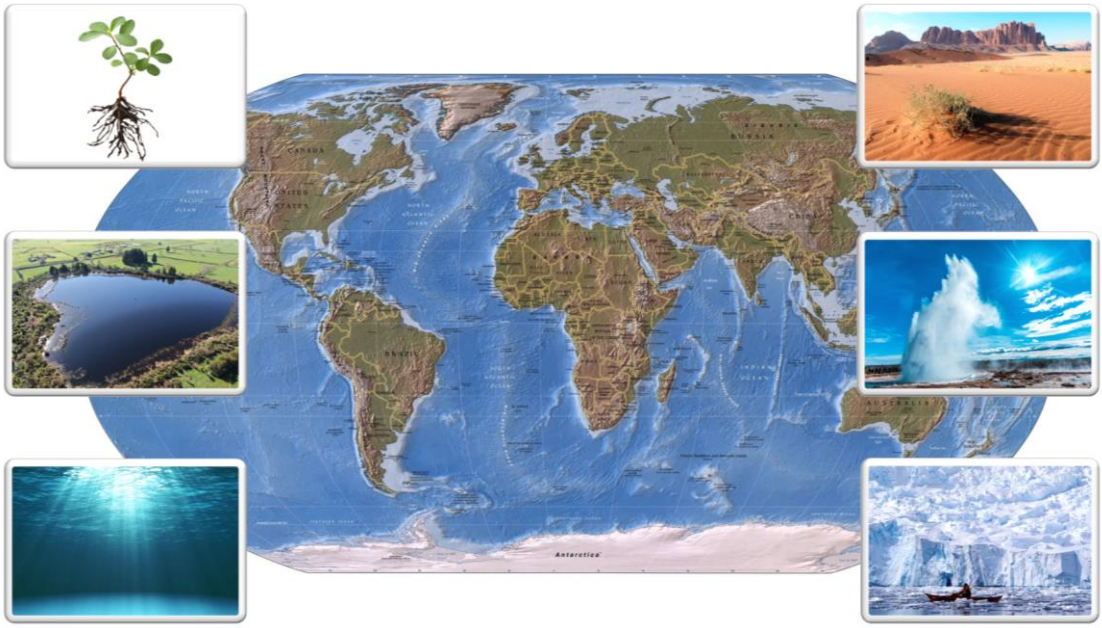
Mikroorganizmaların rakipleri ve çevredeki patojenleri ile mücadele etmek için milyarlarca yıldır biyosentezlediği antibiyotikler ve diğer biyoaktif maddeler, insanların hastalıklarla olan savaşını büyük bir başarı ile kazanmasına yol açmıştır. 1928'de penisilinin keşfiyle 1940'lardan 1970'lere kadar uzanan antibiyotik çağı, bugün hala kullanımda olan *β*-laktamlar ve aminoglikozitler gibi bir dizi ilaç sınıfının, geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Ancak kısa bir sürede ortaya çıkan dirençli patojenler antibiyotik direncine, antibiyotik direnci de antibiyotik çağının sona ermesine neden olmuştur.

Antibiyotik direnci, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda iki milyondan fazla enfeksiyonun 23 binden fazla ölümle (20), Avrupa'da 25 binden fazla ölümle gitgide büyüyen bir tehlike oluşturmaktadır (21). Her antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkması ile son kullanma tarihini doldurmaktadır. Bu nedenle antibiyotiklerin akılcı kullanımı önem taşımaktadır.

Günümüzde klinik kullanımda olan antibiyotik sınıflarının çoğu, 1970 yılından önce keşfedilmiştir. Bununla birlikte yeni ilaçların birçoğu bu mevcut yapı iskeletlerin yarı sentetik türevleridir. Antibiyotiklerin yapısal çeşitliliğindeki sınırlılık, artan direnç tehdidinin üstesinden gelmeyi zorlaştıran ana faktörler arasındadır. Bu nedenle, yalnızca yeni antibiyotiklere değil, aynı zamanda bilinen direnç mekanizmalarından etkilenmeyen, yeni iskeletlere sahip moleküllere ve yeni etki mekanizmalarına acil ihtiyaç duymaktayız. Tedavide yaşanan tüm gelişmelere rağmen, yeni ilaçların araştırılması kanser tedavisi için de önceliğini hiç kaybetmeyen bir hedeftir. Birden fazla kemoterapötik ilaca direncin hızlı gelişimi, ilaçların istenmeyen yan etkileri, tedavi edilemeyen tümörler, terapötik etkinliği daha yüksek ancak yan etki potansiyelleri daha düşük yeni antitümör ilaçlara olan talebi artırmaktadır (22). Mikrobiyal doğal ürünler, biyoaktif metabolitlerin kaynağı olarak hizmet eden vazgeçilmez bir role sahiptir ve insanlık tarihi boyunca da rolünü korumaya devam edecektir.

AKTİNOMİSETLER

Aktinomisetler, baskın bakteri filumlarından biridir. Yüksek fenotipik çeşitlilik gösteren, DNA'larında (%70-80) çok yüksek guanin (G) + sitozin (C) içeriğine sahip Gram pozitif, hareketsiz ve aerobik mikroorganizmalardır. Aktinomiset türlerinin çoğu hem su hem de kara ekosistemlerinin her yerinde bulunan serbest yaşayan mikroorganizmalardır (Şekil 1) (23). Aktinomisetler için okyanuslar, çöller, dağlar, Antarktika, termal kaynak suları, endofitler ve ortak yaşamlar yeni biyoaktif bileşik arayışının odak noktalarıdır.



Şekil 1. Aktinomisetlerin habitatları.

Aktinomisetler, aşırı koşullara sahip habitatlarda da hayatlarını sürdürebilirler. Bu yetenekleri karasal mikroorganizmalarda gözlemlenmeyecek olan antitümör, antimikrobiyal ve diğer ilginç farmakolojik aktivitelere sahip bileşikler üretme potansiyeli sunan benzersiz metabolik ve fizyolojik yetenekler geliştirmelerine yol açmıştır (24). Bu titiz mikroorganizmalar, mükemmel antibakteriyel etki ve çoğunlukla sitotoksisitesi düşük, farklı türlerde, eşsiz, benzersiz, karmaşık molekül yapılarına sahip olabilen bileşikler üretmiştir (25). İlginçtir ki, basit terpenoidler veya benzenoidler gibi birkaç kimyasal türe bu bileşikler arasında rastlanmamaktadır. Polien makrolidler, oligomisin tipi büyük üyeli makrolidler, daunomisin tipi antrasiklinler, nigerisin tipi polieter antibiyotikler, siklopolilaktonlar, streptotrikinler,

aktinomisin ve kuinoksalin-peptitler ve aminoglikozitlerin çoğu sadece Actinomycetales takımının üyeleri tarafından üretilmektedir (4, 26).

Saccharopolyspora, Micromonospora ve *Actinoplanes* gibi diğer aktinomisetler de biyoaktif metabolitler üretmektedir. Ancak bu cinsler daha düşük bir ölçekte üretim yapmaktadır (27). Aktinomisetlerin biyoaktif metabolit açısından en verimli kaynağını *Streptomyces* sp. oluşturmaktadır (28). Tanımlanan 140'tan fazla cinsi ile aktinomisetlerin ürettiği tüm metabolitlerin yaklaşık %75'i (7 600 metabolit) *Streptomyces* cinsinin türleri tarafından üretilir (4, 29). Tüm antibakteriyellerin yaklaşık %3'ü, yeni ilaçların keşfedilmesi için umut verici bir kaynak olarak hizmet eden *Streptomycetes* tarafından sentezlenmiştir (30).

Günümüzden altmış yıl kadar önce, streptomisin, bir *Streptomyces* türünden izole edilen ilk antibiyotiktir. O zamandan beri, *Streptomyces* sp., antibakteriyel, antifungal, antiparaziter, sitostatik veya diğer biyolojik aktivitelere sahip binlerce düşük moleküler ağırlıklı, kimyasal yapı olarak birbirinden farklı bileşiklerin en zengin ve eşsiz kaynakları olduğu kanıtlanmıştır (30).

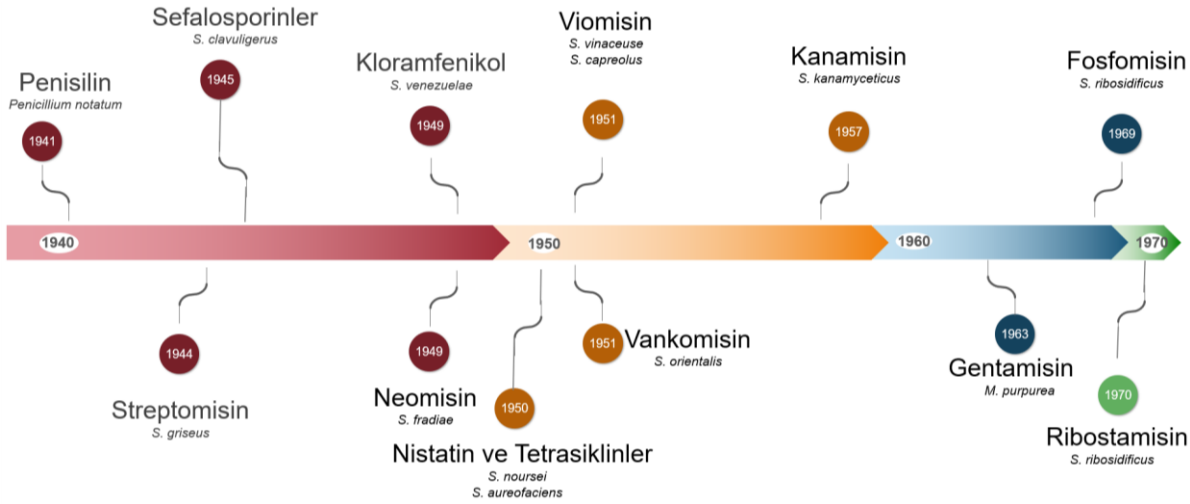
Tanımlanan 900'den fazla türüyle *Streptomyces* sp., diğer birçok mikrobiyal gruba üstün gelen muazzam çeşitliliğe ve biyoaktif potansiyele sahiptir. Büyük bir genom boyutuna (7 milyon baz çiftinden fazla) ve bazılarının 20'den fazla bilinen biyosentetik yolakları kodlayan gen kümesine sahip olduğu rapor edilen *Streptomyces* sp. rakipsiz bir biyosentetik kapasiteye sahiptir (31). Bu sayede antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, vb. aktiviteleri olan çeşitli yeni ve faydalı sekonder metabolitlerin üretimine benzersiz bir katkıda bulunmuştur. Doğal mikrobiyal bileşikler doğrudan veya değiştirilerek biyoaktif ilaç moleküllerine dönüştürülebilir. Mikroorganizma türevli doğal ürünler ve bunların analogları, bugüne kadar hastalıklara karşı en başarılı savunmamız olmuştur ve olmaya devam edecektir (32, 33).

AKTİNOMİSETLERDEN ANTİMİKROBİYAL METABOLİTLER

İlk antibiyotik penisilin, 1928'de *Penicillium notatum*'dan Alexander Fleming tarafından bir rastlantı sonucu keşfedilmiştir. Günümüzde de kullandığımız modern kemoterapinin ilk kullanımı ise 1930'lu yıllarda sülfonamidlerin keşfine dayanmaktadır (34). Waksman ve arkadaşlarının 1943'te, *S. griseus* kültürlerinden streptomisini

izolasyonuyla antimikrobiyal metabolit keşifleri hız kazanmıştır. 1944'ten itibaren tedavide kullanılmaya başlayan bu antibiyotik, Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmaların pek çoğunda ve Mikobakterilerde etki göstermiştir (35).

Antibiyotik çağının başlamasıyla 1940'larda tetrasiklinler ve makrolidler gibi önemli antibiyotik sınıfları keşfedilmiştir. En bilinen önemli antibiyotik sınıflarının keşfedildiği 1950'ler ve 1970'ler arasındaki dönem "altın dönem" olarak isimlendirilmiştir. Antibiyotiklerin zaman içerisinde gelişimi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Antibiyotiklerin tarihsel gelişimi.

Enfeksiyonlarla mücadelemizde 1952'de kullanıma giren tetrasiklinler elimizi güçlendiren bir diğer unsur olmuştur. Ancak eritromisin kullanımına karşı hızlıca gelişen direnç, kullanımın sınırlanmasına neden olmuştur. Yarı sentetik tetrasiklin türevleri klaritromisin ve azitromisin de direnç nedeniyle solunum yolu ve ürogenital sistem enfeksiyonlarına karşı kullanılmıştır. 1970'li yıllara gelindiğinde sülfonamidlere karşı allerji, yüksek toksisite ve direnç gelişimi gibi nedenlerle sülfonamidlerin kullanımı sınırlandırılmıştır. Bu sınırlandırma sülfonamidlerin trimetoprim ile kombine edilmesine kadar sürmüştür. Yarı sentetik yapılı antimikrobiyaller amikasin ve netilmisinin kullanıma girmesi de bu yıllardadır.

1970'li yılların sonuna doğru gelindiğinde penisilin, metisilin, sefalosporinler, aminoglikozidler, klindamisin ve eritromisin gibi antimikrobiyallere karşı dirençli suşlar ortaya çıkmıştır (36). Dirençli suşlarla mücadele etmek için bir sonraki dönemde geniş spektrumlu ajanlar (yeni nesil sefalosporinler, karbapenemler, sefamisin ve

florokinolonlar gibi) kullanıma girmiştir (34). Bu dönemin sonlarında nazokomiyal çoklu ilaca dirençli Mikobakteri enfeksiyonları ile 1990'lı yıllarda mikroorganizmaların direnç kazanmasının imkânsız olduğunun düşünüldüğü vankomisine karşı direncin görülmesi enfeksiyon hastalıklarına karşı olan mücadelemizin hiçbir zaman son bulmayacağını kanıtlar niteliktedir (37).

Antimikrobiyaller sayesinde artık birçok enfeksiyon tedavi edilebilmektedir. Ayrıca antimikrobiyal ajanlar yaşam kalitesinin ve beklenen yaşam süresinin eskisinden daha yüksek olmasını sağlamıştır. Antibiyotik direnci krizine, antibiyotiklerin aşırı kullanımı, uygunsuz reçeteleme ve bilinçsiz kullanımla ilgili faktörler dahil olmak üzere farklı nedenler katkıda bulunmuştur (38). Bu bağlamda, *Actinomyces* tarafından üretilen antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitlerin büyük çeşitliliği, antibiyotik direnci kriziyle mücadele için önemli bir araçtır.

Bir molekülün antimikrobiyal aktivitesi, kimyasal yapısına ve dolayısıyla belirli bir biyolojik hedefe olan afinitesine bağlıdır. Antibiyotik klinik kullanım için ökaryotik sisteme zarar vermeden spesifik bir prokaryotik hedef üzerinde hareket etmelidir. Bakteri biyolojisi ve morfolojisinin ökaryotik hücreninkinden oldukça farklı olması antimikrobiyal moleküller için çeşitli hedefler oluşturmaktadır. En yaygın antimikrobiyal hedefler arasında hücre duvarı biyosentezi, DNA sarmalanması, translasyon veya transkripsiyon adımlar ve bakteri metabolizmasının bazı spesifik özellikleri bulunmaktadır.

Bakteriyel patojenlerin antibiyotiklere duyarlılığı membran geçirgenliği ile ilgilidir. *β*-laktamlar ve florokinolonlar gibi küçük hidrofilik ilaçlar hücre içine ulaşmak için gözenek oluşturucu porinleri kullanırken makrolidler ve diğer daha büyük hidrofobik ilaçlar çift lipid katmanı boyunca yayılmaktadır. Çok sayıda bakteri türünde ilaca dirençli suşların varlığı pasif difüzyon ve aktif taşımada yer alan membran bileşenlerinin modifikasyonundan kaynaklanmaktadır (39). Bir diğer önemli direnç mekanizması, hedef modifikasyonu ya da amplifikasyonudur. Hedef elemanlarının mutasyon, kimyasal modifikasyon, ikame veya maskelenmesinin bir sonucu olarak antibiyotik hedefinin değiştirilmesi, ilacı etkisiz hale getirmektedir. Antibiyotik hedefinin gen duplikasyonu veya amplifikasyonu ile de ilaç inaktive olabilmektedir. İlaç inaktivasyonu, bakterilerin antibiyotiklerin kimyasal yapısını değiştirebildiği ve etkisiz hale getirebildiği son mekanizmadır.

Direnç kazanan patojenler nedeniyle keşifleri ve araştırmaları hiç son bulmayacak olan antibiyotikler, ABD'de 1900'de 47 yıldan 2000'de erkeklerde 74'e ve kadınlarda 80'e varan ortalama yaşam beklentisinin artmasında çok önemli olmuştur (40). *Streptomyces*, antimikrobiyal ajanlar olarak sekonder metabolitleri sentezlemek için kullanılabilen başlıca aktinobakteri grubudur ve ayrıca dirençli mikroorganizmaların tedavisi için bir çözüm potansiyeli taşımaktadır (41).

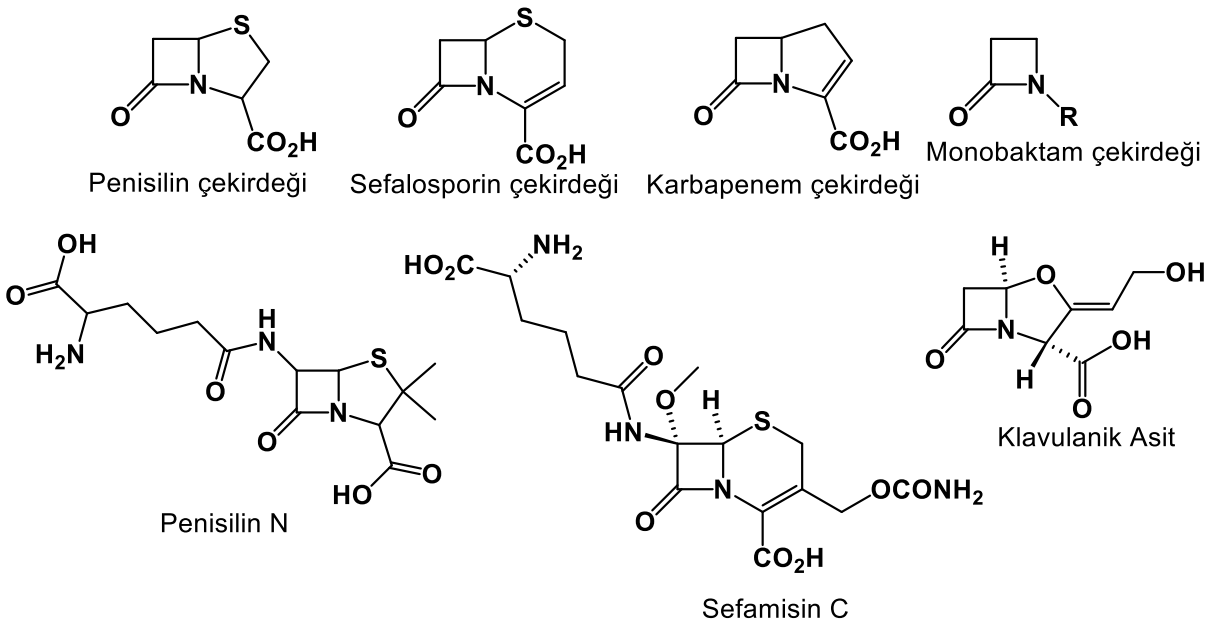
Geride bıraktığımız 20 yıl içerisinde dirençli bakteri suşları küresel hale gelmiştir. Buna karşılık yeni etki mekanizmalarına sahip yeni moleküllerin keşfedilmesinin zorluğu, düşük karlılık sorunları ve klinik deneylerin zorluğu, geliştirme sürecindeki yeni antimikrobiyallerin sayısının azalmasına neden olmuştur (42). Özellikle bulaşıcı hastalıklarla mücadelede ticari olarak temin edilebilen antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde doğal ürünlerin oranı yüksektir. Bu nedenle antimikrobiyal direnç, doğal ürünlerin en aktif olabileceği alan olarak kabul görmektedir (22).

Penisilinin keşfinden beri antimikrobiyal etkiye sahip yeni moleküller bulmak için bir dizi çalışma gerçekleştirilmiştir. Aktinomisetler, en önemli antibiyotik kaynaklarıdır. Bu antibiyotikler *β*-laktamlar, ansamisinler, makrolidler, linkozamidler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, antibiyotik peptitler, aminokumarinler ve epoksitler olarak sınıflandırılabilmektedir.

β-Laktamlar

β-laktam antibiyotikler, genellikle bakterisidal aktiviteye sahip bakteriyel ve fungal moleküllerdir. Biyolojik etkilerini, mikroorganizmanın hücre duvarındaki bağlara benzerliğinden dolayı geri dönüşü olmayan hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonu ile göstermektedirler.

Dört üyeli bir siklik amid içeren dört ana doğal *β*-laktam sınıfı vardır: bir kükürt atomlu beş üyeli bir halka ile kaynaşmış bir *β*-laktam halkasına sahip olan penisilinler, kükürt atomlu altı üyeli doymamış bir halkaya ile bir *β*-laktam halkasına sahip olan sefalosporinler, heteroatom içermeyen doymamış beş üyeli bir halkaya sahip olan karbapenemler ve sadece *β*-laktam halkasını içeren monobaktamlar (Şekil 3) (43).



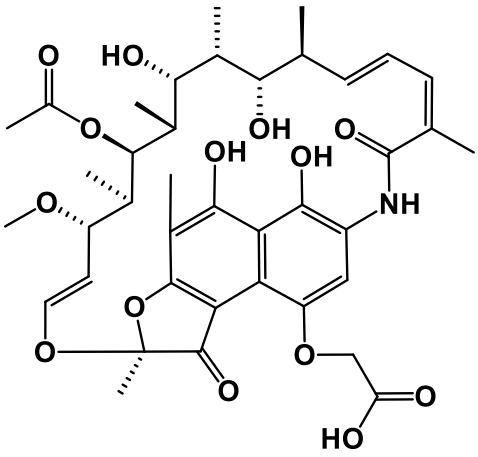
Şekil 3. *β*-laktam antibiyotiklerin temel yapısal çekirdekleri ve aktinomisetler tarafından üretilen doğal *β*-laktam antibiyotiklerin örnekleri.

Akış pompalarının üretimi, antibiyotik hedefinin modifikasyonu ve antibiyotiği inaktive edebilen enzimlerin sentezi (*β*-laktamaz, serin (ser) veya Zn^{2+} proteazlar gibi) antibiyotiklerin etkisiz hale gelmesine neden olan direnç mekanizmalarının başlıcalarıdır.

Tıpta kullanılan yaklaşık 40 *β*-laktam bileşiği bulunmaktadır. *S. lipmanii*'den izole edilen penisilin N (44) ve *S. griseus*'tan sefamisin (45) aktinomisetler tarafından üretilen doğal *β*-laktam antibiyotiklerdendir. *S. clavuligerus'*tan izole edilen klavulanik (46) asit ise *β*-laktamaz inhibitörlerindendir.

Ansamisinler

Ansamisinler, bir amid bağlantısında sonlanan bir poliketid zinciri ile köprülenmiş aromatik kısımlar içerirler. Ansamisin yapısındaki en önemli doğal antibiyotik rifamisin B'dir (Şekil 4).



Şekil 4. Doğal ansamisin: rifamisin B.

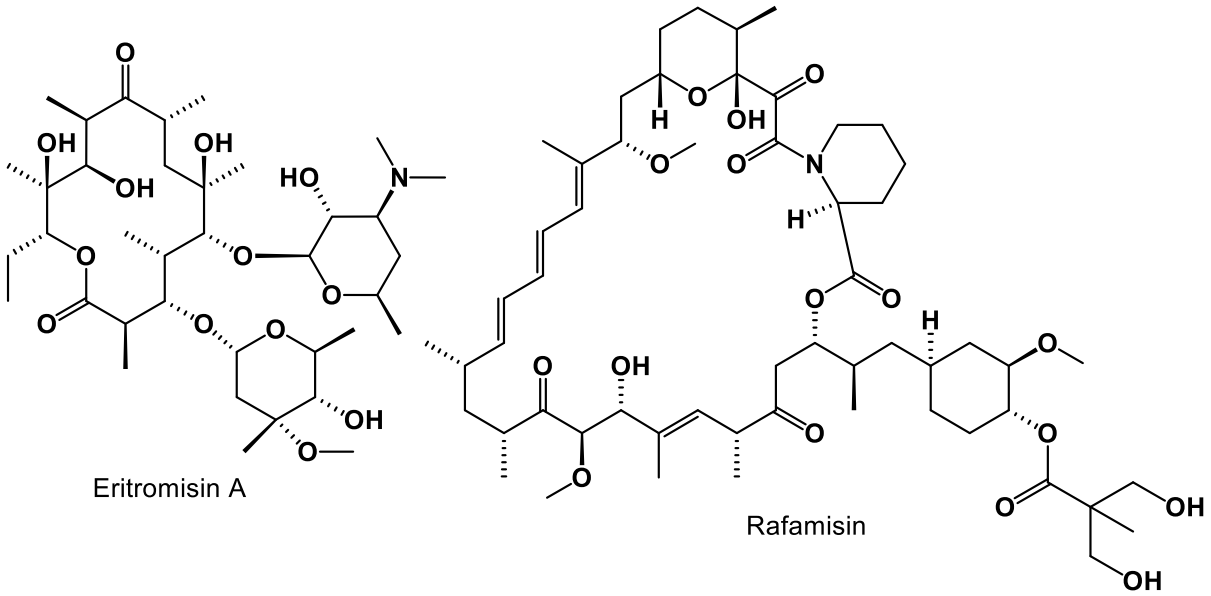
Rifamisinler, bakterisidal aktivitelerini deoksiribonükleik asit (DNA)'e bağımlı ribonükleik asit (RNA) polimerazı inhibe ederek göstermektedirler. Rifamisinlere karşı gelişen en yaygın direnç mekanizması, DNA'ya bağımlı RNA polimerazın bir kromozomal mutasyonu yoluyla antibiyotik hedefinin modifikasyonudur (47). Bu antibiyotik sınıfı patojenik Gram pozitif bakteriyel enfeksiyonların tedavisi önem taşımaktadır (48-50).

Makrolidler

Doğal makrolidler sınıfı 14, 15 veya 16 karbon atomlu ve bir veya daha fazla deoksi şeker içeren makrolakton bileşiklerini kapsar. Makrolidler bakteriyostatik ajanlar olarak kabul edilmekle birlikte bakterisidal aktivite gösterebilirler. Aktivitelerini prokaryotik ribozomun 50S alt birimi ile etkileşime girerek ribozomun yer değiştirmesini engelleyerek gösterirler. Genellikle akış pompaları ve hedefin modifikasyonu ile ilgili direnç mekanizmaları makrolidlerin etkisiz hale gelmesine neden olur (51).

Makrolidler, farklı *Streptomyces* cinslerinden izole edilmiştir (52-54). Eritromisin (Şekil 5) *S. erythreus'tan* (55, 56) izole edilmiştir.

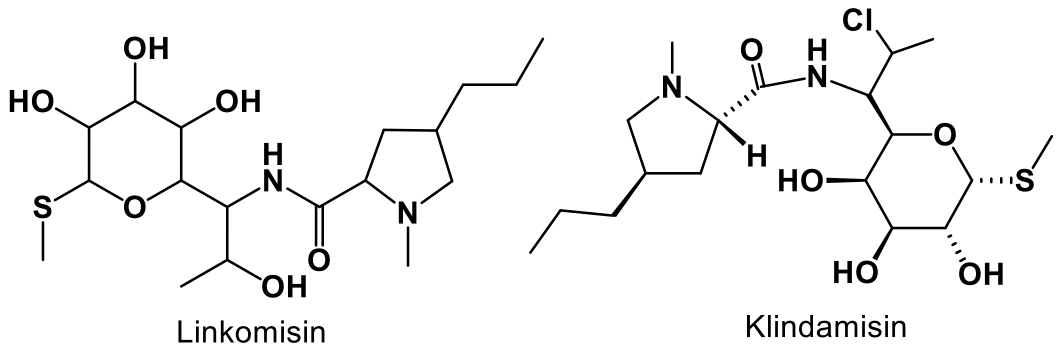
Başlangıçta antifungal ajan olarak kullanılan rapamisin (Şekil 5), bağışıklık baskılayıcı özelliklerinin keşfiyle, organ nakillerinde reddin önlenmesi için tercih edilen bir ilaç haline gelmiştir. Bu durum hem kimyasal yapı hem de biyoaktivite açısından *Streptomyces* suşları tarafından üretilen metabolitlerin büyük çeşitliliğinin bir başka örneğidir (57).



Şekil 5. Aktinomisetler tarafından üretilen makrolidler: Eritromisin A ve Rapamisin.

Linkozamidler

Linkozamidler, makrosiklik lakton mevcut olmaması ve şeker molekülünün bir amino asit elementine bağlı olması nedeniyle kimyasal yapıları bakımından oldukça farklı olsalar da aktivite spektrumu ve etki mekanizmaları açısından makrolidlere çok benzemektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Doğal linkozamid (linkomisin) ve yarı sentetik linkozamid (klindamisin).

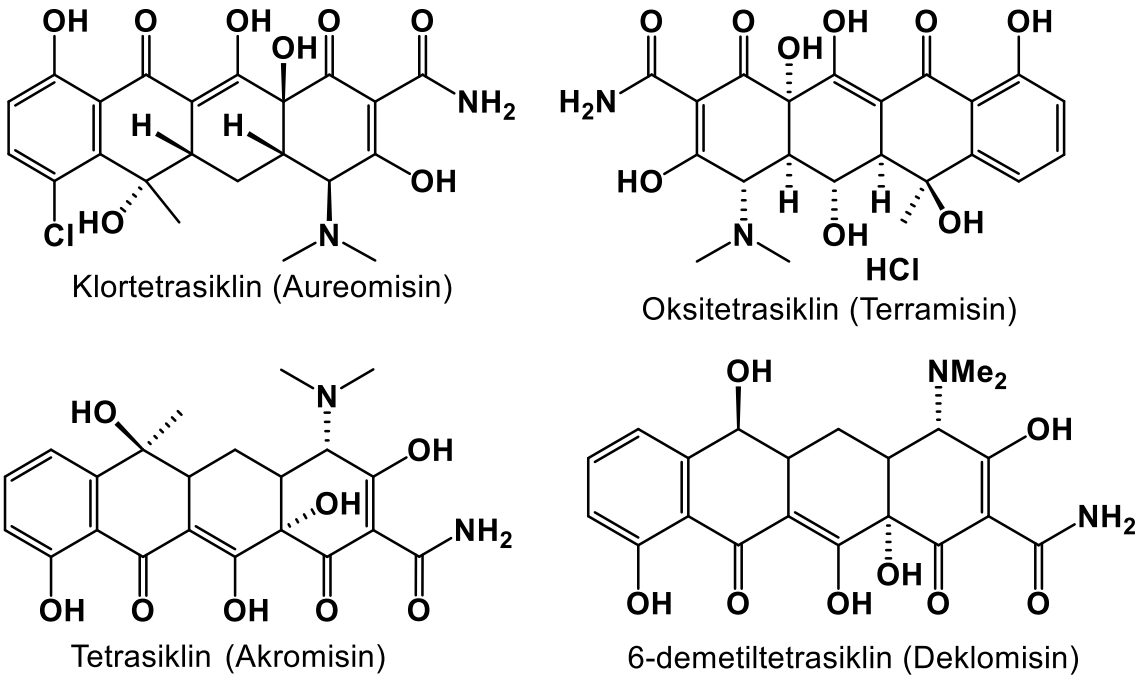
Direnç mekanizmaları genellikle, bir metilazın ribozomun 50S alt biriminde bir değişikliği indüklediği makrolidler ve streptograminlerinkiyle bağlantılıdır. Linkomisin, izole edilen ilk linkozamid bileşiğidir. Linkomisinin yarı sentetik klorlanmış türevi klindamisin, anaerobik bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde linkomisinden daha aktiftir (58).

Linkomisinler, *S. lincolnensis* (59, 60) gibi çeşitli aktinomisetlerden (61, 62) izole edilmişlerdir.

Tetrasiklinler

20. yüzyılın ikinci yarısında keşfedilen tetrasiklinler, genellikle naftasen çekirdeğinin C-2, C-4, C-6 ve C-7 karbonlarına yerleştirilmiş bir naftasen karboksamid çekirdeğine sahiptirler. Bakteriyostatik etkilerini prokaryotik ribozomun 30S alt birimine bağlanma yoluyla protein sentezini engelleyerek gösterirler. Plazmit veya transpozon DNA'sında tetrasiklinlere karşı farklı direnç mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu genler, genelde Gram negatif bakterilere, antibiyotiğin hücreden dışarıya atılmasını sağlayan akış pompası yoluyla ekstrüde etme veya Gram pozitif bakterilerin çoğunluğunda ise antibiyotiğin bağlanmasını engellemek için ribozom modifikasyonu yeteneği kazandırmaktadır.

FDA tarafından klinik kullanım için onaylanan ilk doğal tetrasiklin, klortetrasiklin (1948), ardından oksitetrasiklin (1951), tetrasiklin (1953) ve demetilklortetrasiklindir (Şekil 7) (63, 64).



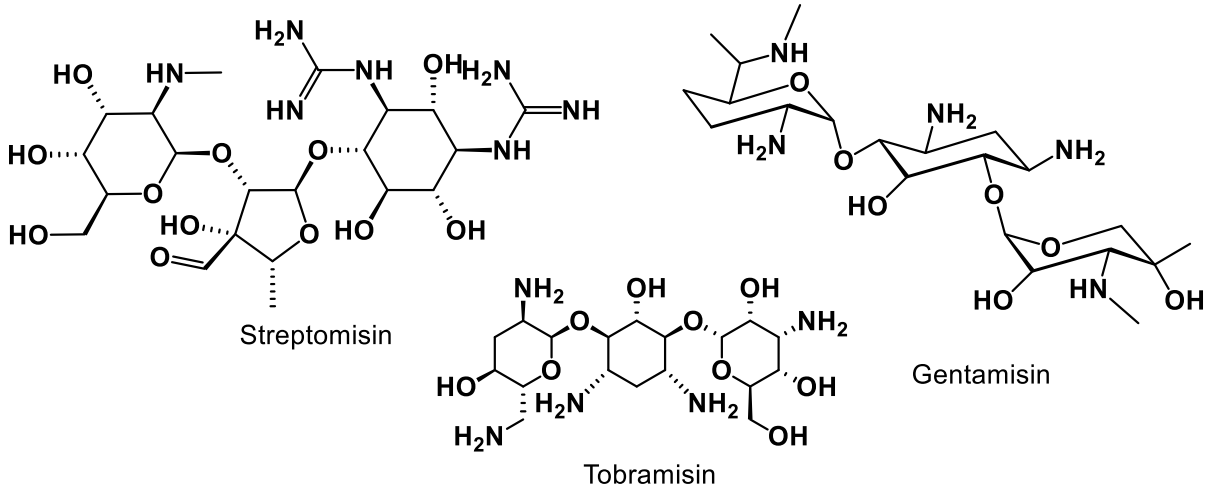
Şekil 7. Birinci nesil tetrasiklinler.

Tetrasiklin üreticileri arasında *S. avellaneus* (66) başta olmak üzere çeşitli türler yer almaktadır.

Aminoglikozidler

Aminoglikozitler, genellikle bir merkezi aminosiklitol çekirdeğine bir glikozidik bağ ile bağlanan iki veya üç amino şekerden oluşan moleküllerdir. Aktivitelerini, ribozomun 16S ribozomal ribonükleik asite (rRNA) bağlanıp ribozomlarla etkileşerek protein sentezinin değiştirilmesi veya engellemesi ile gösteririler (64). Aminoglikozidlere karşı gelişen ana direnç mekanizmaları antibiyotiği modifiye edebilen spesifik enzimlerin ekspresyonu ve hücre içindeki antibiyotik geçirgenliğinin azalmasıdır (67).

Doğada aktinomisetler tarafından üretilen birçok aminoglikozit vardır (Şekil 8).



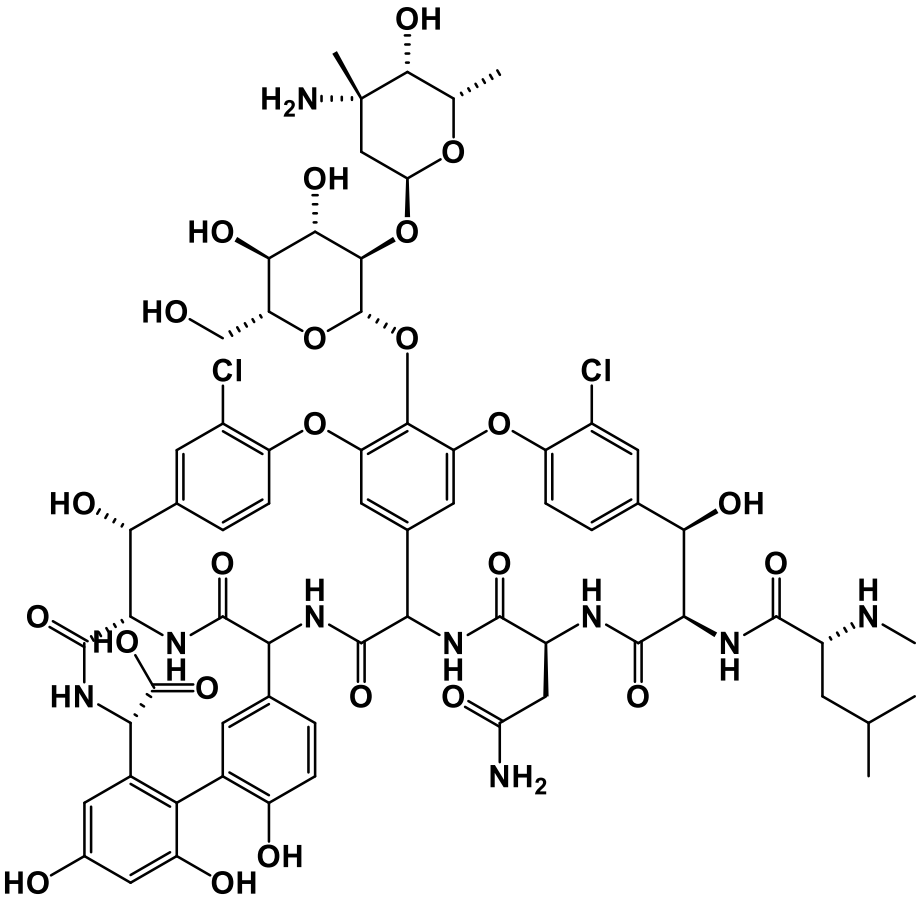
Şekil 8. Aktinomisetlerin ürettiği aminoglikozid örnekleri.

Günümüzde tüberküloz tedavisinde primer antitüberküloz etkin madde olarak kullanılan streptomisin *S. griseus*'tan izole edilmiştir (68). Göz enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan tobramisin *S. tenebrarius*'tan (69), gentamisin ise *M. purpurea*'dan izole edilmiştir (70).

Antibiyotik Peptitler

Antibiyotik peptitler, biyosentetik bir bakış açısından iki gruba ayırılabilir: ribozomal peptit sentetazlar ve ribozomal olmayan peptit sentetazlar (NRPS'ler). Aktinomisetler tarafından üretilen antibiyotiklerin büyük bir kısmı (lipopeptit, glikopeptidler ve streptograminler) NRPS'ler arasındadır (71).

Farklı aktinomiset türleri tarafından üretilen bu sınıfın en önemli doğal antibiyotikleri, vankomisin (Şekil 9) gibi glikopeptidler, daptomisin gibi lipopeptitler ve streptograminlerdir. Glikopeptidler farklı şekerlerle lipopeptitler farklı yağ asitleriyle, klor, asetil veya metil grupları gibi belirli fonksiyonel gruplarla donatılmış doğrusal veya siklik peptidik yapı iskeleti içeren moleküllerdir. Bir makrosiklik çoklu doymamış lakton yapısı (streptogramin A) ve bir siklik hepta veya heksadepsipeptid yapısı (streptogramin B) görülen streptograminler makrolidlere çok yakın özelliklere sahiptir (72).



Şekil 9. Vankomisin.

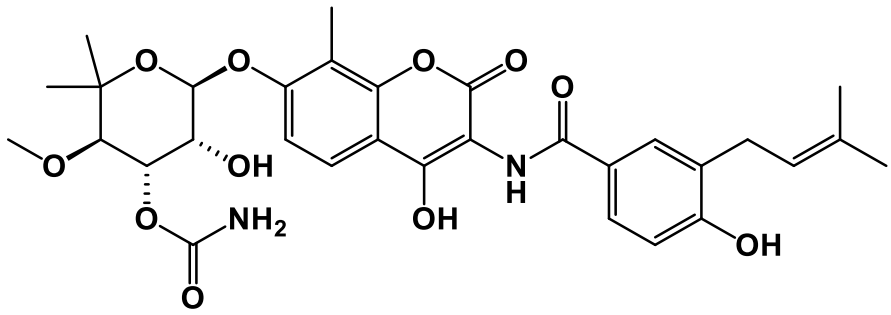
Glikopeptid antibiyotikler, hidrofobik van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları ile stabilize edilen kısımlarını ile bağlanma yoluyla transpeptidasyon ve transglikozilasyon reaksiyonlarını bloke ederek hücre duvarı sentezini bozabilir (73). Bunun yerine lipopeptid antibiyotikler, aynı biyolojik yapının kimyasal fiziksel özelliklerinin dengesizliğine neden olarak doğrudan bakteri zarına bağlanarak yüzey aktif maddeler olarak hareket edebilirler (74). Bakteriler hücre duvarının kalınlığını

artırarak glikopeptid antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilir. Streptograminler, 70S bakteri ribozomlarının 50S alt birimine geri dönüşümlü bağlanma yoluyla bakteriyostatik aktivite gösterirler. Streptograminlere karşı gelişen direnç mekanizmalarının başlıcaları akış pompaları ve hedefin modifikasyonu üzerinedir. (75)

Günümüzde 1 000'den fazla antimikrobiyal peptit bilinmektedir. Aktinomisetler tarafından doğada üretilen en önemli antibiyotik peptitler arasında vankomisin (76) ve *S. filamentosus*'tan (77) izole edilen daptomisin yer almaktadır.

Aminokumarinler

Aminokumarinler, farklı pozisyonunda çeşitli şekillerde düzenlenmiş 3-amino-4,7-dihidroksikumarin halkasının oluşturduğu bir antibiyotik sınıfıdır. Novobiyosin, hayvansal kullanımlar için onaylanmış bu sınıfa ait en önemli doğal moleküldür (Şekil 10).



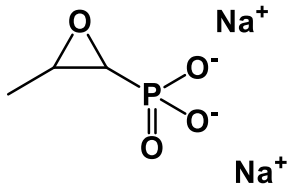
Şekil 10. Aktinomisetlerden izole edilen aminokumarin novobiyosin.

Bir şeker kalıntısı (novobiyoz) ve kumarin halkasına bağlı bir benzoik asit türevinden oluşan novobiyosinin, başlıca üretisi *S. spheroides*'tir (74).

Aminokumarinler, replikasyon ve translasyonda üretilen enzimler için DNA'yı kopyalanmasını sağlamak için gerekli bir enzim olan DNA girazı inhibe edebilir. Bu inhibisyonu adenozin trifosfat (ATP) bağlanma bölgesini kısmen kaplayarak gerçekleştirir (78). Bakterilerde kazanılan direnç genellikle antibiyotik hedefindeki modifikasyonla, ilaç ile enzim arasındaki bağlanmayı bozan mutasyonla ilgilidir (79).

Epoksitler

Epoksitlere ait en önemli doğal molekül fosfomisin olarak bilinen L-cis-1,2-epoksipropilfosfonik asittir (Şekil 11).



Şekil 11. Aktinomiset kaynaklı epoksit fosfomisin.

Çoğu Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı kullanılabildiğinden oldukça geniş aktivite spektrumuna sahiptir. Aktivitesini peptidoglikan sentezinin ilk adımında yer alan bir enzimi (MurA) geri dönüşümsüz şekilde engellerek etkisini gösterir. Monoterapide sıklıkla dirençli bakteri türlerinin ortaya çıkmasına neden olan fosfomisin klinikte her zaman başka bir antibiyotik ile birlikte kullanılmaktadır. Taşıyıcıları kodlayan yapısal genlerdeki mutasyon ya da mutasyonlara bağlı olarak fosfomisin alımının azalması, MurA hedef enziminin aşırı ekspresyonu veya modifikasyonu veya antibiyotik inaktivasyonu fosfomisine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır (80).

Doğada fosfomisin üreten aktinomisetler arasında *S. fradiae* (81, 82) en başta gelmektedir.

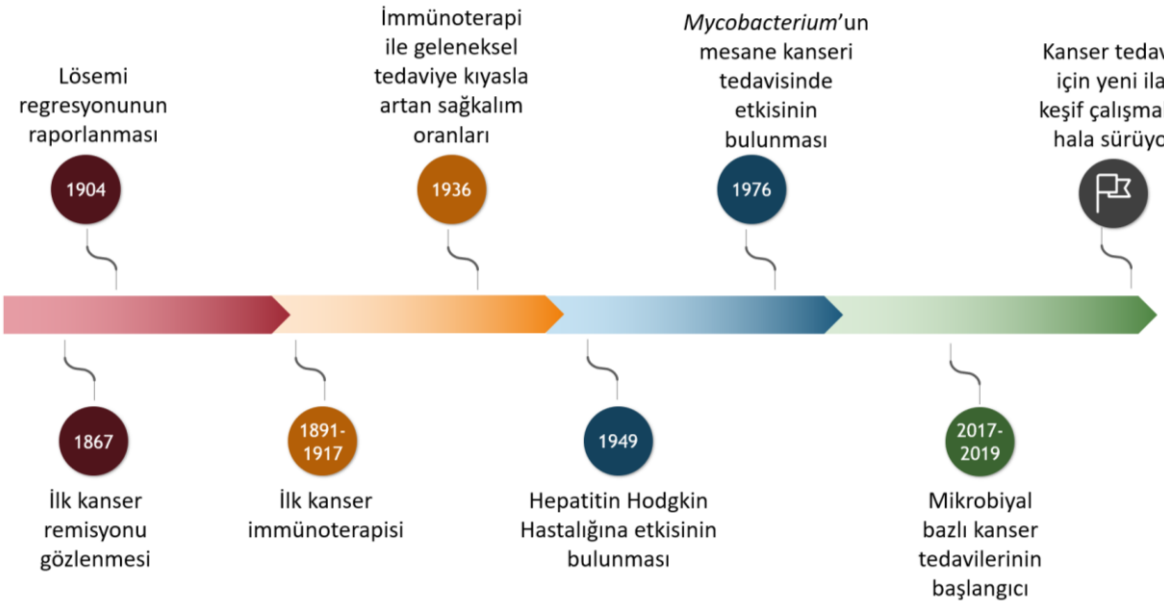
AKTİNOMİSETLERDEN ANTİPROLİFERATİF METABOLİTLER

Tanı koyma ve tedavide yakın zamanda meydana gelen gelişmelere rağmen, kanser her yıl milyonlarca cana mal olan ölümcül bir hastalık olarak varlığını sürdürmektedir (83). Kanser, kardiyovasküler hastalıktan sonra ikinci önde gelen ölüm nedeni olarak kaydedilmiştir (84). 2017 yılında dünyada 24.5 milyon kanser vakası ve 9.6 milyon kanser nedenli ölüm kaydedilmiştir (85).

Kontrolsüz hücre bölünmesi ile diğer dokuları istila etme kapasitesine sahip değiştirilmiş konakçı hücreler, tümör kütlesi oluşumu, vaskülarizasyon ve metastaz ile sonuçlanmaktadır. Kanser hücreleri, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlık, kendi kendine yeterli büyüme sinyalleri, apoptoz direnci, sınırsız çoğalma

potansiyeli, sürekli metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere kendi fizyolojilerinde göze çarpan özellikler sergiler.

Kemoterapötik ajanlar, cerrahi, radyoterapi ve immünoterapi gibi antikanser tedavinin destekleyicileri, sistemik toksisite ve tümör hücresi infiltrasyonu için önemli bir zorluk teşkil etmektedir (86). Bu zorlukların yanında kemoterapötiklerin uzun süreli kullanımına bağlı gelişen ilaç direnci, tedavinin etkisiz olmasına yol açmıştır. Tüm bu sorunların üstesinden gelebilmek için, yeni ve daha iyi antikanser kemoterapötikler gereklidir. Bu bağlamda, mikroorganizma türevli enzimler, proteinler ve peptitler ile kanser terapötiklerinde yeni bir çağı açarak yeni nesil kanser tedavi terapileri keşfedilmiştir. Şekil 12'de mikrobiyal bazlı kanser tedavisinin tarihsel gelişimi gösterilmiştir (87).



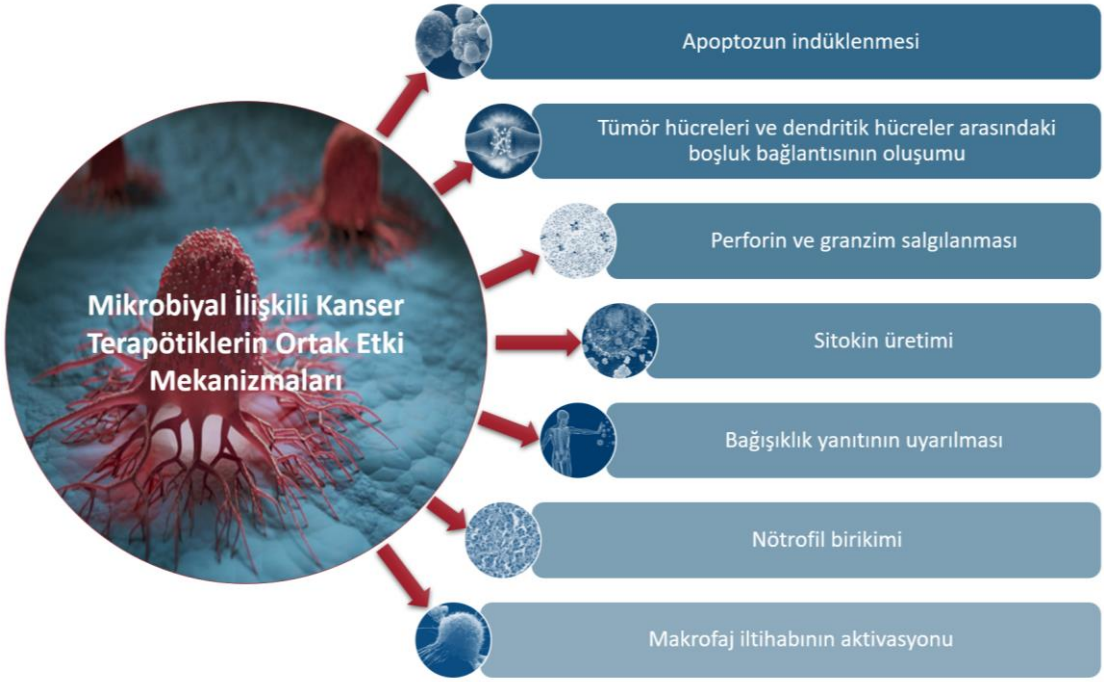
Şekil 12. Mikrobiyal bazlı kanser tedavisinin tarihi.

Mikrobiyal temelli kanser tedavisinin büyük potansiyeli 1867'de, Dr. Busch tarafından yanlışlıkla erizipel ile kontamine olmuş hastalarda kanser remisyonu gözlemlendiğinde ortaya çıkarıldı. 1882'de remisyonun nedeni olarak *Streptococcus pyogenes* bildirildi (88). 19. yüzyılın sonlarında, immünoterapi öncüsü Dr. Coley, patojenik bakteri bulaşmış hastalarda tümör gerilemesi bildirdi. Ardından, ısıyla inaktive edilmiş *S. pyogenes* ve *Serratia marcescens*'ten elde edilen lizatlarla bir tedavi yöntemi geliştirdi. Bağışıklık aktivasyonunda, tümör hücrelerinin apoptozunu

teşvik ederek işlev yapan mikrobiyal varyantların bu karışımına “Coley'in Toksini” adı verilmiştir (89).

Clostridium histolyticum'dan elde edilen steril filtratlar, ilerlemiş kanserleri tedavi etmek için kullanıldı ve gözlemlenen tümör regresyonu, enzim üretiminin neden olduğu hipotezini ortaya koydu (90). Bu önemli sonuçlar kansere karşı mücadelemizde günümüzde gerçekleştirebildiğimiz antikanser tedavilerin temelini oluşturmuştur.

Günümüzde tedavide kullandığımız kanser terapötiklerinin yaklaşık %60'ından fazlası doğal kaynaklardan elde edilmiştir (91). Kanser tedavisinde kullanılan mikrobiyal terapiler bazı ortak etki mekanizmalarına sahiptir (Şekil 13).



Şekil 13. Kanser terapötiklerinin ortak etki mekanizmaları.

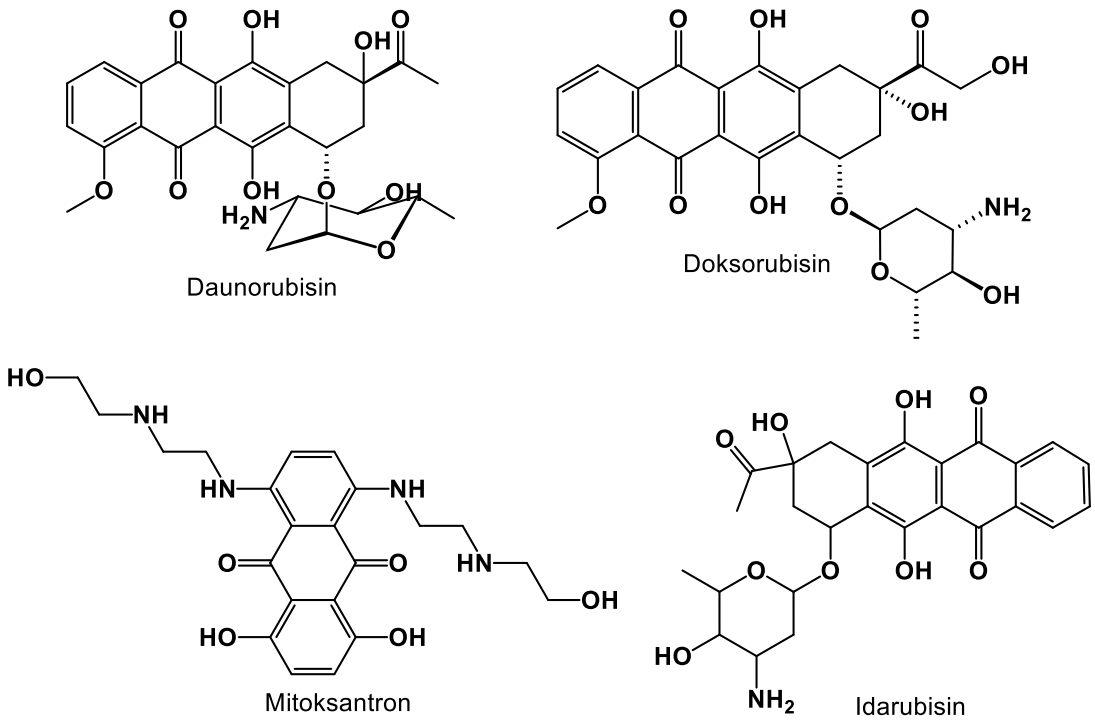
Apoptoz mekanizması, toksin üretimiyle veya tümör hücrelerinden besin yoksunluğu yoluyla tümör hücresini yok eder. Tümör hücreleri ve dendritik hücreler arasında boşluk bağlantısının oluşumu, tümör antijenlerinin dendritik hücrelere çapraz sunumunu kolaylaştırır. Perforin ve granzim salgıları hücre geçirgenliği üzerine etki ederek apoptoza yol açar. Mikrobiyal bileşenler, hücreleri hem doğal hem de adaptif bağışıklık için gerekli sitokinleri üretmesi için uyarır. Bağışıklık tepkisinin uyarılması, artan interlökin 12 üretimi ile karakterize edilir. Nötrofil birikimi,

tümör nekroz faktörü-*α* ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligandın yüksek miktarda salgılanmasına neden olur, bu durum bağışıklık tepkisini arttırır ve apoptozu indükleyerek tümör hücrelerini öldürür. Makrofaj iltihabının aktivasyonu yoluyla interlökin-1*β* ve tümör nekroz faktörü-*α*'nın tümör mikro çevresine salgılanmasına yol açar.

Mikrobiyal türevli biyoaktif bileşikler, kanser hücrelerine karşı ya membranolitik süreç ya da mitokondrideki bozulma yoluyla seçici olarak hareket etmek için benzersiz mekanizmalara sahiptir (92). Kanser hücreleri üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda anyonik fosfatidilserin, katyonik antikanser peptitlerini hücre yüzeyine çeker ve hücre zarına bağlanır, bu da zar yapısının bozulmasına ve hücre ölümüne yol açar (93, 94).

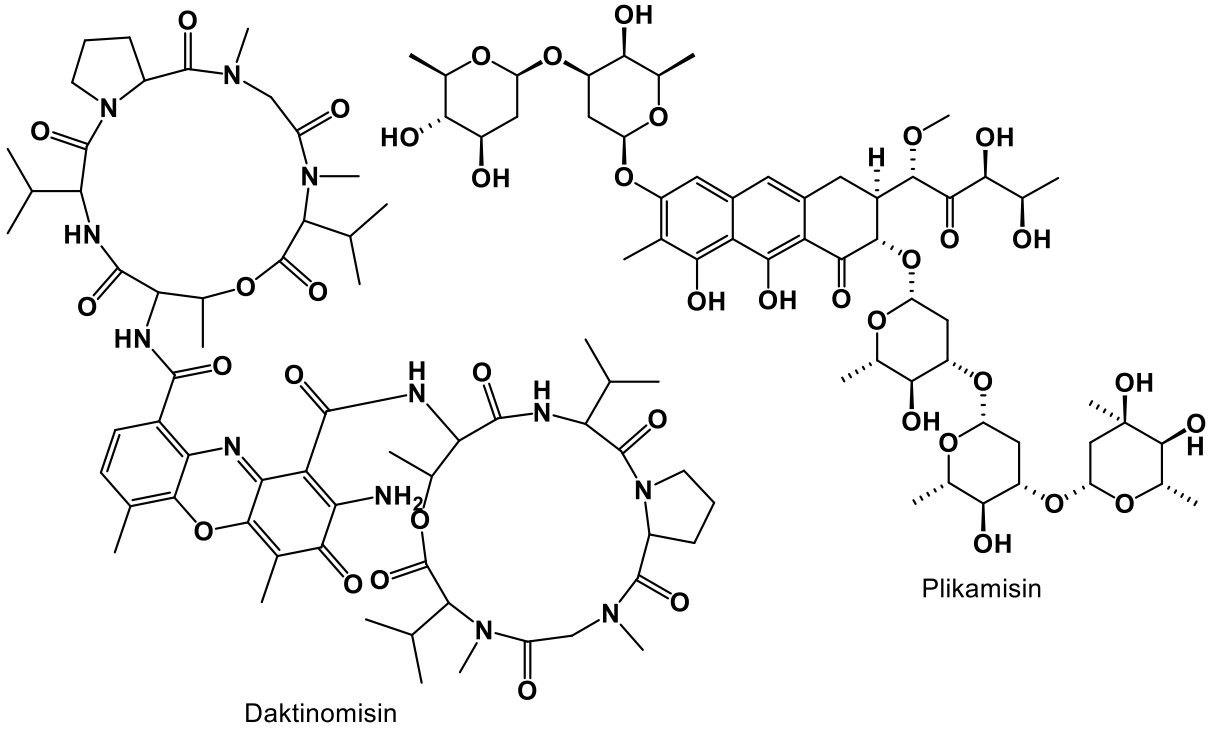
Son yıllarda, mikroorganizmalardan, özellikle de aktinomisetlerden potansiyel antitümör aktiviteleri olan sekonder metabolitler keşfedilmiştir. Antrasiklinler kromomisinler ve siklodipeptitler, kanser kemoterapötik ajanlarının en önemlileri arasındadır.

Antrasiklinler: Doksorubisin, daunorubisin, mitoksantron ve idarubisin (Şekil 14) *Streptomyces* cinsine ait türlerden izole edilen antitümör antibiyotiklerdendir (95-98).



Şekil 14. Antrasiklin yapılı antitümör bileşikler.

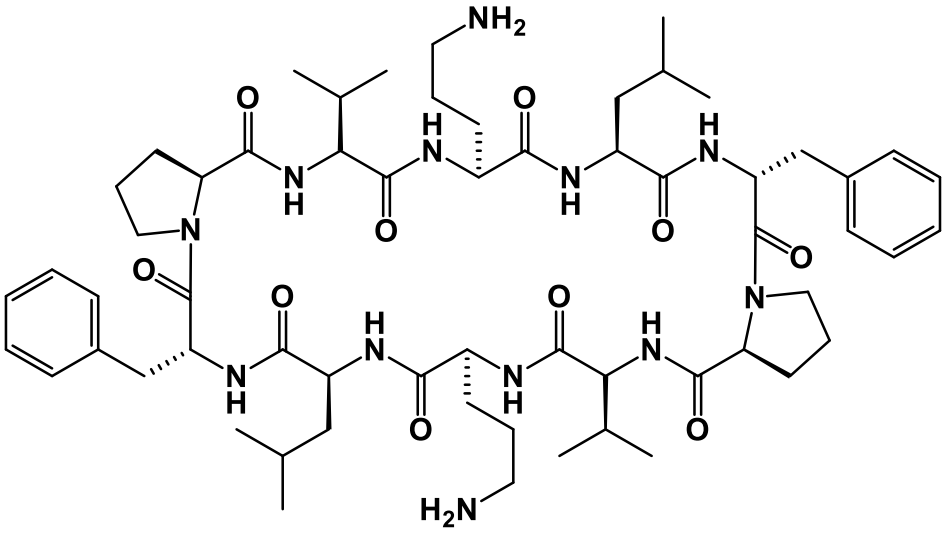
Kromomisinler: *Streptomyces* kaynaklı bir peptolid antibiyotik olan daktinomisin ve plikamisin (Şekil 15) antitümör etkiye sahiptir (99, 100).



Şekil 15. Kromomisin yapılı antitümör bileşikler.

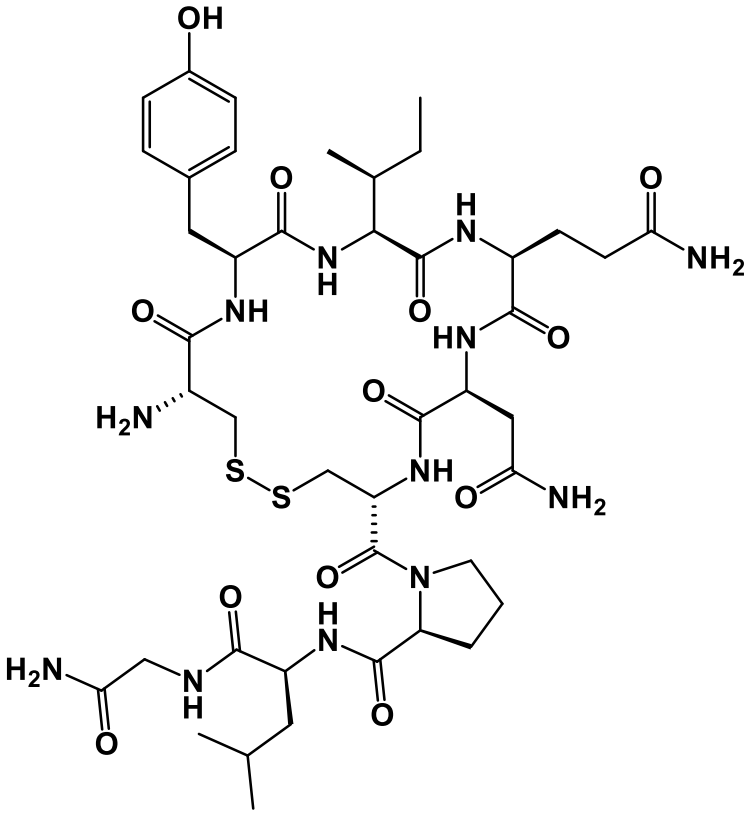
Siklopeptidler: Doğal peptit ürünleri, tıbbi açıdan önemli bileşiklerin en dinamik kaynaklarından biridir (101). Siklik peptidler yapısal olarak içinde çok çeşitli bileşikleri bulundurmakla beraber homomerik siklik peptitler ve heteromerik siklik peptitler olmak üzere iki sınıfa ayrılabilmektedir. Halkanın amino asitlerinin amid bağları yoluyla birbirine bağlandığı peptitler homomerik (homodetik) siklik peptitler olarak adlandırılmaktadır. Fenil içeren homomerik halkanın bir veya daha fazla yapı birimi amino asit olmadığında, bunlara heteromerik (heterodetik) siklik peptitler adı verilmektedir.

Homomerik siklik peptitlerde amid bağlarının çoğu, gramisidin S (Şekil 16) ve tirozidinlerde bulunanlar gibi karboksil grupları ve amino grupları arasında oluşan tipik peptit bağlarıdır. Polimiksinler gibi bu grubun diğer üyelerinde, halkanın amid bağlarının bir kısmı, karboksil konumuna *α* olanlar dışındaki amino gruplarıyla oluşturulur (102, 103).



Şekil 16. Gramisidin.

Heterodetik peptitlerde halka sistemi, amidlerden ve amid olmayan heteroatom bağlarından (disülfür köprüsü, tiyoeter veya lakton bağlantısı gibi) oluşur (102). Bu grup peptitlerdeki en yaygın nonamid bağlantıları, disülfit bağları (oksitosin (Şekil 17) ve vazopressin gibi) ve ester (lakton) bağlarıdır (104).



Şekil 17. Oksitosin.

Amit bağlantılarının cis konumda olduğu diketopiperazin halkasını taşıyan siklik dipeptidler, homodetik siklik peptidlerin en basit biçimidir (105).

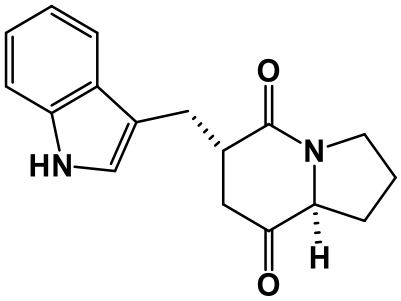
2,5-diketopiperazinler olarak da adlandırılan siklodipeptidler, doğada sıklıkla bulunan en küçük siklik peptitlerdir ve genellikle mikroorganizmalar tarafından sentezlenirler. Siklodipeptitler, iki azot atomunun amid bağları ile altı üyeli piperazin halkasına bağlandığı bir siklik organik bileşik sınıfıdır. Siklodipeptitler, iki *α*-amino asidin kaynaşmasıyla oluşturulan bir ana iskelet yapısına sahiptir. Siklodipeptitler hem *cis* hem de *trans* izoformları olarak konfigüre edilebilir, ancak *cis* konfigürasyonları daha yaygındır (106).

Dipolar iyonlar (zwitteriyonlar) halinde bulunmayan siklodipeptitler genellikle nötr bileşiklerdir. Grubun daha basit yapıya sahip olanları suda çözünür, ancak fenilalanin (Phe) türevleri suda çok az çözünür (107). Fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri, uzaysal düzenlemelerine bağlıdır. Siklodipeptitler hormonlar, antibiyotikler, antiviraller, fitotoksik bileşikler gibi çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (107, 108).

Bir siklodipeptitin IR spektroskopisi alındığında 1550 cm^{-1} bandının varlığı peptitte *trans* bağ varlığını ifade etmektedir. Bu bant yardımıyla *cis* ve *trans* ayrımı yapılabilir. *Cis*-amid bağında C=O gerilmesi 1670-1690 cm^{-1} aralığında band gözlenmesine neden olurken *trans*-amid bağlarında bu değer 1650 cm^{-1} bandı olarak görülür. N-H gerilmesi *cis*-amid bağlarında 3180-3195 cm^{-1} bandı *trans*-amid bağlarında 3350 cm^{-1} bandı olarak görülür (107).

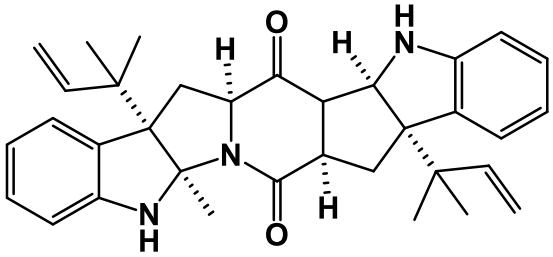
Kütle spektrometrisi (MS), bir siklodipeptitin yapısını belirlemede çok önemli ve hızlı bir yöntem haline gelmiştir. Kütle spektrumunda, yan zincirlerin bölünmesine ve altı üyeli diketopiperazin halkasının kopmasına karşılık gelen fragmanlar yaygın olarak gözlenmektedir. Ana veya moleküler iyon belirgindir. C=O veya CHO kaybı, amin fragmantasyonu ve H-N-C=O'nun eliminasyonu temel fragmantasyonlar olarak gözlenir (108). Diketopiperazin halkasının varlığı *m/z* 85, *m/z* 113 ve *m/z* 114 iyonları ile doğrulanabilir. Yan zincirlerin yapısı ise *m/z* (113+R) iyonunun veya $[M–R]^+$ iyonlarının varlığından belirlenebilir. *m/z* 107, 91 ve 128 iyonları sırasıyla tirozin (Tyr), fenilalanin (Phe) ve alanin (Ala) kalıntılarının karakteristiğidir (109).

Siklo-D-triptofan-L-prolin denizel mikroorganizma *P. vinaceum*'dan izole edilmiş antimikrobiyal aktiviteye sahip bir triptofan-prolin siklodipeptittir (Şekil 18) (110).



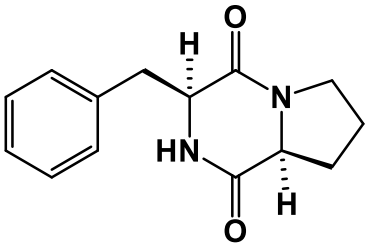
Şekil 18. Siklo-D-triptofan-L-prolin.

Novoamuromin (Şekil 19), mikroorganizma kaynaklı olup kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir (111).



Şekil 19. Novoamuromin.

Siklo-L-prolin-L-fenilalanin (Şekil 20), mikroorganizma kaynaklı olup fitotoksik etki göstermiştir (112, 113).



Şekil 20. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin.

Tüm siklodipeptitlerin yaklaşık %90'ı bakteriyel kaynaklıdır (114). Antikanser aktiviteleri olan siklopeptidler büyük oranda aktinomisetlerden elde edilmiştir.

TEZ KAPSAMINDA KULLANILAN AKTİNOMİSETLER

Kaplıcalar, buzullar, derin denizde düşük sıcaklıklar, endüstriyel atık ve maden atık sularındaki asidik veya alkali pH, çöllerdeki yüksek radyasyon ve aşırı kuruluk, göllerdeki yüksek tuz konsantrasyonu gibi çeşitli farklı ekosistemlere aktinomisetler uyum sağlamışlardır. Bu alışılmadık habitatlara yüksek adaptasyon yetenekleri sayesinde eşsiz metabolitleri üretebilirler (115). Bu bağlamda, kapalı su ekosistemlerinden, göl çökeltileri gibi keşfedilmemiş habitatlarda farklı zorlu koşullara uyum sağlamış aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli biyoaktif özelliklere sahip sekonder metabolitler yeni terapötik moleküllerin keşfi açısından büyük önem taşımaktadır (116, 117).

Tuz gölleri ve beşerî deniz tuzlu su göletleri, aşırı ortamlarda mikrobiyal çeşitlilik ve ekosistem işlevlerinin araştırılması için ilginç sistemlerdendir. Yapılan çalışmalar, bu tür ortamların oldukça verimli ve yeni mikroorganizmalar için değerli bir kaynak olduğunu göstermiştir (118-120).

Ülkemiz sınırları içinde yer alan henüz araştırılmamış aktinobakteriyel çeşitliliği ile Dünya'nın en büyük hipersalin gölleri arasında yer alan bir talasohalin habitatı olan (121) Tuz Gölü, Ankara'nın 120 km güneyinde bulunan iç kısımları aşırı tuzlu bir su kütlesidir. Su, Konya Ovası'nın Melendiz Çayı ve drenaj kanallarından Tuz Gölü'ne akmaktadır. Kışın yaklaşık 2 metre su derinliğine sahip olan göl, yazın kuruyup buharlaşma nedeniyle 30 cm'lik bir tuz tabakası oluşturmaktadır. Gölün toplam tuz konsantrasyonu %33 oranına kadar varmaktadır (122, 123).

Tuz Gölü'nün oluşumu Geç Kretase'de gerilim hareketleri ile başlamış, bunu Geç Eosen'de havzanın açık denizden izole edilmesiyle sonuçlanan sıkışma atakları izlemiştir (124). Tuz Gölü gibi tuzlu göller, yeni mikroorganizmaların değerli bir kaynağı olmuştur (120).

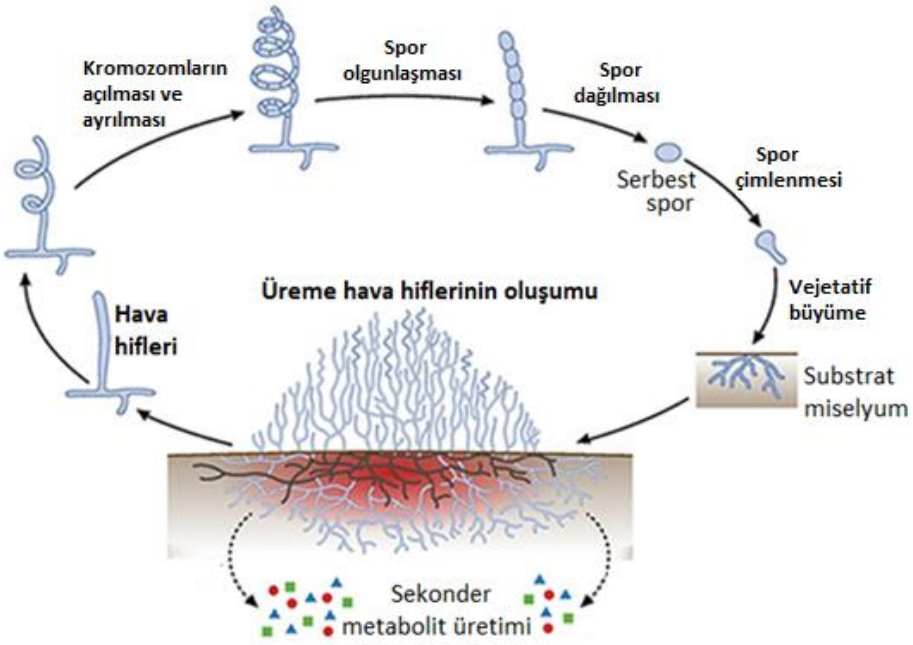
Tuz gölleri mL başına 10^7-10^8 CFU (colony forming units: koloni oluşturan birim) kadar halofilik bakteri içerebilmektedir. Halofilik mikroorganizmalar tarafından bakteriodopsinler, halorodopsinler, biyopolimerler, yüzey aktif maddeler, ekzopolisakkaritler, polihidroksialkanoatlar, tatlandırıcılar, antitümör etkili ilaç etken maddeleri gibi çok çeşitli biyoteknolojik ürün üretilmektedir (125, 126).

Gerçekleştirilen çalışmalarda tuz toleranslı ve alkalifilik bir suş olan *Streptomyces tanashiensis*'in antimikrobiyal potansiyeli belirlenmiş ve tuz toleranslı

diğer bir olan suş *S. microflavus*'tan yeni bir antiherpetik ajan olan fattivirasin izole edilmiştir (127, 128). Organik kirleticileri ayrıştırmak ve biyopolimerler, yüzey aktif maddeler üretmek için halofilik veya halotolerant mikroorganizmaların kullanımına gösterilen ilgi gittikçe artmaktadır (129, 130). Literatürden alınan bu son örnekler, geçmiş yıllar boyunca yeni terapötiklerin keşfi için aktinomisetlerin kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen, aktinomisetlerin ve *Streptomyces* cinslerinin yeni biyoaktif benzersiz moleküller için hala aktif bir araştırma alanı olmaya devam ettiği gerçeğini vurgulamaktadır (131).

Streptomycetaceae Familyası

Streptomycetaceae familyası, daha önce *Chania, Elytrosporangium, Kitasatoa, Kitasosporia, Actinosporangium* ve *Streptoverticillium* olarak sınıflandırılan suşları içeren *Streptomyces* cinsini içerir. Streptomycetaceae familyasının tüm üyeleri, besin tükenmesi görüldüğünde sporların oluştuğu, uzun bir bitkisel substrat miselyum ve hava hiflerini içeren karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir (Şekil 21). Spesifik menakinonlar içerirler, tanısal bir amino asit olan L,L-diaminopimelik asidi peptidoglikan yapılarına dahil ederler, ancak karakteristik bir şeker içermezler (132).



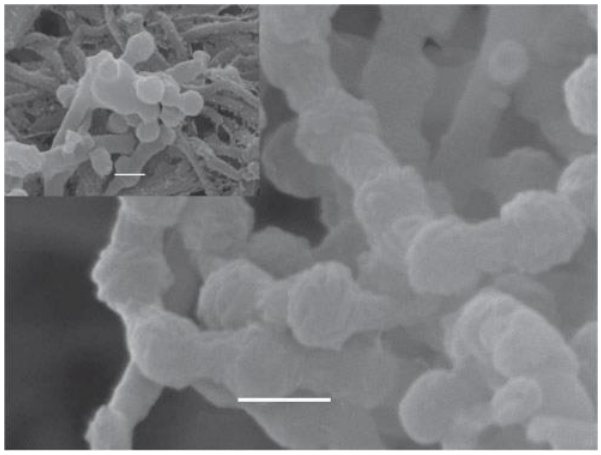
Şekil 21. Streptomycetaceae familyası üyelerinin hayat döngüsü.

Streptomyces Cinsi

Streptomyces cinsinin üyeleri, nispeten yüksek guanin ve sitozin içeriğine sahip aerobik ve Gram boyama pozitif aktinomisetlerdir (133). Filamentöz özellik göstermektedirler. Bu cinsin üyeleri yaşam döngülerinde morfolojik farklılaşmalar yaşarlar. Mikoorganizmanın gelişim gösterdiği ortama gömülü vejetatif miselyum ve pigment oluşumundan kaynaklı renkli, çok sayıda spor zinicirli havasal miselyum oluştururlar. Spor halinde bulunurken ortam ve besin şartları uygun olduğunda çimlenir ve vejetatif miselyumu meydana getirirler. Bu oluşum sırasında meydana gelen morfolojik değişimler pigmentler ve antibiyotikler gibi sekonder metabolitlerin de üretilmesine yol açmaktadır (134, 135).

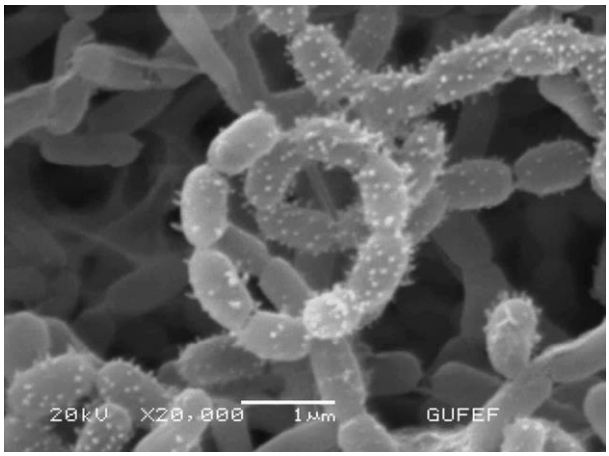
Çoğunlukla çürükçül olan *Streptomyces*'lerin birkaç türü insanlar ve hayvanlarda, birkaçı da bitkilerde patojen özellik göstermektedir. Cinsin bir diğer benzersiz özelliği ise cinse ait türler gerçekleştirilen araştırmalarla sayılarını durmaksızın artmasıdır. 1997'ye dek bildirilmiş 464 tür ile 45 alttür (136) bulunurken 2002'de Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu (DSMZ)'nda kayıtlı *Streptomyces* türleri 650'den fazla sayıdadır (137).

Streptomyces iconiensis: *S. iconiensis* Konya Tuz Gölü'nden toplanan bir sediment örneğinden izole edilmiştir. Kahverengimsi-gri substrat miselyuma ve siğil yüzeyli sporların açık uçlarının farklılaşarak oluşturduğu koyu grimsi kahverengi hava hiflerine sahiptir. Gram pozitif, aerobik, hareketsiz, asit içermeyen, alkol hızlı bir aktinomisettir. Elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 22'de verilmiştir (138).



Şekil 22. 28 °C'de, 21 gün inkübasyonu sonunda Modifiye Bennett Agar üzerinde büyütülen *S. iconiensis* suşunun hücrelerinin taranan elektron mikrografı. Bar, 1 µm'yi ifade etmektedir (138).

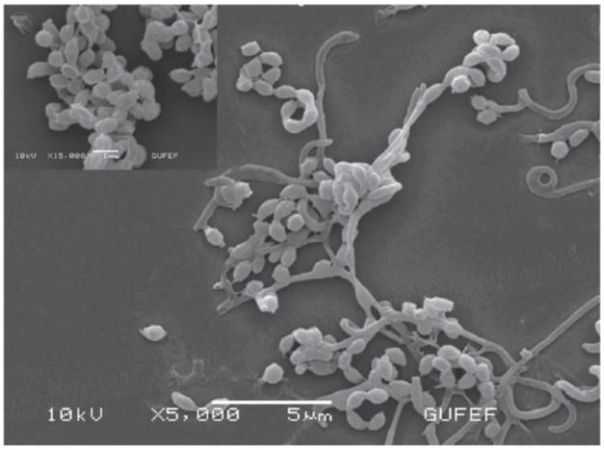
Streptomyces seymenliensis: *S. seymenliensis,* Ankara ili sınırlarında Seymenli Tuz Gölü'nden toplanan sediment örneklerinden izole edilmiştir. Dikenli yüzeyli sporları farklılaşarak spiral zincirlerine, bu zincirler dallanark substrat miselyumu ve hava hifleri oluşturmaktadır. Aerobik, asit içermeyen, alkol hızlı, Gram boyama pozitif, hareketsizdir. Mikroorganizmaya ait elektron mikroskobu fotoğrafı Şekil 23'te gösterilmiştir (139).



Şekil 23. 28 °C'de ISP-4 ortamında 14 günlük inkübasyon ile *S. seymenliensis* mikroorganizmasının elektron mikrografı. Bar, 1 µm'yi belirtmektedir (139).

Streptomyces ovatisporus: *S. ovatisporus*, Ağustos 2010 tarihinde Karadeniz'in Samsun ili açıklarından, 42 m deniz derinliğinden alınan bir tortu

örneğinden izole edilmiştir (örnekleme sahasının koordinatları 41˚ 19.201’ N, 036˚ 25.489 157’ E). Aerobik, asit içermeyen, alkol hızlı, hareketsiz, Gram pozitiftir. Mikroorganizmanın elektron mikroskobu altındaki fotoğrafı Şekil 24’te gösterilmektedir (140).



Şekil 24. 28 ° C'de ISP-4 besi yerinde 14 gün inkübe edilen *S. ovatisporus* mikroorganizmasının görünümü. Bar, 5 µm’dir (140).

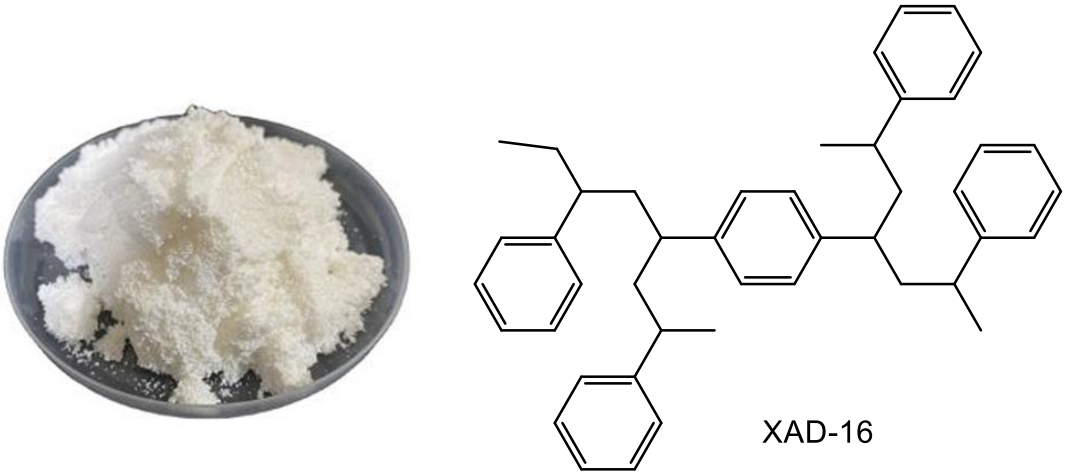
AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI

Ekstraksiyon

Mikroorganizmaların ürettikleri metabolitlerin ekstraksiyonu, diğer organizmalardan (bitki, alg) elde edilen metabolitlerin ekstraksiyonunda olduğu gibi sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile gerçekleştirilebilmesine rağmen, besi yeri ortamının içerdiği pek çok organik molekül göz önüne alındığında besi yeri kimyasallarının çözücüye geçmesini engellemek için reçine kullanımı tercih edilir. Reçinenin seçimine, adsorpsiyon, desorpsiyon kapasiteleri, adsorblanacak bileşiklerin molekül ağırlıkları ve bağlama özelliklerinin değerlendirilmesi ile karar verilir. Genel olarak reçinenin bağlama kapasitesini etkileyen üç parametre vardır: Dipol momenti, gözenek boyutu ve yüzey alanı. Adsorbe edilecek malzeme gözeneklerden adsorbe edici yüzeye geçebilmelidir. Eşit gözenek boyutuna sahip adsorbanlar için, daha büyük bir yüzey alanı, çözünen madde için daha yüksek kapasiteye sahiptir. Yüzey alanı ile gözenek boyutu arasında ters bir ilişki vardır: gözenek boyutu ne kadar küçükse yüzey alanı o kadar büyük olur.

Polar olmayan XAD reçineleri genellikle organik maddelerin sulu sistemlerden ve polar çözücülerden adsobsiyonu için kullanılır. Absorblanacak molekülün molekül ağırlığına göre; nispeten düşük moleküler ağırlıktaki bileşikler için XAD-4, küçük ila orta molekül ağırlıklı bileşikler için XAD-16, nispeten büyük molekül ağırlıklı organik bileşiklerler için X-1180 reçinelerinin kullanılması önerilmektedir.

XAD-16 reçinesi: AmberLite™ XAD-16 Polimerik Adsorban, beyaz çözünmeyen boncuklar olarak görünmektedir. Adsorpsiyon özelliklerini makro gözenekli yapısından (hem sürekli bir polimer fazı hem de sürekli bir gözenek fazı içerir), yüksek yüzey alanından ve yüzeyinin aromatik yapısından alan iyonik olmayan, hidrofobik, çapraz bağlı bir polimerdir (Şekil 25). Bu reçine, antibiyotiklerin, suda çözünür steroidlerin, enzimlerin, amino asitlerin ve proteinlerin geri kazanılması ve saflaştırılması ile fenol gibi polar olmayan bileşiklerin polar çözücülerden uzaklaştırılması uygulamalarında kullanılabilmektedir.



Şekil 25. AmberLite™ XAD™16N reçinesinin görünümü ve molekül yapısı.

Kromatografik Yöntemler

Bitkisel pigmentler gibi maddeleri renklerine göre ayırma işlemi ile kullanılmaya başlanan kromatografik teknikler, zamanla gelişerek oldukça geniş bir uygulama alanı kazanmıştır. Özellikle yüksek duyarlılığı, yüksek devir hızı, kantitatif bir yöntem olarak kullanımı başta olmak üzere birçok üstün özelliğe sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ile pek çok doğal ürün saflaştırabilmektedir.

Kromatografik yöntemler, bir karışımdaki moleküllerin özelliklerindeki farklılıklarına (adsorpsiyon, partisyon, afinite ve moleküler ağırlıklar gibi) göre ayırmak için kullanır. Kromatografinin birçok türü vardır ve her birinin etkinliği ayrılacak molekülün doğasına bağlıdır (141).

Etkili mekanizmaya göre kromatografik yöntemler altı genel mekanizmaya ayrılabilmektedir.

a. Normal faz kromatografisi: Normal fazlı kromatografide, durağan (sabit) faz, polar iyonik olmayan fonksiyonel grupların (hidroksil, nitro, siyano (nitril) veya amino) kimyasal olarak bağlı olduğu silika veya silika gibi bir polar adsorbandır. Bu fazlar orta derecede polardır ve yüzey daha düzgündür, bu da daha iyi elüsyon profilleri sağlar. Bu mod için mobil faz, çözücü kuvvetini ve seçiciliğini kontrol etmek için metilen klorür gibi daha polar bir değiştiricinin eklendiği hekzan gibi polar olmayan bir çözücüden oluşur.

b. Ters faz kromatografisi: Tüm kromatografik ayrımlarının %70'inden fazlası, polar olmayan bir durağan faz ve bir polar mobil faz kullanan ters faz modunda gerçekleştirilir. Oktadesil (C_{18}) zinciri [-$(CH_2)_{17}CH_3$] ile oktadesilsilil bağlı fazlar, oktil (C_8) veya bütil (C_4) gibi daha kısa zincirli hidrokarbonlar veya fenil grupları da kullanılır. Ters fazlı kromatografide, genellikle metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran ile karıştırılmış su gibi polar mobil fazlar kullanır. Çözünenler, polar olmayan durağan faz ile hidrofobik etkileşimler nedeniyle tutulur ve artan hidrofobiklik (azalan polarite) sırasına göre ayrıştırılır. Mobil fazın polar bileşeninin arttırılması, çözünen madde tutulmasını arttırır, mobil fazın organik çözücü içeriğinin arttırılması ise tutmayı azaltır.

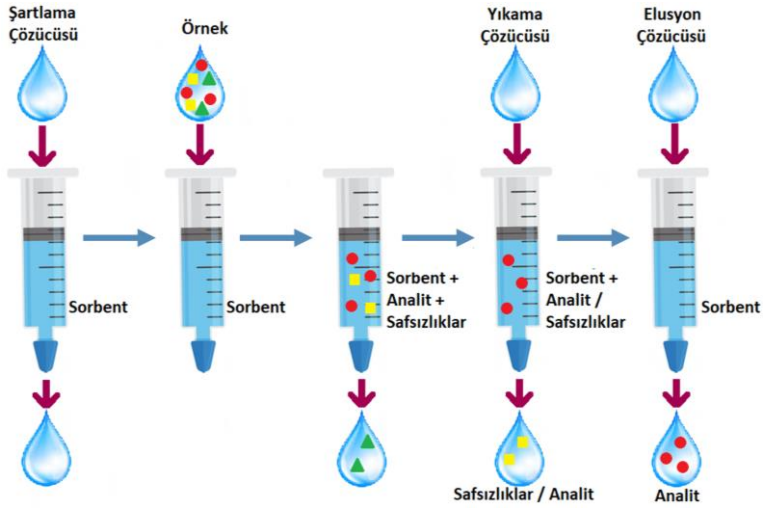
c. Hidrofobik etkileşim kromatografisi: Özel matrislerin kullanılmasıyla, hidrofobik etkileşim kromatografisi, denatüre olmayan proteinler de dahil olmak üzere birçok bileşiği daha az sert elüentler ve koşullarla ayırma imkânı sunar. Teknik, yüksek tuzlu (ancak denatüre edici olmayan) koşullar altında hidrofobik kolon matrisi ile etkileşime girebilen numune moleküllerinin yüzeyinde veya yakınında hidrofobik grupların varlığına dayanır. Numune daha sonra elüentin tuz konsantrasyonu düşürülerek ayrıştırılır.

d. İyon değişimi kromatografisi: İyon değişimi kromatografisi için genellikle sülfonatlı veya aminli poli(stiren-divinilbenzen) gibi işlevselleştirilmiş organik reçineler kullanılmaktadır. İyon değiştirme kromatografisindeki mobil faz genellikle sulu bir tampondur ve çözünen maddenin tutulması, mobil faz iyonik kuvveti veya pH değiştirilerek kontrol edilir.

e. Partisyon kromatografisi: Partisyon (boyut dışlama kromatografisi) çözünenleri yalnızca boyut bazında ayrıştırır ve önce daha büyük moleküller ayrıştırılır.

f. Afinite kromatografisi: Afinite kromatografisi, saflaştırılacak moleküllerin, kromatografik bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilmiş başka moleküler türlerle seçici ancak geri dönüşümlü bir etkileşim oluşturabilmesi ilkesine dayanır. Hemen hemen her malzeme uygun şekilde aktive edilmiş bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilebilse de ana ligandlar, lektinler, nükleik asitler ve boyalar dahil olmak üzere proteinlerdir. Afinite kromatografisi glikoproteinleri saflaştırmak için kullanılmaktadır (142).

Katı faz ekstraksiyonu (SPE): SPE prensip olarak, çözünenlerin iki faz arasında bölünmesini içeren sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzemektedir. Ancak sıvı-sıvı ekstraksiyonunda olduğu gibi birbiri ile karışmayan iki sıvı faz yerine SPE'de, numune matrisi veya analitleri içeren çözücü olmak üzere bir sıvı faz ve bir katı faz (sorbent) arasında ayrım sağlanır. Bu teknik ile, katı bir sorbent üzerinde absorpsiyon ve ekstraksiyondan sonra ekstraktın toplanması yoluyla çözeltiden analitlerin saflaştırılmasını sağlar. Genel prosedür (Şekil 26), SPE katı fazına bir çözelti yüklemek, istenmeyen bileşenleri yıkayarak uzaklaştırmak ve ardından istenen analitleri uygun bir çözücü ile bir toplama tüpüne aktarmaktır (143).



Şekil 26. SPE prosedürü.

SPE'nin çok yönlülüğü, bu tekniğin saflaştırma, eser zenginleştirme, tuzdan arındırma, türevlendirme ve sınıf ayırma gibi birçok amaç için kullanılmasına izin verir. Bir SPE ekstraksiyonunun en iyi şekilde gerçekleşmesi için uygun sorbent seçimi, uygun sorbent seçimi de sorbent ve ilgili analit arasındaki etkileşim mekanizma ya da mekanizmalarına bağlıdır. Seçim hem çözünen maddenin hem de sorbentin hidrofobik, polar ve iyonojenik özellikleri dikkate alınarak yapılır. SPE'deki en yaygın etkileşim mekanizmaları, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları, dipol-dipol kuvvetleri ve katyon-anyon etkileşimleridir. SPE üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir:

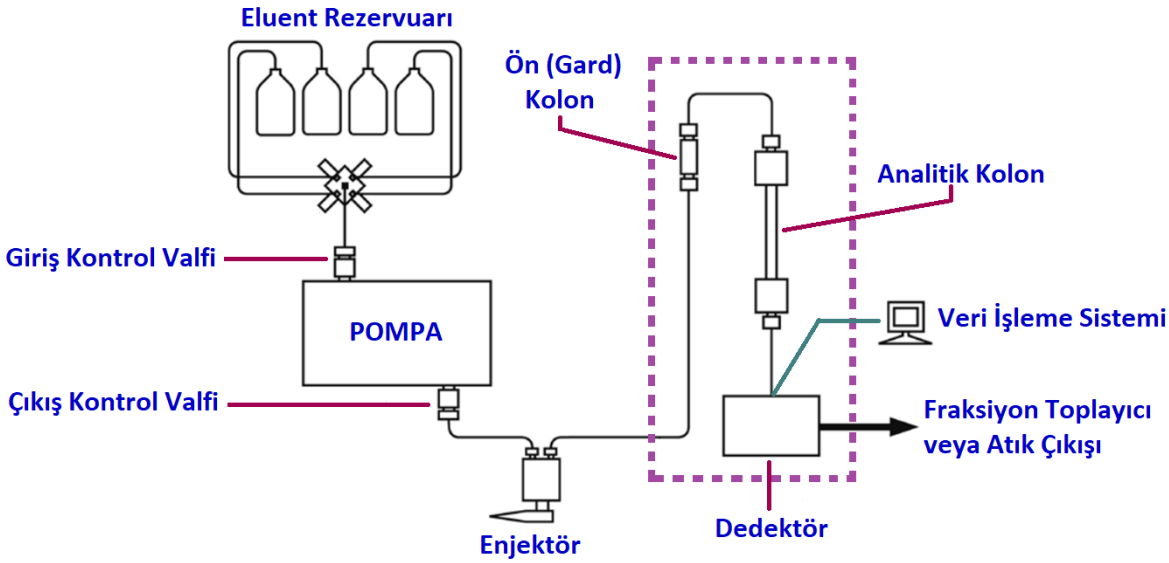
– Polar veya orta derecede polar numune matrisi ve polar olmayan analitten oluşan ters faz,
– Polar analit ile bir orta ila polar olmayan matristen oluşan normal faz,
– Bir çözelti içindeki bileşikler için iyon değiştirici (144).

HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi): HPLC, karışımda bulunan veya numune çözeltisinde çözünen ilgili bileşenleri ayırmak için kullanılan bir sıvı kromatografi şeklidir. Hareketli fazın yüksek basınç altında dolgulu kolondan pompalanmasına dayanır. HPLC'de temel prensip, hareketli fazın yüksek basınç uygulanarak sıkıştırılmış bir kolondan pompalanmasına dayanmaktadır.

HPLC, mobil faz olarak kullanılabilen bir sıvı içinde çözünürlüğe sahip herhangi bir bileşiğin analizine uygulanabilmektedir. Çoğunlukla analitik bir teknik

olarak kullanılmasına rağmen, HPLC ayrıca preperatif uygulamalarda da kullanılabilir. HPLC'nin geleneksel düşük basınçlı kolon sıvı kromatografisine göre birçok avantajı vardır: Hız (birçok analiz 30 dakika veya daha kısa sürede gerçekleştirilebilir), çeşitli sabit fazlar, geliştirilmiş çözünürlük, daha yüksek hassasiyet (farklı dedektörler kullanılabilir), kolay numune geri kazanımı (142).

Temel bir HPLC sisteminin şematik diyagramı Şekil 27'de gösterilmektedir. Bu sistemin ana bileşenleri pompa, enjektör, kolon, dedektör ve veri sisteminden oluşmaktadır. Şekil 27'de görüldüğü gibi kolon ya da kolonlar ve dedektör, yüksek sıcaklıkta çalışma için kesikli çizgi ile gösterildiği gibi termostatlı olabilmektedir.



Şekil 27. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için bir sistemin şematik gösterimi.

Pompa: HPLC pompası, mobil fazı sistem üzerinden, tipik olarak belirli bir akış hızında, kontrollü, doğru ve kesin bir şekilde iletir. Halihazırda HPLC'de kullanılan pompaların çoğu, pistonlu pompalardır.

Enjektör: Enjektörün rolü, kolona giriş için numuneyi akış halindeki mobil faza yerleştirmektir.

Kolon: Bir HPLC kolonu genellikle, enjektör ve dedektör sistemleri arasında bağlanmasına izin veren sonlandırıcılara sahip paslanmaz çelik borulardan yapılır. Kolonlar ayrıca cam, erimiş silika, titanyum ve polieter eter keton reçinesinden de yapılabilir.

Dedektör: Bir dedektör, HPLC kolonundan çıkış yapan karışımdaki numune konsantrasyonu değişikliklerini elektrik sinyallerine çevirir. Çözünen maddelerin spektrokimyasal, elektrokimyasal veya diğer özellikleri, her birinin avantajları ve dezavantajları olan çeşitli araçlarla ölçülebilir. Hangisinin kullanılacağının seçimi, çözünen madde tipine ve konsantrasyonuna ve detektör hassasiyetine, lineer aralığa ve kullanılacak solvent ve elüsyon modu ile uyumluluğa bağlıdır. Maliyet de dedektör seçimini etkileyebilir.

Veri İşleme Sistemleri: Bir dedektör, HPLC kolon çıkış maddesinin bileşimi ile ilgili bir elektronik sinyal sağladığından, kromatogramı görüntülemek ve entegre etmek HPLC sisteminin son elemanının işlevidir. Bir HPLC analizi ilerledikçe, HPLC detektörlerinden gelen veriler sayısallaştırılır ve bir bilgisayarın sabit sürücüsüne kaydedilir.

YAPI AÇIKLAMA METODLARI

Ultraviyole Spektroskopisi (UV)

UV spektroskopisinin prensibi moleküllerin sahip olduğu konjugasyonlar nedeniyle yapıların tanımlamasıdır. UV (veya yakın UV), elektromanyetik spektrumun 200-400 nm aralığını kapsar. Kısa dalga boyuna sahip UV ışınlar elektronların enerji seviyelerinde değişmeye neden olur. Homoatom ya da heteroatom tek bağlar, çift bağlar ve üçlü bağlar içeren moleküller spektrum üzerinde tek bir band şeklinde absorbans sinyali oluşturur. UV spektroskopisi, kantitatif analiz yapmak için uygundur. Molar soğurma katsayısı, Lambert Beer yasasına göre absorbans değerinin molar derişim ve ışığın katettiği yolun çarpımına bölünerek bulunur.

İnfrared (Kızılötesi) Spektroskopisi (IR)

Bir materyaldeki kimyasal bağlara bağlı olan kızılötesi radyasyonun emilimi infrared spektroskopisi ile ölçülür. Molekülün içerdiği fonksiyonel gruplar, fonksiyonel grubun içinde bulunduğu molekülün geri kalanının yapısından bağımsız olarak, IR radyasyonunu aynı frekans aralığında absorbe etme eğilimindedir. Bir molekülün yapısı ile IR radyasyonunu absorbe ettiği frekanslar arasındaki bu korelasyon, moleküllerin yapısının tanımlanmasına ve molekülün yapısal veya kimyasal değişikliklerinin takip edilmesine olanak tanır (145).

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

NMR spektroskopisi, manyetik alanda bir çekirdek tarafından radyo frekansı enerjisinin emilmesi ve salınması anlamına gelir. Hem yüke hem de dönüşe sahip olmak, bazı çekirdeklere (^{1}H, ^{13}C ve ^{15}N gibi tek sayıda proton ve nötron içeren) manyetik moment adı verilen manyetik özellik kazandırır. Dış manyetik alanda, dönen bir çekirdeğin manyetik momenti, alanın yönü etrafında yönelim gösterecektir. Elektromanyetik radyasyon enerjisi çekirdekler tarafından daha düşük enerjili dönme durumunda absorblanır ve onları daha düşük enerjili dönme durumuna yükseltir.

Çekirdeğin içinde bulunduğu elektron bulutu tarafından diyamanyetik korunması, komşu anizotropik koruma etkileri, molekül içi elektrik alan etkileri ve C-C bağ kaymaları çekirdeklerin manyetik alanda etkileşimlerinde farklılıklar görülmesine yol açar. Bu farklılıklara kimyasal kayma denir. Kimyasal kayma değerleri ve sinyal şiddetleri grafik haline getirilerek NMR spektrumu elde edilir (146).

Tek Boyutlu (1D) NMR Spektroskopisi

1. Proton NMR (^{1}H-NMR) spektroskopisi: Bir molekülün kaç adet protona sahip olduğu, molekülün içerdiği protonların türü ve molekülün protonlarına komşu gruplar ile ilgili bilgiler sağlayan spektroskopi ^{1}H-NMR spektroskopisidir. Kimyasal kayma değerleri 0-14 ppm aralığında gözlenmektedir (147).

2. Karbon NMR (^{13}C-NMR) spektroskopisi: ^{13}C çekirdeğinin dış manyetik alanın etkisiyle oluşturduğu sinyaller sonucu molekül karbonları hakkında bilgiler sağlayan spektroskopidir. Sinyaller, 0-250 ppm aralığında gözlenmektedir (148).

3. APT (Doğrudan Bağlı Proton Testi, Attached Proton Test) ölçümleri: Karbon atomuna bağlı proton sayısının ve karbon türünün belirlenebildiği ölçümler APT ölçümleridir. Uyarılan ve rezonansa uğrayan molekülün karbon atomlarına ait ^{13}C sinyalleri, karbon atomlarına bağlı olan hidrojenlerin sayısı nedeniyle farklı davranış sergilemektedir.

APT ölçümlerinde diğer tekniklerden farklı olarak kuaterner karbon sinyalleri gözlenmektedir. APT ölçümlerinde, kuaterner ve metilen karbonları (CH_2) negatif fazlanırken, metin (CH) ve metil (CH_3) karbonları pozitif fazlanır (149).

İki Boyutlu (2D) NMR Spektroskopisi

2D NMR spektroskopisinin 1971'de tanıtımından itibaren tek boyutlu ^{1}H-NMR spektroskopisi ve ^{13}C-NMR spektroskopisinin yeterli olmadığı karmaşık numunelerde yapısal ayrıntılar üzerinde kullanılmaktadır (150).

1D NMR spektrumlarında, sinyal şiddetini ifade eden parametre üzerinde değişiklik yapıldığında kimyasal kayma sabiti ve etkileşme sabiti değerlerinde değişiklik gözlenmezken, 2D NMR spektrumlarında kimyasal kayma sabiti veya etkileşme sabiti üçüncü eksen olarak üç boyutlu spektrumda yer almaktadır (151). Bununla birlikte, 2D NMR, spektroskopisi sadece yapı aydınlatmada değil, aynı zamanda çalışılan kimyasalların konsantrasyonunun nicelendirilmesinde de kullanılmaktadır.

1. COSY (Çapraz-Pik İlişkilendirme) tekniği: 2D homonükleer NMR metodlarından biri olan COSY metodunda x ve y eksenlerinde ^{1}H-NMR spektrumları yer almaktadır. COSY tekniği ile molekülün iki protonu arasında herhangi bir etkileşmenin varlığı belirlenir. Protonlar arasındaki etkileşme çift rezonans deneyleri ile saptanır. Molekülün içerdiği tüm protonlara çift rezonans deneyi yapılarak protonların kimyasal kayma değerleri, bu kimyasal kayma değerlerinin farkı ile de molekül yapısı aydınlatılır (152).

2. HMQC (Heteronükleer Çoklu Kuantum Korelasyon) ve HSQC (Heteronükleer Tekli Kuantum Korelasyon) tekniği: HMQC (Heteronükleer çoklu kuantum korelasyon spektroskopisi) spektrumları, ^{1}H ve ^{13}C çekirdekleri arasındaki etkileşimi veren bir metottur. Karbon atomlarının bağlı olduğu hidrojen atomlarıyla ilgili bilgi vermektedir.

HSQC (Heteronükleer Tekli Kuantum Korelasyon Spektroskopisi), tek bağ uzaklıktaki ^{1}H ve ^{13}C çekirdekleri arasındaki etkileşim hakkında bilgi veren metottur. Bu metotta görülen pikler birbirine bağlı atomlara ait kimyasal kayma değerleri birleştirilerek elde edilir.

HMQC tekniği, HSQC tekniği ile farklı bir yöntem kullanarak aynı spektrum vermektedir. HSQC tekniği daha büyük moleküller için daha kullanışlıdır (153).

3. HMBC (Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyon Spektroskopisi) tekniği: HMBC (Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyon Spektroskopisi) spektrumları, iki veya

üç bağ uzaklıktaki ^{1}H ve ^{13}C çekirdekleri arasındaki etkileşimi gösteren bir metottur. Bu metotta bir bağ uzaklıktaki çekirdekler arasındaki etkileşimler hakkında bilgi sahibi olunamamaktadır. Dolaylı olarak molekülün karbon-karbon ilişkileri spektruma yansıtılmış olur. Bu metodun en önemli avantajı kuarterner karbon atomlarına ait bağlar hakkında bilgi sağlamasıdır (154).

4. NOESY (Nükleer Overhauser Etki Spektroskopisi) tekniği: NOESY (Nükleer Overhauser Etki Spektroskopisi) metodunda molekülün içerdiği tüm protonlar arasındaki pik şiddetinin arttırılması temel alınır. Bu amaçla tüm çekirdekler ışınlar ile rezonans haline getirilir. Rezonans halindeki bir çekirdek hem kendisine bağlı bulunan çekirdeklerin hem de kendisine komşu olan çekirdeklerin pik şiddetlerinde değişme meydana getirir (154).

NOESY, diğer yöntemlerde görülen doğrudan bağ etkileşimlerinden ziyade molekül içindeki boşluk içi etkileşimleri gösterir. Bu yöntem özellikle bir moleküldeki stereokimyasal ilişkileri belirlemek için kullanışlıdır (155).

Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisinin (MS) temel prensibi, uygun yöntemle moleküllerden iyonlar oluşturmak, kütle-yük oranlarına (*m/z*) göre oluşan bu iyonları birbirinden ayırarak hem kalitatif hem de kantitatif olarak saptamaktır. Bir kütle spektrometresi, yüksek vakum koşulları altında çalışan bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü ve bir detektörden oluşur.

Moleküllerin iyonlaştırılmasında termal yol, elektrik alan veya enerjik elektronların, enerjik nötr atomlar ve ağır küme iyonları ve yahut fotonların çarpıştırılması kullanılabilir. Elde edilen iyonlar tek iyonize atomlar, iyon kümeleri, moleküller veya bunların fragmanları halinde olabilir. Kütle spektrumu, sinyal yoğunluğunun *m/z*'ye karşı iki boyutlu ifadesidir.

NMR ve IR spektroskopisi gibi diğer spektroskopik yöntemler numune geri kazanımına izin verirken, kütle spektrometrisinde analit tüketimden dolayı numune geri kazanımı olmaz. Ancak nanogram düzeyi kadar düşük miktarda numune tüketimi ile analitik bilgi sağlayabilen MS çoğunlukla tercih edilen bir yöntemdir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- Hekzan (Tekkim)
- Etil asetat (Tekkim)
- Diklorometan (DCM) (Tekkim)
- Metanol (Tekkim)
- Etanol (Tekkim)
- Bütanol (Sigma)
- Silikajel Hazır Plakalar (Merck ITK Silica gel 60 F254)
- C-18 Dolgu Maddesi (Kromasil)
- Aseton (Tekkim)
- HPLC Grade Metanol (İsolab)
- Dötero kloroform ($CDCl_3$) (Merck)
- Dötero metanol (CD_3OD) (Merck)
- Dötero dimetilsülfoksit (DMSO-d_6) (Merck)
- HPLC Kolonu (Kromasil C-18 (21.2x250mm))
- Maya Ekstresi (Merck)
- Malt Ekstresi (Merck)
- Glukoz Monohidrat (Tekkim)
- Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) (Sigma)
- Agar (Sigma)

- Yulaf (CityFarm)
- Demir sülfat penta hidrat ($FeSO_4x7H_2O$) (Sigma)
- Mangan klorür tetra hidrat ($MnCl_2x4H_2O$) (Sigma)
- Çinko sülfat hepta hidrat ($ZnSO_4x7H_2O$) (Sigma)
- Kobalt klorür hekza hidrat ($CoCl_2x6H_2O$) (Sigma)
- Sodyum molibdat ($NaMoO_4x2H_2O$) (Sigma)
- Bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2x2H_2O$) (Sigma)
- Borik asit (H_3BO_3) (Sigma)
- Çözünebilir Nişasta (Sigma)
- Susuz Dipotasyum Fosfat (K_2PO_4) (Sigma)
- Magnezyum sülfat penta hidrat ($MgSO_4x7H_2O$) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
- Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) (Sigma)
- L-asparajin (Sigma)
- Gliserol (İsolab)
- Kazein (Sigma)
- Potasyum nitrat (KNO_3) (Sigma)
- Et ekstresi (Beef Ekstract) (Merck)
- N-Z-Amin (Sigma)
- Reçine (Amberlite XAD-16N) (Sigma)

KULLANILAN CİHAZLAR

- Otolav (Daihan Scientific, Maxtrelie 47 Dikey Tip)
- Pastör Fırını (Daihan Scientific)
- Sınıf II Mikrobiyolojik Emniyet Kabini (Alpina)
- Ultra Saf Su Cihazı (Purelab Option-Q, Elga DV 25)
- Densitometre (BioSan DEN-1 McFarland Densitometer)
- Vorteks (Velp Scientifica, $2x^3$)
- Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Velp Scientifica, Arex Ceraltop)
- Hassas Terazi (Shimadzu, ATX324)
- Otomatik pipet (Eppendorf)
- İnkübatör (Wisd Daihan Scientific, WIR-250)

- Isıtmalı Çalkalamalı İnkübatör (Daihan Scientific, ThermoStable IS-20R)
- Isıtıcı Tabla (Daihan Scientific HPLP-C-P)
- Etüv (Daihan Scientific Wisd, WON-105)
- Santrifüj (Gyrozen 1248)
- Sonikatör (Daihan Scientific, Wisd, WUC-D06H)
- UV Lamba (UVP, UVGL-58)
- Dönerbuharlaştırıcı (Heidolph, Hei-VAP HL Adv/Pre EU)
- Vakum Kontrollü Dönerbuharlaştırıcı (Buchi V-700 R-3)
- Liyofilizatör (HyperCOOL, Cooling Trap HC3110)
- Binoküler Işık Mikroskobu (Leica)
- Buzdolabı (Vestel, Eko NF480)
- Derin Dondurucu (Arçelik, 2081 NFD)
- Sepet ısıtıcı (Isotex 98-I-B)
- Preperatif HPLC (Waters; Autosampler 2707, Binary HLPC Pump 1525, Photodiode Array Detector 2998, Fraction Collector III)
- Soğutucu Banyo (Daihan Scientific, Wisd, WiseCircu WCR)
- NMR (Bruker 500 MHz ve Varian 400 MHz)
- FT-IR Spektrofotometre (PerkinElmer)

KULLANILAN BESİ YERLERİ

ISP-2 (International *Streptomyces* Project (Uluslararası *Streptomyces* Projesi) 2) Besi Yeri

Maya ekstresi	4.0 g
Malt ekstresi	10.0 g
Dekstroz	4.0 g
Agar	20.0 g
Distile su	1000.0 mL

ISP-3 (Yulaf Agar) Besi Yeri

Yulaf	20.0 g
Agar	18.0 g
Distile su	1000.0 mL
Eser Tuz Çözeltisi	1 mL

$FeSO_4$ 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	100.0 mL

ISP-4 (İnorganik Tuz Nişasta) Besi Yeri

Çözelti I:	
Nişasta	10.0 g
Distile su	500.0 mL
Çözelti II:	
$CaCO_3$	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	1.0 g
NaCl	1.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
Distile su	500.0 mL
Eser Tuz Çözeltisi	1.0 mL

ISP-5 (Gliserol-Asparajin) Besi Yeri

L-asparajin	1.0 g
Gliserol	10.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
Distile su	1000.0 mL
Eser Tuz Çözeltisi	1.0 mL
Agar	20.0 g

ISP-7 (Tirozin) Besi Yeri

L-asparajin	1.0 g
L-tirozin	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0.5 g
NaCl	0.5 g
Agar	20.0 g
Gliserol	15.0 g

Distile su	1000.0 mL
Eser Tuz Çözeltisi	1.0 mL
$FeSO_4$ x 7 H_2O	1.360 g
$CuCl_2$ x 2 H_2O	0.027 g
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0.040 g
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0.025 g
$ZnCl_2$	0.020 g
Borik asit	2.850 g
$MnCl_2$ X 4 H_2O	1.800 g
$C_4H_4Na_2O_6$	1.770 g
Distile su	1000.0 mL

Starch-Casein Agar

Nisaşta	10.0 g
Kazein	0.3 g
KNO_3	2.0 g
K_2HPO_4	2.0 g
NaCl	2.0 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0.05 g
$CaCO_3$	0.02 g
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0.01 g
Agar	18.0 g
Distile su	1000.0 mL

Modifiye Bennet's Agar

Et ekstresi	1.0 g
Gliserol	10.0 g
N-Z-Amin	2.0 g
Maya ekstresi	1.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000.0 mL

N-Z-Amin Besi Yeri (DSMZ Medium 554)

Glukoz	10.0 g

Nişasta	20.0 g
Maya ekstresi	5.0 g
N-Z-Amin	5.0 g
$CaCO_3$	1.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000.0 mL

GYM (Glukoz-Yeast (Maya)-Malt) Besi Yeri (DSMZ Medium 65)

Glukoz	4.0 g
Maya ekstresi	4.0 g
Malt ekstresi	10.0 g
$CaCO_3$	2.0 g
Agar	12.0 g
Distile su	1000.0 mL

KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

Streptomyces iconiensis

Çalışmada kullanılan DSM 42109 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

Streptomyces seymenliensis

Çalışmada kullanılan DSM 42117 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

Streptomyces ovatisporus

Çalışmada kullanılan DSM 42103 kodlu mikroorganizma DSMZ firmasından satın alınmıştır.

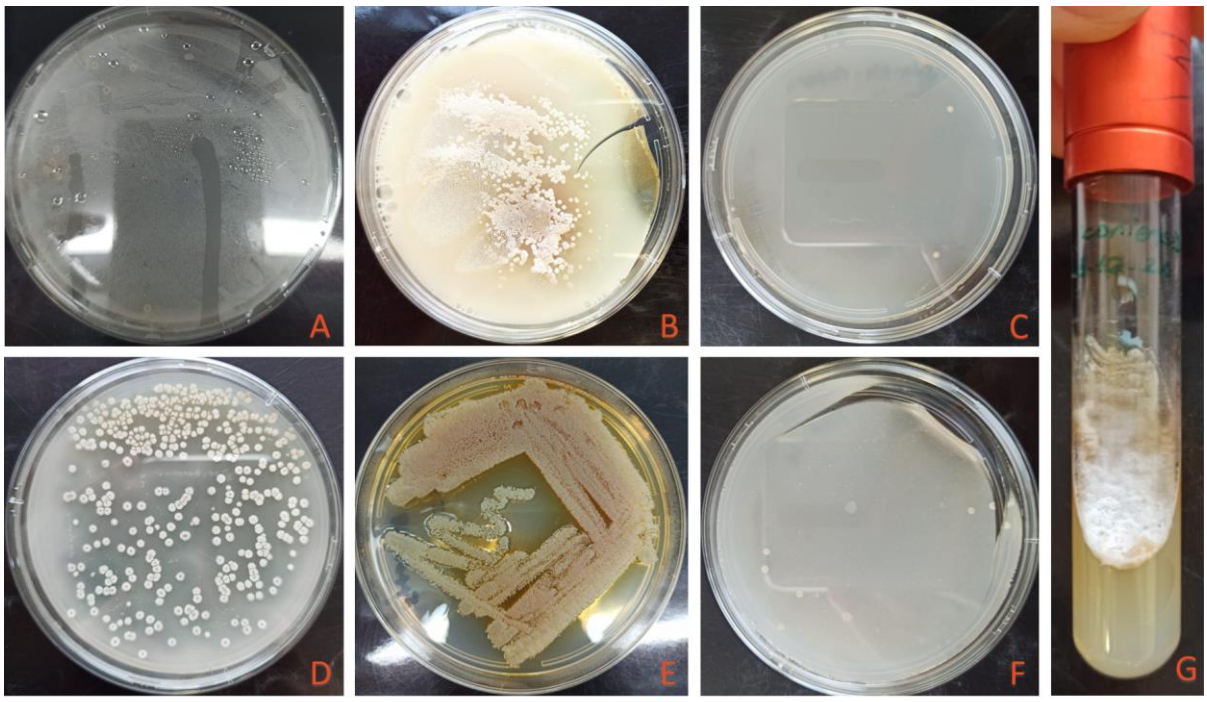
ÇÖZÜCÜLER

Ekstraksiyon ve fraksiyonlandırma işlemlerinde kullanılan organik çözücüler (n-hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol) destile edildikten sonra kullanıldı. Preperatif HPLC'de HPLC kalitesinde çözücüler kullanıldı. Besi yerlerinin hazırlanmasında distile su, diğer tüm işlemlerde ve preperatif HPLC'de ultra saf su kullanılmıştır. Spektral analizlerde ise dötero metanol (CD_3OD), dötero kloroform ($CDCl_3$) ve dötero dimetilsülfoksit (DMSO-d_6) kullanıldı.

Streptomyces iconiensis İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Mikroorganizmaların Küçük Ölçekte Üretimi

Liyofilize formda temin edilen *Streptomyces iconiensis,* içinde 50 mL sıvı ISP-2 besi yeri bulunan erlene boşaltıldı. Erlen 28 ˚C'de 120 rpm çalkalama hızında 6 gün inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizma inkübasyon süresi sonunda katı ISP2, ISP-3, ISP4, ISP-5, Starch-Casein Agar, N-Z-Amin ve Modifiye Bennett's Agar besi yerlerine pasajlandı. Pasaj yapılan tüm katı besi yerleri 28°C'de inkübasyona bırakıldı. 3 günlük inkübasyon sonunda ekim yapılan tüm besi yerlerinde üreme gözlendi. Mikroorganizmanın farklı besi yerlerinde (A-E) görüntüsü Şekil 28'de gösterilmiştir. Katıya pasaj sonucu en iyi üreme N-Z-Amin ve ISP-2 besi yerlerinde gözlenmiştir.

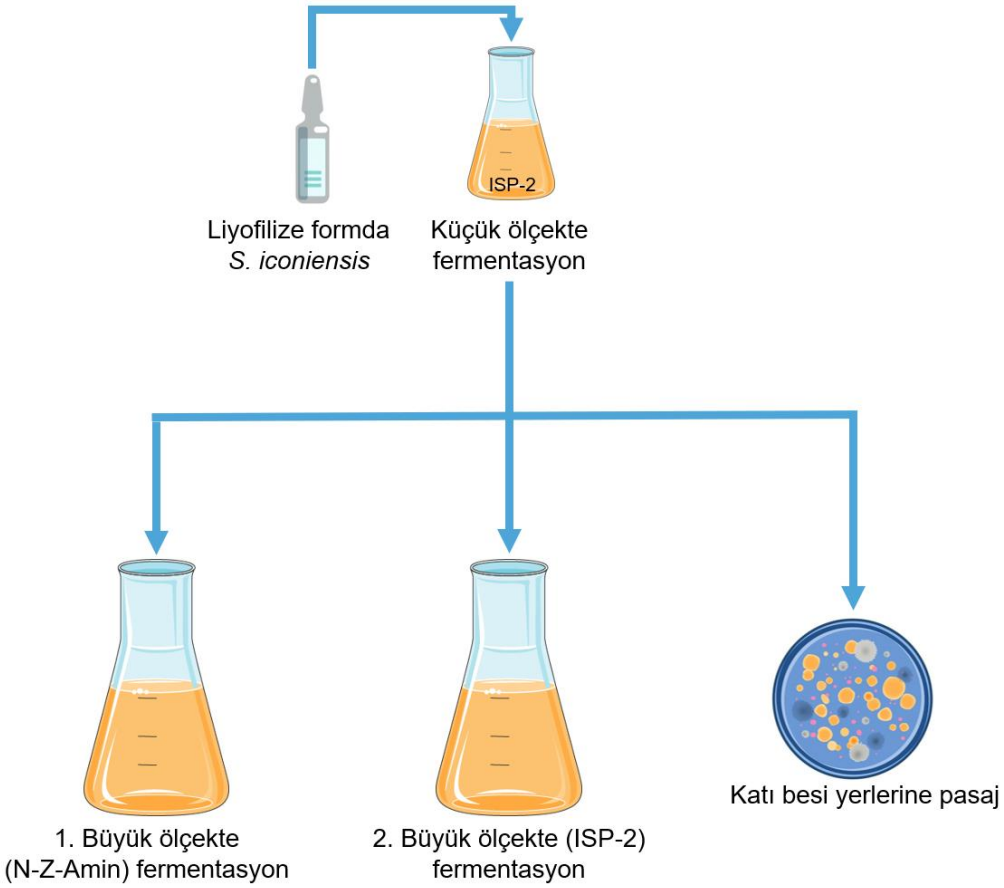


Şekil 28. Farklı besi yerlerinde *S. iconiensis*'in görüntüsü (A. ISP-3, B. N-Z-Amin, C. ISP-4, D. Starch-Casein Agar, E. Modifiye Bennet's Agar, F. ISP-5, G. ISP-2.).

S. iconiensis'in gerek sıvı gerekse katı besi yerlerinde hızlı üremesi mikroorganizmanın fermentasyonu için doğrudan büyük ölçekte çalışmaya olanak tanımıştır.

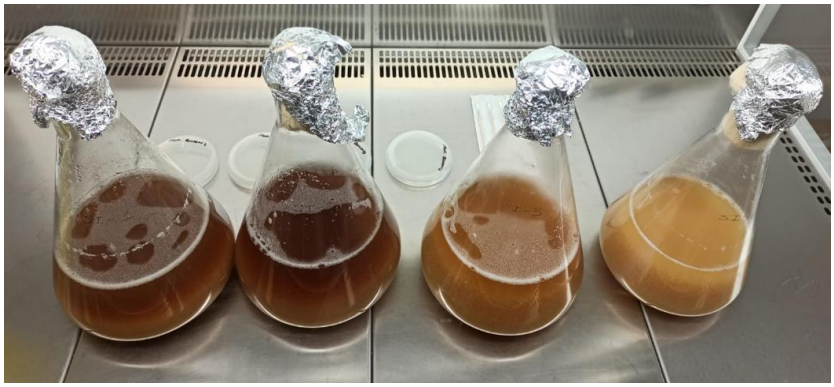
Büyük Ölçekte Fermentasyon

Yoğun bir şekilde üreme gözlenen katı ISP-2 besi yerindeki mikroorganizma kolonilerinden birkaç öze dolusu alınarak, dört adet 2 L sıvı ISP-2 besi yerlerine ekim yapıldı. Katı N-Z-Amin besi yerinde üreyen mikroorganizma kolonileri ise üç adet 2 L ve bir adet 1.5 L sıvı N-Z-Amin besi yerlerine pasajlandı. *S. iconiensis* mikroorganizmasının üretim basamakları Şekil 29'da gösterilmiştir.



Şekil 29. *S. iconiensis* mikroorganizmasının üretim basamakları.

N-Z-Amin besi yerleri 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızında 9 gün inkübe edildi. Sekonder metabolitlerin biyosentezi için ISP-2 besi yerleri 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızında 15 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda *S. iconiensis* N-Z-Amin besi yerleri Şekil 30'da, ISP-2 besi yerleri Şekil 31'de gösterilmiştir.

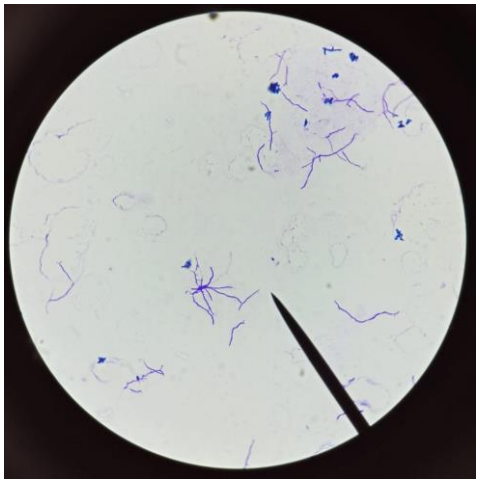


Şekil 30. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. iconiensis*'in N-Z-Amin besi yerlerinin görüntüsü.



Şekil 31. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. iconiensis*'in ISP-2 besi yerlerinin görüntüsü.

İnkübasyon sürelerinin sonunda besi yerlerinin kontamine olup olmadığının belirlenmesi amacıyla her bir besi yerinden katı besi yerlerine (Starch-Casein Agar ve Modifiye Bennett's Agar) ekim yapıldı. 2 günlük inkübasyonun sonunda ekim yapılan besi yerlerinde kontaminasyon olmadığı görüldü. Besi yerlerininde kontaminasyon olasılığı ışık mikroskobu altında metil mavisi ile boyanarak incelendi (Şekil 32).



Şekil 32. *S. iconiensis* mikroorganizmasının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (x100).

Fermentasyonları sonlandırılan besi yerleri birbirine karıştırılmadan, N-Z-Amin besi yerleri 5000 rpm'de 30 dk, ISP-2 besi yerleri 5000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüjlendi. Hücre kalıntıları dekante edilerek uzaklaştırıldı.

Ekstraksiyon

Hücre kalıntılarından tamamen ayrılan besi yerlerine 15 g/L olacak şekilde XAD-16 reçinesi eklendi ve 1 gece, 120 rpm hızında çalkalanarak bekletildi. Bekleme süresi sonunda reçineler süzülerek besi yerlerinden ayrıldı. N-Z-Amin besi yerlerine ise ikinci kez XAD-16 reçinesi (15 g/L) eklendi ve 1 gece, 120 rpm çalkalama hızında çalkalayarak bekletildikten sonra süzülerek ayrıldı. Sekonder metabolitleri absorblayan reçine önce ultra saf su ile iki kez yıkandı. Daha sonra reçineler 500 mL diklorometan:metanol (1:1) içeren çözücüde çalkalanarak 6 saat bekletildi. Reçine çözücüsünden süzülerek ayrıldı. İşlem iki kez tekrarlandı. Reçineler son kez metanol ile çalkalanarak 6 saat boyunca bekletildi. Reçinenin süzülerek ayrılması sağlandı. Çözücüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu.

ISP-2 besi yerinden elde edilen ekstre 2.02 g, N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ekstre 10.3 g olarak tartıldı. Elde edilen ekstreler, sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutularak fraksiyonlandırıldı.

Fraksiyonlandırma

N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ham ekstre (10.3 g) su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan : 65.5 mg
DCM : 830.0 mg
EtOAc : 182.5 mg
BuOH : 3.6 g

Elde edilen fraksiyonlara HPLC uygulamasından önce daha iyi ayrım yapılması amacıyla katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulanarak tekrar fraksiyonlandırılmıştır.

DCM ekstresi, içinde 12 mL C-18 dolgu maddesi (Kromasil) bulunan, 60 mL hacimli kolon kullanılarak her biri 65 mL olan çözücü sistemleri geçirilerek %50 metanol:su (SPE-1), %75 metanol:su (SPE-2) ve %100 metanol (SPE-3) olmak üzere üç fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanıp çözücüleri uçurulduktan sonra SPE-1 fazı 593.4 mg, SPE-2 fazı 139.1 mg ve SPE-3 fazı 103.7 mg olarak belirlendi.

Etil asetat ekstresi, 8 mL C-18 dolgu maddesi kullanılarak 20 mL hacimli kolon ile 30'ar mL %25 metanol:su (SPE-1), %50 metanol:su (SPE-2), %75 metanol:su (SPE-3) ve %100 metanole (SPE-4) geçirilerek dört fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanıp çözücüleri uçurulduktan sonra SPE-1 fazı 105.8 mg, SPE-2 fazı 8.4 mg, SPE-3 fazı 15.3 mg ve SPE-4 fazı 21.2 mg olarak tartıldı.

Bütanol ekstresi, içinde 16 mL C-18 dolgu maddesi bulunan, 60 mL hacimli kolon ile 100'er mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanıp uçurulduktan sonra fazların miktarları sırasıyla 900 mg, 241.8 mg, 323.6 mg, 209.8 mg ve 123.2 mg olarak tartıldı.

ISP-2 besi yerinden elde edilen ham ekstre de aynı şekilde su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, diklorometan, etil asetat ve bütanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan : 8.4 mg

DCM : 60.5 mg

EtOAc : 50.0 mg

BuOH : 1.3 g

DCM ekstresi 0.5 mL C-18 dolgu maddesi içeren 2 mL hacimli kolon kullanılarak her biri 5 mL olan çözücü sistemleri geçirilerek %25 metanol:su (SPE-1), %50 metanol:su (SPE-2), %75 metanol:su (SPE-3) ve %100 metanol (SPE-4) olmak üzere dört fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplandıktan sonra uçuruldu. SPE-1 fazı 28.4 mg, SPE-2 fazı 8.2 mg, SPE-3 fazı 8.1 mg ve SPE-4 fazı 5.2 mg olarak belirlendi.

Etil asetat ekstresi 0.5 mL C-18 dolgu maddesi ve 2 mL hacimli kolon ile her biri 5 mL hacminde olan çözücü sistemleri geçirilerek %25 metanol:su (SPE-1), %50 metanol:su (SPE-2), %75 metanol:su (SPE-3) ve %100 metanol (SPE-4) olmak üzere dört fraksiyona ayrıldı. Toplanan fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldığında SPE-1 fazı 13.3 mg, SPE-2 fazı 4.2 mg, SPE-3 fazı 7.8 mg ve SPE-4 fazı 6.1 mg olarak tartıldı.

Bütanol ekstresi, içinde 8 mL C-18 dolgu maddesi bulunan 20 mL hacimli kolon ile 40'ar mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Toplanan fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldığında SPE-1 fazı 130.2 mg, SPE-2 fazı 44.8 mg, SPE-3 fazı 82.9 mg, SPE-4 fazı 99.6 mg ve SPE-5 fazı 122.3 mg olarak belirlendi.

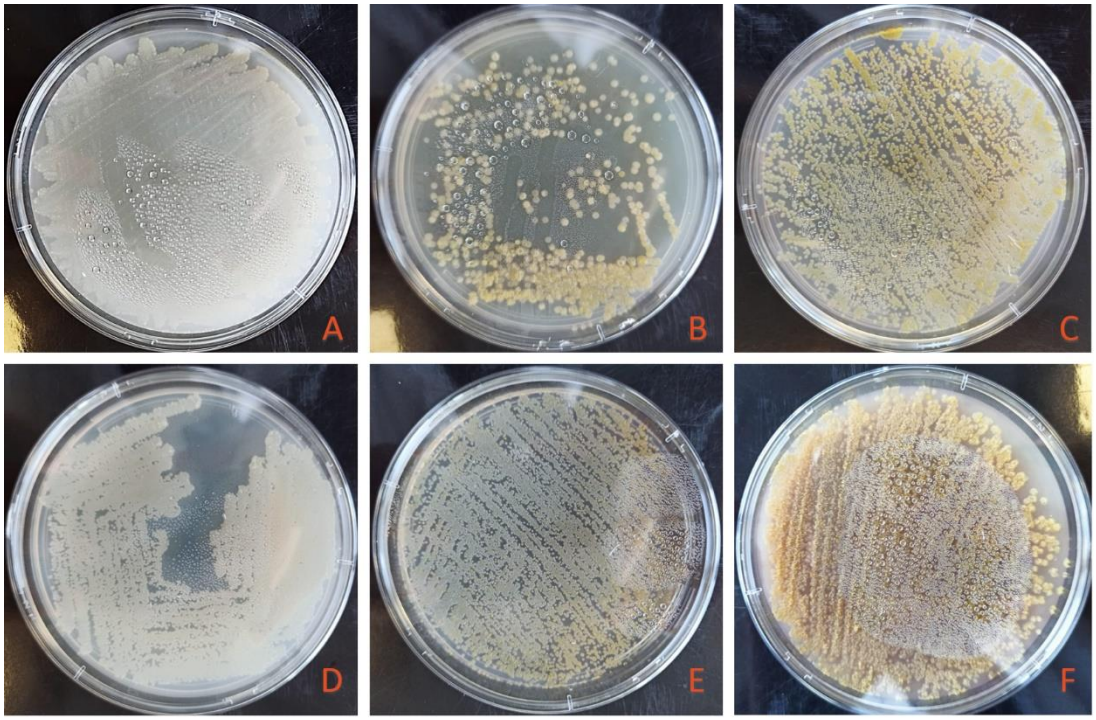
Elde edilen ekstreye ait fazlar izolasyon için preperatif HPLC'ye tabi tutuldu.

Streptomyces seymenliensis İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Mikroorganizmaların Küçük ve Orta Ölçekte Çoğaltılması

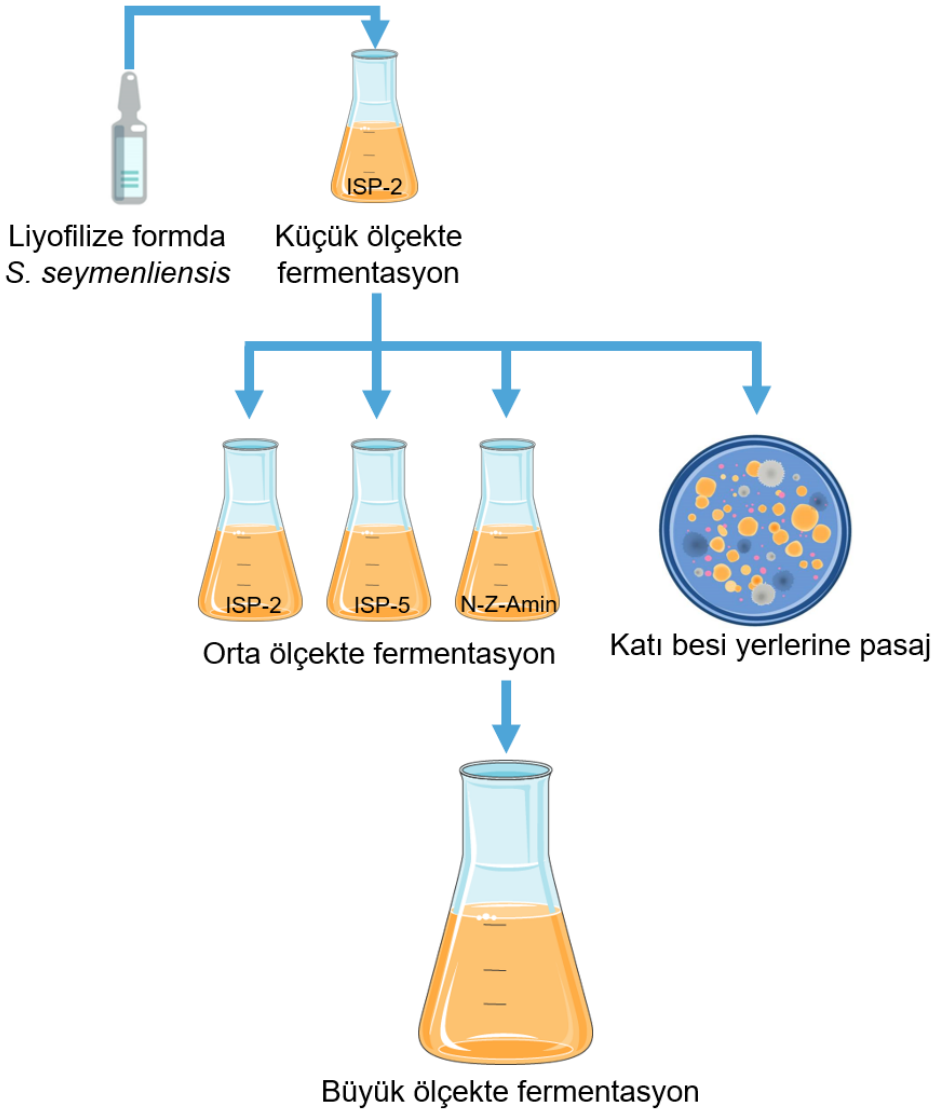
Liyofilize formdaki *S. seymenliensis* sıvı 50 mL ISP-2 besi yerine boşaltıldı. Besi yeri 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. 8 günlük inkübasyon süresinin sonunda ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, Starch-Casein Agar, Modifiye Bennett's Agar ve N-Z-Amin katı besi yerlerine pasajlandı. Besi yerleri 28°C'de inkübasyona bırakıldı. 4 günlük inkübasyon süresinin sonunda ekim yapılan

tüm besi yerlerinde üreme gözlendi. Mikroorganizmanın altı farklı (A-F) katı besi yerlerindeki görüntüsü Şekil 33'te gösterilmiştir.



Şekil 33. Farklı besi yerlerinde *S. seymenliensis*'in görüntüsü (A. ISP-4, B. ISP-2, C. ISP-5, D. Starch-Casein Agar, E. Modifiye Bennett's Agar, F. N-Z-Amin).

Büyük ölçekte üretimin hangi besi yerinde gerçekleştirileceğinin kararı için mikroorganizmaların daha fazla sayıda ve fazla miktarda metabolit ürettiği besi yerlerini tespit etmek için orta ölçekte fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmanın üretim basamakları Şekil 34'te özetlenmiştir.



Şekil 34. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının üretim basamakları.

Orta ölçekli üretim için, katı besi yerlerinde en fazla üremenin görüldüğü üç besi yeri seçilerek bu besi yerlerinden 50'şer mL sıvı besi yerleri hazırlanmıştır. Bu besi yerleri ISP-2, ISP-5 ve N-Z-Amin besi yerleridir. Hazırlanan üç besi yerine öze dolusu ekim yapılarak 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızında 4 gün inkübe edilmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. ***S. seymenliensis*** **mikroorganizmasının orta ölçekli farklı besi yerlerinde görünümü (sağdan sola doğru N-Z-Amin, ISP-2 ve ISP-5).**

İnkübasyon süresinin sonunda besi yerleri 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası besi yerleri dekante edilerek hücre kalıntılarından ayrılmıştır. Besi yerlerine 15 g/L XAD-16 reçinesi eklenerek 20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda reçineler besi yerlerinden süzülerek alınmıştır. Reçineler su ile yıkandıktan sonra 40'ar mL diklorometan:metanol (1:1) içeren çözücüde 120 rpm hızında çalkalanarak 6 saat süre ile bekletildi. İşlem üç kez tekrarlandı. Reçinelerden ayrılan çözücüler dönerbuharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen ekstrelerin miktarları ISP-2 ekstresi 3.8 mg, ISP-5 ekstresi 3.6 mg ve N-Z-Amin ekstresi 6.1 mg olarak belirlenmiştir.

Elde edilen ekstrelerin HPLC Analizi

Orta ölçekteki ISP-2, ISP-5 ve N-Z-Amin besi yerlerinden elde edilen ekstrelerden alınan numuneler HPLC analizi ile değerlendirildi.

N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin içeriği HPLC profili alınarak belirlenmiştir (Şekil 36). Kullanılan gradient metot şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

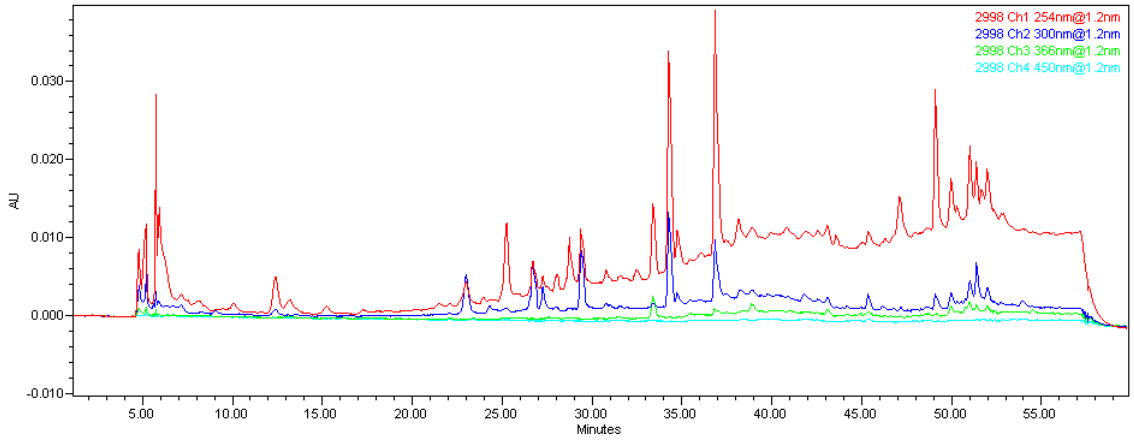
0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-45 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-50 dk %100 MeOH,

50-52 dk %70 su-%30 MeOH sistemine dönüş,

52-60 dk %70 su-%30 MeOH çözücü sistemi ile çalışılmıştır.



Şekil 36. N-Z-Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı.

ISP-2 besi yerinden elde edilen ekstrenin içeriği HPLC profili alınarak belirlenmiştir (Şekil 37). Kullanılan metot şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

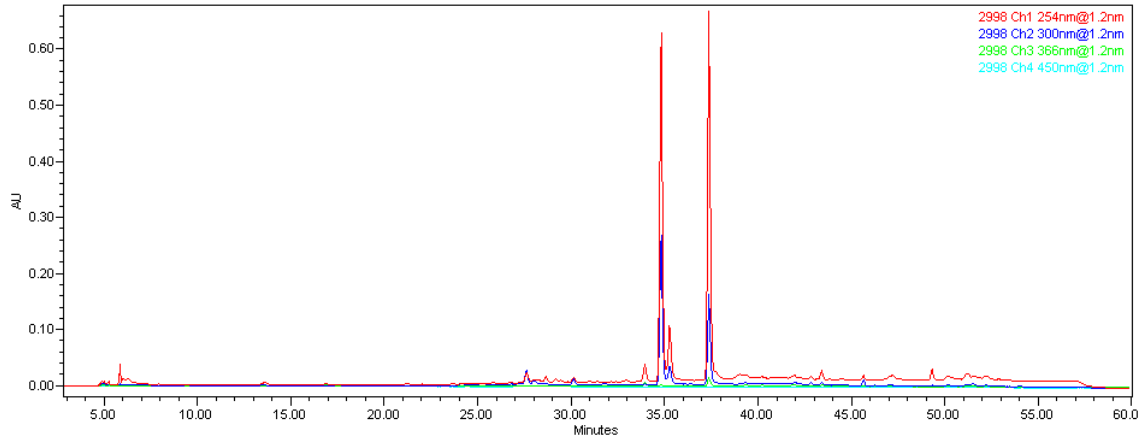
0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-45 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-50 dk %100 MeOH,

50-52 dk %70 su-%30 MeOH sistemine dönüş,

52-60 dk %70 su-%30 MeOH çözücü sistemi ile çalışılmıştır.



Şekil 37. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı.

ISP-5 besi yerinden elde edilen ekstrenin içeriği HPLC profili alınarak belirlenmiştir (Şekil 38). Kullanılan gradient metot şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

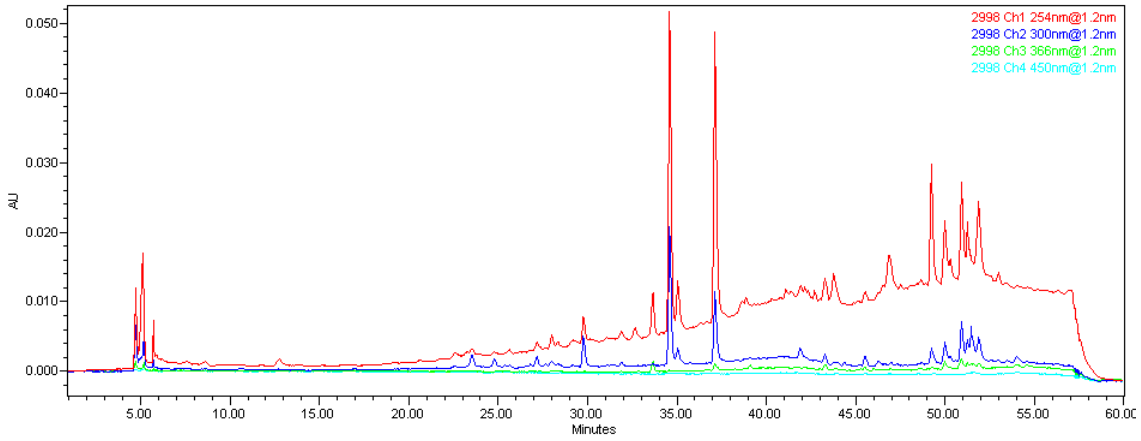
0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-45 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-50 dk %100 MeOH,

50-52 dk %70 su-%30 MeOH sistemine dönüş,

52-60 dk %70 su-%30 MeOH çözücü sistemi ile çalışılmıştır.



Şekil 38. ISP-5 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı.

Elde edilen ekstrelerin HPLC kromatogramları karşılaştırıldığında (Şekil 36, 37 ve 38), N-Z-Amin, ISP-2 ve ISP-5 besi yerinde çoğalan mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolit içeriklerinin ortak olduğu ancak en fazla sekonder metabolit çeşitliliğinin N-Z-Amin besi yerinde olduğu görülmektedir. Ayrıca orta ölçekli fermentasyon ile N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin (6.1 mg), ISP-2 besi yerinden elde edilen ekstreye (3.8 mg) ve ISP-5 besi yerinden elde edilen ekstreye (3.6 mg) göre miktarca fazla olması izolasyon çalışmaları için kolaylık sağlayacağından büyük ölçekte fermentasyon için N-Z-Amin besi yerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Büyük Ölçekte Fermentasyon

Katı N-Z-Amin besi yerlerinde çoğaltılan mikroorganizmalar 2 L besi yeri içeren yedi adet 3 L'lik ve 1.5 L besi yeri içeren bir adet 2 L'lik erlene ekim yapılmıştır. Ekim yapılan erlenler, çalkalamalı inkübatörde 14 gün boyunca 28°C'de 120 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda (Şekil 39) her bir besi yerinden katı besi yerlerine (Starch-Casein Agar) pasaj yapılarak kontaminasyon olmadığı görülmüştür. Fermentasyonu sonlandırılan besi yerleri 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi ile dibe çöken hücre kalıntıları dekantasyon ile ayrılmıştır.



Şekil 39. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. seymenliensis*'in üretildiği ISP-2 besi yerlerinin görüntüsü.

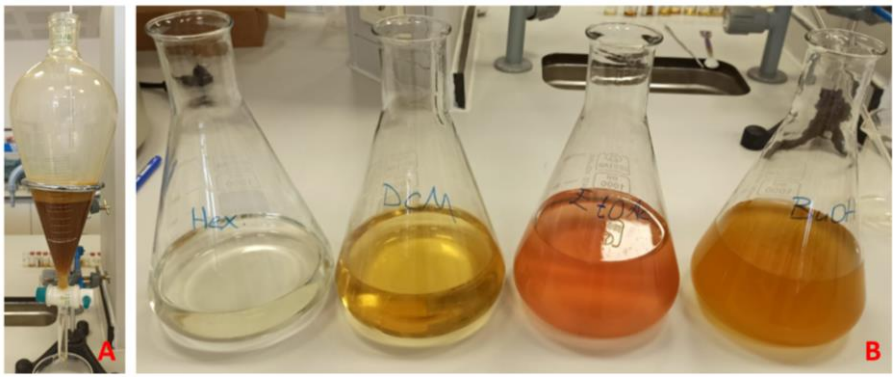
Ekstraksiyon

Hücresel kalıntılardan ayrılan besi yerleri içerisine 15 g/L XAD-16 reçinesi eklenerek bir gece 120 rpm hızında çalkalanarak reçinenin sekonder metabolitleri absorblaması için bekletildi. Süre sonunda reçineler besi yerlerinden süzülerek ayrıldı ve ardından ultra saf su ile iki kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra reçineler 1000 mL diklorometan:metanol (1:1) içeren çözücü karışımına konulmuştur. Çözücü karışımı içerisinde reçineler 120 rpm hızında çalkalanarak 6 saat bekletildi.

Ortama eklenen ilk reçinenin süzülüp ortamdan ayrılmasından sonra ortama 15 g/L XAD-16 ikinci kez konularak işlemler tekrarlandı. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen çözücüler döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Toplamda 7.94 g ekstre elde edildi.

Fraksiyonlandırma

S. seymenliensis mikroorganizmasının N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ham ekstre su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile dört fraksiyona ayrılmıştır. İşlem ve ayrılan fraksiyonlar Şekil 40'ta gösterilmiştir.



Şekil 40. *S. seymenliensis* ham ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fraksiyonlandırılması (A). *S. seymenliensis*'in soldan sağa doğru hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH fraksiyonları (B).

Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan : 384.5 mg
DCM : 1.62 g
EtOAc : 283.2 mg
BuOH : 1.77 g

Elde edilen fraksiyonlardan DCM, EtOAc ve BuOH fraksiyonlarına HPLC uygulamasından önce daha iyi ayrım yapılması amacıyla SPE uygulanmıştır.

DCM ekstresi, içinde 6 mL C-18 dolgu maddesi bulunan 10 mL hacimli kolon kullanılarak her biri 35 mL olan çözücü sistemleri geçirilerek %100 su (SPE-1), %75 su:metanol (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanol (SPE-5) olmak üzere beş fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanıp çözücüleri uzaklaştırıldı. SPE-1 fazı 1.13 g, SPE-2 fazı 140.5 mg, SPE-3 fazı 39.8 mg, SPE-4 fazı 56.6 mg ve SPE-5 fazı 69.7 mg olarak tartıldı.

EtOAc ekstresi, 2.5 mL C-18 dolgu maddesi ve 5 mL hacimli kolon ile 20'şer mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanıp çözücüleri uçurularak miktarları sırasıyla 170.6 mg, 21.1 mg, 19.6 mg, 17.6 mg ve 12.6 mg olarak belirlendi.

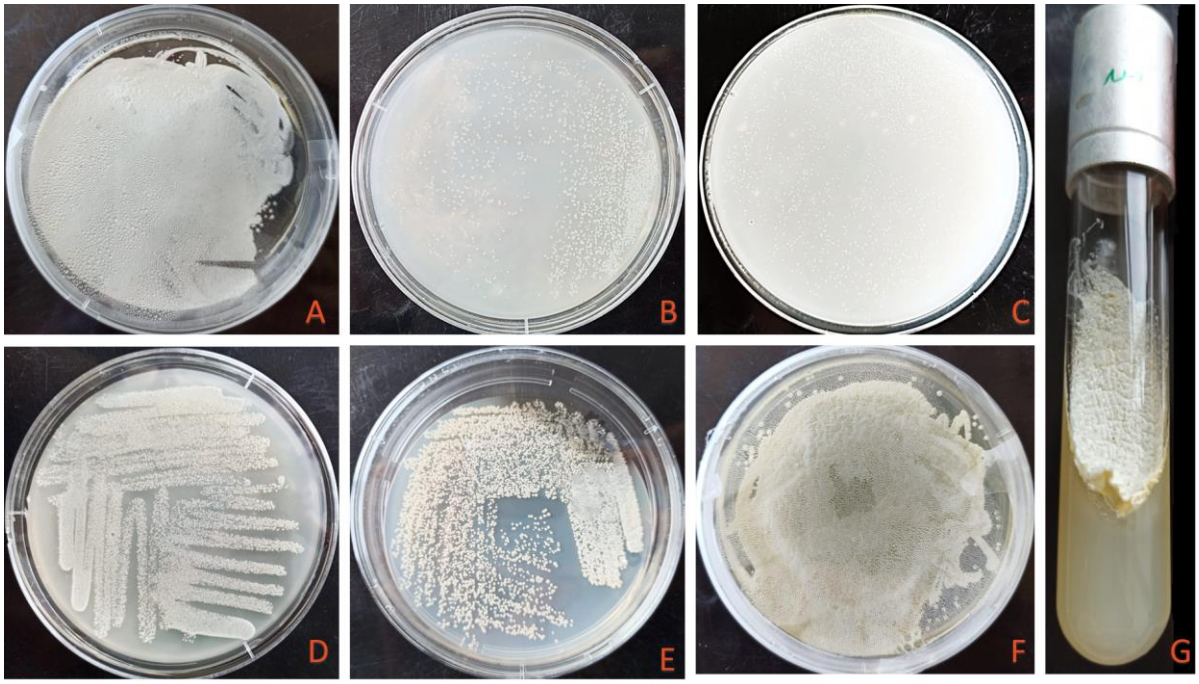
BuOH ekstresi, içinde 6.5 mL C-18 dolgu maddesi ve 10 mL hacimli kolon ile 30'ar mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Toplanan fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldı. SPE-1 fazı 1067.4 mg, SPE-2 fazı 91.1 mg, SPE-3 fazı 109.3 mg, SPE-4 fazı 65.7 mg ve SPE-5 fazı 99.9 mg olarak tartıldı.

Mikroorganizma fermentasyonu sonucu elde edilen ekstreye ait fazlar izolasyon için preperatif HPLC'ye tabi tutuldu.

Streptomyces ovatisporus İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Mikroorganizmaların Küçük ve Orta Ölçekte Çoğaltılması

Liyofilize formda temin edilen *S. ovatisporus* mikroorganizması 50 mL ISP-2 besi yerine ve N-Z-Amin besi yerine ekildi. Besi yerleri 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızıyla üç hafta boyunca inkübe edildi. 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda katı besi yerlerine (ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, Starch-Casein Agar, Modifiye Bennett's Agar; GYM Agar ve N-Z-Amin) pasajlandı. Ekim yapılan katı besiyerleri 28°C'de 10 gün boyunca inkübe edildi. Ekim yapılan tüm besi yerlerinde üreme gözlendi, ancak GYM Agar besi yerinde zayıf üreme gözlendi. Mikroorganizmanın katı besi yerlerindeki görüntüsü (A-F) Şekil 41'de gösterilmiştir.



Şekil 41. Farklı besi yerlerinde *S. ovatisporus*'un görüntüsü (A. ISP-5, B. ISP-4, C. ISP-3, D. Starch-Casein Agar, E. Modifiye Bennett's Agar, F. ISP-2, G. N-Z-Amin).

Mikroorganizmanın orta ölçekli üretimi için 50 mL ISP-2 ve 50 mL N-Z-Amin besi yerlerine ekim yapıldı. Besi yerleri 28°C'de, 120 rpm çalkalama hızıyla 21 günlük inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda besi yerleri santrifüjlenip dekante edilerek hücresel kısımlarından ayrıldı. Besi yerlerine 15 g/mL XAD-16 reçinesi eklendip oda sıcaklığında 120 rpm hızında çalkalanarak bir gece boyunca bekletildi. Süre sonunda reçineler süzülerek besi yeri ortamından ayrıldı. Reçineler iki kez ultra saf su ile yıkandıktan sonra 200 mL 1:1 DCM:metanol ile oda sıcaklığında 120 rpm çalkalama hızında 6 saat bekletildi. Bekleme süresi sonunda reçineler süzülerek çözücü sistemlerinden ayrıldı. Reçineler ikinci kez 200 mL 1:1 DCM:metanol ile 6 saat boyunca ekstrakte edildi. Reçineler bekleme süresi sonunda süzülerek %100 metanol ile üçüncü ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Reçineler 6 saat boyunca metanol içerisinde bekletildikten sonra süzülürek çözücüden ayrıldı. Elde edilen çözücüler birleştirildi ve döner buharlaştırıcıda çözücülerinin buharlaşması sağlandı. Elde edilen ISP-2 ekstresi 65.0 mg, N-Z-Amin ekstresi 125.1 mg'dır.

Elde edilen ekstrelerin HPLC Analizi

Orta ölçekteki ISP-2 ve N-Z-Amin besi yerlerinden elde edilen ekstreler HPLC analizi ile değerlendirildi. N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ekstrenin içeriği HPLC profili alınarak belirlenmiştir (Şekil 42). Kullanılan gradient metot şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

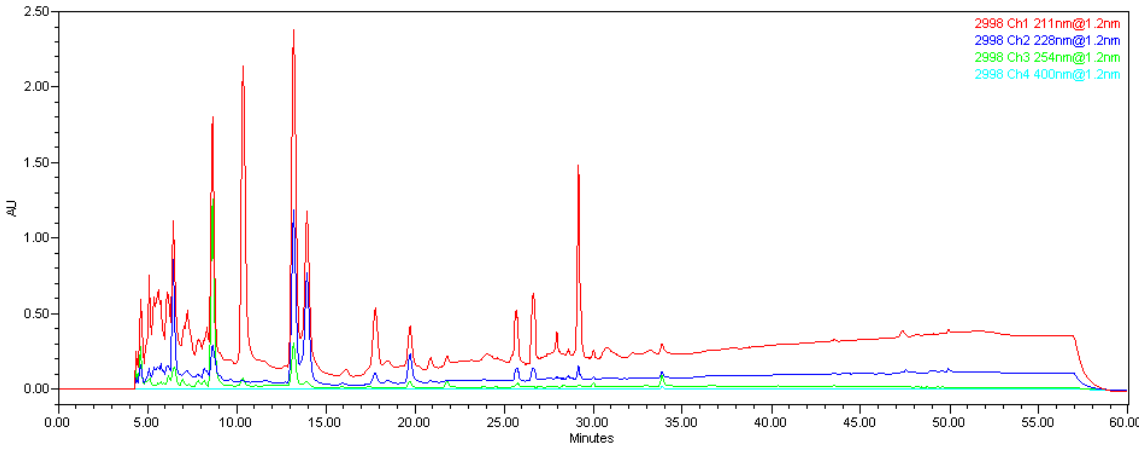
0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-45 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-50 dk %100 MeOH,

50-52 dk %70 su-%30 MeOH sistemine dönüş,

52-60 dk %70 su-%30 MeOH çözücü sistemi ile çalışılmıştır.



Şekil 42. N-Z-Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı.

ISP-2 besi yerinden elde edilen ekstrenin içeriği HPLC profili alınarak belirlenmiştir (Şekil 43). Kullanılan gradient metot şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

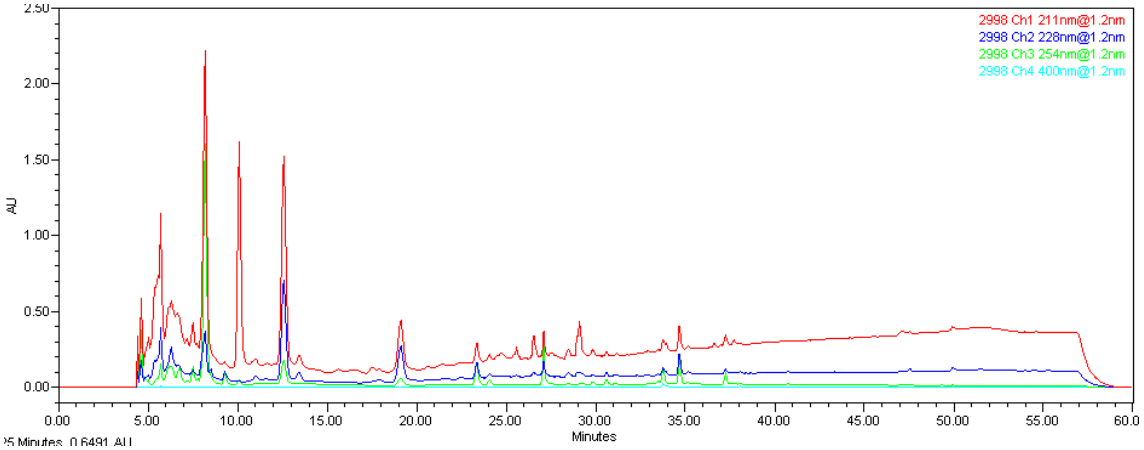
0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-45 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-50 dk %100 MeOH,

50-52 dk %70 su-%30 MeOH sistemine dönüş,

52-60 dk %70 su-%30 MeOH çözücü sistemi ile çalışılmıştır.

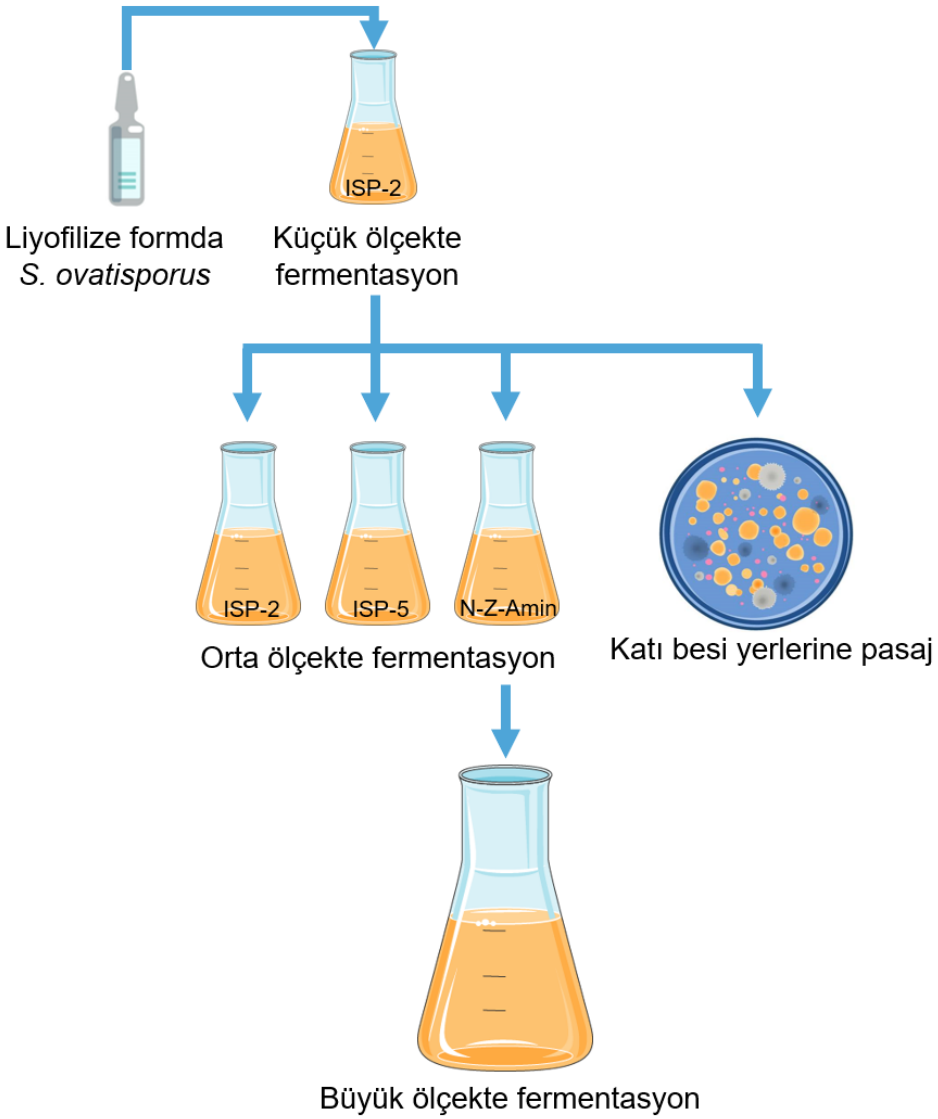


Şekil 43. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı.

Elde edilen ekstrelerin HPLC kromatogramları karşılaştırıldığında (Şekil 41, 42 ve 43), N-Z-Amin ve ISP-2 besi yerlerinde çoğalan mikroorganizmaların hemen hemen aynı sekonder metabolitleri ürettikleri, metabolitlerin miktarlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca orta ölçekli fermentasyon ile N-Z-Amin besi yerinden elde edilen ekstre (125.1 mg), ISP-2 besi yerinden elde edilen ekstreye (65.0 mg) göre miktar bakımından fazladır. Fazla miktarda ekstre izolasyon çalışmalarında daha yüksek miktarda metabolit izolasyonuna neden olacağından büyük ölçekte fermentasyon için N-Z-Amin besi yerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Büyük Ölçekte Fermentasyon

N-Z-Amin besi yerlerinde canlandırılan mikroorganizmalar 1.5 L besi yeri içeren beş adet 2 L hacimli erlenlere ve 2 L besi yeri içeren üç adet 3 L hacimli erlenlere N-Z-Amin besi yerlerine ekilmiştir. Mikroorganizmanın üretim basamakları Şekil 44'te özetlenmiştir. Ekim yapılan erlenler, çalkalamalı inkübatörde 21 gün boyunca 28 °C'de 120 rpm'de sekonder metabolitlerin biyosentezinin gerçekleşmesi için bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda (Şekil 45 ve Şekil 46) kontaminasyon kontrolü için katı besi yerlerine (N-Z-Amin ve kanlı agar) ekim yapılarak inkübe edilmiş ve Gram boyama ya da basit boyama yapılan örnekler ışık mikroskobunda incelenmiştir.



Şekil 44. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının üretim basamakları.



Şekil 45. İnkübasyon süresinin sonunda besi yerlerinin görünümü.



Şekil 46. İnkübasyon süresinin sonunda besi yerlerinin görünümü.

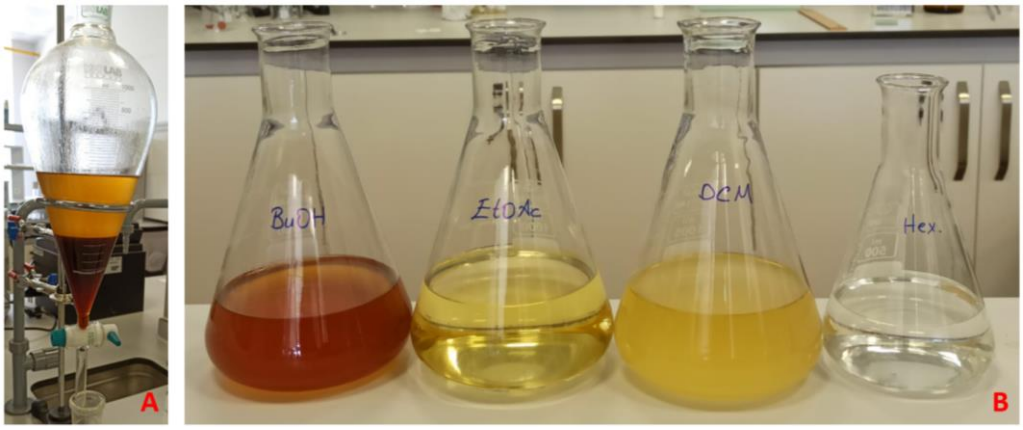
Fermentasyonu sonlandırılan besi yerleri 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi ile dibe çöken hücre kalıntıları dekantasyon ile ayrılmıştır.

Hücresel kalıntılardan ayrılan besi yerlerine ilk olarak 15 g/L XAD-16 reçinesi eklenerek bir gece reçinenin sekonder metabolitleri absorblaması için bekletilmiştir. Süre sonunda reçineler besi yerlerinden süzülerek ayrılmış ve ardından ultra saf su ile iki kez yıkanmıştır. Bir gece çözücü karışımı içerisinde bekletilen reçineler süzülüp ortamdan ayrıldıktan sonra ortama 15 g/L XAD-16 reçinesi ikinci kez konuldu. Besi yeri içinde bir gece bekletilen reçineler süre sonunda süzülerek iki kez ultra saf su ile yıkandı ve süzüldü. Süzülen reçineler 1200 mL diklorometan:metanol (1:1) çözücü karışımında bir gece ekstrakte edildi. Reçineler tekrar süzülüp çözücü karışımından ayrıldıktan sonra işlem tekrarlanıp bir gece boyunca ekstrakte edildi. Birer gece süreyle iki kez diklorometan:metanol (1:1) çözücü karışımı ile ekstrakte edilen reçineler son olarak 1200 mL metanol ile bir gece ekstrakte edilip süzüldü.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen çözücüler döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Mikroorganizmanın büyük ölçekte fermentasyonu ile 15.9 g ekstre elde edildi. Elde edilen ham ekstreye fraksiyonlandırma işlemleri uygulandı.

Fraksiyonlandırma

S. ovatisporus mikroorganizmasının N-Z-Amin besi yerinden elde edilen 15.9 g ham ekstre 200 mL su ile seyreltilerek sırasıyla hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile dört fraksiyona ayrıldı. Ekstraksiyon işlemi ve ayrılan fraksiyonlar Şekil 47'de gösterilmiştir.



Şekil 47. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının N-Z-Amin besi yeri fermantasyonunda elde edilen ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fraksiyonlandırılması (A) ve elde edilen ekstrenin soldan sağa BuOH, EtOAc, DCM ve hekzan fraksiyonları (B).

Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ekstrelerin miktarları şu şekildedir:

Hekzan : 30.6 mg
DCM : 897.1 mg
EtOAc : 391.1 mg
BuOH : 5.9 g

Elde edilen fraksiyonlardan DCM, EtOAc ve BuOH fraksiyonlarına HPLC uygulamasından önce daha iyi ayrım yapılması amacıyla SPE işlemine tabi tutuldu.

DCM ekstresi, içerisinde 4 mL C-18 dolgu maddesi bulunan 10 mL hacimli kolon kullanılarak her biri 20 mL olan çözücü sistemleri geçirilerek %100 su (SPE-1), %75 su:metanol (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanol (SPE-5) olmak üzere beş fraksiyona ayrıldı. Toplanıp çözücüleri uzaklaştırılan SPE-1 fazı 755.5 g, SPE-2 fazı 37.4 mg, SPE-3 fazı 25.3 mg, SPE-4 fazı 18.5 mg ve SPE-5 fazı 23.7 mg olarak kaydedildi.

EtOAc ekstresi, 2 mL C-18 dolgu maddesi ve 5 mL hacimli kolon ile 15'er mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Toplanıp çözücüleri uçurulan fraksiyonların miktarları sırasıyla 325.9 mg, 5.5 mg, 6.4 mg, 2.2 mg ve 5.3 mg olarak belirlendi.

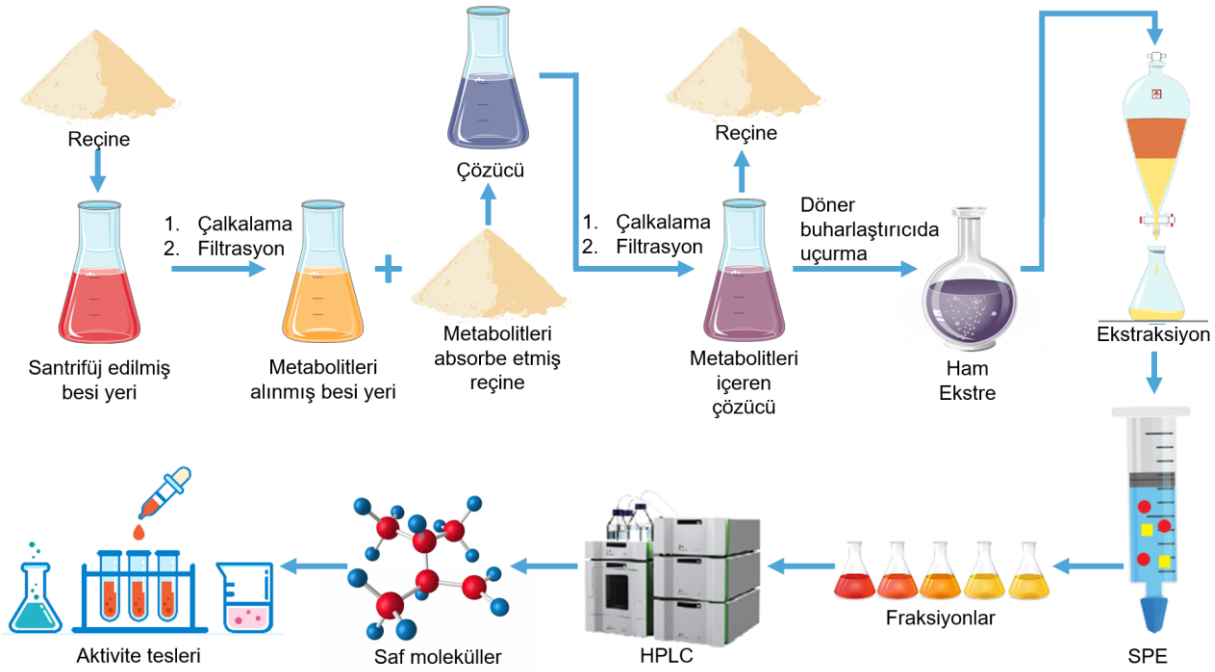
BuOH ekstresi, içinde 6 mL C-18 dolgu maddesi bulunan, 20 mL hacimli kolon ile 50'şer mL %100 su (SPE-1), %25 metanol:su (SPE-2), %50 metanol:su (SPE-3), %75 metanol:su (SPE-4) ve %100 metanole (SPE-5) geçirilerek beş fraksiyona ayrıldı. Fraksiyonlar toplanarak çözücüleri uzaklaştırıldı. SPE-1 fazı 5220.8 mg, SPE-2 fazı 57.2 mg, SPE-3 fazı 104.7 mg, SPE-4 fazı 53.6 mg ve SPE-5 fazı 9.5 mg olarak kaydedildi.

Elde edilen ekstreye ait fazlar izolasyon için preperatif HPLC'ye tabi tutuldu.

İZOLASYON VE SAFLAŞTIRMA

Mikroorganizmaların fermantasyonu sonucu besi yeri santrifüjlenip hücre kalıntıları ortamdan uzaklaştırılmıştır. Reçine eklenerek ortamdaki metabolitlerin reçine tarafından absorblanması amaçlanmıştır. Reçinenin ekstraksiyonu ile ham ekstre elde edilmiştir. Ham ekstreler hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak dört fraksiyona ayrılmıştır. DCM, EtOAc ve BuOH fraksiyonları SPE ile alt fraksiyonlara ayrılmıştır. Elde edilen fazlar HPLC ile izolasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. İzolasyon gerçekleştirilmeden önce farklı polaritelerde gradient çözücü sistemleri kullanarak fraksiyon profilleri alınmıştır. Alınan profiller ışığında en uygun metot seçilerek izolasyon metoduna karar verilmiştir. Metabolitlerin izolasyonunda Water HPLC cihazı ve Kromasil C-18 kolon (21.2x250 mm) kullanılmıştır. İzolasyon metotlarının akış hızı 9 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Tez çalışmasında her bir fraksiyon için uygulanan izolasyon metotlarına, preperatif HPLC kromatogramlarına ve maddelerin retensiyon sürelerine Bulgular bölümünde yer verilmiştir. Belirtilen retensiyon sürelerinde görülen pikler toplanıp çözücüleri uçurularak izole edilmiştir.

Şekil 48'de fermentasyon işlemi sonrası gerçekleştirilen izolasyon basamakları şematize edilmiştir.



Şekil 48. Fermantasyon sonrası her mikroorganizma için izolasyon basamaklarının şematik gösterimi.

KULLANILAN SPEKTROSKOPİK TEKNİKLER

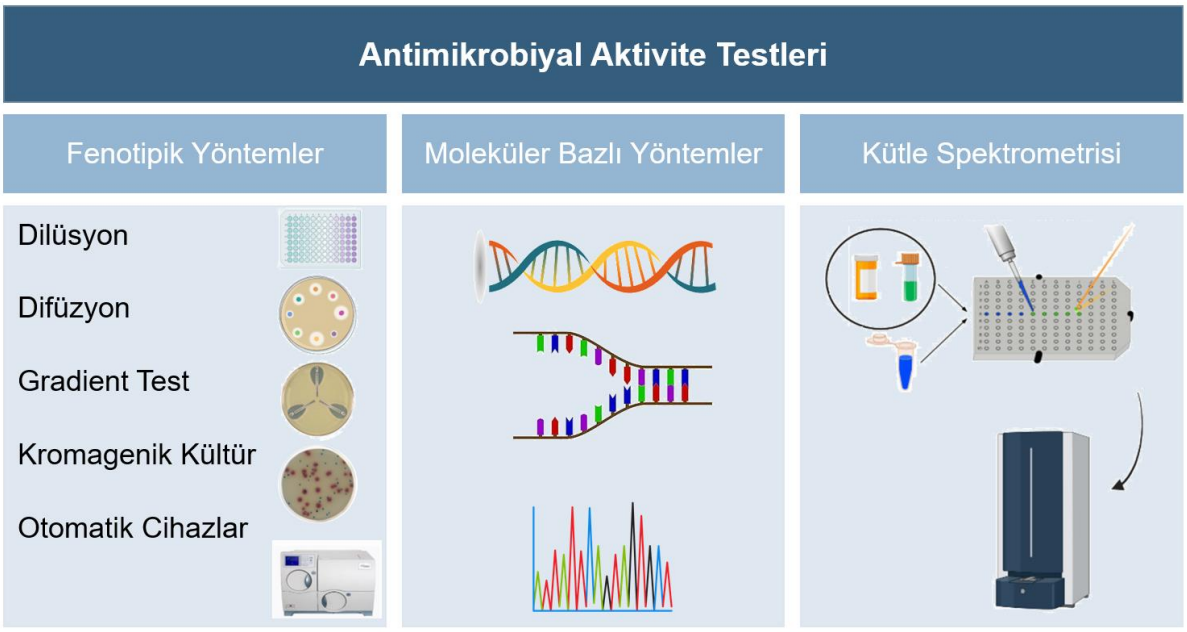
İzole edilen saf bileşiklerin yapıları öncelikle tek boyutlu NMR teknikleri (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve APT) ile ve iki boyutlu NMR teknikleri (HSQC, HMBC, COSY ve NOESY) ve LC-Q-TOF-MS kullanılarak aydınlatılmıştır.

SAF BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Mikroorganizma ekstrelerinden izole edilen saf metabolitlerin biyolojik aktivitelerini tespit etmek amacıyla antimikrobiyal ve antiproliferatif aktivite testleri yapılmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Günümüzde antimikrobiyal aktifliği belirlemek için birkaç yöntem kullanmaktadır. Bu yöntemleri Şekil 49'da görüldüğü gibi fenotipik yöntemler, moleküler bazlı yöntemler ve kütle spektroskopisi olarak sınıflandırılmaktadır.



Şekil 49. Antimikrobiyal aktivite testi yöntemleri (156).

Fenotipik yöntemler, bir maddeye verilen bakteriyel yanıtı inceler. Difüzyon testi, gradient difüzyon testi gibi testlerle gerçekleştirilen fenotipik yöntemlerde klinik olarak önemli bakterilerin çoğu için sonuçlar en az 18-48 saat içinde elde edilir. Ancak yavaş büyüyen mikroorganizmalar kullanıldığında bu süre uzamaktadır. Moleküler bazlı yöntemler, bakteriyel izolatlarda veya doğrudan klinik örneklerde direnç belirleyicilerinin 1-6 saatlik bir geri dönüş süresiyle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlerle saptanmasına dayanmaktadır. Yüksek maliyetler, direnç geninin bir direnç fenotipinin ifadesi ile zorunlu olarak ilişkili olmaması nedeniyle, yalnızca bilinen problar tarafından hedeflenen direnç genlerinin saptanması ve direncin olduğundan fazla tahmin edilmesi moleküler yöntemlerin dezavantajları arasındadır. Kütle spektroskopisi temelli yöntemler, test maddesine maruz kalan bakteri izolatlarının kontrollerle karşılaştırıldığında göreli büyüme oranlarını ölçmek için yarı kantitatif MALDI-TOF MS kullanan yöntemdir (156).

Tez çalışmasında saf bileşiklerin antimikrobiyal aktivite testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (157).

Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş olan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus*

faecalis ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları kullanıldı.

Meropenem (Sigma), imipenem (Sigma), siprofloksasin (Sigma), vankomisin (Mayne Pharma), ampisilin (Sigma), gentamisin (Sigma), seftazidim (TUM Ekip İlaç), flukonazol (Sigma) saf olarak kullanıldı ve stok çözeltileri CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda uygun çözücülerde çözülüp stok solusyonları 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-morfolino]-propansülfonik asit (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 bileşikler dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 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. Bileşiklerin 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/mL konsantrasyonları oluşturuldu. Dilüsyon işlemi tamamlanarak, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum

süspansiyonlarından 10µL inokülasyon yapıldı. Her mikrodilüsyon plağında kontrol kuyucukları sadece besi yeri+mikroorganizma içeren, sadece besi yeri içeren olarak kullanıldı. Kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkileri belirlendi. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C'de 18-24 saat, maya inoküle edilmiş plaklar ise 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) değerleri, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük bileşik konsantrasyonu olarak saptandı.

Antiproliferatif Aktivite Testleri

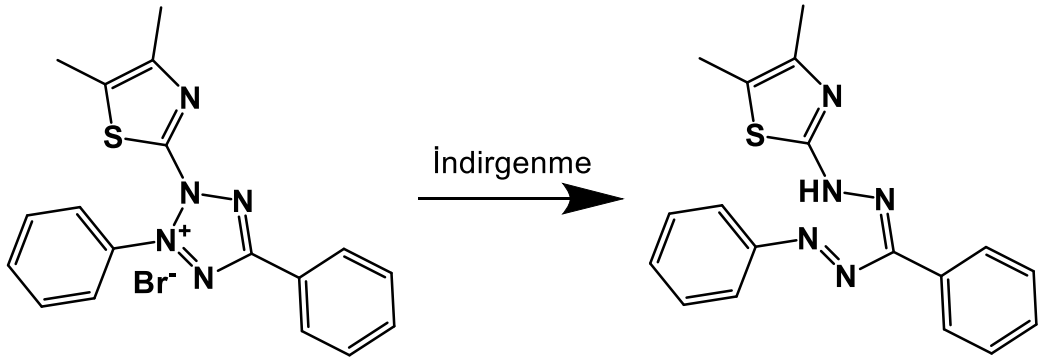
Sitotoksik kelimesi anlam olarak hücre ölümüne neden demektir. Bir materyalin sitotoksik potansiyele sahip olup olmadığının tespit edilesi için materyale sitotoksisite çalışmaları yapılır. Sitotoksisite çalışmaları *in vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilebilir. *In vitro* çalışmalardan biri olan hücre temelli çalışmalar, uygulama kolaylığı ve *in vivo* çalışma verileriyle uyumlu sonuçlar sağlaması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (158,159).

Materyalin sitotoksisitesi, o materyalin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sitotoksik materyale maruz kalan hücreler, apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazise uğrayarak proliferasyon özelliklerini kaybedebilir (159). Hücre sağ kalımının belirlenmesi için çok sayıda test kullanılabilir. Testlerin çalışma tipleri ve prensipleri değişiklik gösterse de hepsinin ortak amacı canlı/ölü hücre miktarının tespit edilmesidir (160,161).

Tez çalışmasında antiproliferatif ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için HeLa (Rahim ağzı), MCF-7 (Meme kanseri), MEF (fare embriyo fibroblast) hücre hatlarına karşı, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testi yaygın olarak kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür (MTT) metodu ile gerçekleştirilmiştir.

Güvenilir, kolorimetrik tabanlı ve çeşitli hücre hatlarına uygulanabilen MTT metodu, belirlenmiş koşullar altında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) H'ye bağlı hücresel oksiredüktaz enzimi, ortamdaki hücrelerin sağ kalımını göstermektedir. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür adı verilen tetrazolyum tuzu elektron alarak indirgenmektedir. İndirgenen tetrazolyum tuzu formazan yapısına dönüşmektedir. Bu dönüşüm renk değişikliğine de neden

olmaktadır. Sarı renkli tetrazolyum bileşiği ancak canlı hücrelerin mitokondrilerinde indirgenerek mor renkli ve suda çözünmeyen mor renkli kristallere dönüşebilir. Bu nedenle renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler varlığında görülebilmektedir (Şekil 50).



3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür

(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-1,3-difenilformazan (Formazan)

Şekil 50. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür (MTT) metodu tepkimesi.

Canlılığını kaybetmiş hücreler tetrazolyum halkasını indirgemeyeceklerinden formazan oluşumu ve dolayısıyla renk değişimi gözlenmemektedir. Canlı hücrelerde indirgenme sonucu oluşan kristallerin, dimetilsülfoksit (DMSO) ilavesiyle 492 nm'de absorbansı ölçülmektedir. Ölçülen absorbans değerlerinden %hücre canlılıkları ve hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değerleri hesaplanmaktadır (162).

MTT metodunda kullanılmak üzere hücreler pasajlanıp ve 96 kuyucuklu hücre kültürü mikro plakalarına ekim (180 µL) yapılmıştır. Ekim yapılan plaka 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda izole edilen bileşiklerden plakanın her bir kuyucuğuna 20 µL ilave edilerek 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda 20 µL MTT (5 mg/mL suda hazırlanan) de plakalara ilave edilerek 2-4 saat inkübe edildikten sonra tüm sıvı plakadan uzaklaştırılarak kuyucuklara 200 µL DMSO eklenmiştir. Spektrofotometrede 492 nm'de ölçüm yapılarak absorbanslar kaydedilmiştir (163).

BULGULAR

HPLC ANALİZ SONUÇLARI

Ekstrelerden saf metabolitlerin saflaştırılması amacıyla katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile elde edilen alt fraksiyonlar HPLC'de izolasyona tabi tutulmuştur.

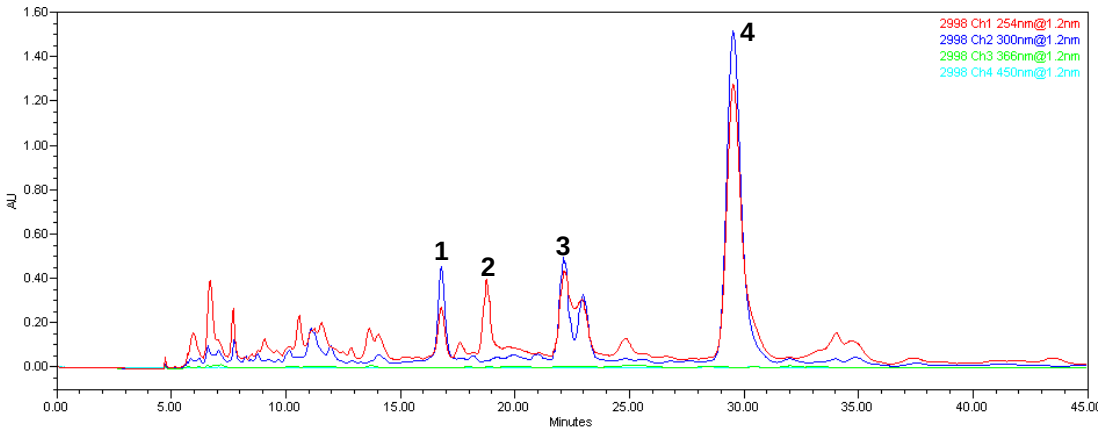
S. iconiensis'ten Metabolitlerin İzolasyonu

***S. iconiensis* Mikroorganizmasının N-Z-Amin Ekstresinden Metabolitlerin İzolasyonu:** N-Z-Amin besi yerinin DCM ekstresine ait SPE-1 fazının HPLC ile saflaştırılmasında izokratik yöntem kullanılmış olup kullanılan yöntem şu şekildedir:

Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-45 dk %60 su-%40 MeOH.



Şekil 51. N-Z-Amin besi yerinin DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramı (Şekil 51) verilen fazdan 10.5 dk'da elüe edilen 1 nolu bileşik 2.6 mg, 16. dk'da elüe edilen 2 nolu bileşik 1.9 mg, 21. dk'da elüe edilen 3 nolu bileşik 2.2 mg, 28. dk'da elüe edilen 4 nolu madde 3.2 mg olarak tartılmıştır. Toplanan bileşikler çözücüleri uçurularak saflaştırılmıştır. İzole edilen saf bileşikler için spektral analiz yapılmıştır.

N-Z-Amin besi yerinin etil asetat ekstresinin SPE-1 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

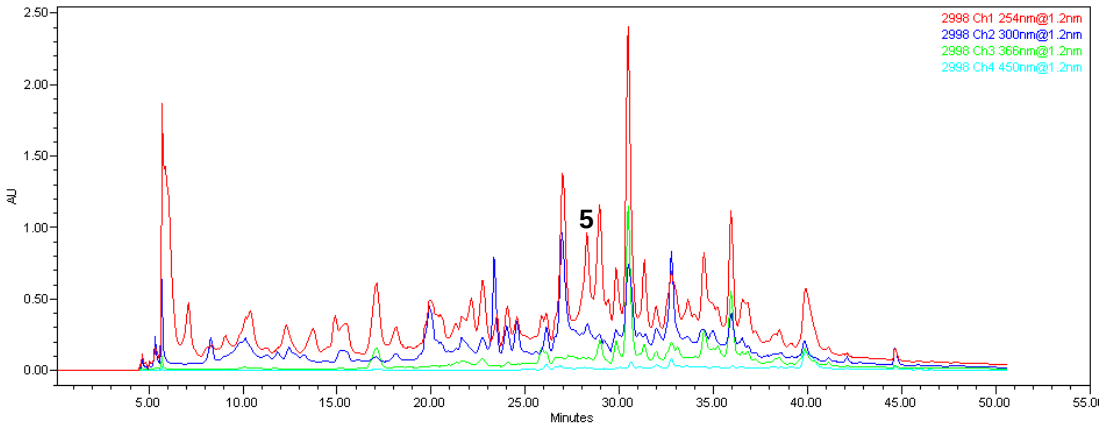
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %65 su-%35 MeOH,

10-45 dk %35 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-55 dk %100 MeOH.



Şekil 52. N-Z-Amin besi yerinin etil asetat ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 52) 28. dk'da gözlenen 5 nolu pik toplanarak çözücüsü uçurulmuştur. 3.6 mg miktarındaki bu maddenin başta NMR ve kütle spektroskopisi teknikleri olmak üzere spektral analiz ile yapısı aydınlatılmıştır.

N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-1 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

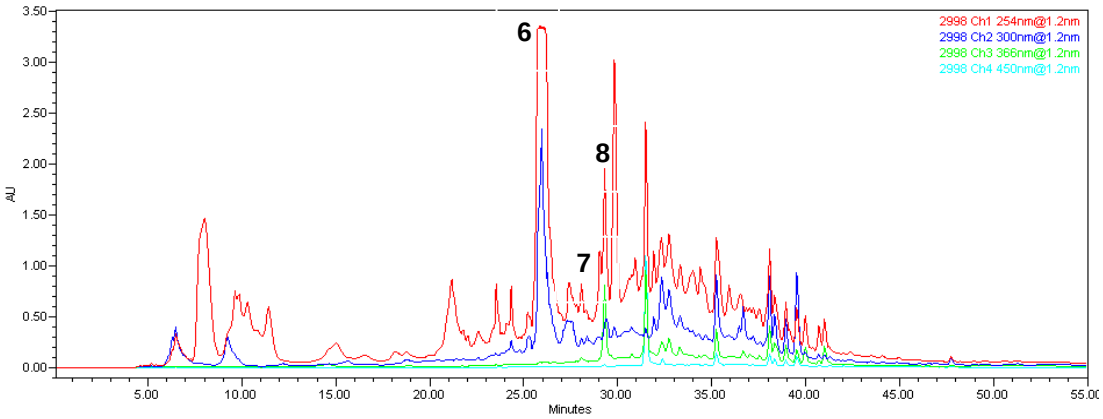
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %90 su-%10 MeOH,

10-45 dk %10 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-55 dk %100 MeOH.



Şekil 53. N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 53) 26. dk'da elüe edilen 6 nolu bileşiğin miktarı 53.3 mg, 28. dk'da elüe edilen 7 nolu bileşiğin miktarı 6.5 mg ve 29. dk'da elüe edilen 8 nolu bileşiğin miktarı 8.3 mg olarak belirlenmiştir. Toplanan saf maddeler ve çözücüleri uçurulup spektroskopik analizlere tabi tutulmuştur.

N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-2 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

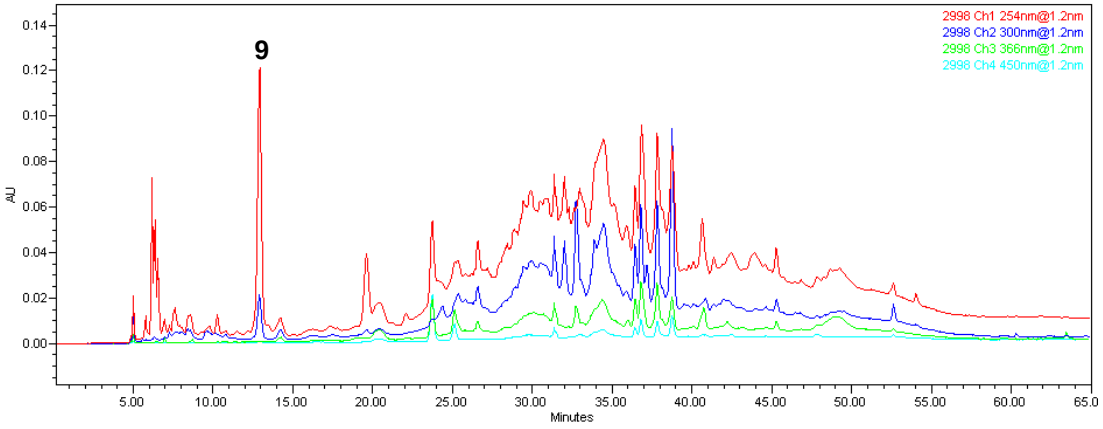
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-55 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

55-65 dk %100 MeOH.



Şekil 54. N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-2 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 54) işaretlenmiş 12.5 dk'da görülen 9 nolu pik toplanmıştır. Saf bileşiğin madde miktarı 2.0 mg olarak belirlenmiştir.

***S. iconiensis* Mikroorganizmasının ISP-2 Ekstresinden Metabolitlerin İzolasyonu:** Mikroorganizmanın ISP-2 besi yerinin DCM ekstresininden preperatif HPLC uygulanarak elde edilen bileşik miktarları spektral analizler için yeterli olmamıştır.

Etil asetat ekstresine ait fazların miktarları çok az (13.3 mg, 4.2 mg, 7.8 mg ve 6.1 mg) olduğundan preperatif HPLC ile ayrım işlemi uygulanmamıştır.

Bütanol ekstresinin SPE-1 fazından izole edilen saf bileşiklerin madde miktarları 2 mg'dan daha az olduğu için spektroskopik analizler için yeterli olmamıştır.

***S. seymenliensis* Mikroorganizmasından Metabolitlerin İzolasyonu**

DCM ekstresine ait SPE-1 fazının HPLC ile saflaştırılmasında gradient yöntem kullanılmış olup kullanılan yöntem şu şekildedir:

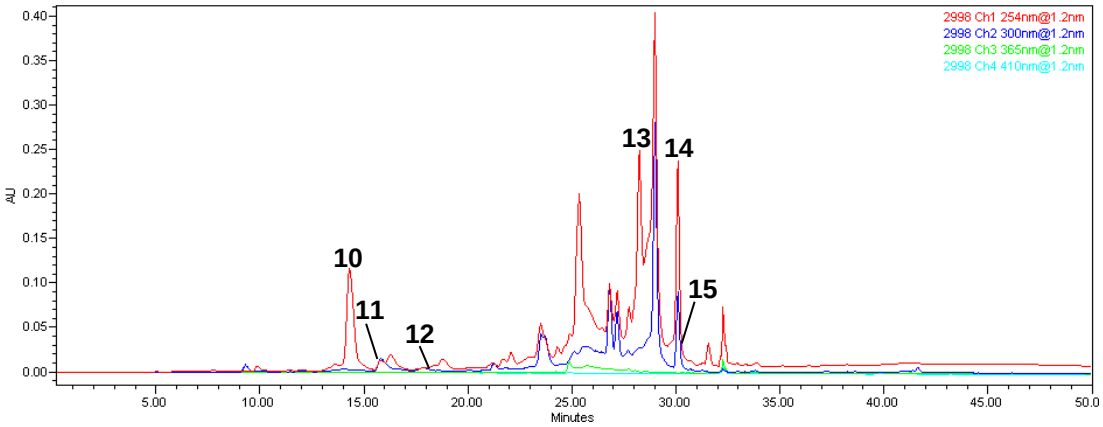
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-40 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

40-50 dk %100 MeOH.



Şekil 55. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Şekil 55'te verilen kromatogramda 14.5 dk'da elüe edilen 10 nolu bileşik 42.5 mg, 16.3 dk'da elüe edilen 11 nolu bileşik 3.3 mg, 16.6-18.3 dk aralığında elüe edilen 12 nolu bileşik 26.3 mg, 28. dk'da elüe edilen 13 nolu bileşik 51.5 mg, 30.2 dk'da elüe edilen 14 nolu bileşik 5.6 mg, 30.4 dk'da elüe edilen 15 nolu bileşik 45.7 mg olarak tartılmıştır. İzole edilen saf bileşikler için spektral analiz yapılmıştır.

S. seymenliensis mikroorganizmasının DCM ekstresine ait SPE-2 fazının saflaştırılmasında izokratik metod kullanılmış olup kullanılan yöntem şu şekildedir:

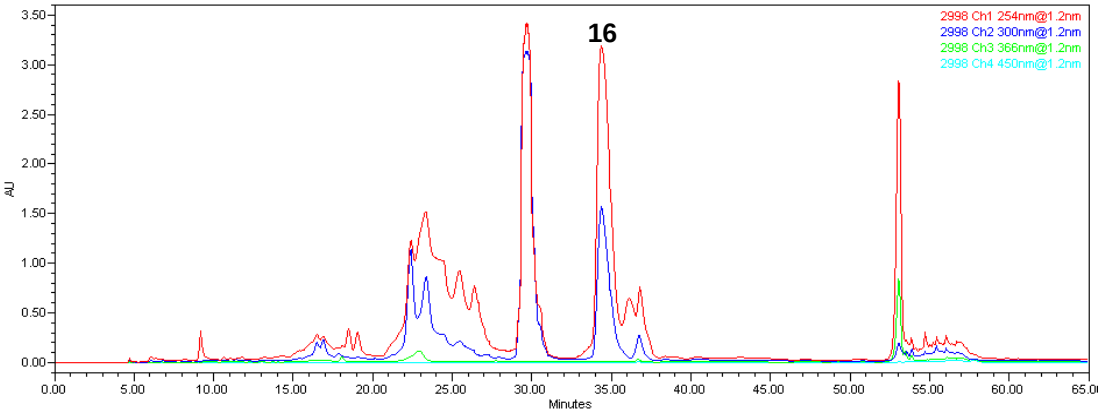
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-45 dk %60 su-%40 MeOH.

45-50 dk %40 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

50-65 dk %100 MeOH.



Şekil 56. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-2 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 56) görüldüğü gibi 34. dk'da 16 nolu pik toplanmış ve çözücüsü uçurulmuştur. 6.2 mg olarak tartılan bu saf bileşik için spektral analizler yapılmıştır.

S. seymenliensis mikroorganizmasının bütanol ekstresinin SPE-1 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

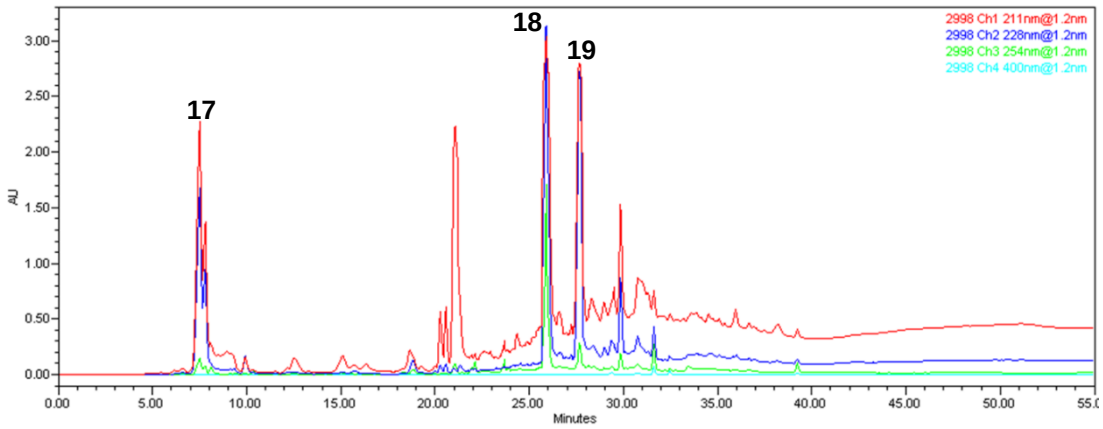
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %90 su-%10 MeOH,

10-45 dk %10 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-55 dk %100 MeOH.



Şekil 57. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının BuOH ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Şekil 57'de yer alan kromatogramda 7.5 dk'da toplanan 17 nolu bileşik 20.2 mg, 25.5 dk'da toplanan 18 nolu bileşik 33.5 mg, 27.3 dk'da toplanan 19 nolu bileşik 43.5 mg olarak tartılmıştır. Toplanıp çözücüleri uçurulan bu üç saf bileşik için spektral analiz yapılmıştır.

S. ovatisporus Mikroorganizmasından Metabolitlerin İzolasyonu

S. ovatisporus mikroorganizmasının fermentasyonu ile elde edilen ekstrenin DCM fraksiyonuna ait SPE-1 fazının HPLC ile saflaştırılmasında gradient yöntem kullanılmış olup kullanılan yöntem şu şekildedir:

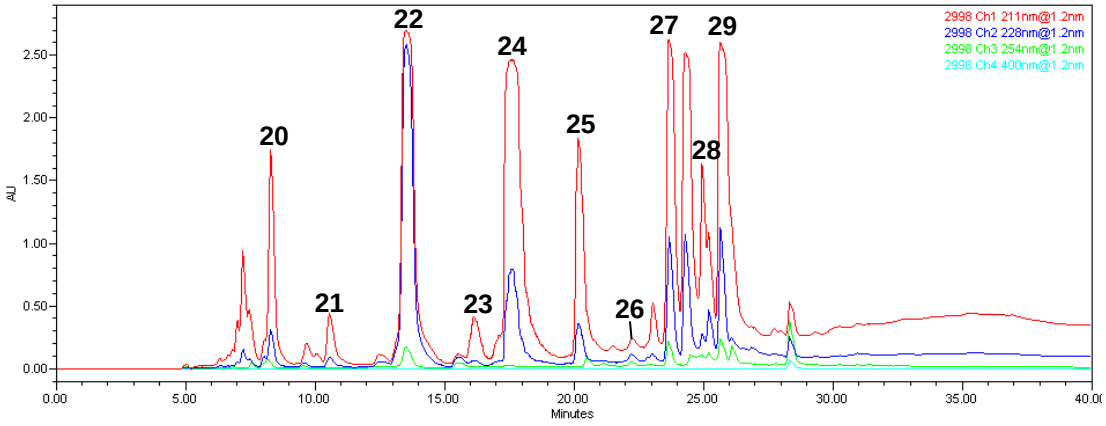
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %70 su-%30 MeOH,

10-30 dk %30 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

30-40 dk %100 MeOH.



Şekil 58. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 58) 8.5 dk'da, 10.5 dk'da, 13. dk'da, 16. dk'da, 16.5-18.5 dk arasında, 20. dk'da, 23. dk'da, 23.5 dk'da, 25. dk'da ve 26. dk'da gözlenen pikler toplanmış ve çözücüleri uçurularak saflaştırılmıştır. Sırasıyla, 20 (10.9 mg), 21 (3.7 mg), 22 (29.1 mg), 23 (5.0 mg), 24 (85.0 mg), 25 (9.4 mg), 26 (3.1 mg), 27 (44.2 mg), 28 (44.4 mg) ve 29 (43.4 mg) nolu saf bileşikler için spektral analiz yapılmıştır.

S. ovatisporus mikroorganizmasının etil asetat ekstresinin SPE-1 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

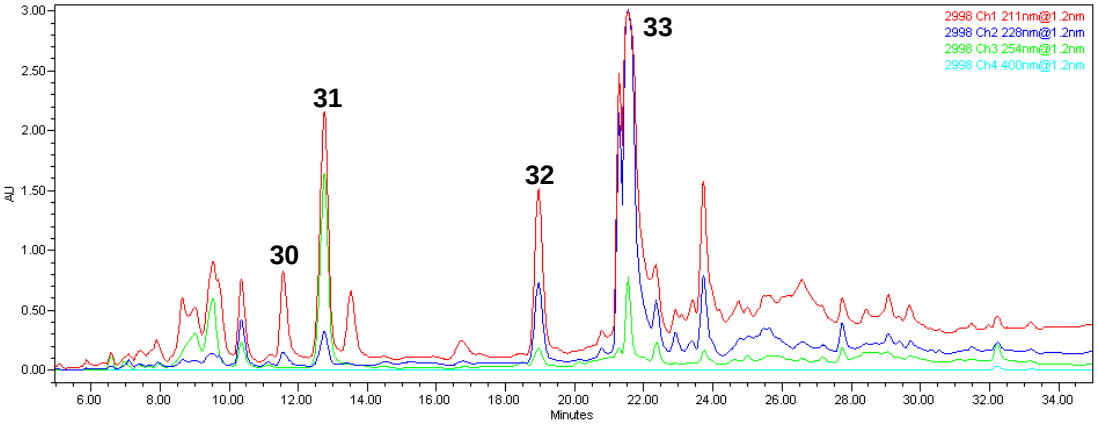
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-15 dk %80 su-%20 MeOH,

15-45 dk %20 MeOH'den %100 MeOH'e dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

45-55 dk %100 MeOH.



Şekil 59. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının EtOAc ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramda (Şekil 59) görüldüğü gibi 30 nolu pik 11. dk'da, 31 nolu 13. dk'da, 32 nolu pik 19-21 dk aralığında ve 33 nolu pik 24.5-25.5 dk aralığında toplanan maddeler sırasıyla 3.7 mg, 4.6 mg, 2.8 mg ve 39.2 mg miktarında elde edilmiştir. Bu toplanan bileşiklerin yapısı NMR ve kütle spektroskopisi teknikleri ile spektral analiz ile aydınlatılmıştır.

S. ovatisporus mikroorganizmasının bütanol ekstresinin SPE-1 fazının saflaştırılmasında kullanılan gradient yöntem şu şekildedir:

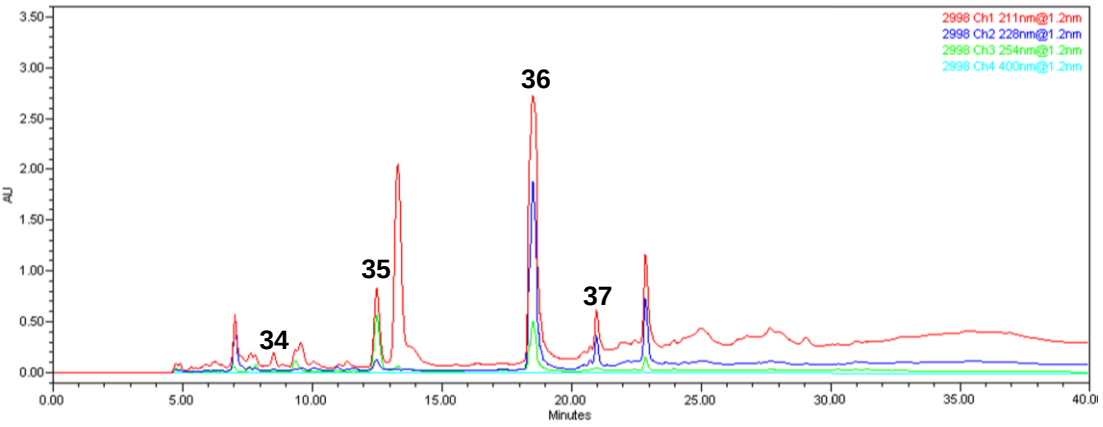
Kolon: Kromasil C-18 (21.2x250 mm)

Akış hızı: 9 mL/dk

0-10 dk %80 su-%20 MeOH,

10-30 dk %20 MeOH'den %100 MeOH'e.dek azalan polaritede gradient çözücü sistemi,

30-40 dk %100 MeOH.



Şekil 60. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının BuOH ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.

Kromatogramı (Şekil 60) verilen fazdan 8.5 dk'da 34 nolu pik, 11.dk'da 35 nolu pik, 16.5-17.5 dk aralığında 36 nolu pik ve 20.5 dk'da 37 nolu pik toplanarak çözücüleri uçurulmuştur. Sırasıyla 5.3 mg, 7.9 mg, 20.7 mg ve 6.1 mg olarak tartılan bu saf bileşik için spektral analizler yapılmıştır.

Tez çalışmasında izole edilen bileşiklerin yapıları 1D ve 2D NMR teknikleri ile aydınlatıldığında farklı mikroorganizmalardan ya da ekstrelerin farklı fraksiyonlardan birkaç ortak bileşiğin izole edildiği anlaşılmıştır. Aynı bileşikler elimine edildiğinde 19 saf bileşiğin izolasyonu sağlanmıştır. İzole edilen bileşiklerin elde edildiği organizmalar ve izole edildikleri fraksiyonlar Tablo 1'de sunulmuştur. Bileşiklerin yapılarının açıklanmasına Tartışma bölümünde yer verilmiştir.

Tablo 1. İzolasyonu gerçekleştirilen bileşiklerin elde edildiği mikroorganizmalar ve fraksiyonlar.

	S. iconiensis			*S. seymenliensis*			*S. ovatisporus*		
Bileşikler (HPLC Pik No)	DCM	EtOAc	BuOH	DCM	EtOAc	BuOH	DCM	EtOAc	BuOH
Siklo-D-prolin-L-valin (**1, 11, 23**)	✓			✓			✓		
Siklo-D-prolin-L-izolösin (**2, 26**)	✓						✓		
Siklo-D-prolin-L-fenilalanin (**3**)	✓								
İndol-3-karboksaldehit (**4**)	✓								
2-Fenilasetik asit (**5, 15**)		✓		✓					
L-Triptofan (**6, 9, 18, 32, 36**)			✓			✓		✓	✓
Siklo-D-prolin-L-tirozin (**7**)			✓						
Bütil-*β*-glukopiranozid (**8**)			✓			✓			
Siklo-L-prolin-L-tirozin (**10, 19, 22, 33, 37**)				✓			✓	✓	✓
Siklo-L-prolin-L-valin (**12, 24**)				✓			✓		
Siklo-L-prolin-L-fenilalanin (**13, 29**)				✓			✓		
Triptofol (**14, 16**)				✓					
Tiramin (**17**)						✓			
Siklo-D-prolin-L-alanin (**20, 30, 34**)							✓	✓	✓
L-prolin (**21**)							✓		
Siklo-L-prolin-L-metiyonin (**25**)							✓		
Siklo-L-prolin-L-izolösin (**27**)							✓		
Siklo-L-prolin-D-lösin (**28**)							✓		
Vidarabin (**31, 35**)								✓	✓

TARTIŞMA

İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLERİN SPEKTRAL ÖZELLİKLERİ

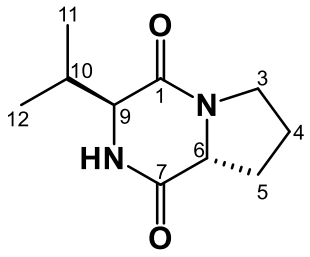
S. iconiensis'ten İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

DCM ekstresi (830 mg) kullanılarak yapılan çalışmalarla siklo-D-prolin-L-valin (1), siklo-D-prolin-L-izolösin (2), siklo-D-prolin-L-fenilalanin (3), indol-3-karbaldehit (4), olmak üzere dört (4) bileşik saf halde izole edilmiştir.

Etil asetat (EtOAc) ekstresinden (182.5 mg) 2-fenilasetik asit (5) bileşiği saf olarak izole edilmiştir.

Bütanol (BuOH) ekstresinden (3.6 g) L-triptofan (6, 9) siklo-D-prolin-L-tirozin (7) ve 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid (8) olmak üzere üç (3) bileşik saflaştırılmıştır.

Siklo-D-Prolin-L-Valin (1)



Şekil 61. Siklo-D-prolin-L-valin.

Renksiz, kristalize formdaki siklo-D-prolin-L-valin bileşiğinin (Şekil 61) yapısı alınan ^{1}H-NMR, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edilen verilerle belirlenmiştir (Şekil 62-65).

IR (ATR) V_{max} (cm^{-1}) 3223 (N-H gerilmesi), 2956 (C-H gerilmesi), 1636 (Amit C=O), 1444 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 62), 4.09 ppm (dd, *J*=6.3, 5.2 Hz, 1H, H-6) ve 3.72 ppm'de (d, *J*=8.9 Hz, 1H, H-9) gözlenen sinyallerin amino asitlerin *α*-proton bölgesine özgü sinyal bölgesinde yer alması bileşiğin dipeptit yapısında olduğu anlamına gelmektedir.

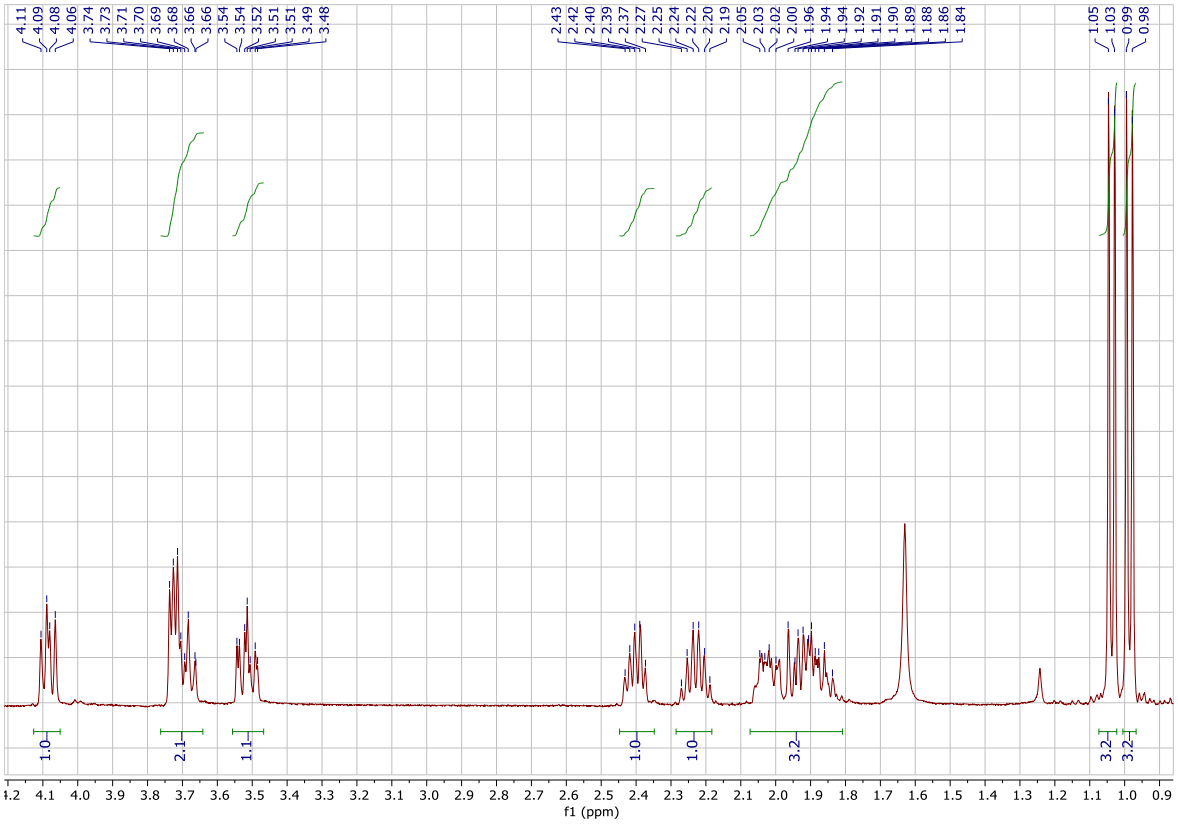
1.85 ppm (m, 1H, H-4a), 1.91 ppm (m, 1H, H-5a), 2.02 ppm (m, 1H, H-4b), 2.38 ppm (m, 1H, H-5b), 3.52 ppm (m, 1H, H-3a) ve 3.72 ppm'de (m, 1H, H-3b) yer alan sinyallerin prolin molekülü için spesifik sinyaller olduğu anlaşılmıştır. HSQC spektrumundan (Şekil 63) bu protonların metilen protonları olduğu anlaşılmıştır. Dört adet CH_2 varlığı prolin yapısını desteklemektedir.

0.98 ppm'de sinyal veren 3H integral değerli protonun (H-12) ve 1.05 ppm'de sinyal veren 3H integral değerli protonun (H-11) dublet yarılma göstermiş olması bu amino asidin valin olduğuna işaret etmektedir. HMBC spektrumunda (Şekil 64) H-11 ve H-12 protonlarının 33.3 ppm'de sinyal veren karbon (C-10) ile 63.5 ppm'de sinyal veren karbon (C-9) ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda bileşiğin yapısı siklo-D-prolin-L-valin olarak açıklanmıştır. Spektral veriler literatür ile uyum göstermektedir (164).

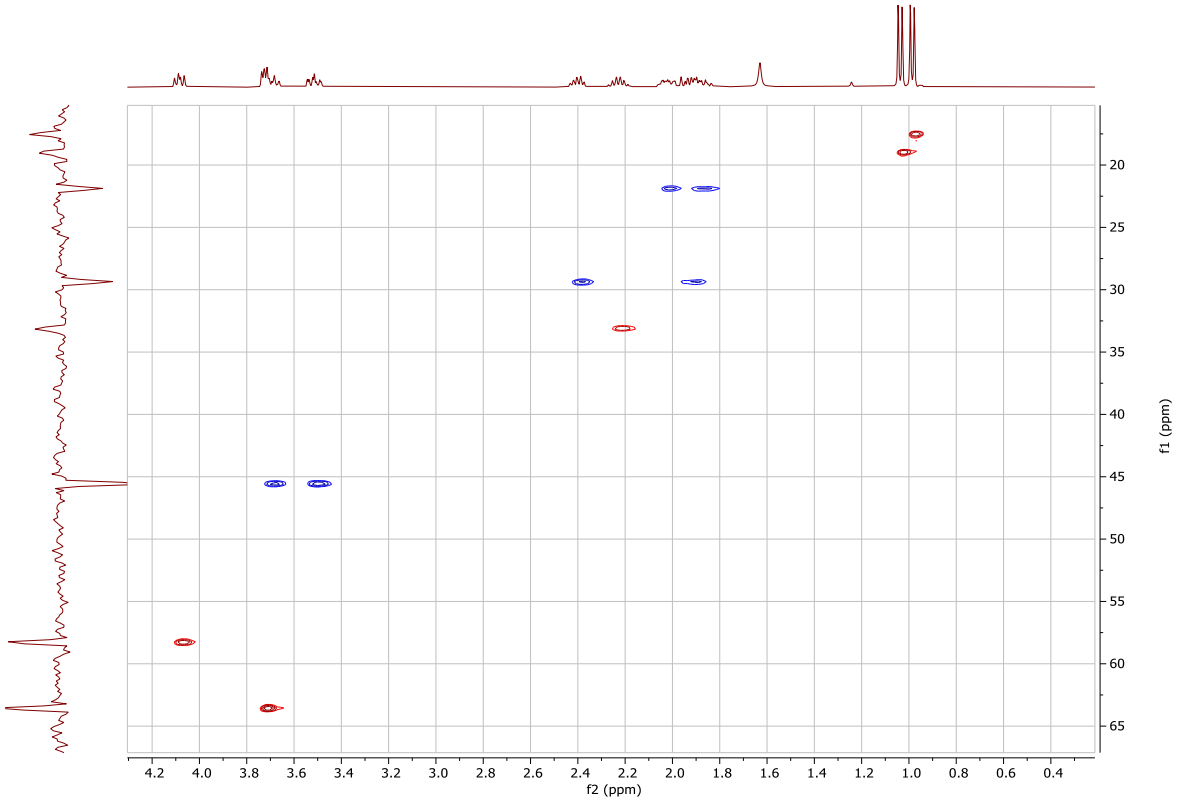
$C_{10}H_{16}N_2O_2$ kapalı formüllü bileşiğin alınan LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 65) moleküler iyon piki *m/z* 197.1297 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. Bileşiğin $C_{10}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülü için teorik değer 197.1290 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. Siklo-D-prolin-L-valin molekülünün 1D NMR değerleri ve HMBC korelasyonları ($CDCl_3$, 400 MHz).

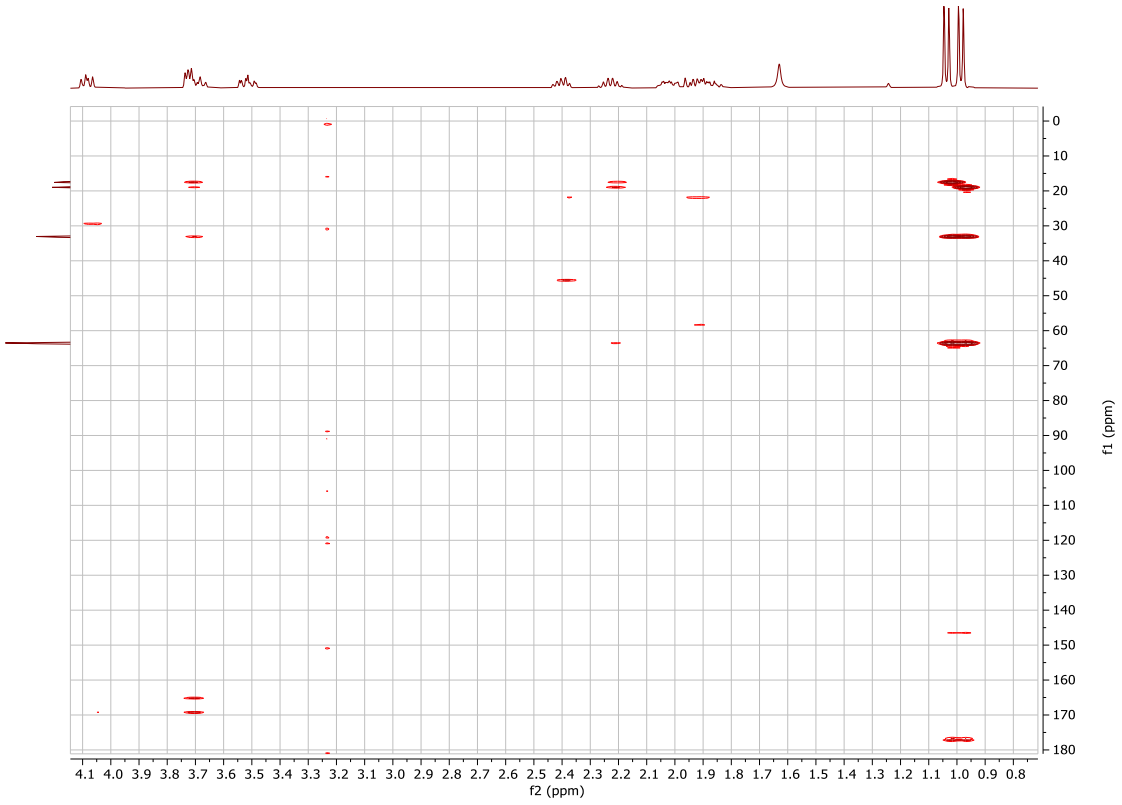
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	165.7	-
2 (N)	-	-	-
3	3.52 (m, 1H) 3.72 (m, 1H)	45.6	C-4, C-5
4	1.85 (m, 1H) 2.02 (m, 1H)	21.8	C-3, C-5, C-6
5	1.91 (m, 1H) 2.38 (m, 1H)	29.3	C-4, C-6, C-7
6	4.09 (dd, *J*=6.3, 5.2 Hz, 1H)	58.3	C-1, C-4, C-5
7	-	169.4	-
8 (N)	-	-	-
9	3.72 (d, *J*=8.9 Hz, 1H)	63.5	C-1, C-7, C-10, C-11,C-12
10	2.22 (m, 1H)	33.3	C-9, C-10, C-11
11	1.05 (d, *J*=6.9 Hz, 1H)	19.1	C-1, C-7, C-9, C-10, C-12
12	0.98 (d, *J*=6.9 Hz, 1H)	17.5	C-1, C-7, C-9, C-10, C-11



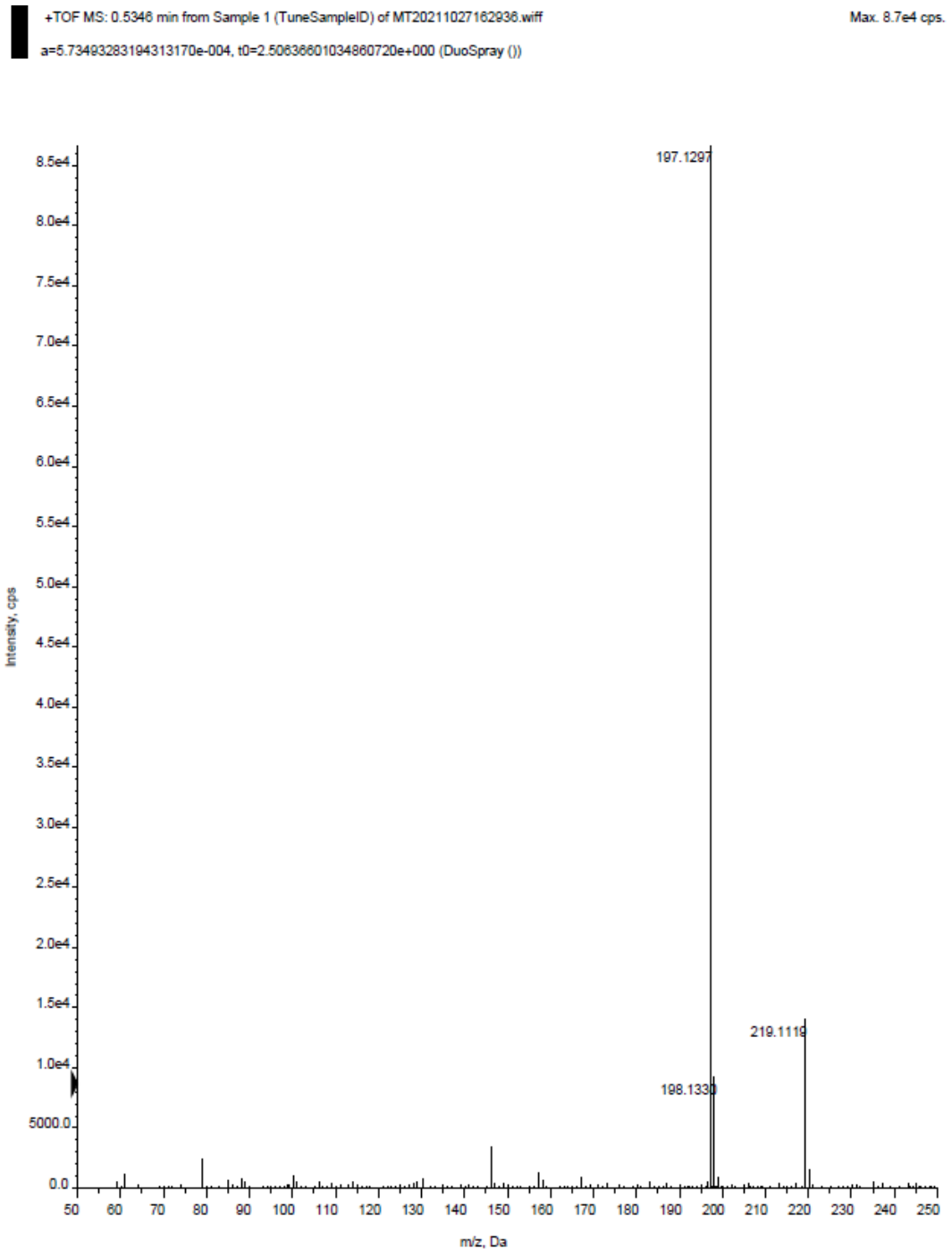
Şekil 62. Siklo-D-prolin-L-valinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz).



Şekil 63. Siklo-D-prolin-L-valinin HSQC spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz).

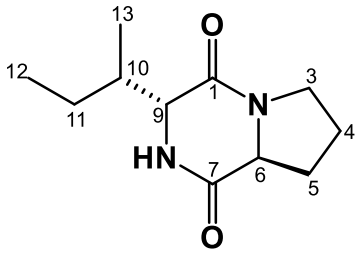


Şekil 64. Siklo-D-prolin-L-valinin HMBC spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz).



Şekil 65. Siklo-D-prolin-L-valinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-D-Prolin-L-İzolösin (2)



Şekil 66. Siklo-D-Prolin-L-İzolösin.

İzole edilen bileşik beyaz-krem toz görünümündedir. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edilen verilerle siklo-D-prolin-L-izolösin (Şekil 66) olarak belirlenmiştir (Şekil 67-71).

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3296 (N-H gerilmesi), 3069 (C=C), 2876 (C-H gerilmesi), 1657 (C=O), 1425 (CH_2, CH_3 eğilmesi).

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 67), spektrumun amino asitlerin *α*-hidrojen sinyal bölgesinde iki tane sinyal görülmesi dipeptit yapısını ifade etmektedir. *α*-hidrojenlerden birisi 4.23 ppm'de (dd, *J*=10.1, 6.6 Hz, 1H, H-6) sinyal vermiştir. Şekil 69'daki HSQC spektrumdan aynı protonun bağlı olduğu karbon değerinin 58.0 ppm (C-6) olduğu belirlenmiştir. 1.88 ppm (m, 1H, H-5a), 2.33 ppm (m, 1H, H-5b), 1.89 ppm (m, 1H, H-4a), 2.02 ppm (m, 1H, H-4b), 3.48 ppm (m, 1H, H-3a) ve 3.60 ppm'de (m, 1H, H-3b) yer alan sinyaller prolin için karakteristik olup HSQC spektrumunda bu sinyallerin -CH_2 grupları olduğu belirlenmiştir.

Bileşiğe ait ikinci *α*-hidrojenine ait sinyal 3.67 ppm'de (d, *J*=6.3 Hz, 1H, H-9) gözlenmektedir. Söz konusu protona ait karbon sinyali HSQC spektrumundan 61.7 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. 1.86 ppm'de (m, 1H, H-10) sinyal görülmesine neden olan protonun bağlı olduğu karbon değeri aynı spektrumdan 39.3 ppm (C-10), 1.21 (m, 1H, H-11a) ve 1.31 ppm'de (m, 1H, H-11b) sinyal veren protonların bağlı olduğu karbon ise 24.3 ppm'de (C-11) -CH_2 olarak gözlenmiştir.

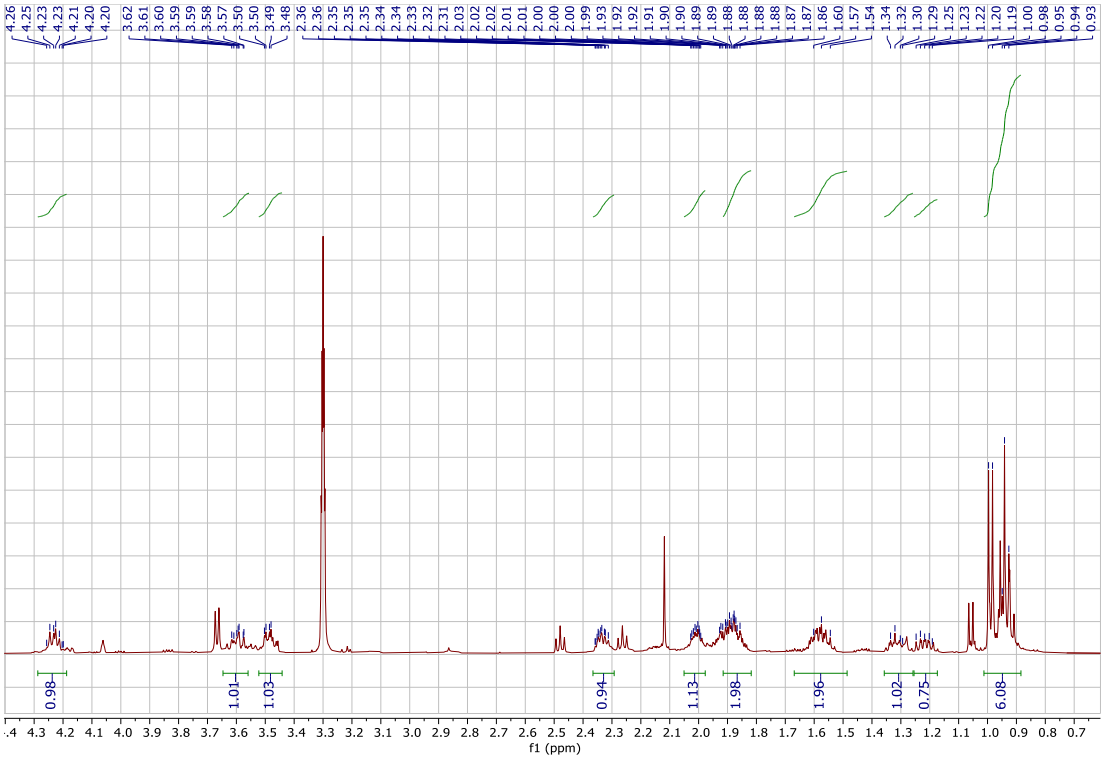
HSQC spektrumu incelendiğinde 0.93 ppm'de (t, *J*=7.5 Hz, 3H, H-12) sinyal veren metil protonun bağlı olduğu karbonun sinyal değeri 10.0 ppm (C-12) olarak, diğer metil protonu 0.99 ppm'de (d, *J*=6.9 Hz, 3H, H-13) sinyal verirken C-13'ün karbon değeri 14.0 ppm olarak belirlenmiştir. H-12 protonunun triplet yarılma verirken

H-13 protonunun dublet yarılma vermesi, terminal metillerin sırasıyla -CH_2CH_3 ve -$CHCH_3$ olarak bağlandığını göstermektedir. Bu sayede bileşiğin yapısındaki diğer amino asidin izolösin olduğu anlaşılmıştır. Böylece molekülün yapısı siklo-L-prolin-L-izolösin olarak belirlenmiştir. Spektrumdan sağlanan veriler literatür ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmüştür (165).

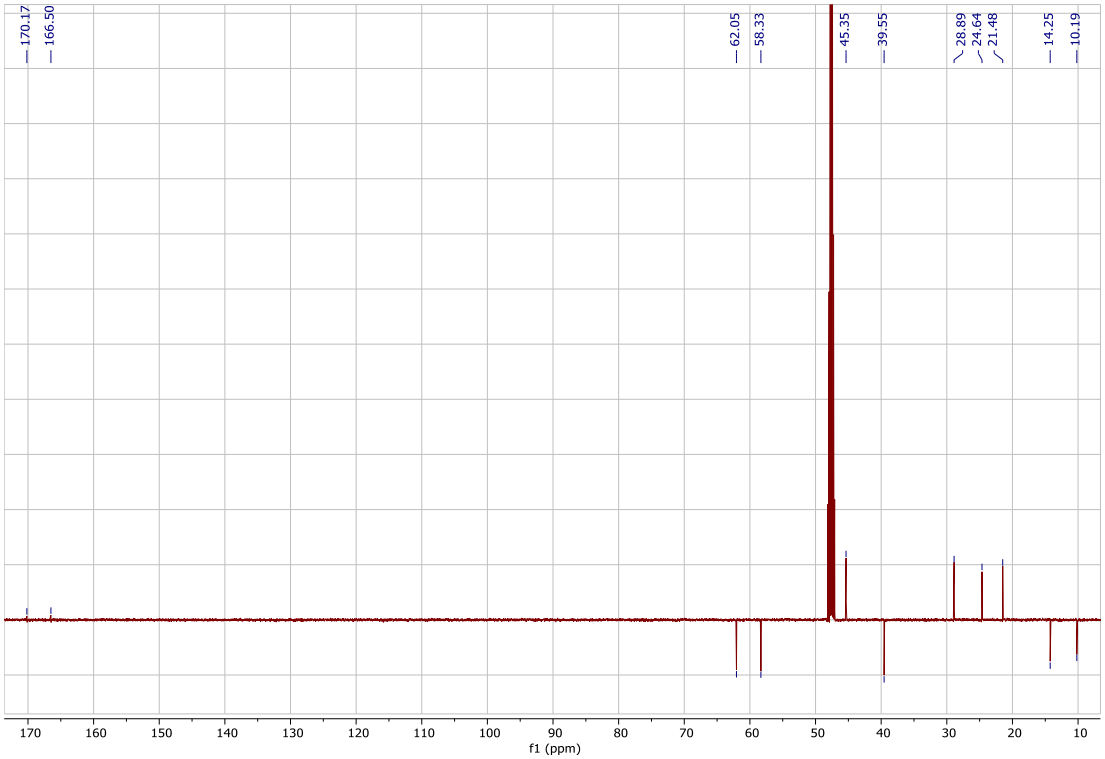
LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 71) $C_{11}H_{18}N_2O_2$ formülünün moleküler iyon piki *m/z* 211.1456 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. $C_{11}H_{18}N_2O_2$ için teorik değer 211.1447 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3. Siklo-D-prolin-L-izolösinin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

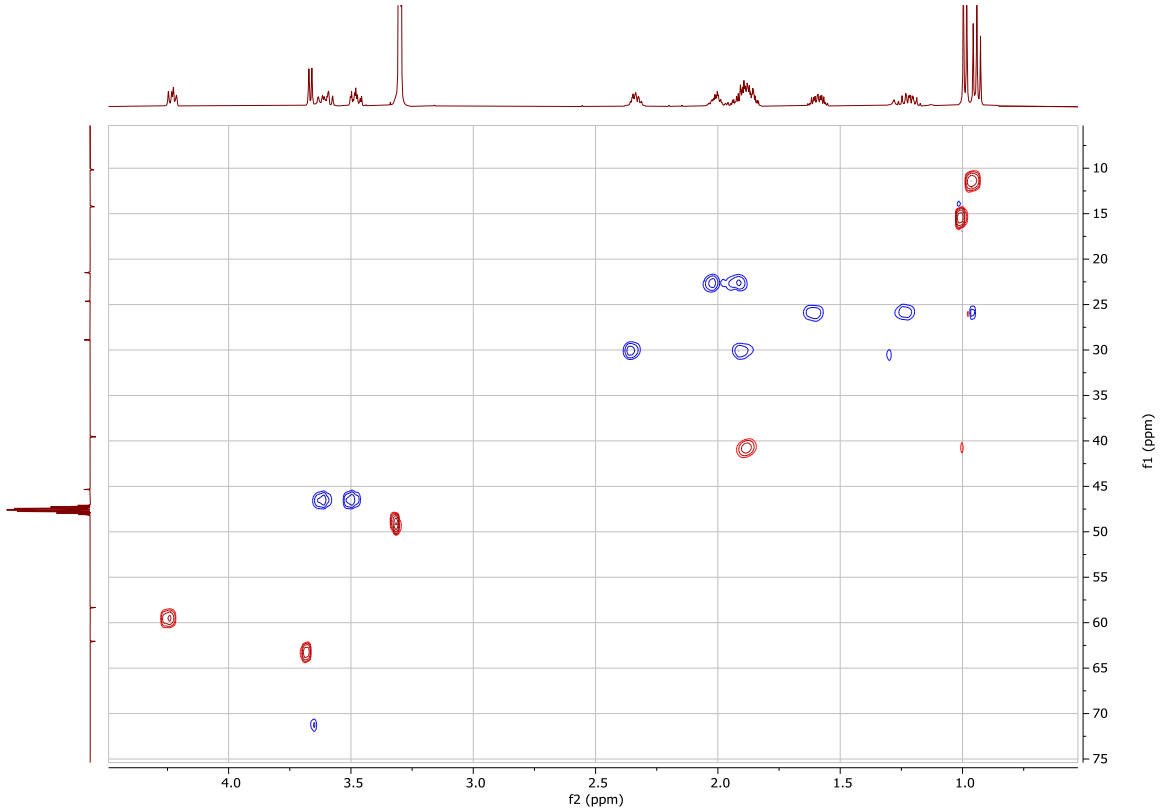
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	164.9	-
2 (N)	-	-	-
3	3.48 (m, 1H) 3.60 (m, 1H)	45.2	C-4, C-5
4	1.89 (m, 1H) 2.02 (m, 1H)	20.9	C-5
5	1.88 (m, 1H) 2.33 (m, 1H)	28.8	C-3, C-4
6	4.23 (dd, *J*=10.1, 6.6 Hz, 1H)	58.0	C-5, C-7
7	-	169.7	-
8 (N)	-	-	-
9	3.67 (d, *J*=6.3 Hz, 1H)	61.7	C-1, C-7, C-10, C-11, C-12, C-13
10	1.86 (m, 1H)	39.3	-
11	1.21 (m, 1H) 1.60 (m, 1H)	24.3	C-9, C-10, C-12, C-13
12	0.93 (t, *J*=7.5 Hz, 3H)	10.0	C-9, C-10, C-11
13	0.99 (d, *J*=6.9 Hz, 3H)	14.0	C-9, C-10, C-11



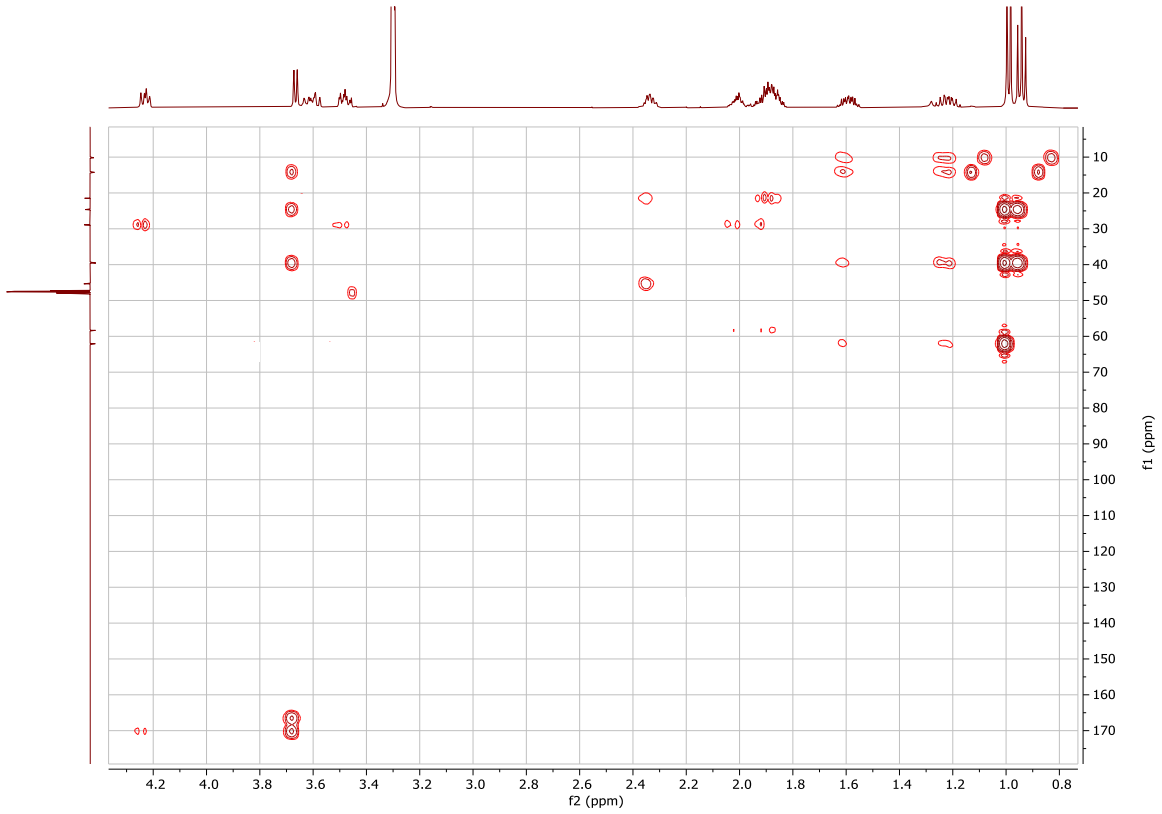
Şekil 67. Siklo-D-prolin-L-izolösinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



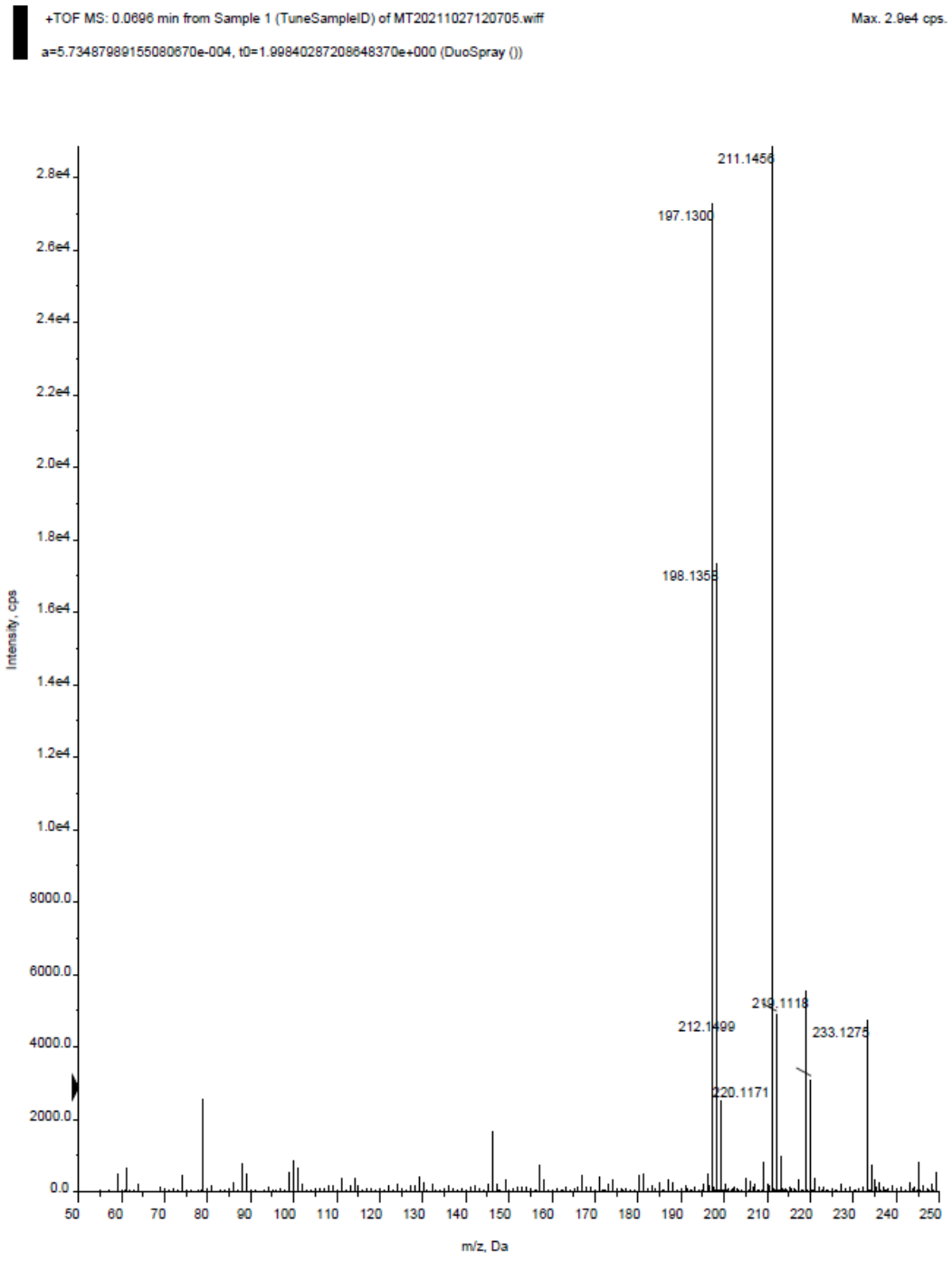
Şekil 68. Siklo-D-prolin-L-izolösinin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 69. Siklo-D-prolin-L-izolösinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

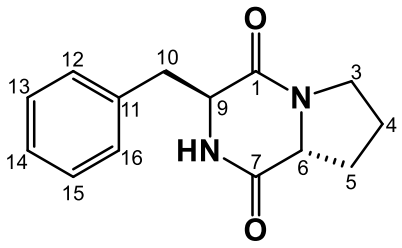


Şekil 70. Siklo-D-prolin-L-izolösinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 71. Siklo-D-prolin-L-izolösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-D-Prolin-L-Fenilalanin (3)



Şekil 72. Siklo-D-prolin-L-fenilalanin.

Bileşik krem renkli toz halindedir. İzole edilen bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri yardımıyla elde edilen verilerle siklo-D-prolin-L-fenilalanin (Şekil 72) olarak belirlenmiştir (Şekil 73-77).

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3298 (NH gerilmesi), 3062 (=C-H gerilmesi), 2928 (-C-H gerilmesi), 1638 (Amit C=O), 1498 (C=C), 1453 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 73), 4.19 ppm (t, *J*=4.6 Hz, 1H, H-9) ve 2.59 ppm'de (dd, *J*=6.1, 5.1 Hz, 1H, H-6) görülen sinyaller amino asitlerin spesifik *α*-hidrojen bölgesinde bulunmaktadır ve bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu belirtmektedir.

HSQC spektrumunda (Şekil 75) 2.59 ppm'de gözlenen *α*-hidrojeninin (H-6) bağlı olduğu karbon atomunun 58.7 ppm'de (C-6) sinyal verdiği belirlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 1.65 ppm (m, 2H, H-4), 1.96 ppm (m, 2H, H-5) ve 3.44 ppm'de (m, 2H, H-3) yer alan sinyaller dikkatle incelendiğinde ve HSQC spektrumundan metilen (CH_2) protonları olduğu anlaşıldığından dipeptit yapısında yer alan amino asitlerden birinin prolin amino asidi olduğu anlaşılmıştır.

Bileşiğin diğer *α*-hidrojenine ait sinyal (H-9) 4.19 ppm'de yer almaktadır. HSQC spektrumundan yararlanılarak bu protonun bağlı olduğu karbonun (C-9) 59.4 ppm'de sinyal verdiği belirlenmiştir. HMBC spektrumu (Şekil 76) incelendiğinde *α*-hidrojeni (H-9) ile 40.5 ppm'de sinyal veren metilen karbonu (CH_2, C-10) ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. C-10 karbonuna ait protonların HSQC spektrumundan yararlanarak 2.98 ve 3.19 ppm'de toplam 2H integral değerinde dd sinyaller veren metilen protonları olduğu anlaşılmaktadır.

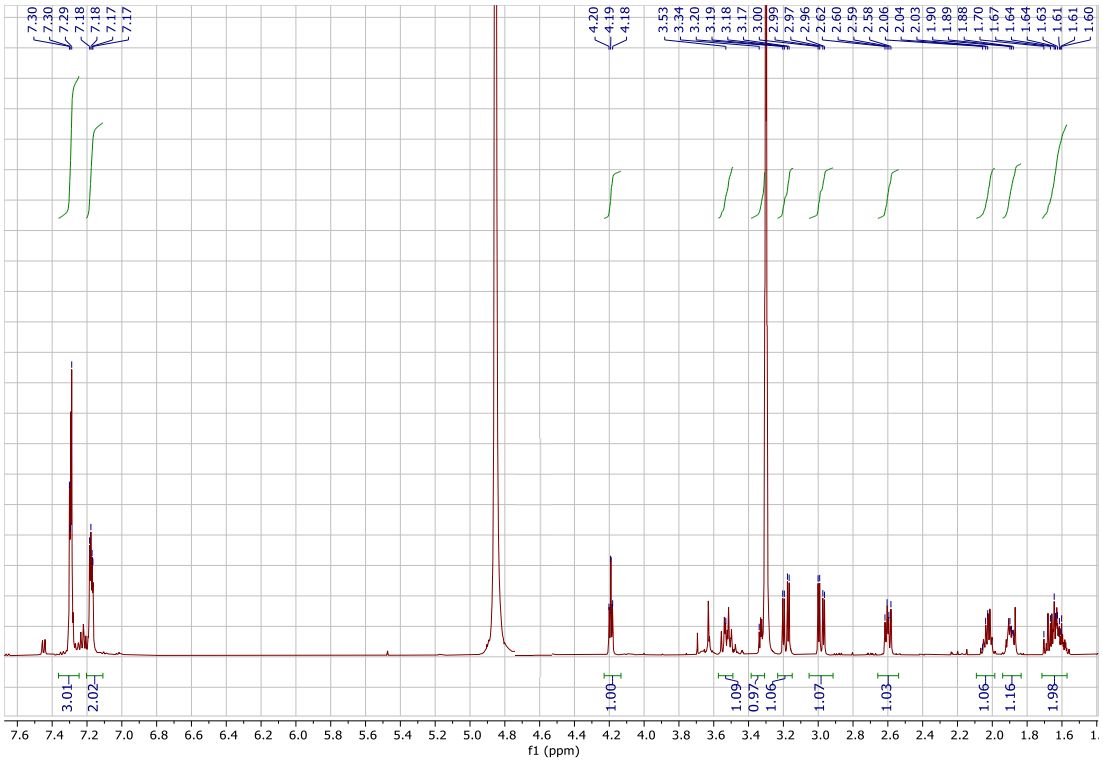
Aromatik halka protonlarının sinyal bölgesinde, 7.15-7.32 ppm'de 5H integral değerinde multiplet yarılmaya sahip sinyal grubu yer almaktadır. Spektrumlardan sağlanan veriler bileşikte fenil grubu varlığını kanıtlamaktadır. HMBC spektrumundan metilen (H-10) protonlarının 136.8 ppm (C-11), 129.2 ppm (C-12), 166.9 ppm (C-1) değerlerinde sinyal veren karbon atomları ile korelasyonu gözlenmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde dipeptit bileşiğin yapısında yer alan diğer amino asidin fenilalanin olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen spektral veriler literatür ile uyum göstermektedir (166).

LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 77) $C_{14}H_{16}N_2O_2$ için moleküler iyon piki *m/z* 245.1282 $[M+H]^+$ görülmüştür. Bileşiğin $C_{14}H_{17}N_2O_2$ formülü için teorik değer 245.1290 olarak hesaplanmıştır.

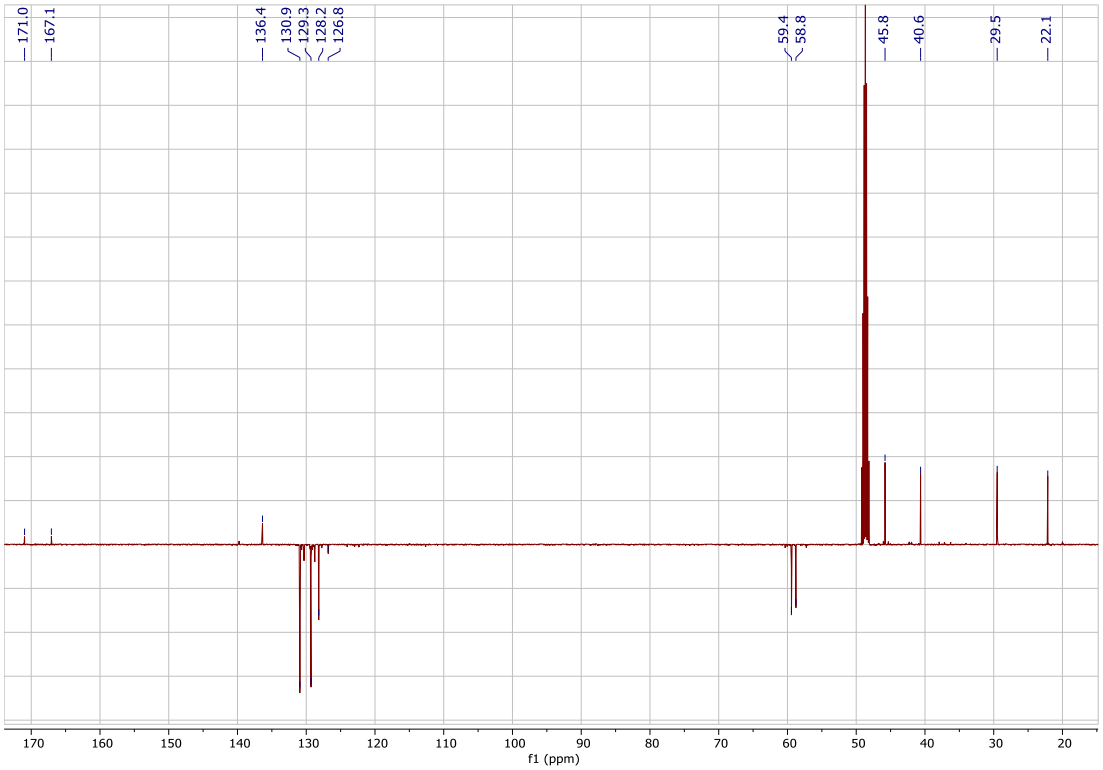
Tablo 4. Siklo-D-prolin-L-fenilalanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	166.9*	-
2 (N)	-	-	-
3	3.34 (m, 1H) 3.53 (m, 1H)	45.7	C-4, C-5
4	1.63 (m, 1H) 1.67 (m, 1H)	22.1	C-3, C-5, C-6
5	1.89 (m, 1H) 2.02 (m, 1H)	29.3	C-3, C-4, C-6, C-7
6	2.59 (dd, *J*=10.9, 6.5 Hz, 1H)	58.6	C-1, C-5, C-7
7	-	170.8*	-
8 (N)	-	-	-
9	4.19 (t, *J*=4.8 Hz, 1H)	59.3	C-10
10	2.98 (d, *J*=4.7 Hz, 1H) 3.19 (d, *J*=4.7 Hz, 1H)	40.5	C-1, C-9, C-11, C-12
11	-	136.7	-
12	7.15-7.32 (m, 5H)	129.2	C-10, C-11
13		128.0	C-12, C-14
14		126.7	C-13, C-15
15		128.0	C-11, C-16
16		129.2	C-10, C-11, C-12

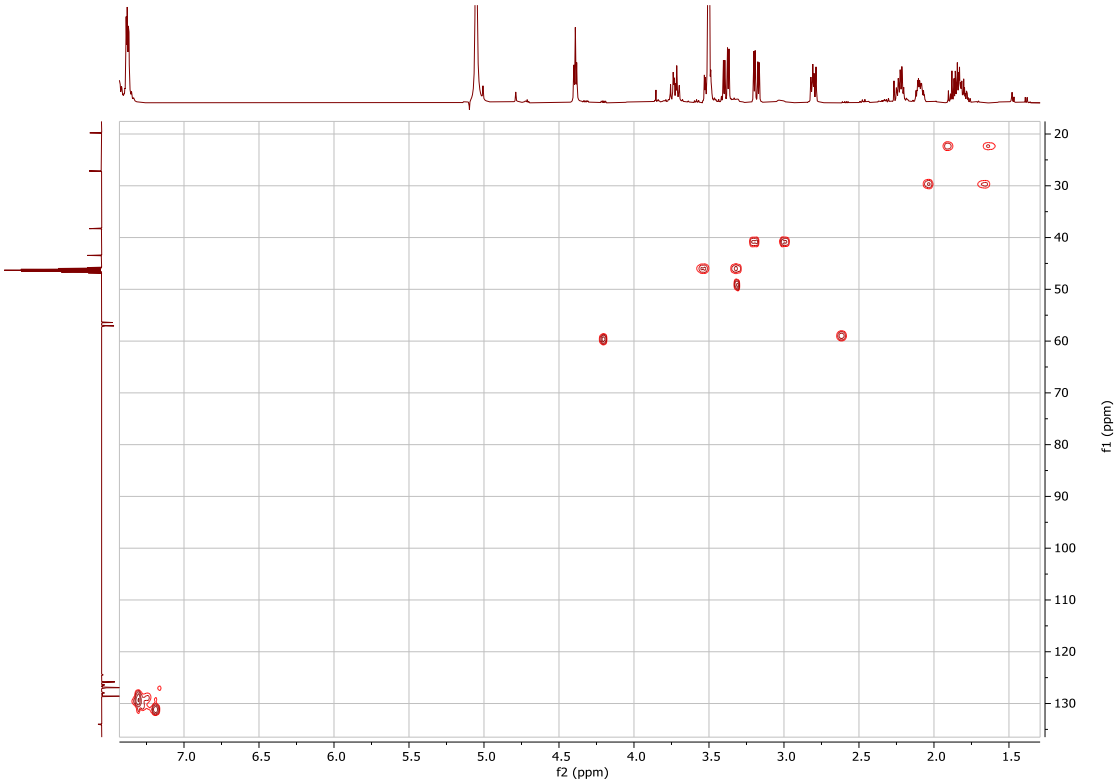
*İşaret ile belirtilen kuaterner karbonlar HMBC'den belirlenmiştir.



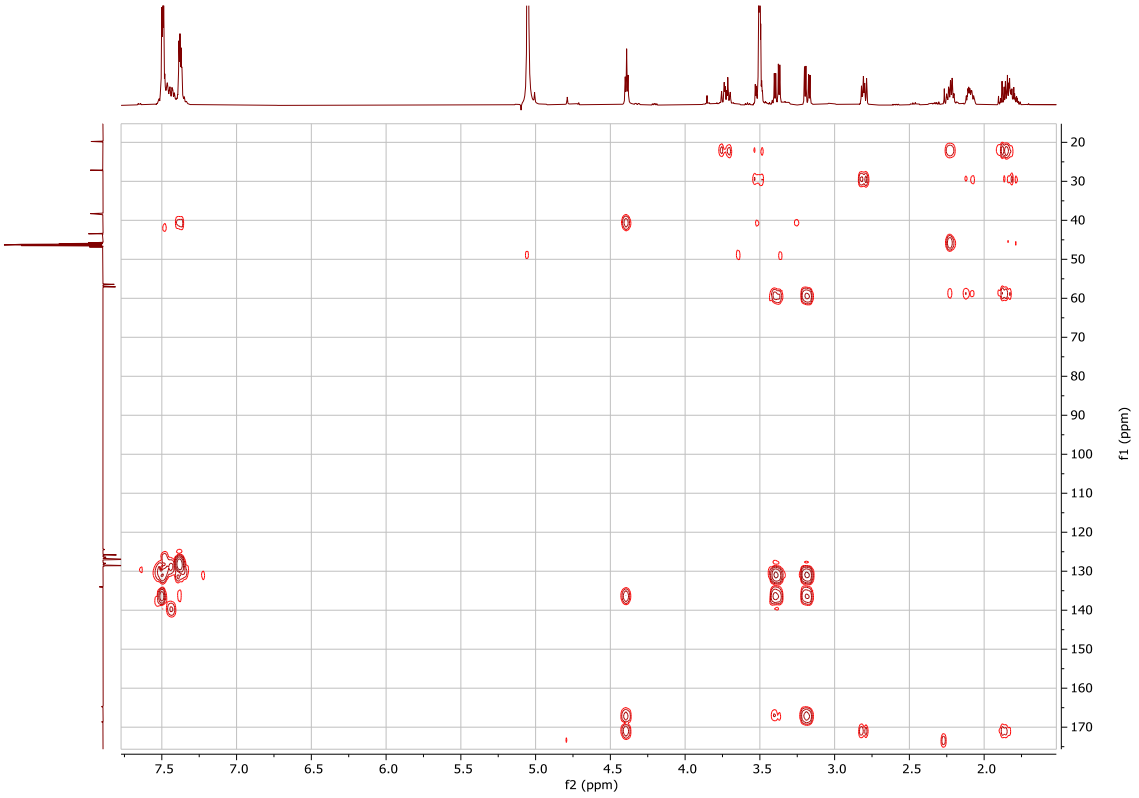
Şekil 73. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



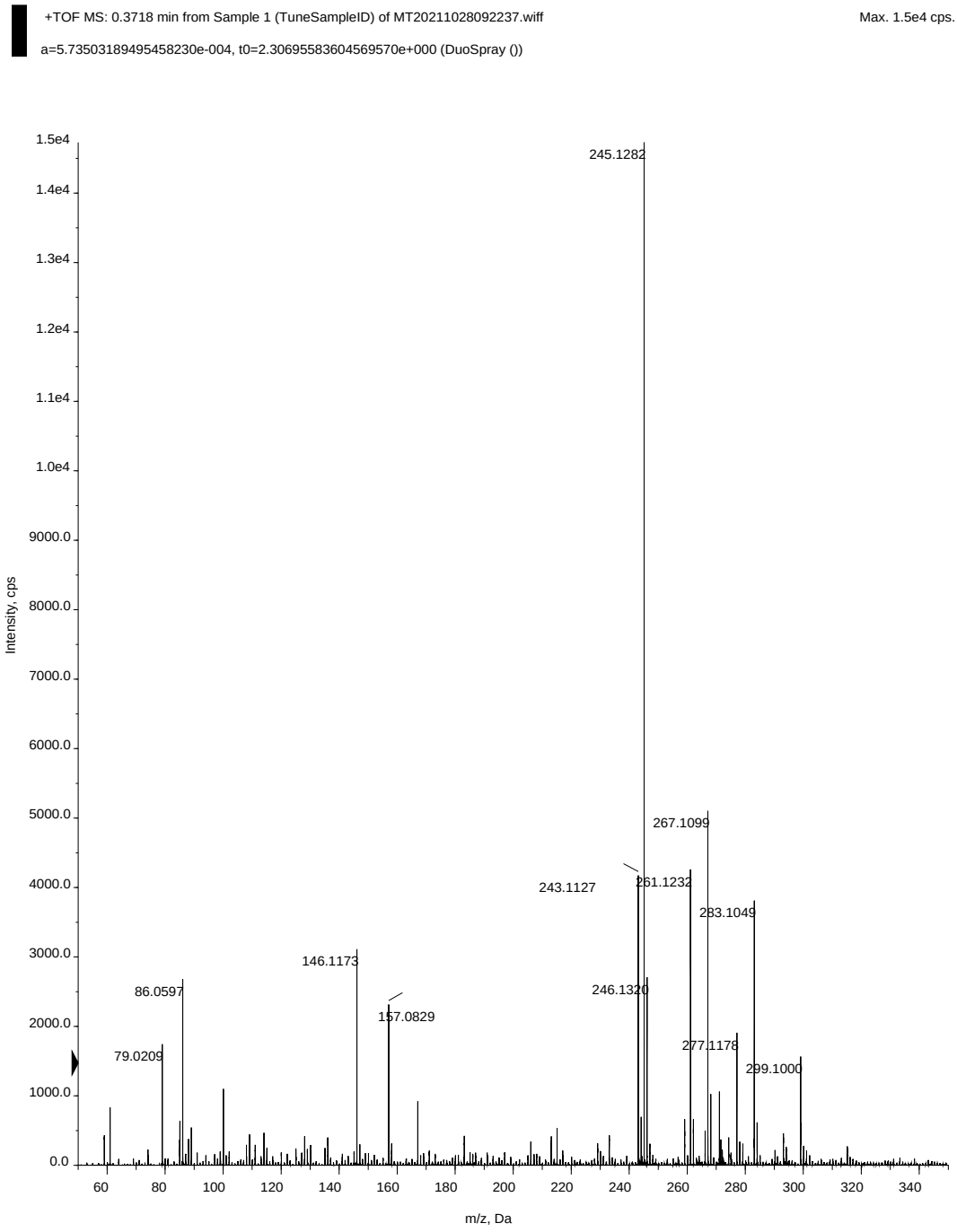
Şekil 74. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 75. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

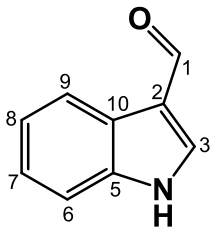


Şekil 76. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 77. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

İndol-3-karboksaldehit (4)



Şekil 78. İndol-3-karboksaldehit.

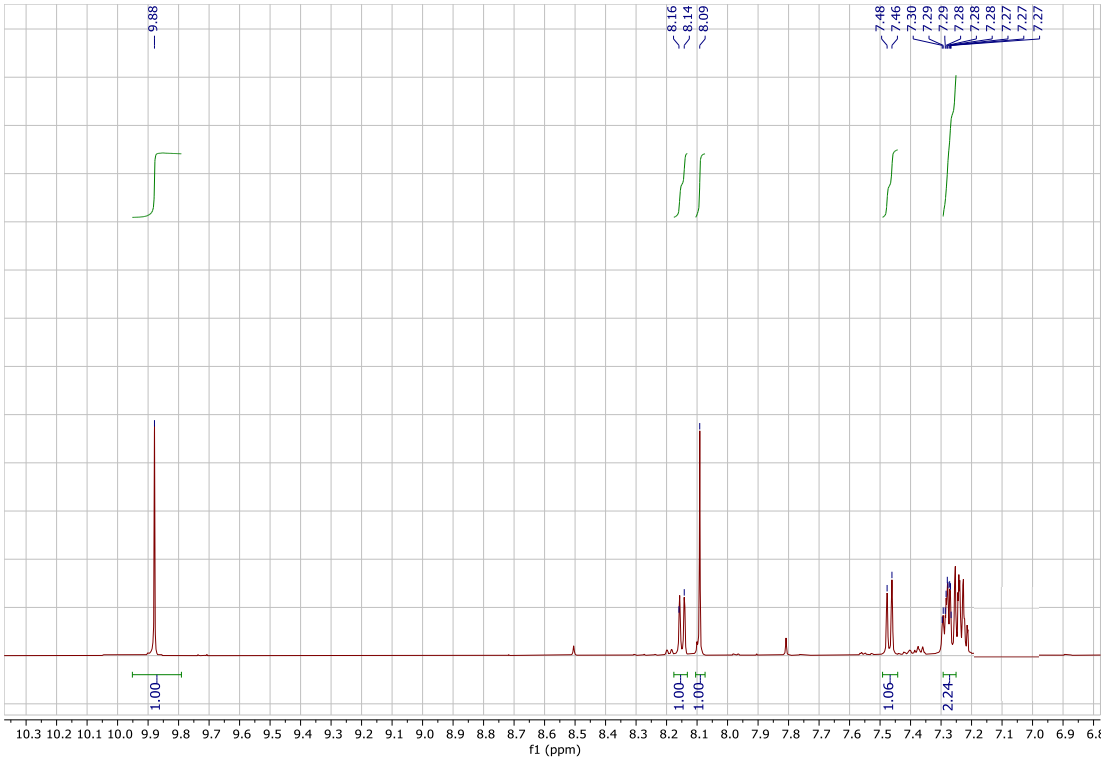
Bileşiğin görünümü krem renginde amorf formundadır. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden sağlanan veriler doğrultusunda, indol-3-karboksaldehit (Şekil 78) olarak belirlenmiştir (Şekil 79-83).

^{1}H-NMR, δ_H (ppm, CD_3OD, 500 MHz) 9.88 (s, 1H, H-1), 8.14 (d, *J*=7.4 Hz, 1H, H-9), 8.08 (s, 1H, H-3), 7.47 (d, *J*=7.4 Hz, 1H, H-6), 7.28 (d, *J*=5.4 Hz, 1H, H-8) 7.24 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, H-7).

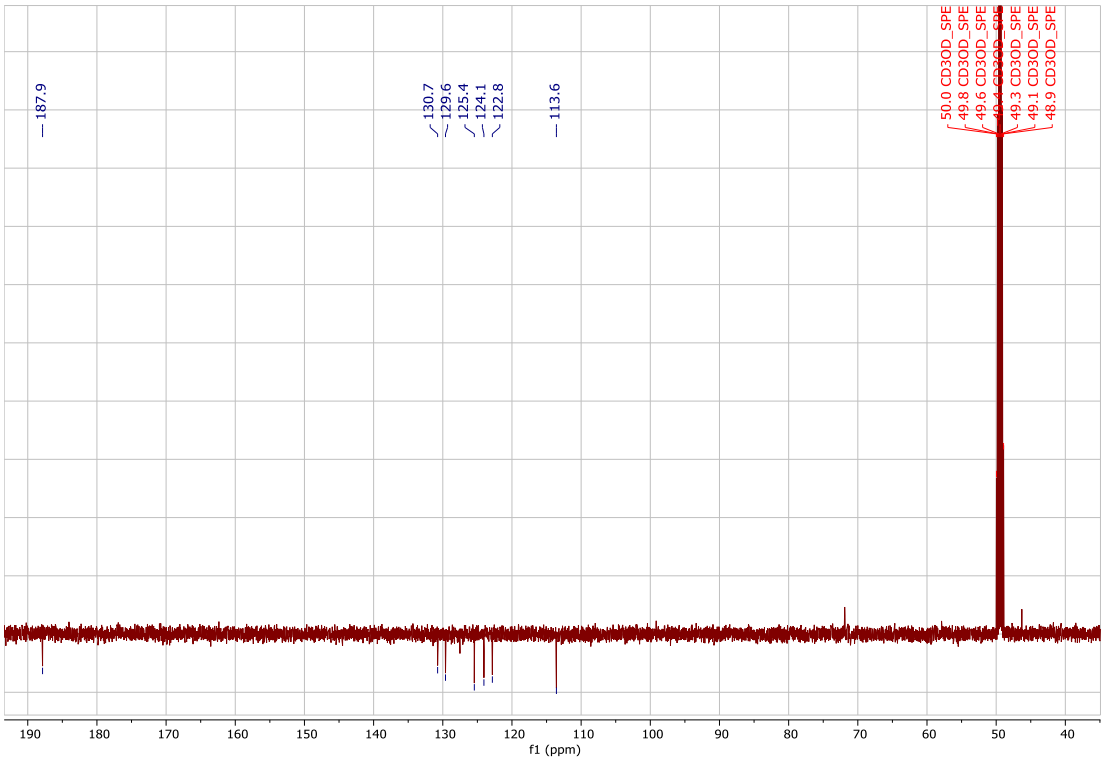
^{13}C-NMR, δ_C (ppm, CD_3OD, 125 MHz) 187.9 (C-1), 138.7 (C-3), 137.4 (C-5), 125.1 (C-10), 124.5 (C-8), 124.1 (C-7), 122.8 (C-9), 118.7 (C-2), 113.6 (C-6).

Bileşiğe ait HMBC spektrumundan (Şekil 82) H-1 protonunun 129.6 ppm (C-10) karbonuyla, 118.7 ppm'de yer alan karbon (C-2) ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. 8.08 ppm'de sinyal veren singlet yarılma gösteren protonun (H-3), 137.4 ppm'de sinyal veren (C-5) karbon, 129.6 ppm'de sinyal veren karbon ile (C-10) ve 118.7 ppm'de sinyal veren karbon ile (C-2) korelasyon göstermektedir. 7.46 ppm'de sinyal veren protonun (H-6) 124.1 ppm (C-7), 125.4 ppm'deki karbon (C-8) ve 129.6 ppm'deki karbon (C-10) ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. 8.14 ppm'de gözlenen protonun (H-9) C-10 ve 124.1 ppm'de sinyal veren karbon (C-7) ile korelasyonu görülmüştür. Spektrumlardan elde edilen bilgilerle bileşiğin yapısı indol-3-karboksaldehit olarak aydınlatılmıştır. Spektral veriler literatür ile uyumludur (167).

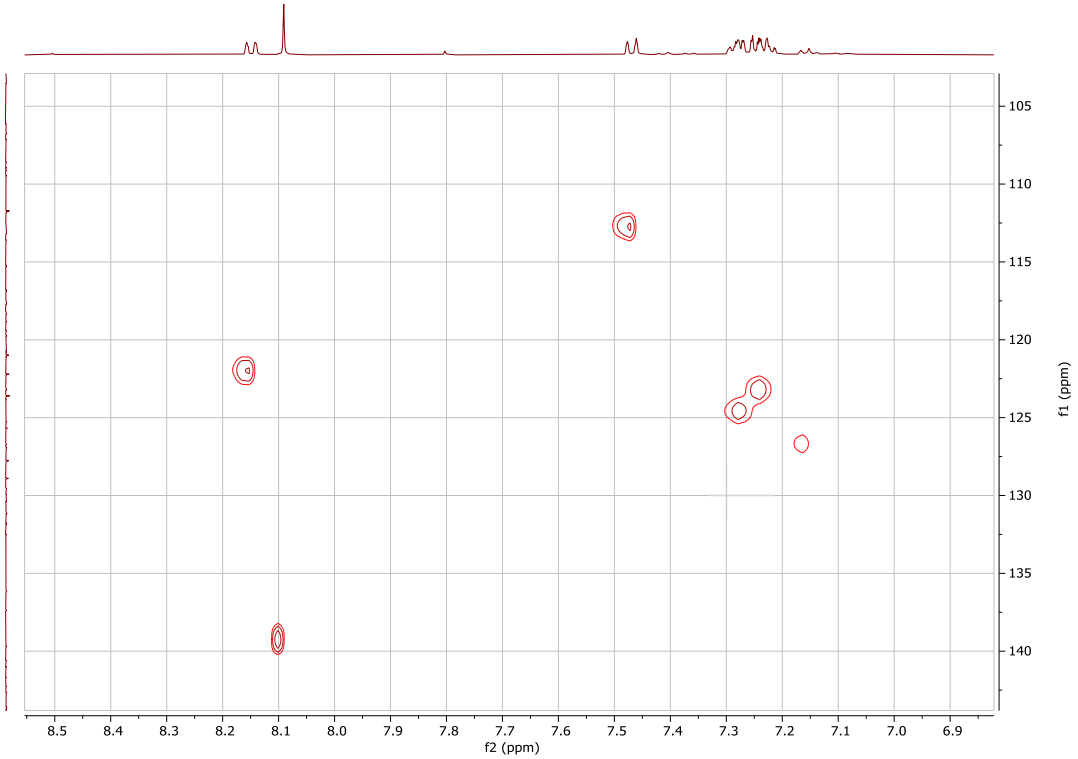
LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 83) $C_9H_7NO_2$ için moleküler iyon piki *m/z* 146.0603 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. Bileşiğe ait $C_9H_7NO_2$ kapalı formülü için teorik değer 146.0606 olarak hesaplanmıştır.



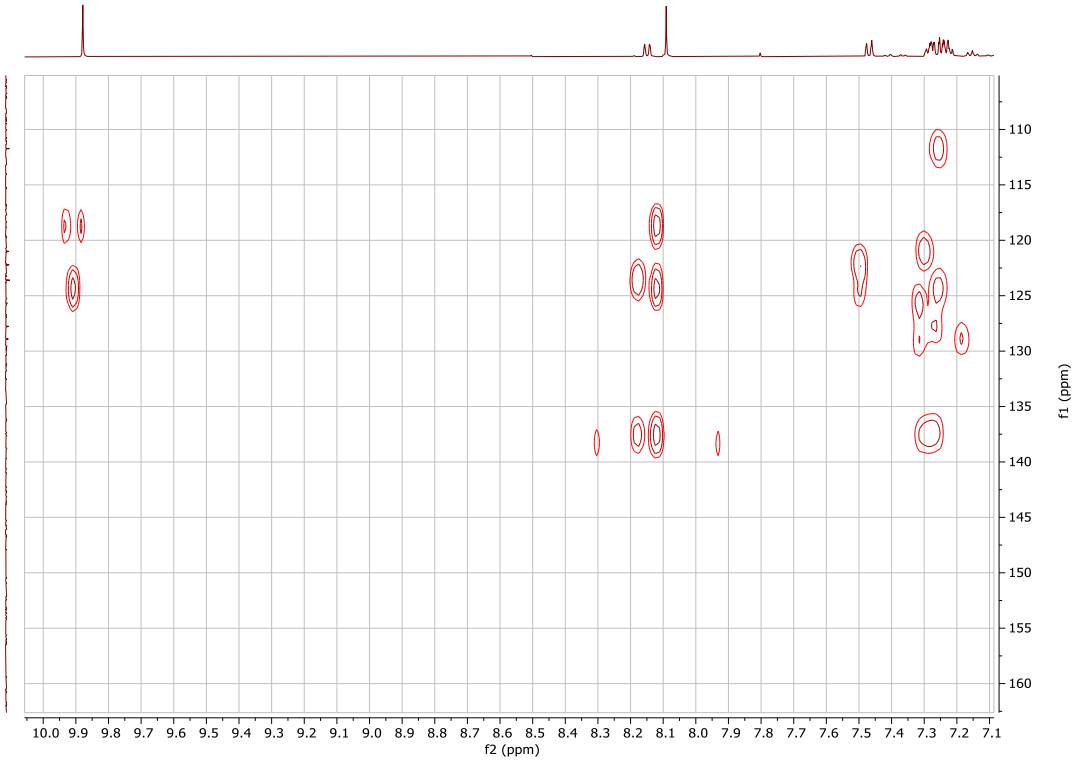
Şekil 79. İndol-3-karboksaldehitin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



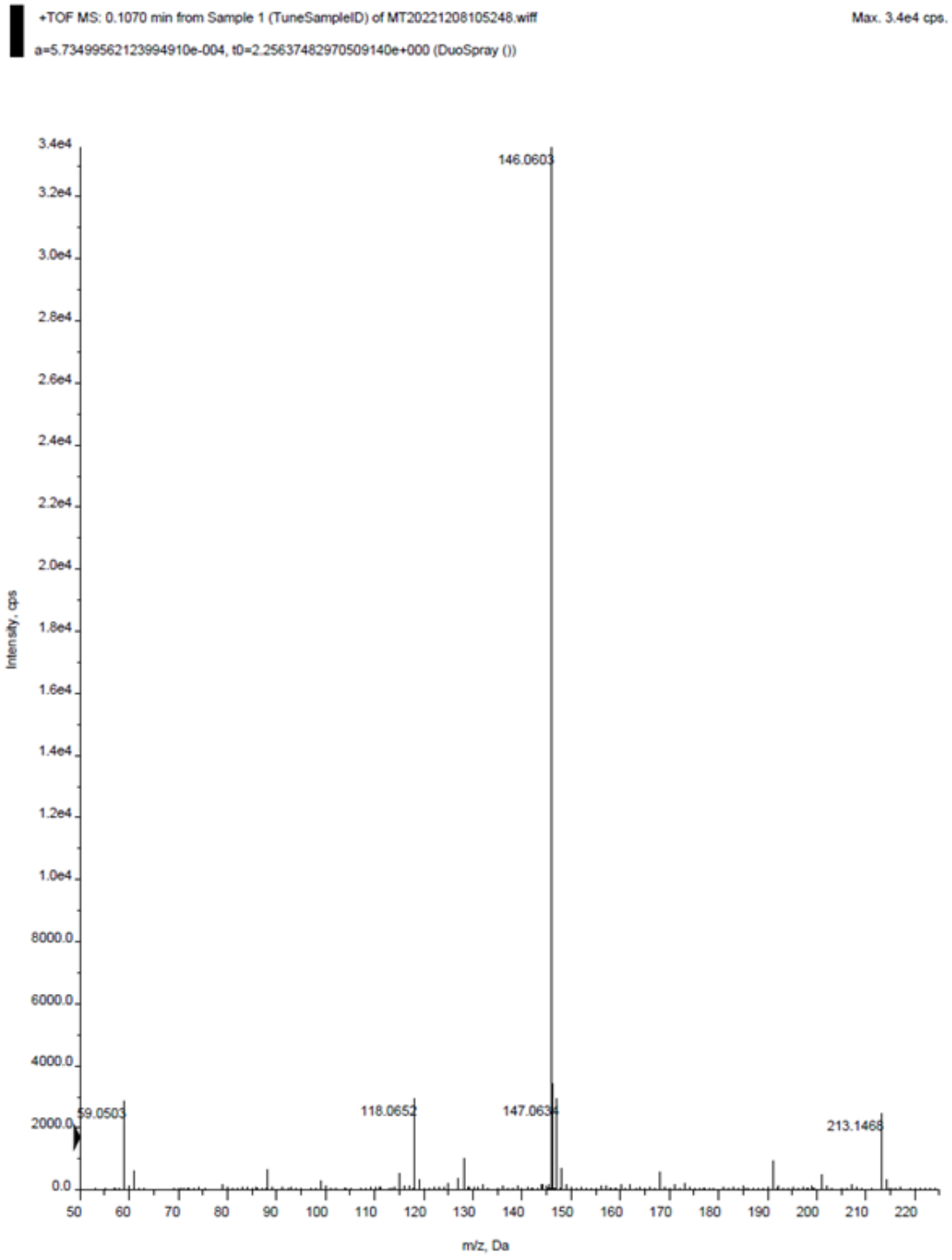
Şekil 80. İndol-3-karboksaldehitin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 81. İndol-3-karboksaldehitin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

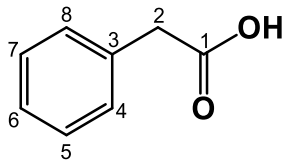


Şekil 82. İndol-3-karboksaldehitin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 83. İndol-3-karboksaldehitin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

2-Fenilasetik Asit (5)



Şekil 84. 2-Fenilasetik asit.

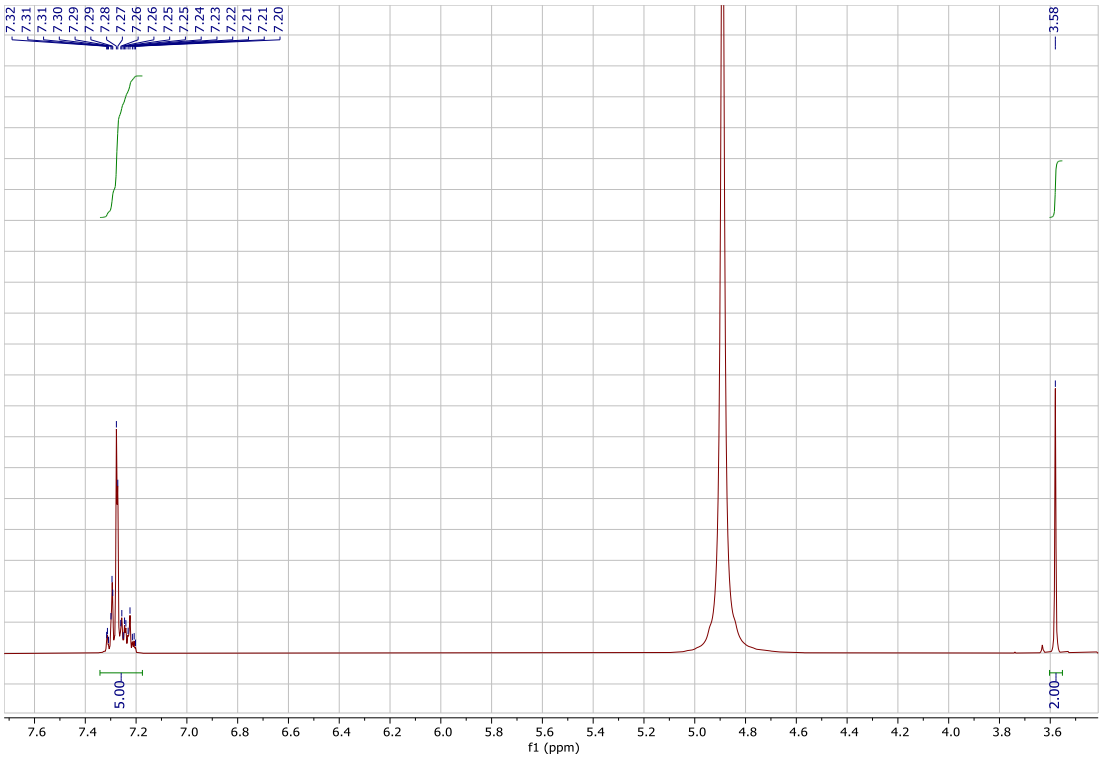
Renksiz amorf formdaki bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edilen verilerle 2-fenilasetik asit (Şekil 84) olarak belirlenmiştir (Şekil 85-88).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 85), 3.58 ppm'de (H-2) görülen singlet (2H) metilen protonlarını ifade etmektedir. ^{13}C-NMR spektrumunda (Şekil 86) 174.6 ppm'de görülen sinyal karboksilli asit karbonil karbonunu işaret etmektedir. Aromatik proton bölgesinde görülen 7.19-7.32 ppm'deki (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8) 5H integral değerindeki multiplet sinyal fenil halkasının varlığını kanıtlamaktadır. DEPT spektrumu (Şekil 87) incelendiğinde bileşiğin yapısında bir metilen karbonu ve üç farklı metin karbonu sinyali gözlenmiştir. ^{13}C-NMR spektrumunda bileşiğin kuarterner karbonları 174.6 ppm (C-2) ve 134.8 ppm (C-3) değerlerinde gözlenmiştir. Bu verilerden yararlanarak molekülün yapısı 2-fenilasetik asit olarak açıklanmıştır. Elde edilen veriler literatür ile kıyaslandığında, uyum gösterdiği görülmüştür (168).

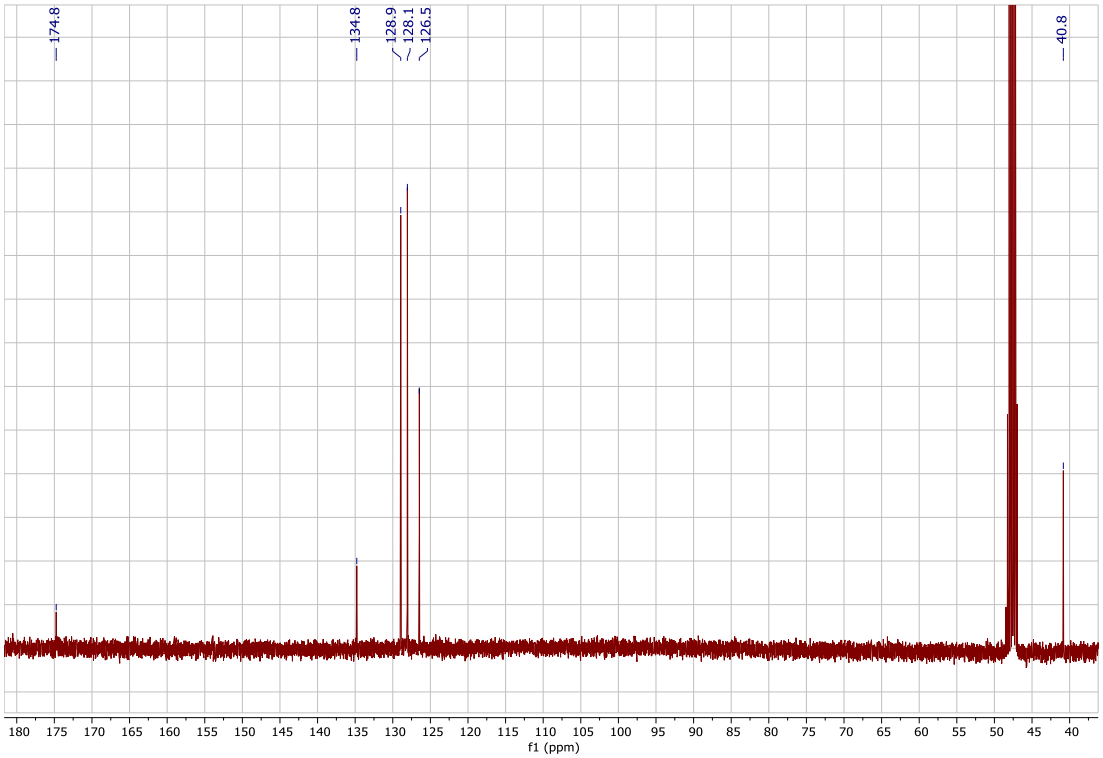
Bileşiğin Şekil 88'de yer alan kütle spektrumunda $C_8H_8O_2$ formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 135.0451 $[M-H]^-$ değerinde görülmüştür. $C_8H_8O_2$ formülü için teorik değer 135.0446 olarak bulunmuştur.

Tablo 5. 2-Fenilasetik asit molekülünün 1D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

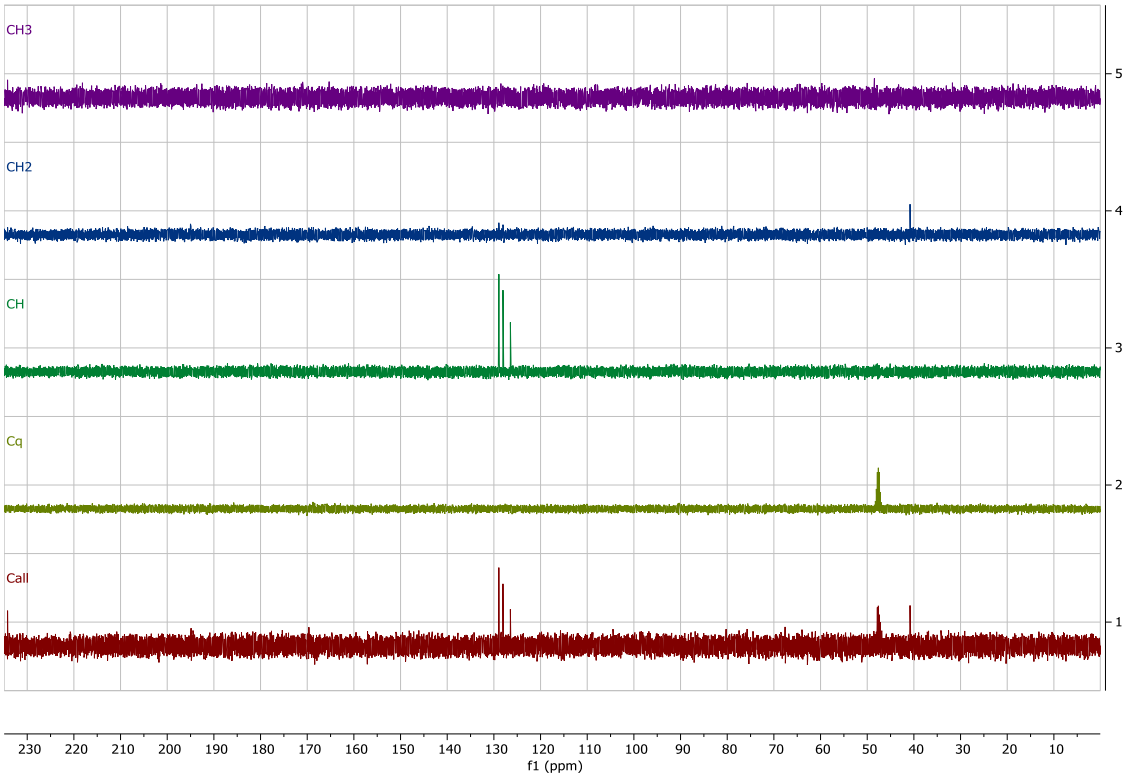
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	174.8
2	3.58 (s, 2H)	40.9
3	7.19-7.32 (m, 5H)	134.8
4		128.9
5		128.1
6		126.5
7		128.1
8		128.9



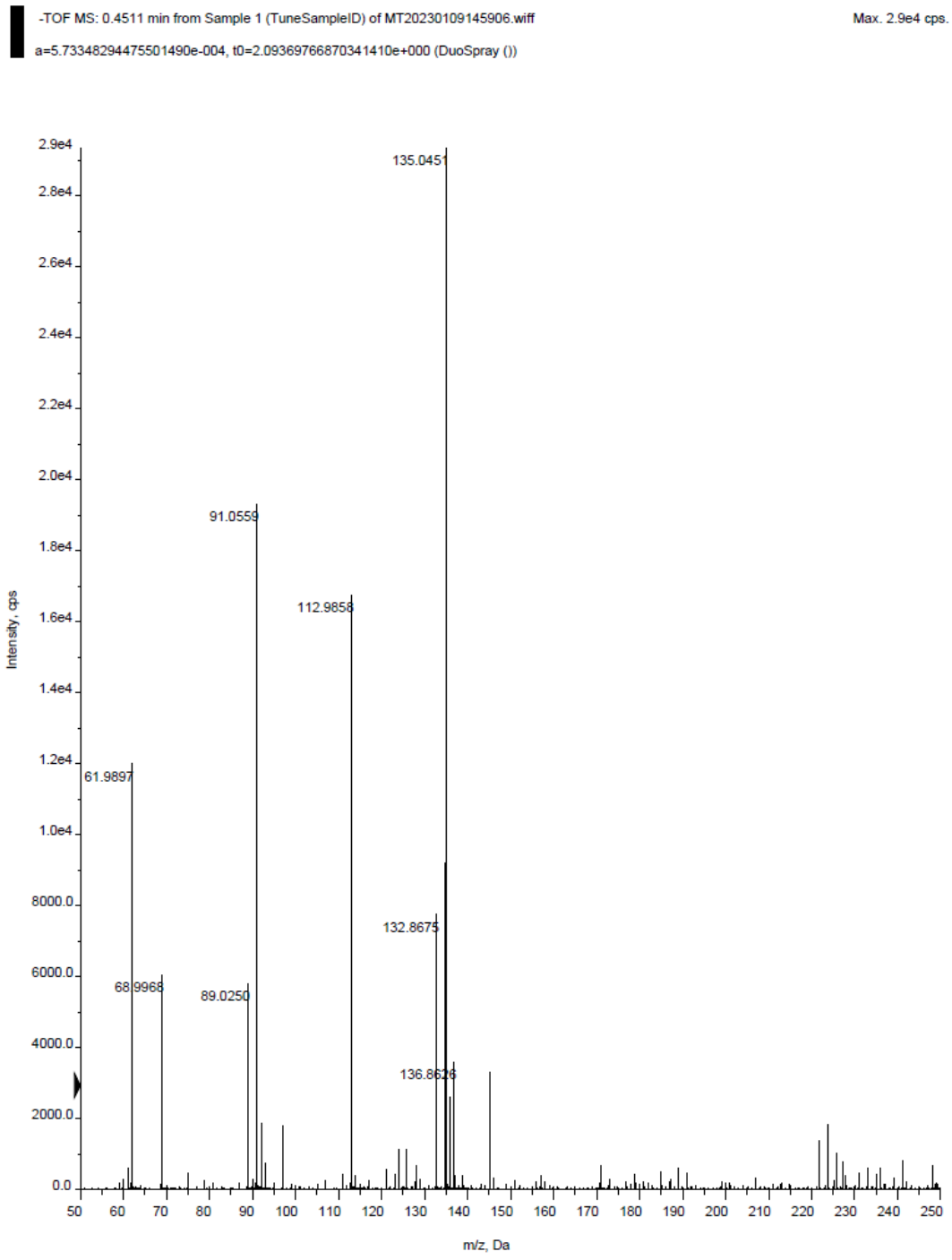
Şekil 85. 2-Fenilasetik asitin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 86. 2-Fenilasetik asitin ^{13}C-NMR spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).

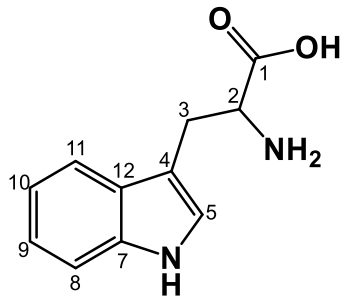


Şekil 87. 2-Fenilasetik asitin DEPT spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).



Şekil 88. 2-Fenilasetik asitin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

L-Triptofan (6)



Şekil 89. L-triptofan.

Krem renkli toz halindeki bileşiğin yapı aydınlatma çalışmaları ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT ve LC-Q-TOF-MS teknikleri ile elde edilen verilerle gerçekleştirilmiş L-triptofan (Şekil 89) olarak belirlenmiştir (Şekil 90-92).

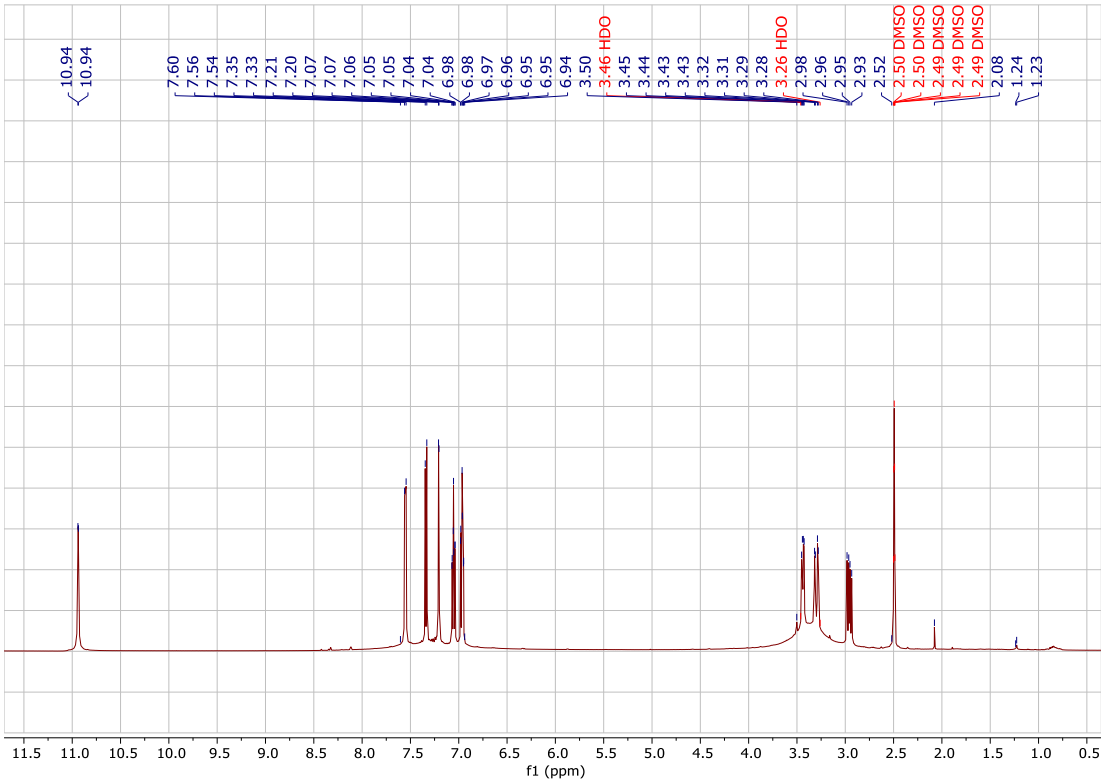
^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 90), 3.46 ppm'de (dd, *J*=8.9, 4.1 Hz, 1H, H-2) *α*-hidrojen sinyali yer almaktadır. Bu bölgedeki bu tek sinyal bileşiğin amino asit yapısında olduğunu göstermektedir.

7.20 ppm'de gözlenen singlet (H-5) protonunun varlığı, 7.33 (d, *J*= 8.2 Hz, H-8) ve 7.55 (d, *J*= 8.2 Hz, H-11) ppm'de gözlenen dubletler ve 7.05 (t, *J*=8.0 Hz, H-9) ppm, 6.96 (t, *J*=8.0 Hz, H-10) pmm'de gözlenen tripletlerin triptofan halkasındaki AA'BB' sistemindeki protonları işaret ettiği anlaşılmıştır. 3.29 ve 2.95 ppm (m, H-3) sinyalleri bir -CH_2 grubunu ifade ederken bu grubun karbon atomu ise ^{13}C-APT spektrumunda 27.1 ppm'de (C-3) sinyal vermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda bileşiğin yapısı L-triptofan olarak aydınlatılmıştır. Spektral veriler, literatür ile kıyaslandığında, molekülün L-triptofan olduğu belirlenmiştir (169).

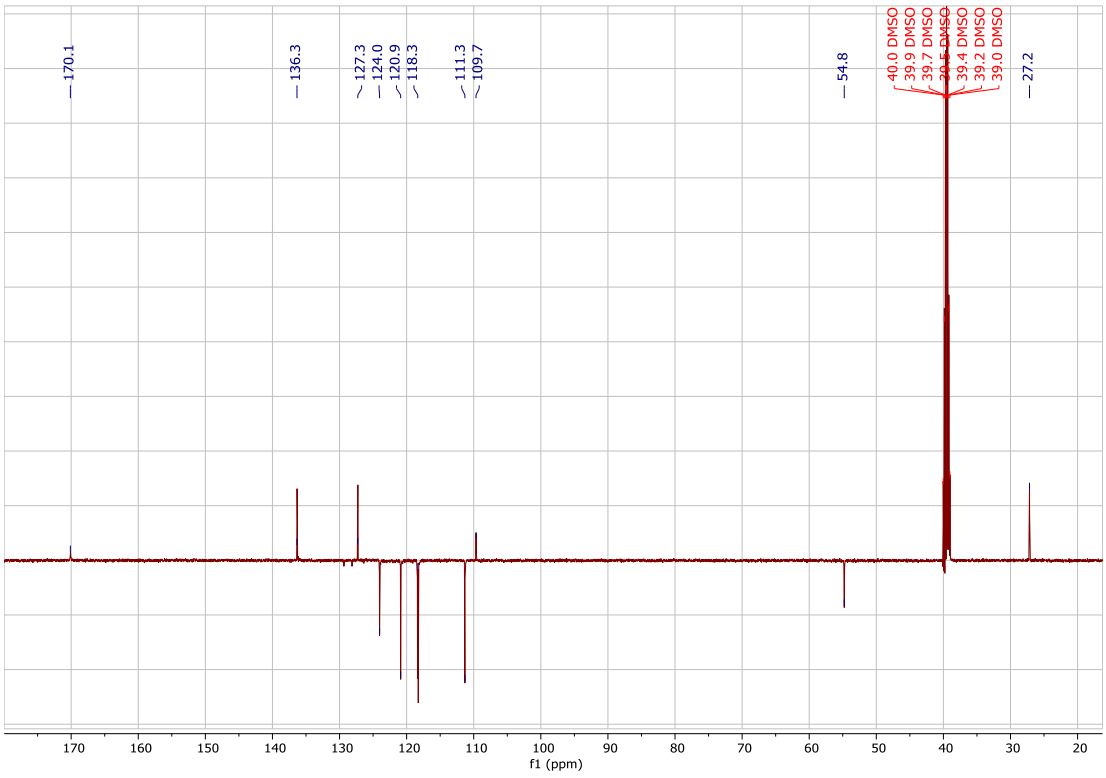
Kütle spektrumunda $C_{10}H_{16}N_2O_2$ için moleküler iyon piki *m/z* 205.1008 $[M+H]^+$ sinyalini vermiştir. $C_{10}H_{16}N_2O_2$ bileşiğine ait teorik değer 205.0977 olarak bulunmuştur (Şekil 92).

Tablo 6. L-triptofan molekülünün ^{1}H-NMR ve ^{13}C-APT değerleri (DMSO-d_6, 500 MHz).

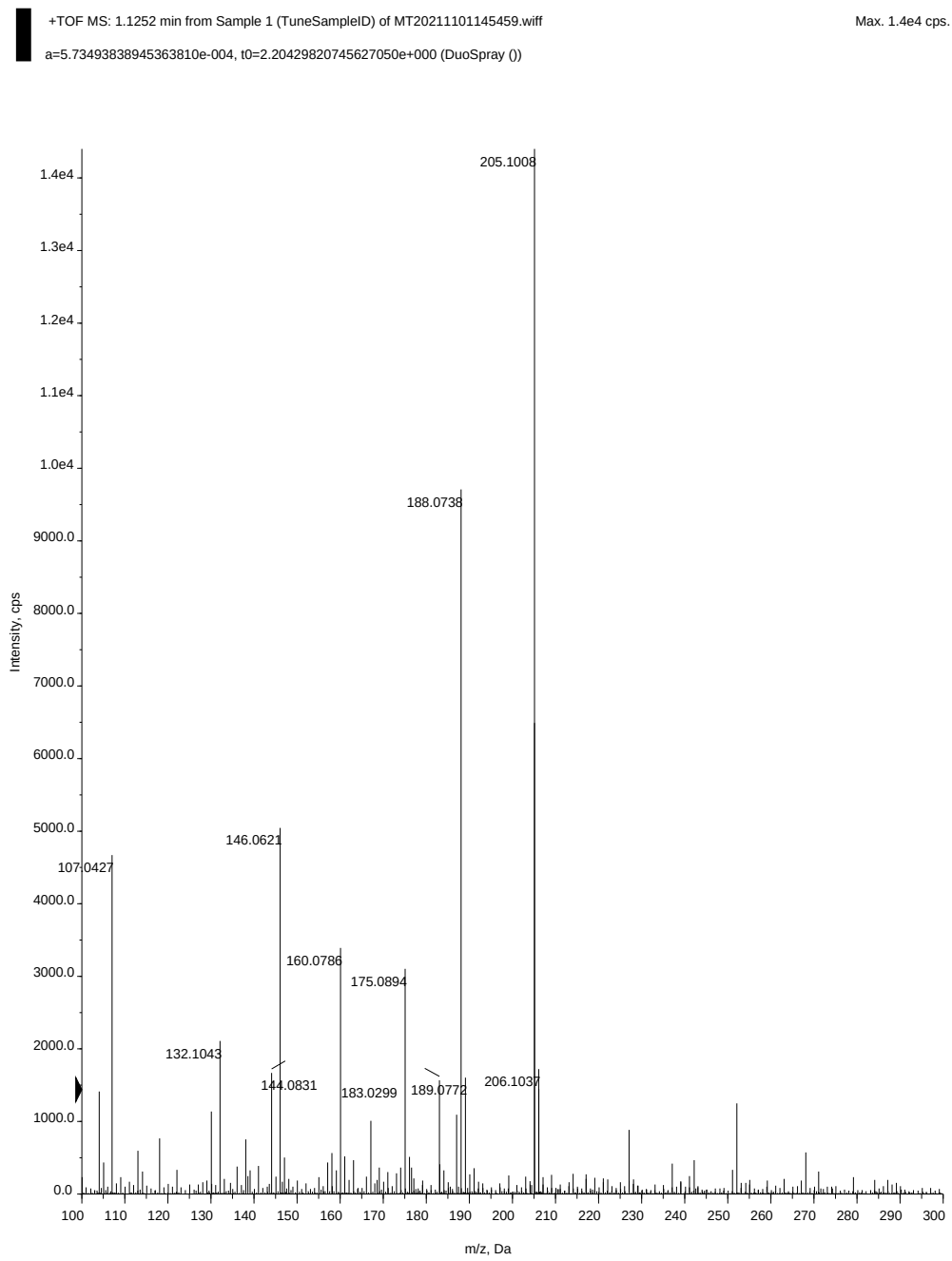
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	170.1
2	3.46 (dd, *J*=8.9, 4.1 Hz, 1H)	54.7
3	3.0 (d, *J*=4.1 Hz, 1H) 2.5 (d, *J*=4.1 Hz, 1H)	27.1
4	-	109.6
5	7.20 (s, 1H)	124.0
6 (N)	-	-
7	-	136.3
8	7.33 (d, *J*=8.2 Hz, 1H)	111.3
9	7.05 (t, *J*=8.0 Hz, 1H)	124.0
10	6.96 (t, *J*=8.0 Hz, 1H)	118.2
11	7.55 (d, *J*=8.2 Hz, 1H)	118.3
12	-	127.2



Şekil 90. L-triptofanın ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d$_6$, 500 MHz).

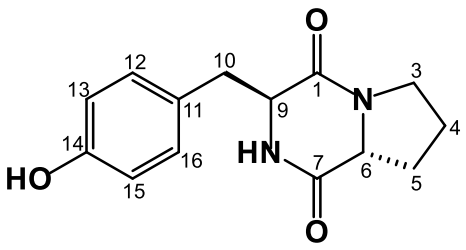


Şekil 91. L-triptofanın ^{13}C-APT spektrumu (DMSO-d$_6$, 125 MHz).



Şekil 92. L-triptofanın LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-D-Prolin-L-Tirozin (7)



Şekil 93. Siklo-D-prolin-L-tirozin.

Saydam renksiz kristaller görünümlü bileşiğin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edilen verilerle siklo-D-prolin-L-tirozin (Şekil 93) olduğu anlaşılmıştır (Şekil 94-98).

IR (ATR) V_{max} (cm^{-1}) 3278 (yayvan OH), 3048 (=C-H gerilmesi), 2956 (-C-H gerilmesi), 1636 (Amit C=O), 1512 (C=C).

^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 94) göz önüne alındığında amino asitler için spesifik *α*-hidrojen bölgesinde yer alan 4.13 (dd, *J*=10.4, 5.9 Hz, 1H, H-9) ve 2.61 (dd, *J*=6.3, 4.8 Hz, 1H, H-6) ppm'deki sinyaller bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu göstermektedir. 2.61 ppm'de, *α*-hidrojenine (H-6) bağlı karbonun kayma değeri HSQC spektrumunda (Şekil 97), 58.9 ppm'de (C-6) sinyal verdiği görülmüştür. HSQC spektrumunda 1.65 ppm (m, 1H, H-4a) ve 1.89 ppm (m, 1H, H-4b) sinyal veren protonların 21.1 ppm'de (C-4), 1.65 ppm (m, 1H, H-5a) ve 2.05 ppm (m, 1H, H-5b) değerlerinde sinyal veren protonların 24.4 ppm'de (C-5), 3.33 ppm (m, 1H, H-3a) ve 3.53 ppm'de (m, 1H, H-3b) sinyal veren protonların 44.6 ppm'de (C-3) sinyal veren karbon atomlarına bağlı olduğu belirlenmiştir. ^{13}C-APT spektrumunda (Şekil 95) C-4, C-5 ve C-3 karbonlarının metilen karbonları olduğu anlaşıldığından dolayı dipeptit yapısında prolin amino asidinin yer aldığı belirlenmiştir.

Molekülün diğer *α*-hidrojenine ait (H-9) sinyal 4.13 ppm'de görülmüştür. HSQC spektrumu incelenerek bu protona bağlı karbonun (C-9) 59.9 ppm'de sinyal verdiği belirlenmiştir.

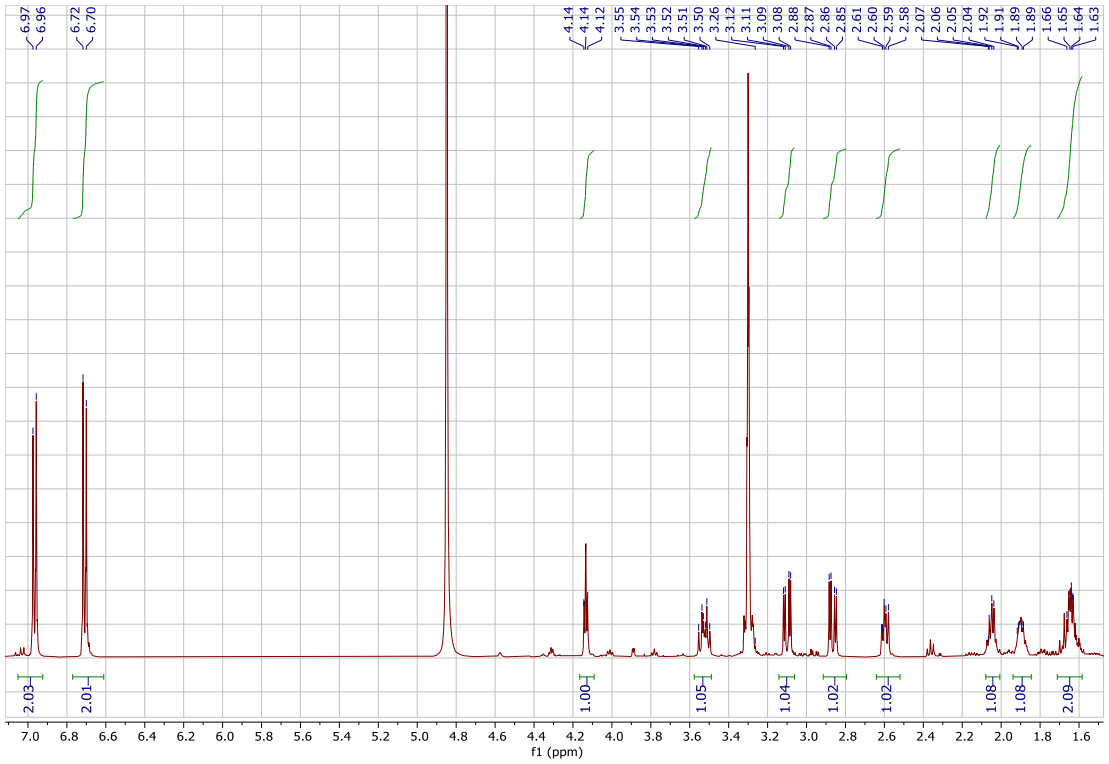
Aromatik halka protonları için karakteristik sinyal bölgesinde, 6.75 ppm ve 6.97 ppm'de yer alan sinyallerin hem dublet yarılma göstermesi hem de eşleşme sabiti değerinin 8.5 Hz olması *orto* etkileşim varlığını, protonların 2H integral değerine sahip olması ise aromatik halkada simetri varlığını ifade etmektedir. Aromatik

halkada *para* pozisyonunda bir fonksiyonel grubun varlığının anlaşılması ve IR'de gözlenen -OH sinyali sayesinde diketopiperazin yapısındaki diğer amino asidin tirozin olduğu anlaşılmıştır. Böylece bileşiğin yapısı siklo-D-prolin-L-tirozin olarak açıklanmıştır. Elde edilen veriler literatür ile uyum göstermiştir (170).

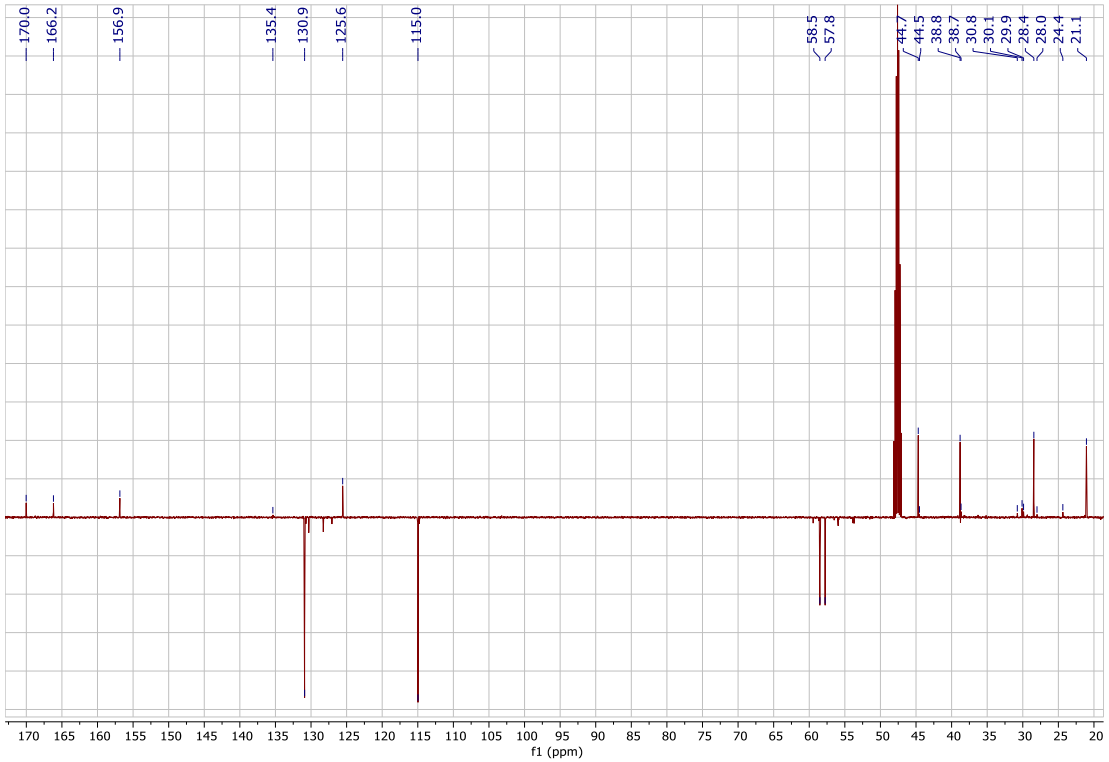
Şekil 98'de görülmekte olan LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{14}H_{16}N_2O_3$ bileşiğine dair moleküler iyon piki *m/z* 261.1218 $[M+H]^+$ değerine sahiptir. $C_{14}H_{16}N_2O_3$ kapalı förmülü için hesaplanan teorik değer 261.1239 olarak bulunmuştur.

Tablo 7. Siklo-D-prolin-L-tirozine ait 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

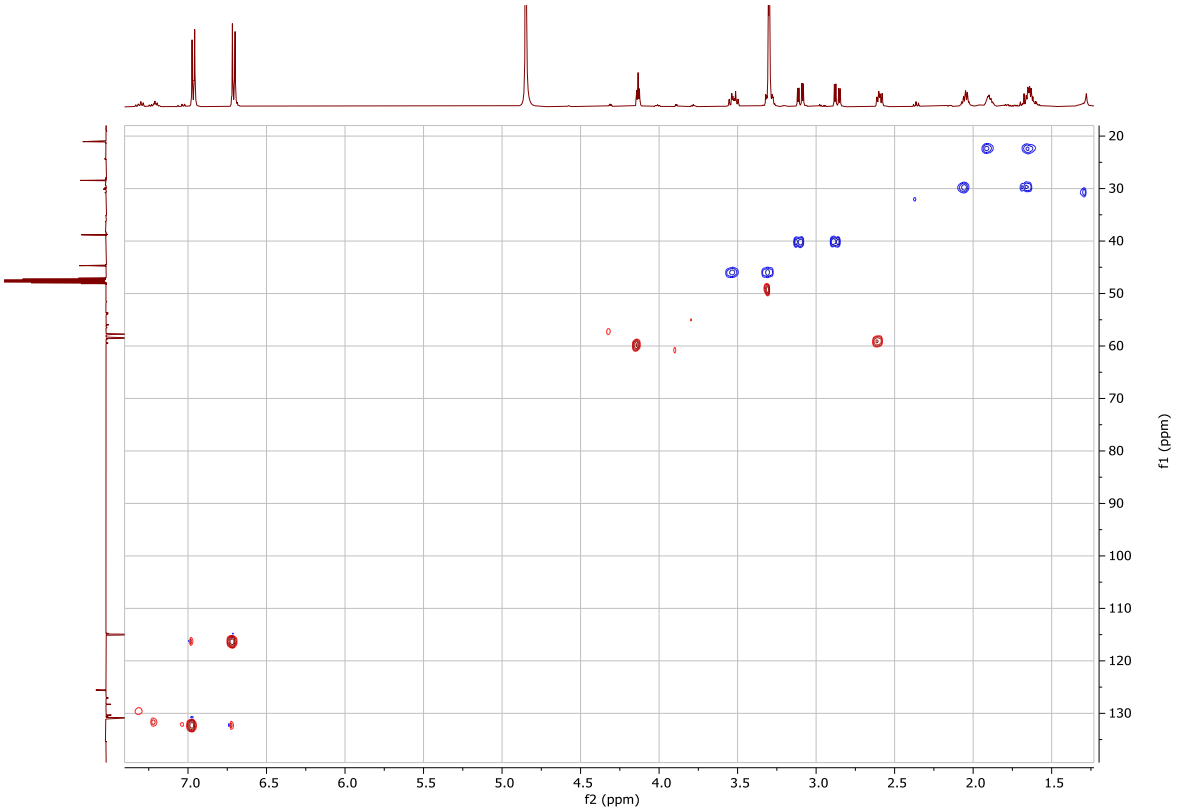
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	166.3	-
2 (N)	-	-	-
3	3.33 (m, 1H) 3.53 (m, 1H)	44.6	C-4, C-5
4	1.65 (m, 1H) 1.89 (m, 1H)	21.1	C-3, C-5
5	1.65 (m, 1H) 2.05 (m, 1H)	24.4	C-3, C-4, C-6, C-7
6	2.61 (dd, *J*=6.3, 4.8 Hz, 1H)	58.9	C-1, C-5, C-7
7	-	170.0	-
8 (N)	-	-	-
9	4.13 (dd, *J*=10.4, 5.9 Hz, 1H)	59.9	C-10
10	3.11 (d, *J*=4.1 Hz, 1H) 3.05 (d, *J*=4.1 Hz, 1H)	38.7	C-9, C-11
11	-	125.5	-
12-16	6.97 (d, *J*=8.5 Hz, 2H)	130.9	C-10, C-11, C-13
13-15	6.75 (d, *J*=8.5 Hz, 2H)	114.5	C-10, C-11
14	-	156.4	-



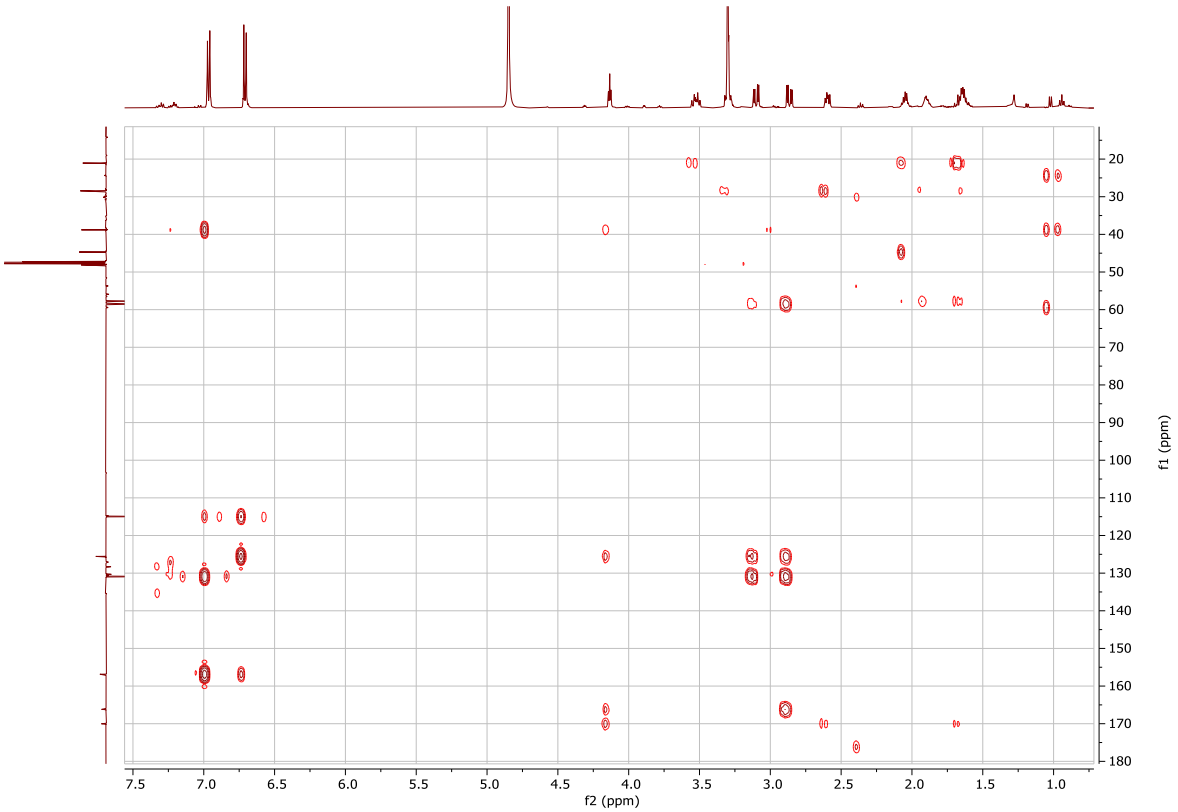
Şekil 94. Siklo-D-prolin-L-tirozinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



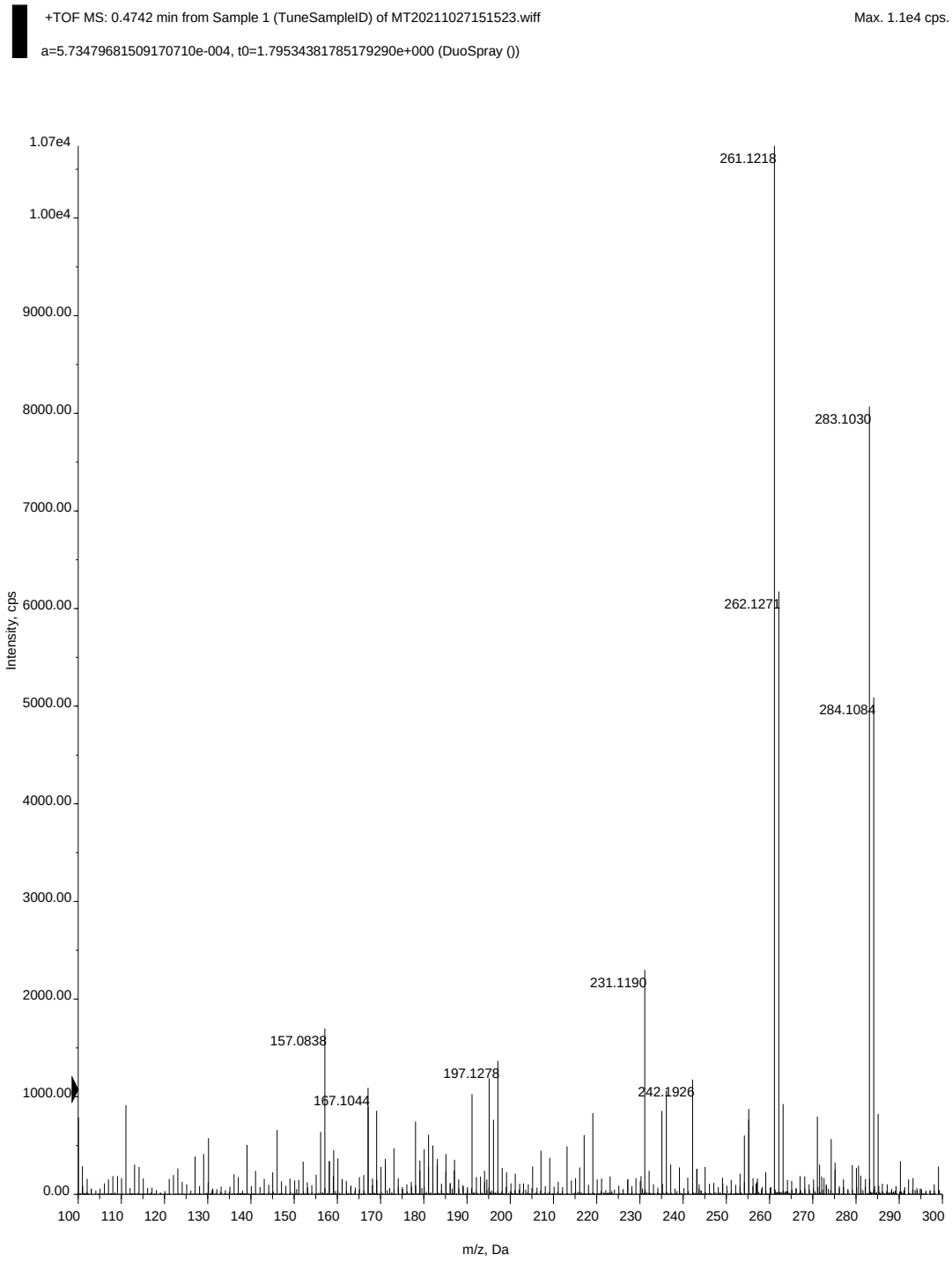
Şekil 95. Siklo-D-prolin-L-tirozinin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 96. Siklo-D-prolin-L-tirozinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

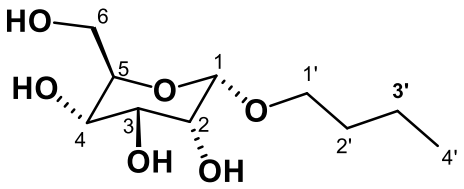


Şekil 97. Siklo-D-prolin-L-tirozinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 98. Siklo-D-prolin-L-tirozinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid (8)



Şekil 99. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid.

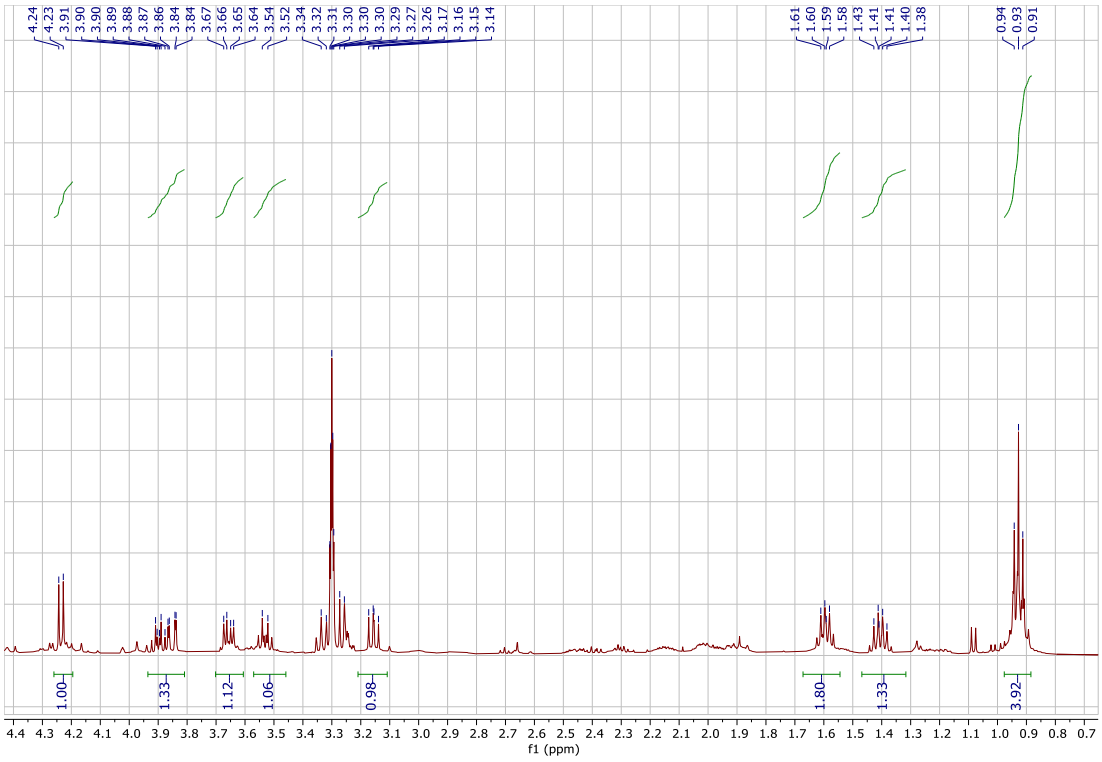
İzole edilen bileşik beyaz amorf görünümlüdür. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edilen verilerle 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid (Şekil 99) olarak belirlenmiştir (Şekil 100-104).

Şekil 100'de verilen ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde 3-4 ppm aralığında şekere ait proton sinyalleri gözlenmiştir. Anomerik hidrojen (H-1) 4.25 ppm'de *J*=7.8 Hz'lik yarılma sabiti ile dublet sinyal olarak gözlenmiştir. Bu yarılma sabiti şekerin *β*-konfigürasyonda olduğunu kanıtlamaktadır. HSQC spektrumundan (Şekil 102) ^{13}C-NMR değeri 102.9 ppm'de (C-1) belirlenmiştir. Oksimetin (-OCH-) sinyalleri, H-2, H-3, H-4 ve H-5, 3.15-3.36 ppm aralığında gözlenmiş ve karbon atomları 70.3, 73.7, 76.5 ve 76.7 olarak gözlenmiştir. ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumlarında ayrıca iki adet oksimetilen (-OCH_2-) sinyali varlığı anlaşılmıştır. Bu metilenlerin karbon atomları ^{13}C-NMR'da 61.4 (C-6) ve 69.2 (C-1') ppm'de gözlenmiştir. *n*-bütil grubuna ait diğer metilenler 1.60 (m, 1H, H-2') ve 1.40 (m, 1H, H-3') ppm'de gözlenmiş ve karbonları HSQC spektrumundan sırasıyla 31.5 (C-2') ve 18.8 (C-3') ppm olarak belirlenmiştir. Terminal metil grubu 0.93 ppm'de triplet olarak gözlenmiştir. Edinilen tüm bu bilgiler doğrultusunda bileşiğin 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid olduğu sonucuna varılmıştır. Bileşiğe ait veriler literatür ile uyumludur (171).

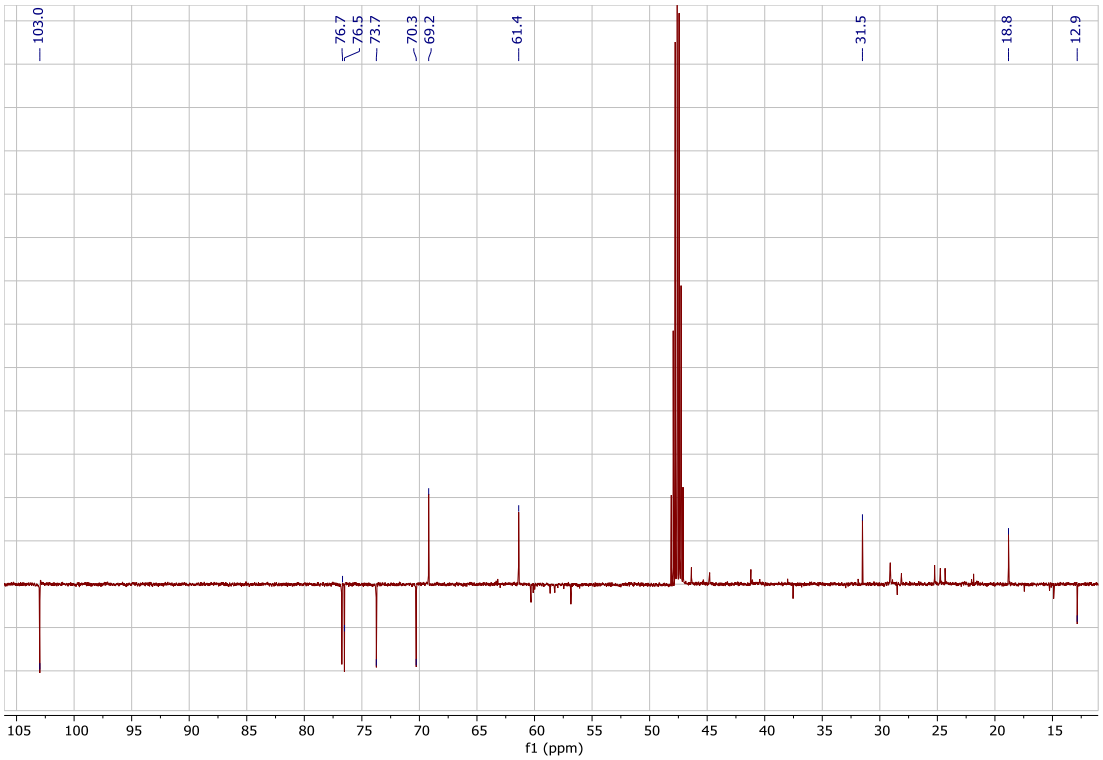
LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 104) $C_{10}H_{20}O_6$ kapalı formüllüne sahip bileşiğin moleküler iyon piki *m/z* 259.1144 $[M+Na]^+$ değerinde görülmüştür. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid bileşiğine ait teorik değer 259.1158 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 8. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

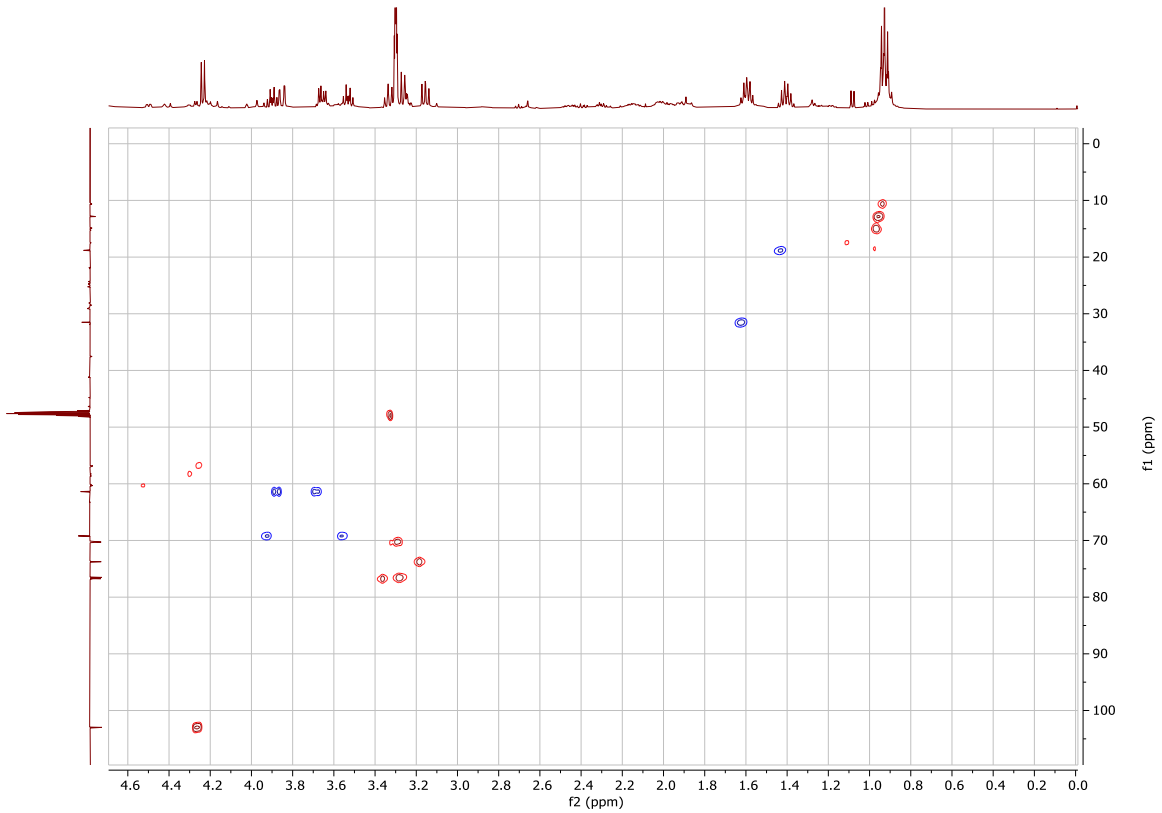
Atom No	δ ^1H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	4.25 (d, *J*=7.8 Hz, 1H)	102.9	C-2’
2	3.15 (m, 1H)	70.3	C-5
3	3.36 (m, 1H)	73.7	C-4
4	3.28 (m, 1H)	76.5	C-3
5	3.27 (m, 1H)	76.7	C-2
6	3.66 (m, 1H) 3.86 (m, 1H)	61.4	-
1’	3.90 (t, *J*=9.6 Hz, 1H) 3.54 (t, *J*=9.6 Hz, 1H)	69.2	-
2’	1.60 (m, 2H)	31.5	C-1, C-3’, C-4’
3’	1.40 (m, 2H)	18.8	C-2’, C-4’
4’	0.93 (t, *J*=7.4 Hz, 3H)	12.8	C-2’



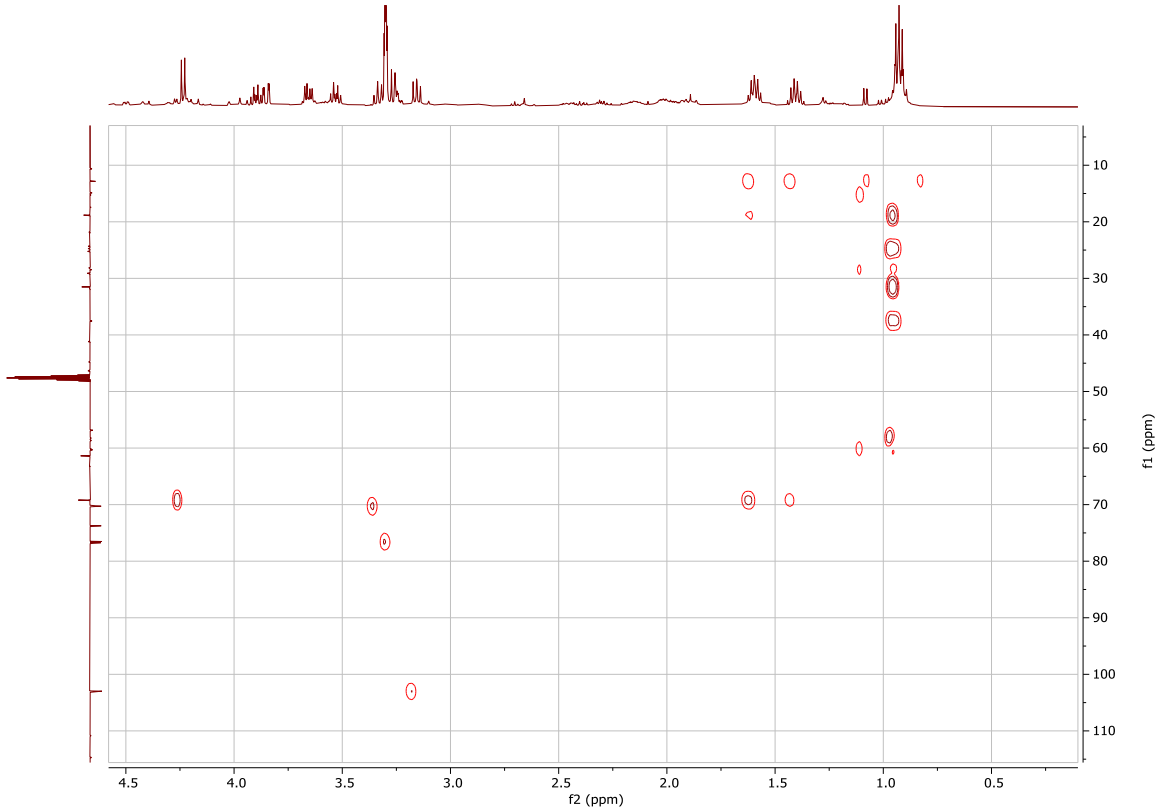
Şekil 100. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin ^1H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



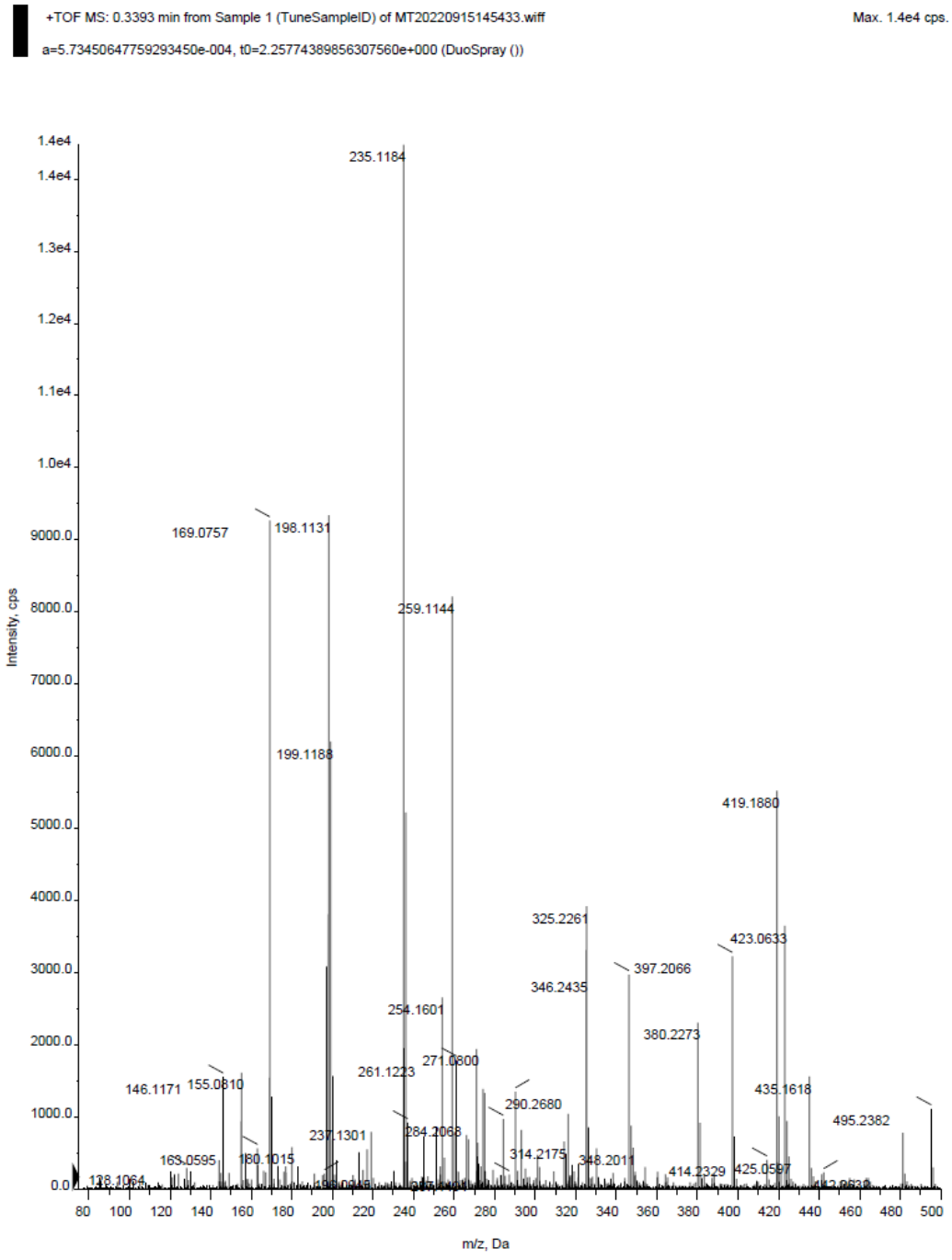
Şekil 101. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 102. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 103. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



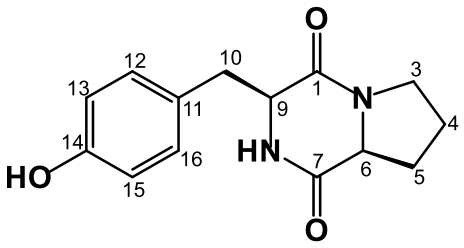
Şekil 104. 1-O-n-bütil-*β*-glukopiranozidin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

S. seymenliensis'ten İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

DCM ekstresi (1.6 g) ile gerçekleştirilen çalışmalarda siklo-L-prolin-L-tirozin (10), siklo-D-prolin-L-valin (11), siklo-L-prolin-L-valin (12), siklo-L-prolin-L-fenilalanin (13), triptofol (14, 16) ve 2-fenilasetik asit (15) olmak üzere altı (6) bileşik izole edilmiştir.

BuOH ekstresinden (1.8 g) tiramin (17), L-triptofan (18) ve siklo-L-prolin-L-tirozin (19) olmak üzere üç (3) bileşik saflaştırılmıştır. L-triptofan (18) bileşiği daha önce *S. iconiensis*'ten izole edildiği için, siklo-L-prolin-L-tirozin (19) bileşiği ise aynı mikroorganizmanın DCM ekstresi içeriğinde belirlendiği için 1D NMR ve 2D NMR spektrumlarına tekrar yer verilmemiştir.

Siklo-L-Prolin-L-Tirozin (10)



Şekil 105. Siklo-L-prolin-L-tirozin.

İzole edilen bileşik şeffaf kristal formundadır. Bileşiğin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri uygulanarak elde edilen veriler sayesinde siklo-L-prolin-L-tirozin (Şekil 105) olarak aydınlatılmıştır (Şekil 106-110).

IR (ATR) $\mathbf{V}_{max}$ (cm^{-1}) 3279 (yayvan OH), 3049 (=C-H gerilmesi), 2957 (-C-H gerilmesi), 1637 (Amit C=O), 1513 (C=C).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 106) 4.35 ppm (t, *J*=4.8 Hz, 1H, H-9) ve 4.04 (dd, *J*=10.9, 6.3 Hz, 1H, H-6) ppm'de görülen sinyaller amino asitlerin *α*-hidrojen bölgesindedir. Bu iki karakteristik sinyal bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu ifade etmektedir.

HSQC spektrumundan (Şekil 108), *α*-hidrojeninin (H-6) karbonunun 57.7 ppm (C-6) değerinde sinyal verdiği belirlenmiştir. 1.79 ppm (m, 2H, H-4), 1.23 ppm (m, 1H, H-5a), 2.07 ppm (m, 1H, H-5b), 3.35 ppm (m, 1H, H-3a) ve 3.53 ppm'de (m, 1H, H-3b) bulunan sinyallerin CH_2 sinyalleri olduğu anlaşılmasıyla dipeptit yapısında prolin varlığı belirlenmiştir.

Moleküle ait diğer amino asidin *α*-hidrojenine ait (H-9) sinyali 4.35 ppm'de görülmüştür. HSQC spektrumunda bu protonun karbonunun (C-9) 60.0 ppm'de sinyal verdiği belirlenmiştir. HMBC spektrumunda (Şekil 109) ise *α*-hidrojeninin (H-9) ile 37.7 ppm'deki C-10 ile korelasyon gösterdiği fark edilmiştir.

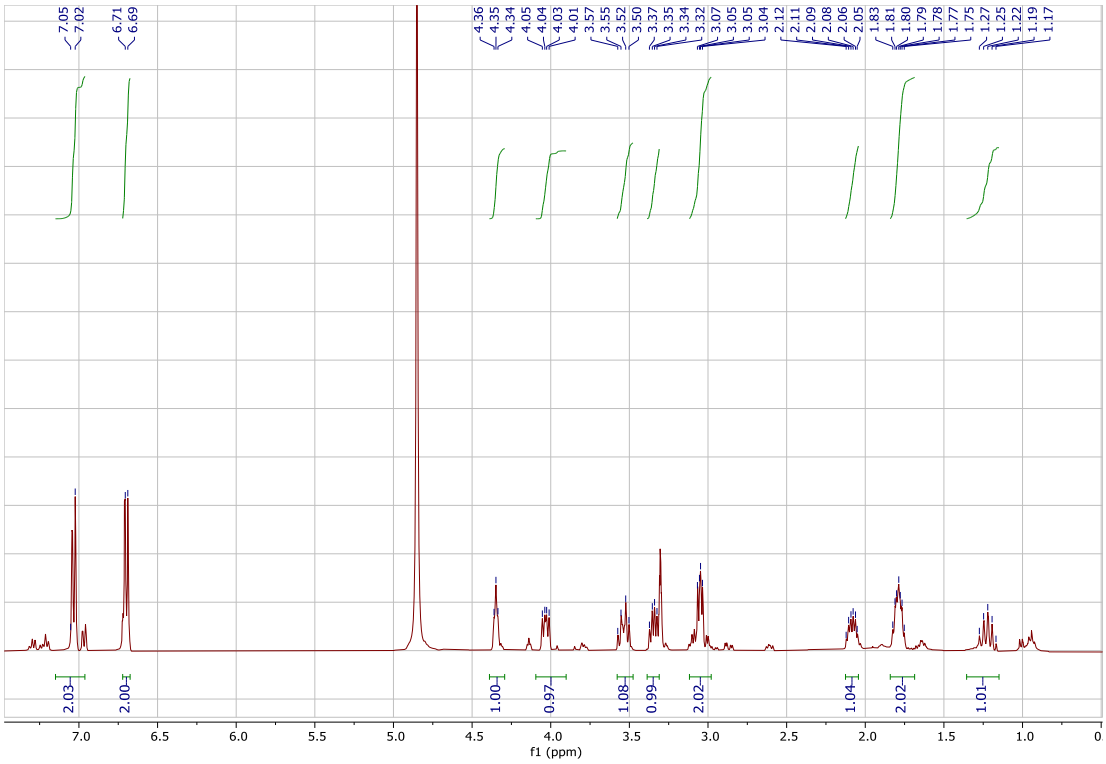
^{1}H-NMR spektrumunda aromatik halka protonları için karakteristik sinyal bölgesinde, 7.03 ppm ve 6.69 ppm'de dublet yarılma gösteren sinyaller bulunmaktadır. Bu sinyallerin eşleşme sabiti değerinin 8.3 Hz olması *orto* etkileşim varlığını, protonların 2H integral değerine sahip olması aromatik halkada simetri

varlığını ifade etmektedir. ^{13}C-APT spektrumunda (Şekil 107), 157.7 ppm değerinde sinyal veren kuarterner karbon varlığının belirlenmesiyle aromatik halkada *para* pozisyonundaki fonksiyonel grubun hidroksil grubu olduğu anlaşılmıştır. Böylece diketopiperazin yapısındaki diğer amino asidin tirozin olduğu belirlenmiştir. Spektral veriler değerlendirilerek bileşiğin siklo-L-prolin-L-tirozin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen veriler literatür ile uyum göstermektedir (172).

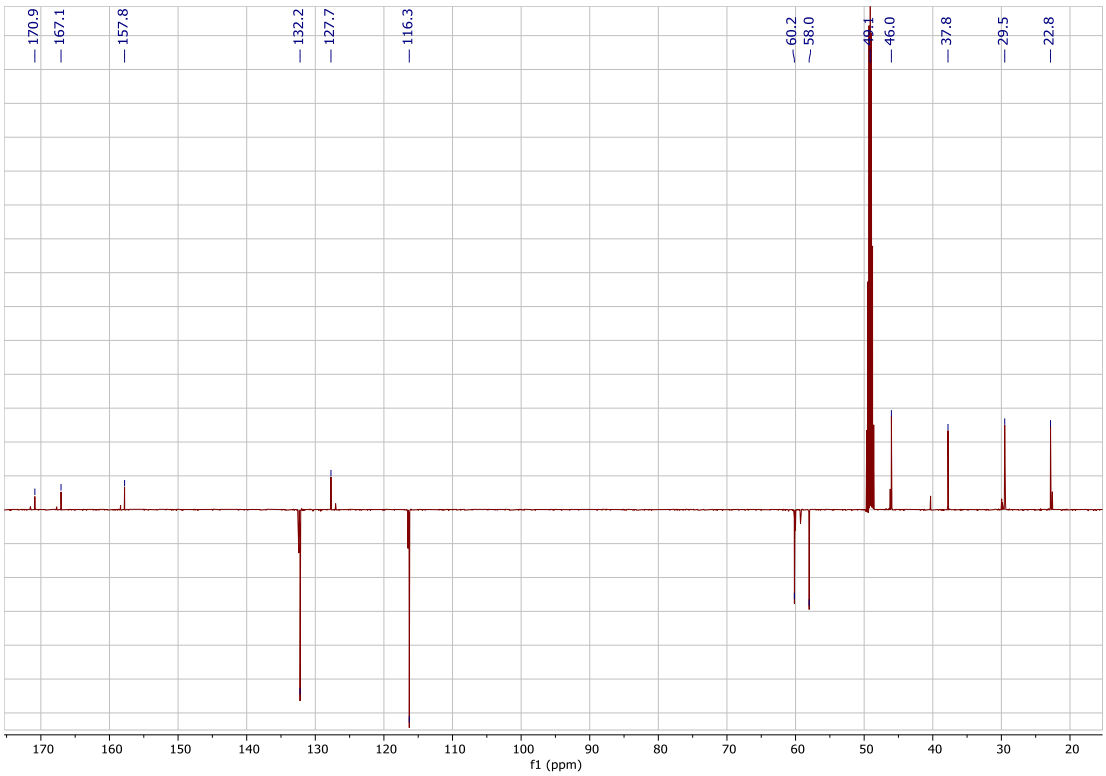
Şekil 110'da yer verilen kütle spektrumunda $C_{14}H_{16}N_2O_3$ için moleküler iyon piki *m/z* 261.1218 $[M+H]^+$ değerinde yer almıştır. $C_{14}H_{16}N_2O_3$ için teorik değer 261.1239 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 9. Siklo-L-prolin-L-tirozine ait 1D (CD_3OD, 400 MHz) ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

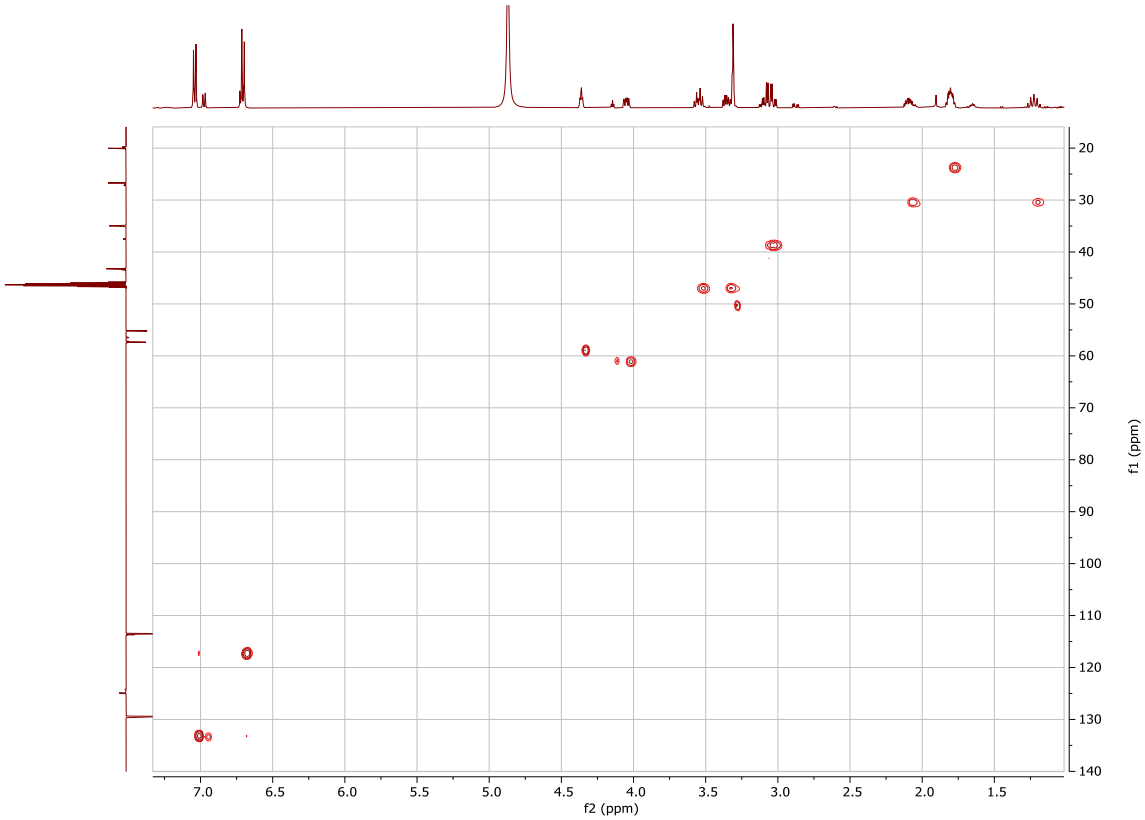
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	170.8	-
2 (N)	-	-	-
3	3.35 (m, 1H) 3.53 (m, 1H)	45.9	C-4, C-5
4	1.79 (m, 2H)	22.7	C-3, C-5
5	1.23 (m, 1H) 2.07 (m, 1H)	29.4	C-3, C-4, C-6, C-7
6	4.04 (dd, *J*=10.9, 6.3 Hz, 1H)	57.7	C-1, C-5, C-7
7	-	167.0	-
8 (N)	-	-	-
9	4.35 (t, *J*=4.8 Hz, 1H)	60.0	C-10
10	3.05 (d, *J*=7.8 Hz, 2H)	37.7	C-9, C-11
11	-	127.6	-
12-16	7.03 (d, *J*=8.7 Hz, 2H)	132.1	C-10, C-13, C-14
13-15	6.69 (d, *J*=8.7 Hz, 2H)	116.7	C-11, C-14
14	-	157.7	-



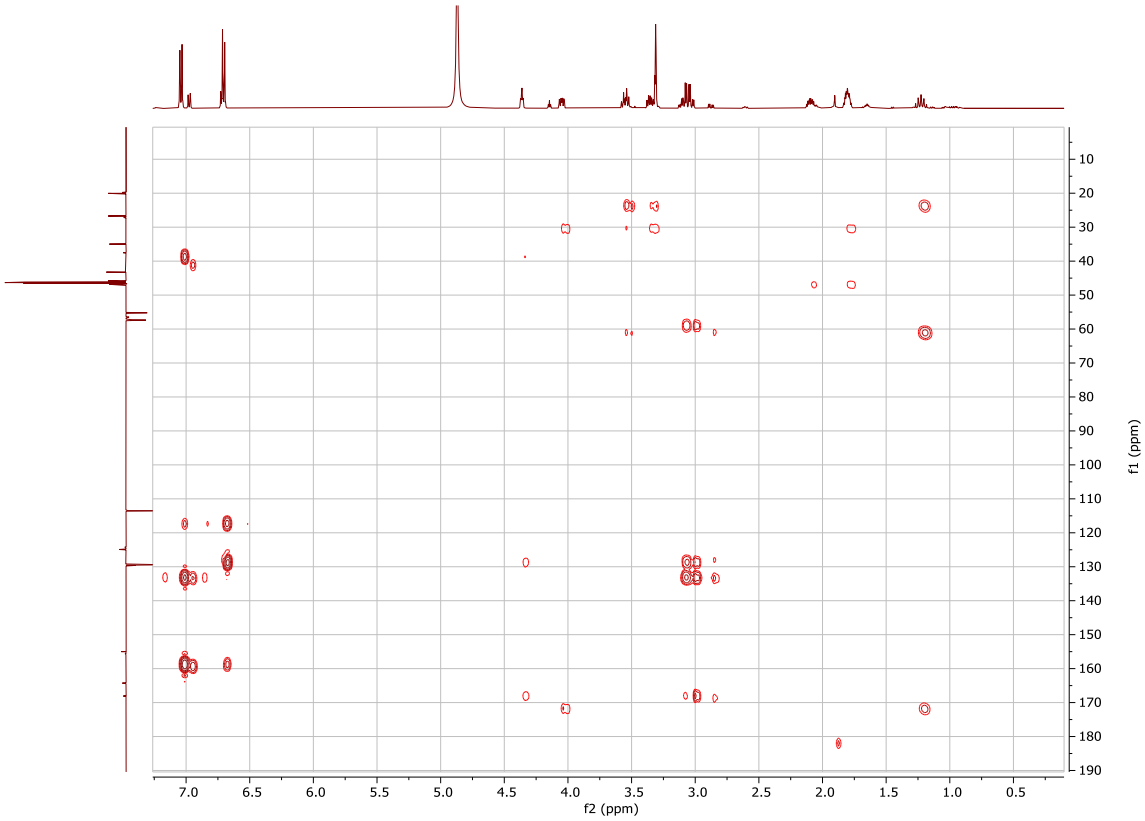
Şekil 106. Siklo-L-prolin-L-tirozinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



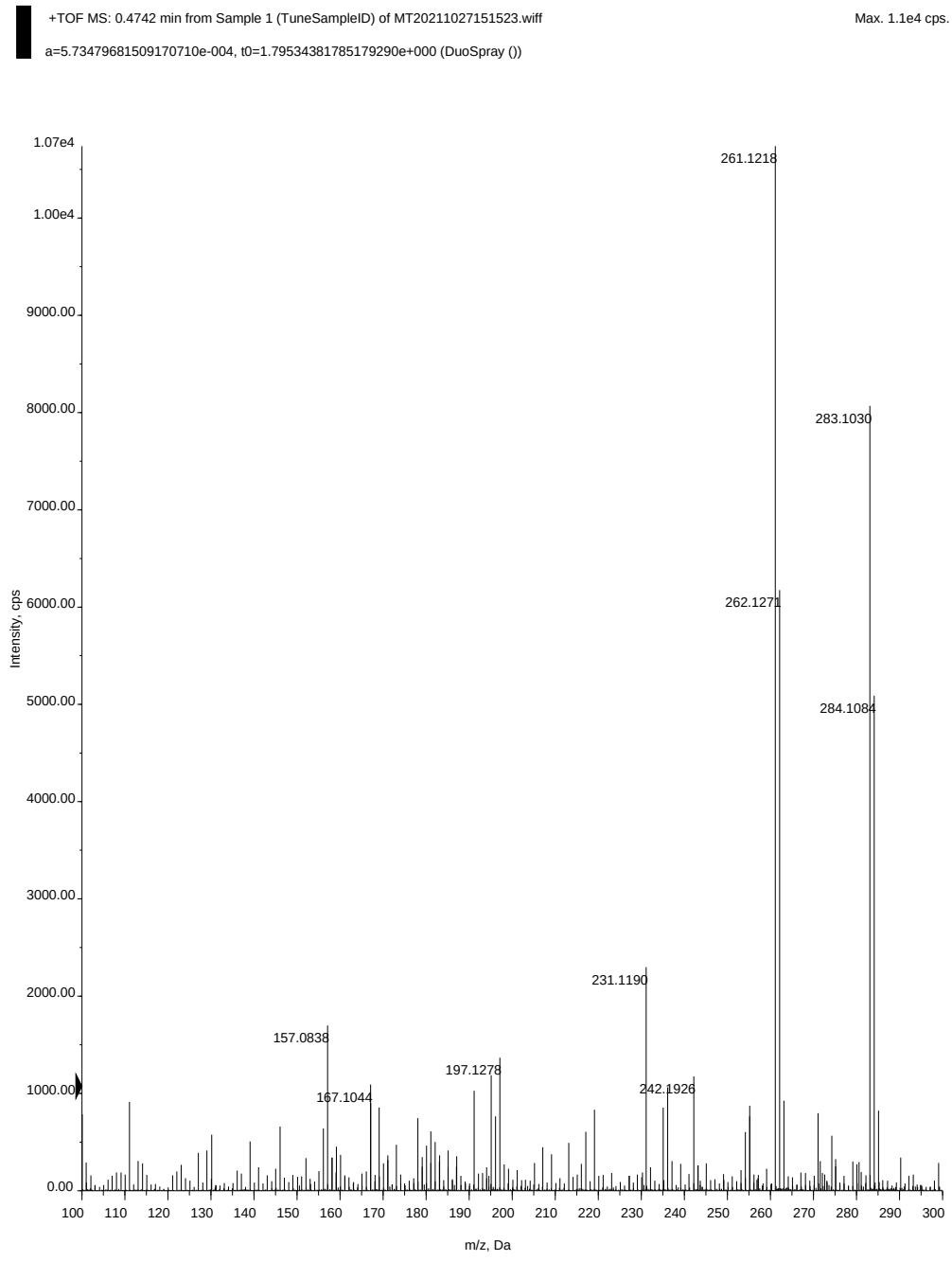
Şekil 107. Siklo-L-prolin-L-tirozinin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 108. Siklo-L-prolin-L-tirozinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

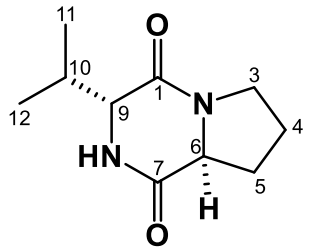


Şekil 109. Siklo-L-prolin-L-tirozinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 110. Siklo-L-prolin-L-tirozinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-L-Prolin-L-Valin (12)



Şekil 111. Siklo-L-prolin-L-valin.

Bileşik şeffaf kristal görünümüne sahiptir. İzole edilen bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, DEPT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik tekniklerinden elde edile verilerle siklo-L-prolin-L-valin (Şekil 111) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 112-117).

IR (ATR) $\mathbf{V}_{max}$ (cm^{-1}) 3224 (NH gerilmesi), 2957 (C-H gerilmesi), 1637 (Amit C=O), 1444 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 112), amino asitlerin *α*-hidrojen sinyal bölgesinde iki sinyal görülmesi bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu ifade etmektedir. HSQC spektrumundan (Şekil 115), 4.20 ppm'de (t, *J*=6.1 Hz, 1H, H-6) gözlenen *α*-hidrojenin, 58.6 ppm değerinde sinyal veren karbona (C-6) bağlı olduğu belirlenmiştir. 1.94 ppm (m, 1H, H-4a), 2.02 ppm (m, 1H, H-4b), 1.92 ppm (m, 1H, H-5a), 2.31 ppm (m, 1H, H-5b) ve 3.52 ppm'de (m, 2H, H-3) yer alan sinyallerin CH_2 grupları olduğunun belirlenmesiyle dipeptit yapısında prolin amino asidi varlığı anlaşılmıştır. Bileşiğin diğer *α*-hidrojenin (4.02 ppm, brs, 1H, H-9) bağlı olduğu karbonun (C-9) 60.1 ppm'de sinyal verdiği gözlenmiştir. 0.93 ppm'de sinyal veren 3H integraline sahip protonun (H-12) ve 1.09 ppm'de sinyal veren 3H integraline sahip protonun (H-11) dublet yarılma göstermiş olması bu amino asidin valin olduğunu göstermektedir.

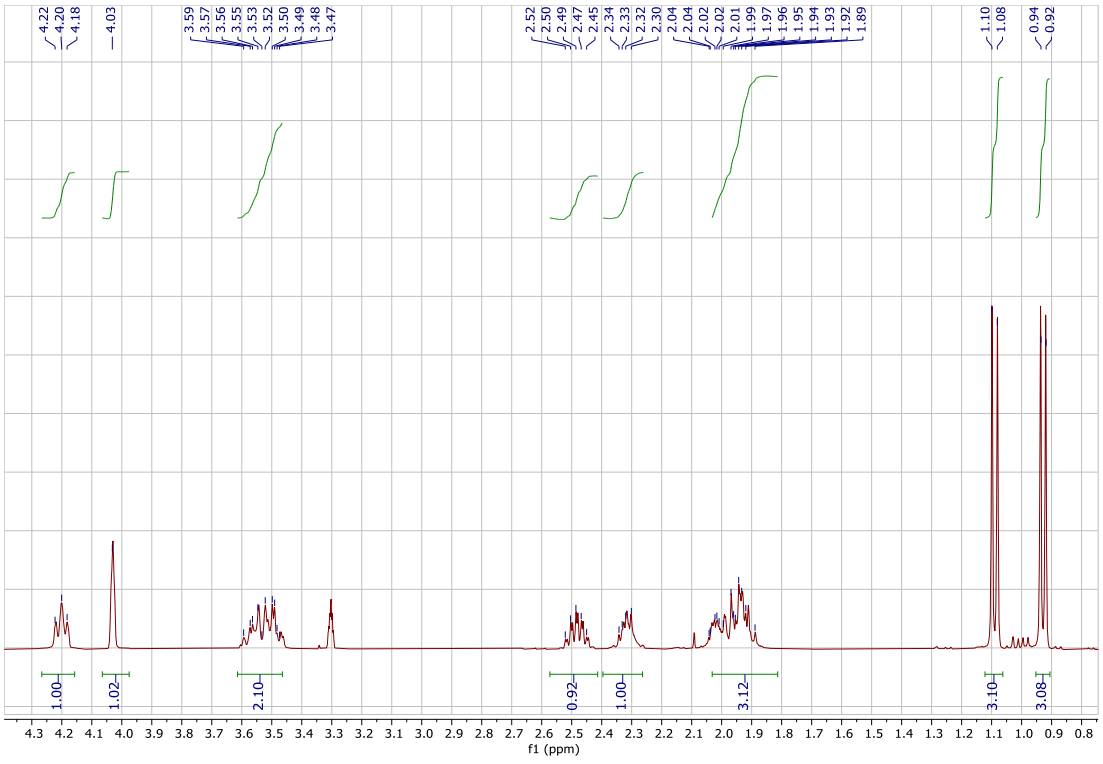
HMBC spektrumunda (Şekil 116) H-9 *α*-hidrojeninin 28.5 ppm'deki metin karbonu (C-10), 15.3 ppm (C-12) ve 17.5 ppm'de (C-11) sinyal veren metil karbonları ile korelasyonu görülmüştür. Tüm veriler değerlendirilerek bileşiğin yapısı siklo-D-prolin-L-valin olarak belirlenmiştir. Spektrumların sağladığı bilgiler, literatür verileri ile uyum göstermektedir (173).

Şekil 117'de verilen LC-Q-TOF kütle.spektrumunda bileşiğin $C_{10}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pik değeri *m/z* 197.1297 $[M+H]^+$

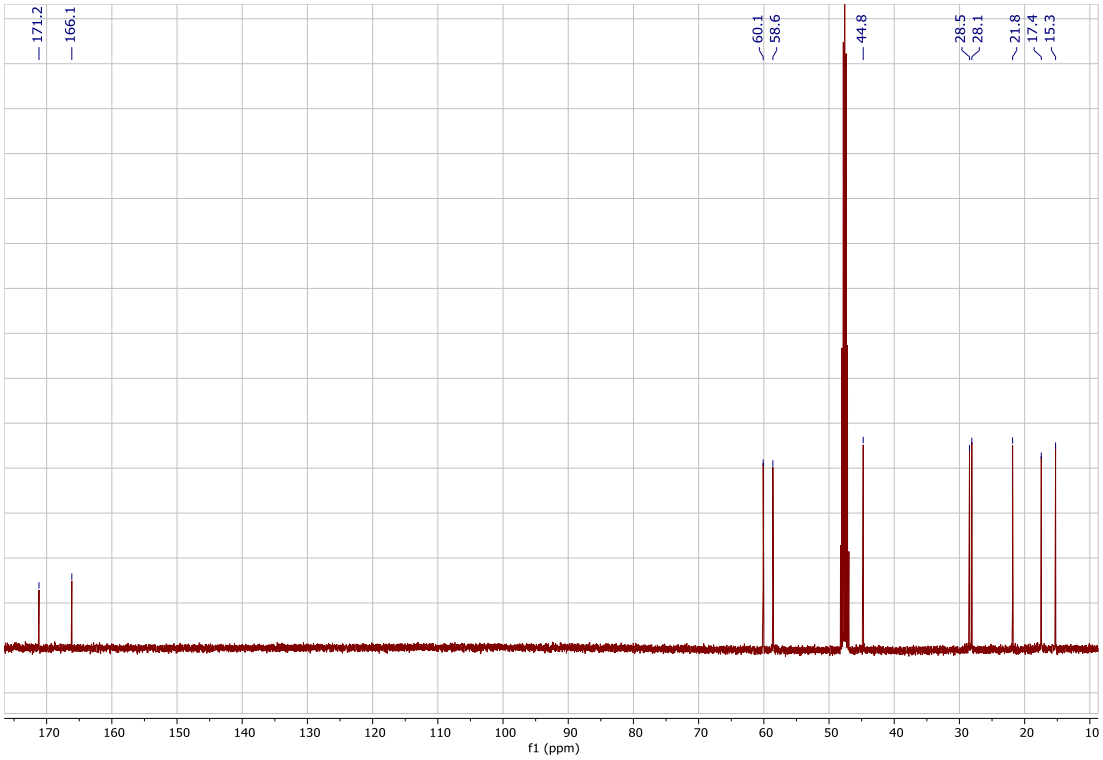
olarak gözlenmiştir. Bileşiğin $C_{10}H_{16}N_2O_2$ kapalı formülü için 197.1290 teorik değeri hesaplanmıştır.

Tablo 10. Siklo-L-prolin-L-valinin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

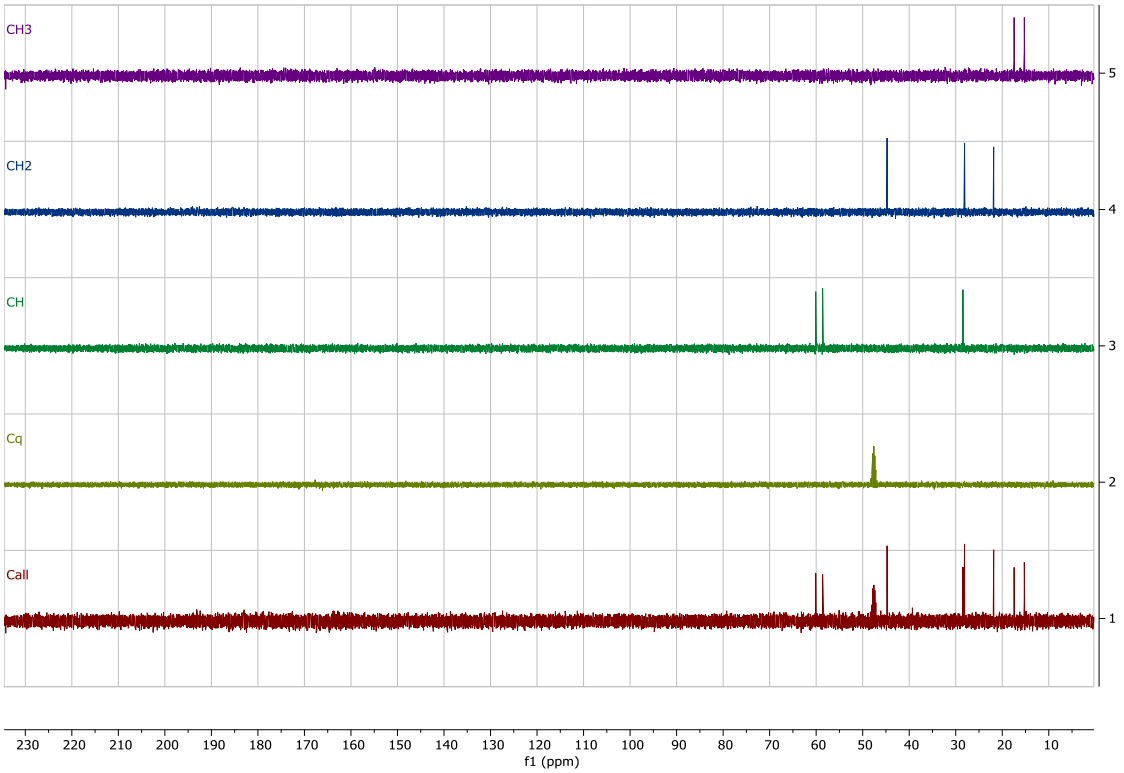
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	166.1	-
2 (N)	-	-	-
3	3.52 (m, 2H)	44.8	C-4, C-5
4	1.94 (m, 1H) 2.02 (m, 1H)	21.8	C-3, C-5, C-6
5	1.92 (m, 1H) 2.31 (m, 1H)	28.1	C-4, C-6, C-7
6	4.20 (t, *J*=6.1 Hz, 1H)	58.6	C-1, C-7
7	-	171.2	-
8 (N)	-	-	-
9	4.02 (brs, 1H)	60.1	C-1, C-7, C-10, C-11, C-12
10	2.48 (m, 1H)	28.5	C-9, C-11, C-12
11	1.09 (d, *J*=6.9 Hz, 1H)	17.5	C-1, C-7, C-10, C-9, C-12
12	0.93 (d, *J*=6.9 Hz, 1H)	15.3	C-1, C-7, C-10, C-9, C-11



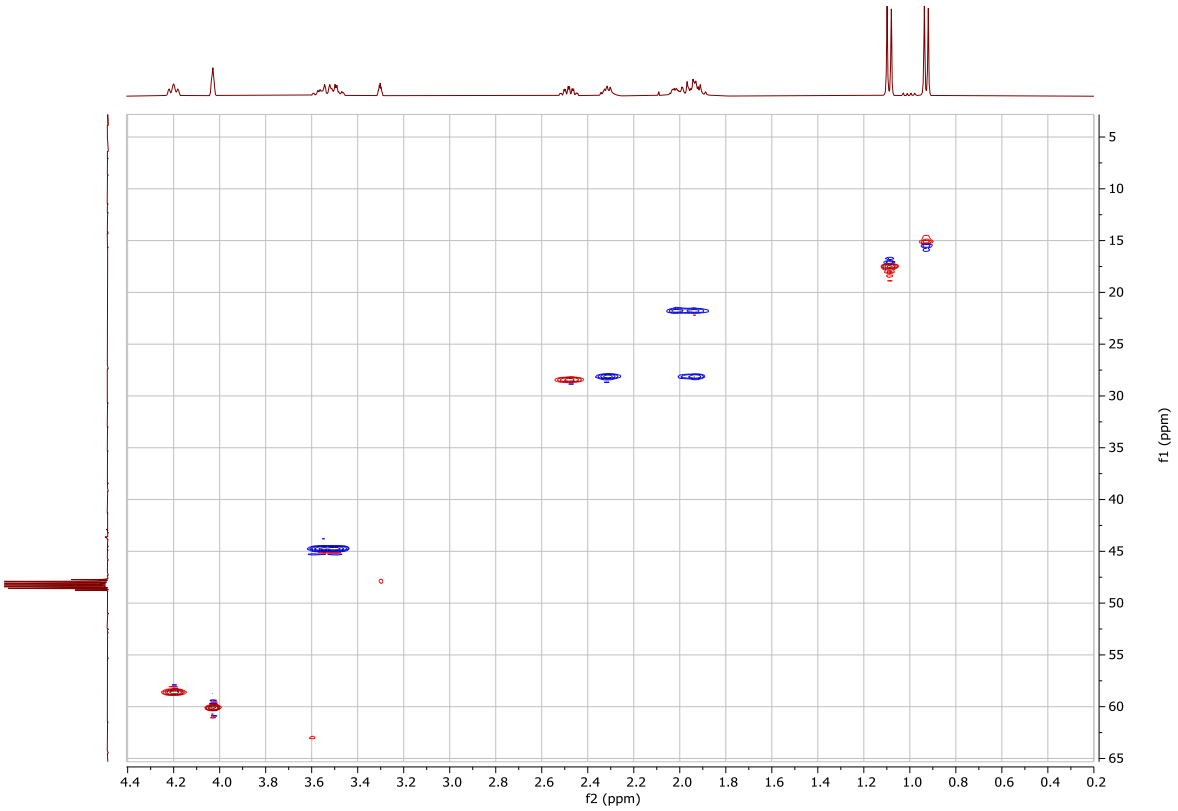
Şekil 112. Siklo-L-prolin-L-valinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



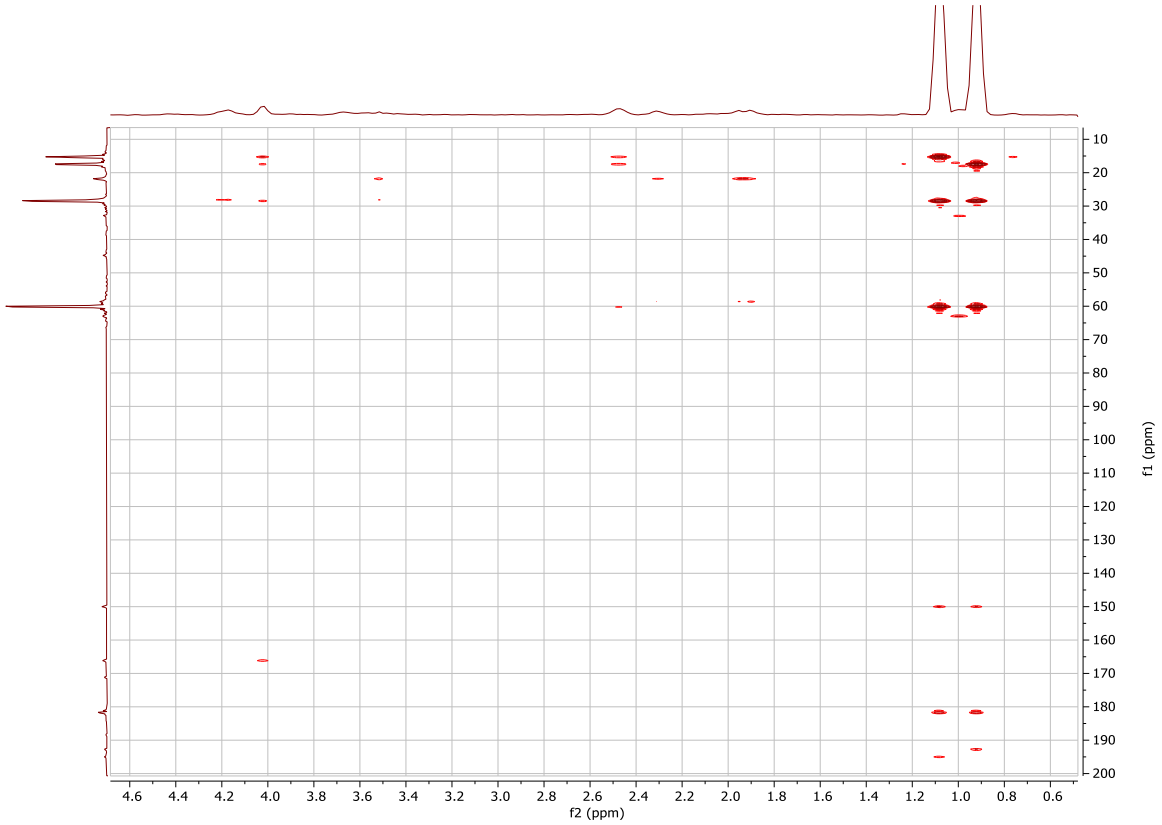
Şekil 113. Siklo-L-prolin-L-valinin ^{13}C-NMR spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).



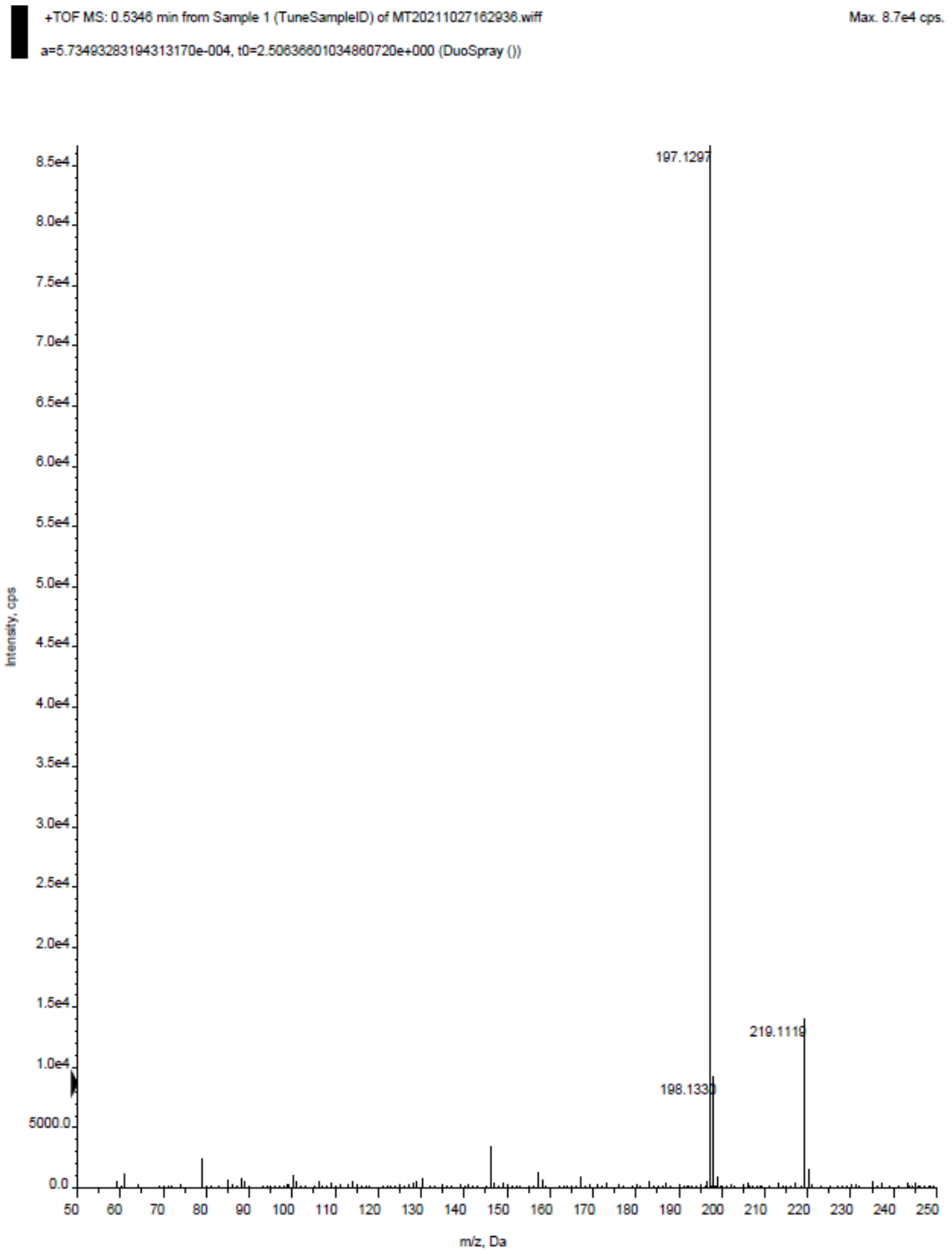
Şekil 114. Siklo-D-prolin-L-valinin DEPT spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).



Şekil 115. Siklo-D-prolin-L-valinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).

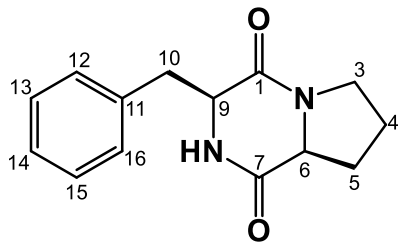


Şekil 116. Siklo-D-prolin-L-valinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 117. Siklo-L-prolin-L-valinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-L-Prolin-L-Fenilalanin (13)



Şekil 118. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin.

Krem renkli toz görünümlü bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri yardımıyla elde edilen verilerle siklo-L-prolin-L-fenilalanin (Şekil 118) bulunmuştur (Şekil 119-123).

IR (ATR) V_{max} (cm^{-1}) 3223 (NH gerilmesi), 2955 (C-H gerilmesi), 1650 (Amit C=O), 1450 (CH_2 eğilmeleri), 750 (Ar-H eğilmesi).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 119), amino asitler için spesifik *α*-hidrojen bölgesinde 4.43 ppm (dd, *J*=3.9, 1.1 Hz, 1H, H-9) ve 3.36 ppm'de (dd, *J*=9.2, 5.3 Hz, 1H, H-6) iki sinyal yer almış olması bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu işaret etmektedir.

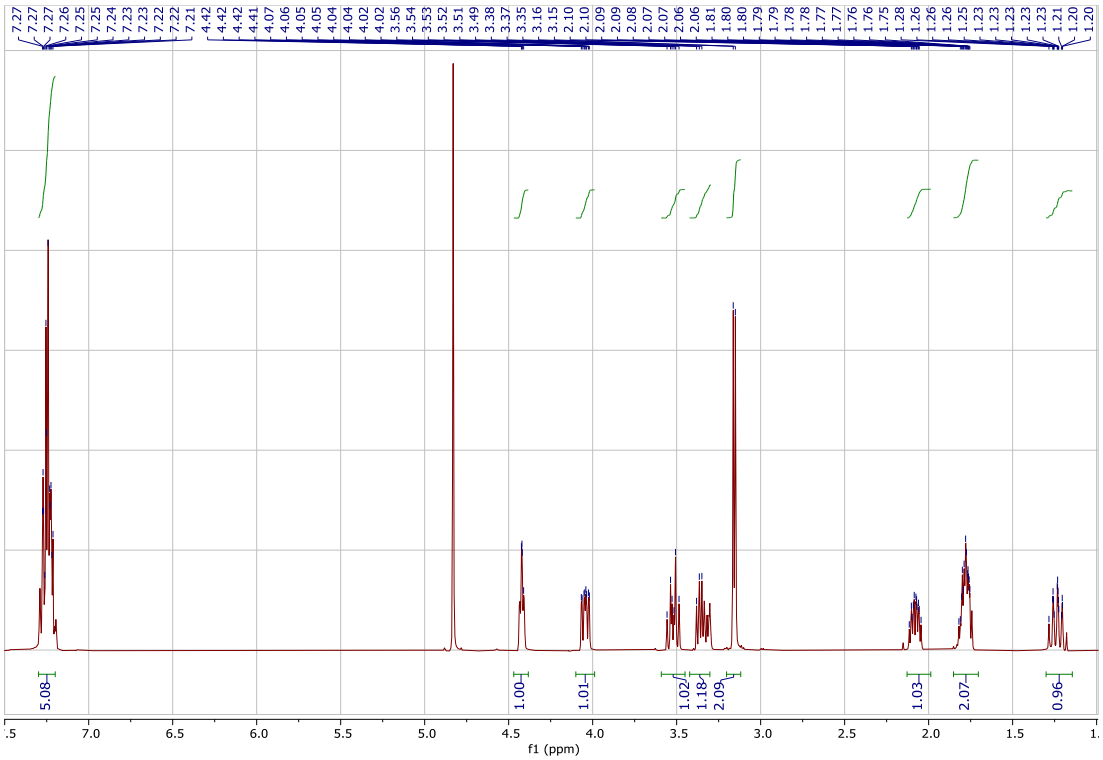
Bileşiğin *α*-hidrojenlerinden birinin (H-6) bağlı olduğu karbon atomunun sinyali, HSQC spektrumundan (Şekil 121), 60.4 ppm'de (C-6) gözlenmiştir. 1.78 ppm (m, 2H, H-4), 1.23 ppm (m, 1H, H-5a), 2.08 ppm (m, 1H, H-5b) ve 3.53 ppm (m, 1H, H-3a), 4.05 ppm'de (m, 1H, H-3b) yer alan sinyaller prolin için spesifiktir. HSQC spektrumundan (Şekil121) bu protonların CH_2 oldukları doğrulanmıştır. Böylece dipeptit yapısında yer alan amino asitlerin birinin prolin amino asidi olduğu anlaşılmıştır.

HSQC spektrumundan yararlanılarak diğer *α*-hidrojeninin (H-9) 58.0 ppm'de sinyal veren karbona (C-9) bağlı olduğu belirlenmiştir. HMBC spektrumu (Şekil 122) incelendiğinde *α*-hidrojeni (H-9) ile 38.5 ppm'de sinyal veren karbon atomuyla (C-10) korelasyon gösterdiği görülmüştür. ^{1}H-NMR spektrumunda aromatik halka protonlarının sinyal bölgesinde, 7.24 ppm'de 5H integral değerinde multiplet yarılma gözlenmesi bileşiğin yapısında yer alan amino asidin fenilalanin olduğunu belirlemiştir. Sonuç olarak bileşiğin yapısı siklo-L-prolin-L-fenilalanin olarak açıklanmıştır. Spektral veriler literatür ile uyum göstermektedir (166).

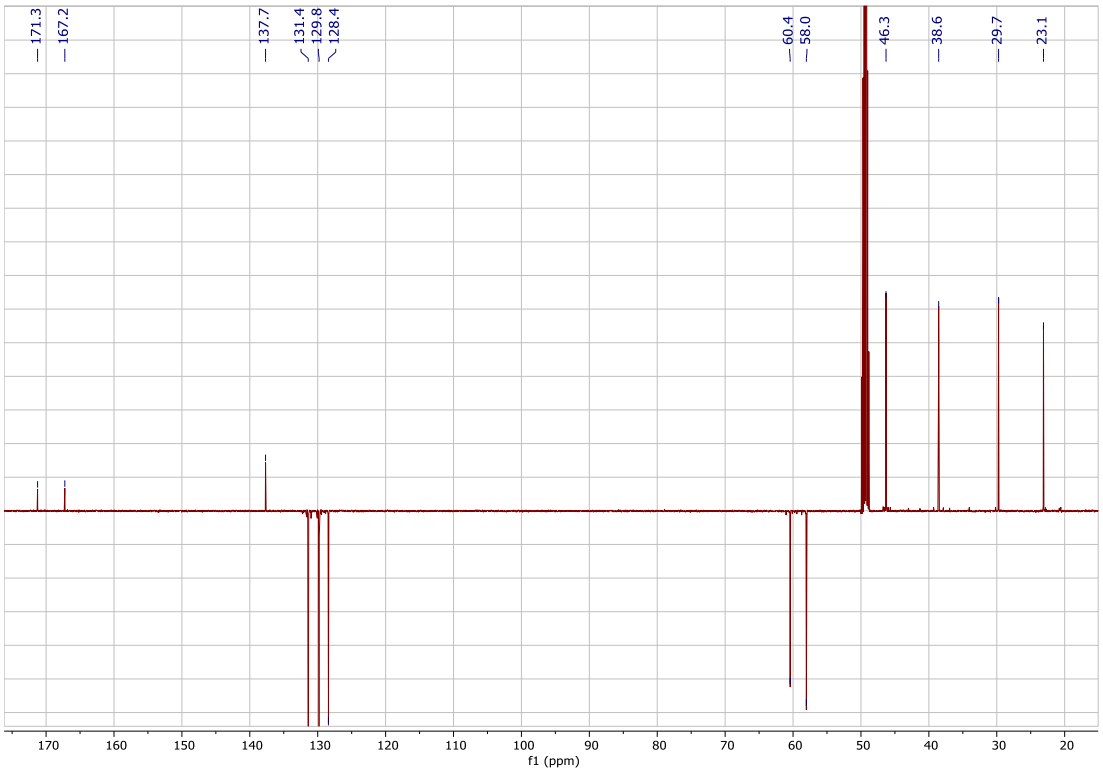
Kütle spektrumunda (Şekil 123) $C_{14}H_{16}N_2O_2$ için moleküler iyon piki *m/z* 245.1282 $[M+H]^+$ değerinde görülmüştür. $C_{14}H_{17}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen bileşik için teorik değer 245.1290 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 11. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin molekülünün 1D (CD_3OD, 400 MHz) ve 2D NMR (CD_3OD, 500 MHz) değerleri.

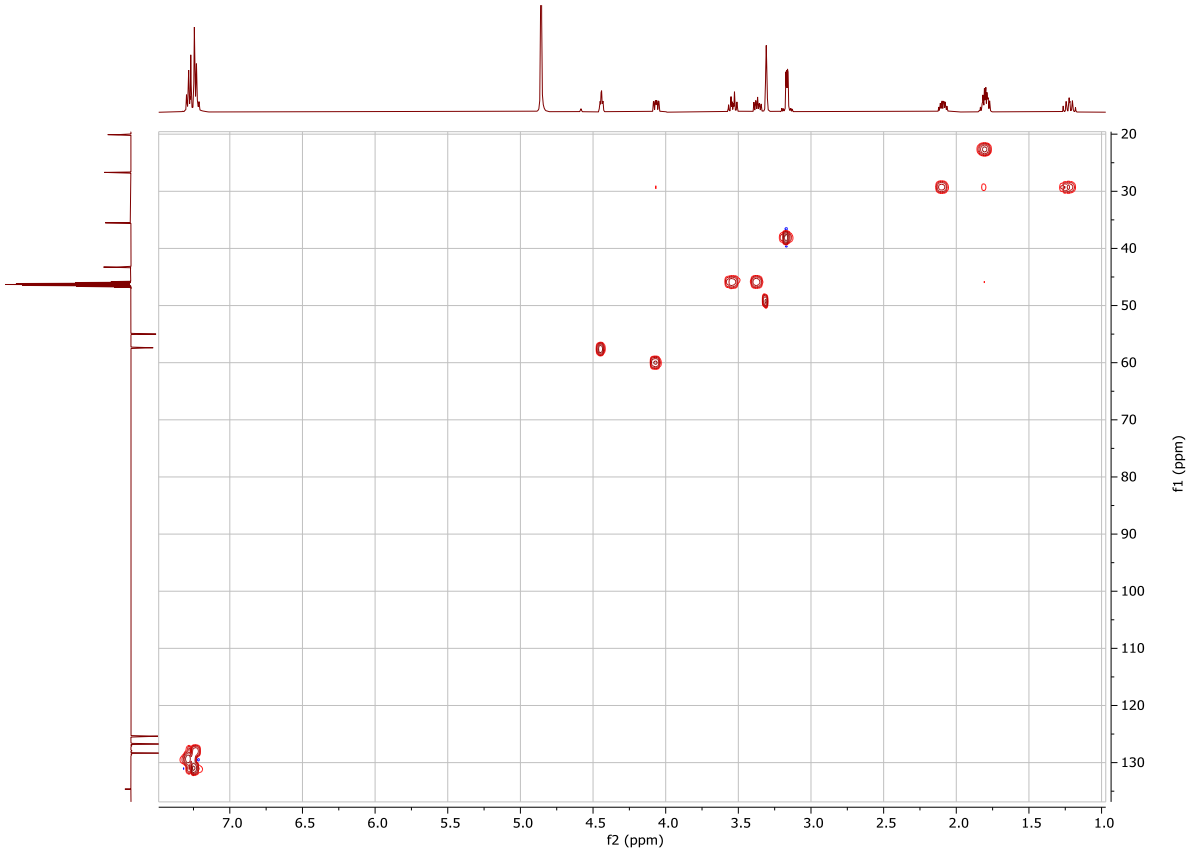
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	167.2	-
2 (N)	-	-	-
3	3.36 (m, 1H) 3.53 (m, 1H)	46.2	C-4, C-5
4	1.78 (m, 2H)	23.1	C-3, C-5
5	1.23 (m, 1H) 2.08 (m, 1H)	29.7	C-3, C-6, C-7
6	4.05 (dd, *J*=9.2, 5.3 Hz, 1H)	60.4	C-1, C-5, C-7
7	-	171.5	-
8 (N)	-	-	-
9	4.43 (dd, *J*=3.9, 1.1 Hz, 1H)	58.0	C-10
10	3.15 (m, 2H)	38.5	C-1, C-11, C-16, C-9
11	-	137.7	-
12	7.19-7.28 (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



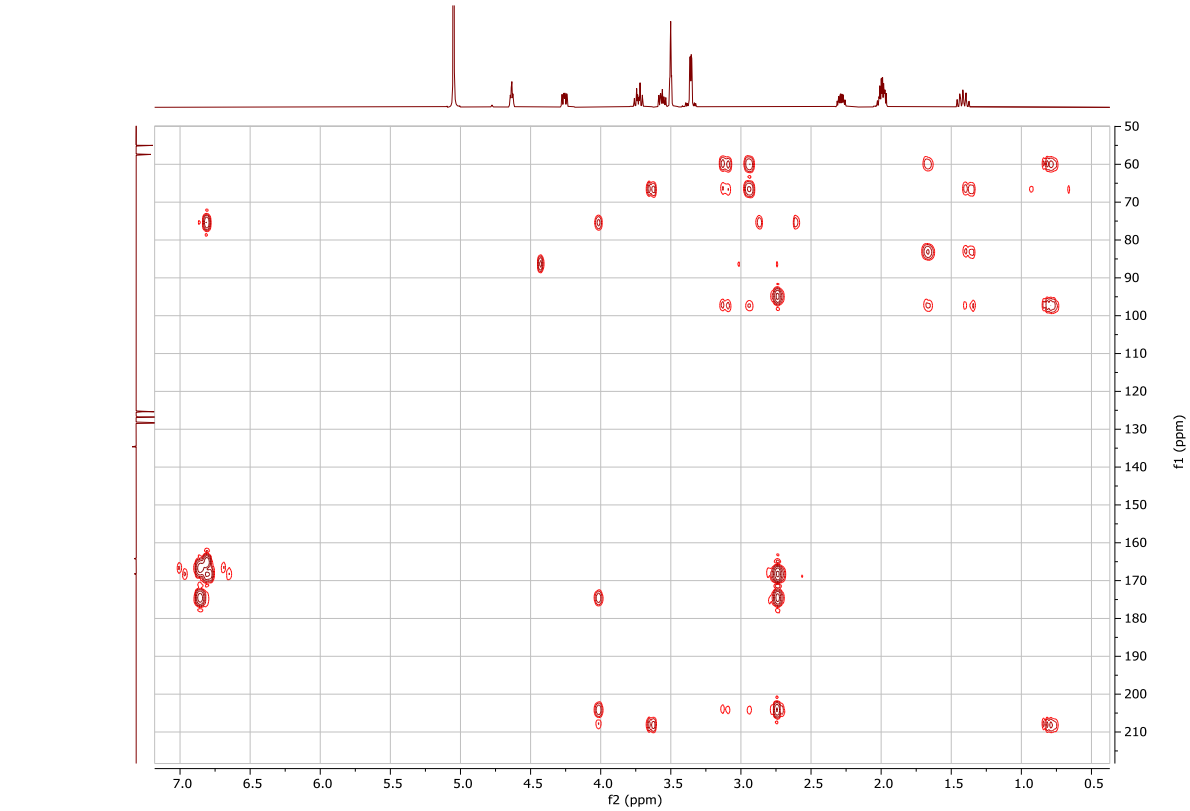
Şekil 119. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



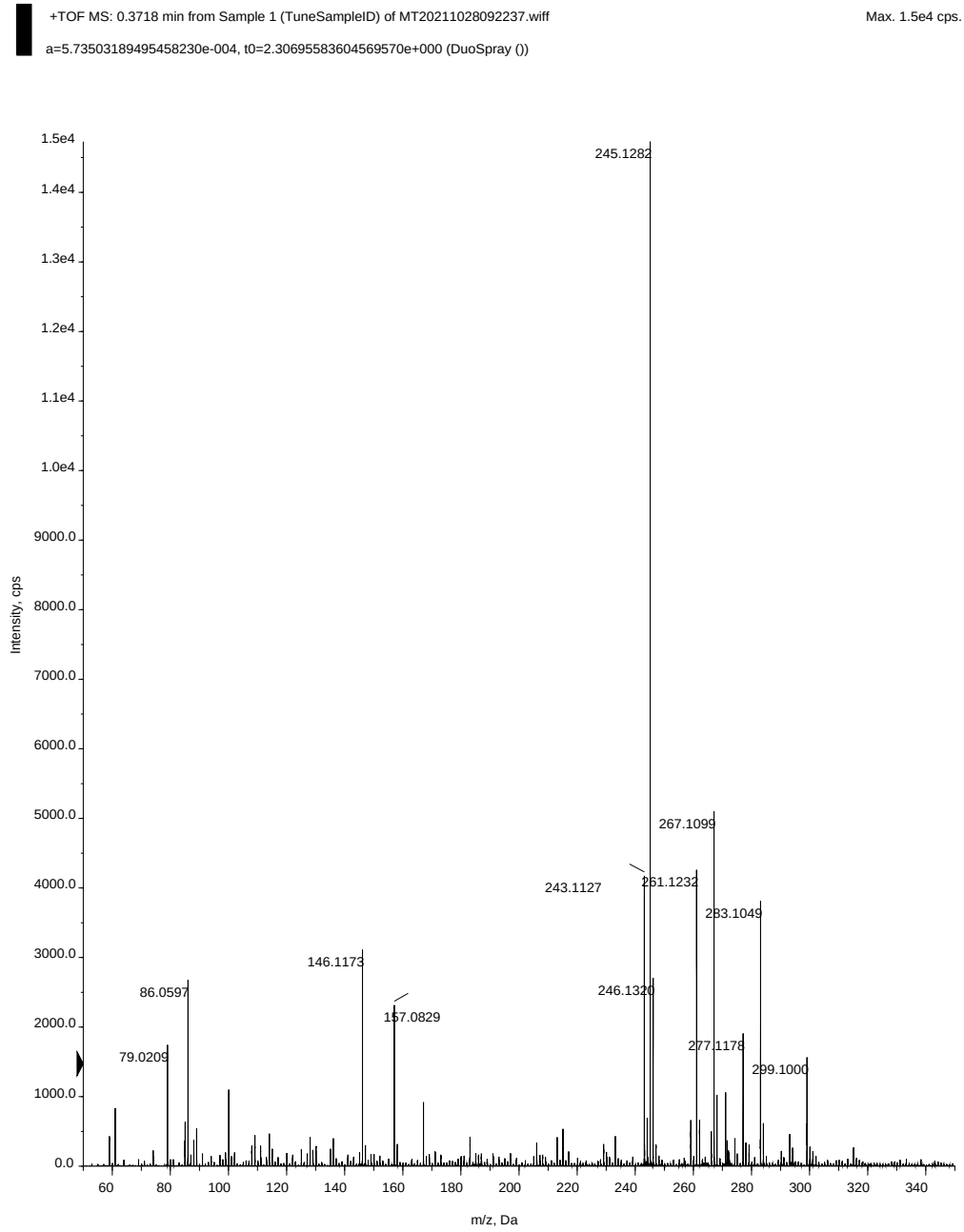
Şekil 120. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 121. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

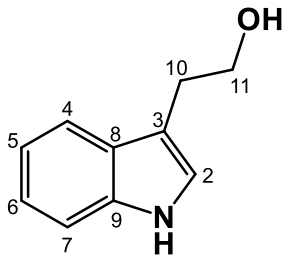


Şekil 122. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 123. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Triptofol (14)



Şekil 124. Triptofol.

Bileşik sarı renkli yağımsı bir görünüme sahiptir. İzole edilen bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektropik tekniklerinden sağlanan verilerle triptofol (3-(2-hidroksietil)indol, 2-(3-indolil)etanol) (Şekil 124) olarak belirlenmiştir (Şekil 125-129).

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3390 (OH gerilmesi), 3820 (NH gerilmesi), 3041 (=C-H gerilmesi), 2933 (-C-H gerilmesi), 1553 (C=C).

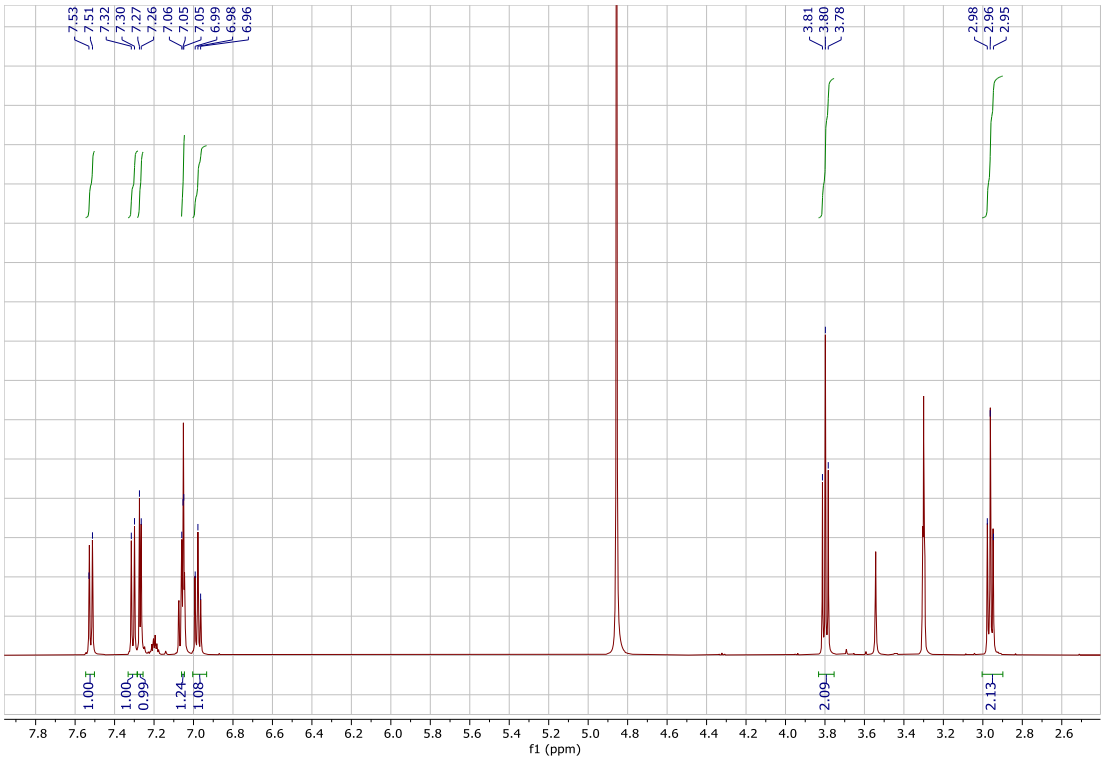
^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 125) değerlendirildiğinde, aromatik proton bölgesinde yer alan 6.98 (t, *J*=7.9 Hz, 1H, H-5), 7.05 (t, *J*=7.9 Hz, 1H, H-6), 7.26 (s, 1H, H-2), 7.31 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, H-7) ve 7.52 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, H-4) ppm'de görülen 5 adet sinyalin, DEPT ve HSQC spektrumları eşliğinde değerlendirilmesi sonucunda 110.8 (C-7), 117.8 (C-4), 118.1 (C-5), 126.1 (C-6) ve 129.0 (C-2) değerlerinde gözlenen -CH (metin) karbonlarına bağlı metin protonları olduğu anlaşılmıştır. 7.26 ppm'de gözlenen singlet (H-2) protonunun varlığı, 7.31 ppm (d, *J*= 8.0 Hz, H-7) ve 7.52 (d, *J*= 8.0 Hz, H-4) ppm'de gözlenen dubletler ve 6.98 ppm (t, *J*= 7.9 Hz, H-5) ve 7.05 (t, *J*= 7.9 Hz, H-6) ppm'de gözlenen triplet sinyaller indol halkasındaki AA' BB' sistemindeki protonları ifade etmektedir.

3.80 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, H-11) ve 2.95 ppm'deki (t, *J*=7.4 Hz, 2H, H-10) sinyaller iki adet -CH_2 grubunu gösterirken DEPT spektrumunda bu protonların bağlı olduğu karbon sinyalleri 28.6 (C-10) ve 62.1 (C-11) ppm'de gözlenmiştir. Tüm bu spektroskopik veriler sayesinde bileşiğin yapısı triptofol olarak açıklanmıştır. Elde edilen veriler literatür ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmüştür (174).

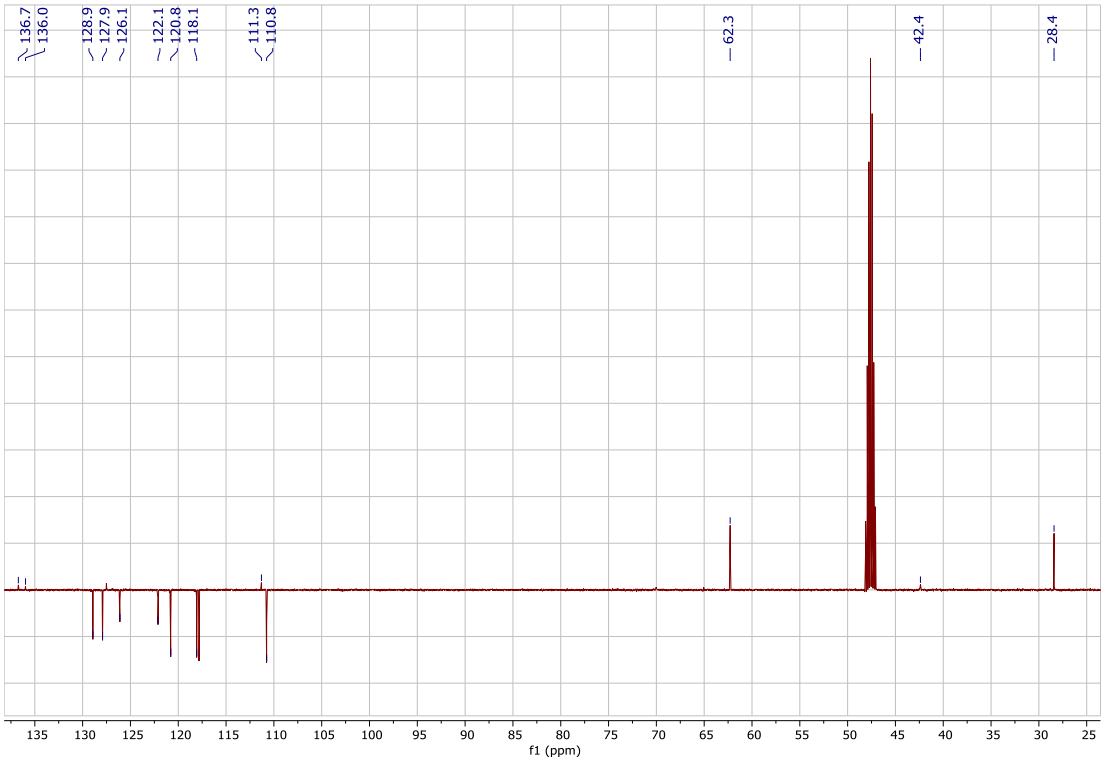
Kütle spektrumunda $C_{10}H_{11}NO$ için moleküler iyon piki *m/z* 162.0916 $[M+H]^+$ değerinde gözlenmiştir. Bileşiğe ait $C_{10}H_{11}NO$ kapalı formülü için teorik değer 162.0919 olarak hesaplanmıştır (Şekil 129).

Tablo 12. Triptofole ait 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

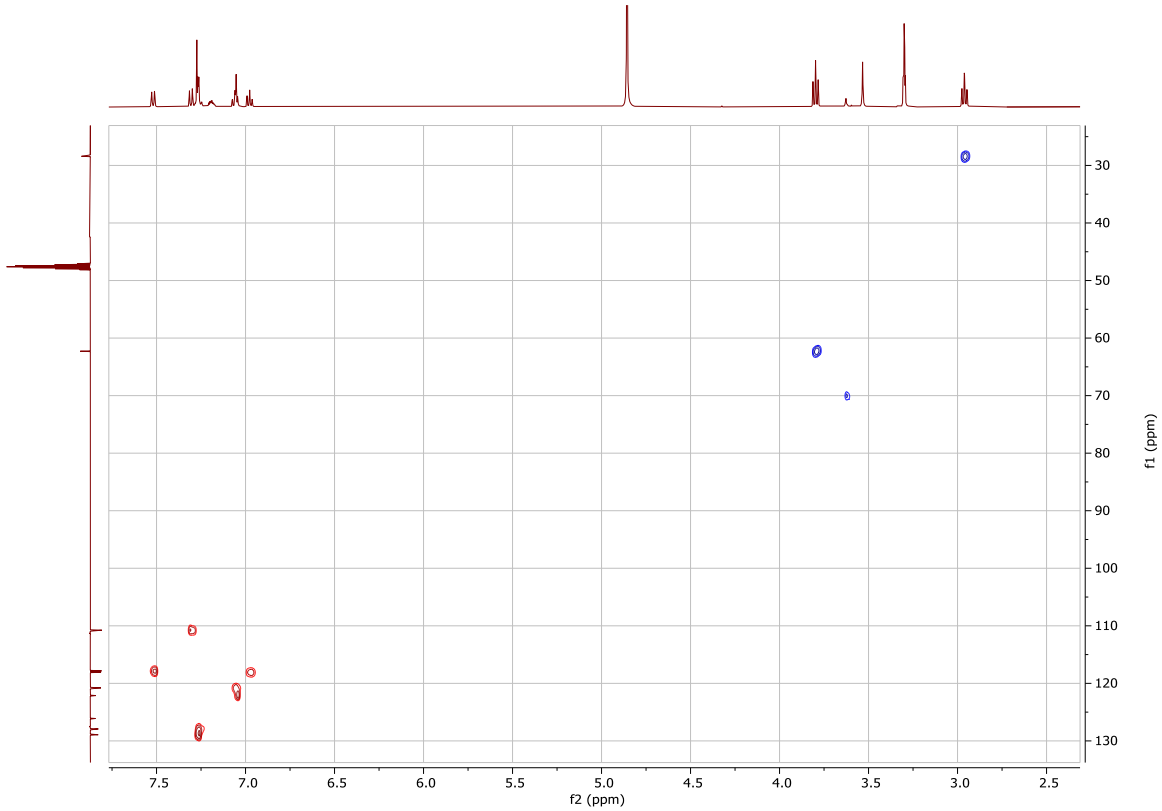
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1 (N)	-	-	-
2	7.26 (s, 1H)	129.0	C-8, C-9
3	-	111.3	-
4	7.52 (d, *J*=8.0 Hz, 1H)	117.8	C-6, C-9
5	6.98 (t, *J*=7.9 Hz, 1H)	118.1	C-7, C-8
6	7.05 (t, *J*=7.9 Hz, 1H)	120.8	C-5, C-7, C-8, C-9
7	7.31 (d, *J*=8.0 Hz, 1H)	110.8	C-5, C-8
8	-	127.5	-
9	-	136.7	-
10	2.95 (t, *J*=7.4 Hz, 2H)	28.6	C-3, C-8, C-11
11	3.80 (t, *J*=7.0 Hz, 2H)	62.1	C-11



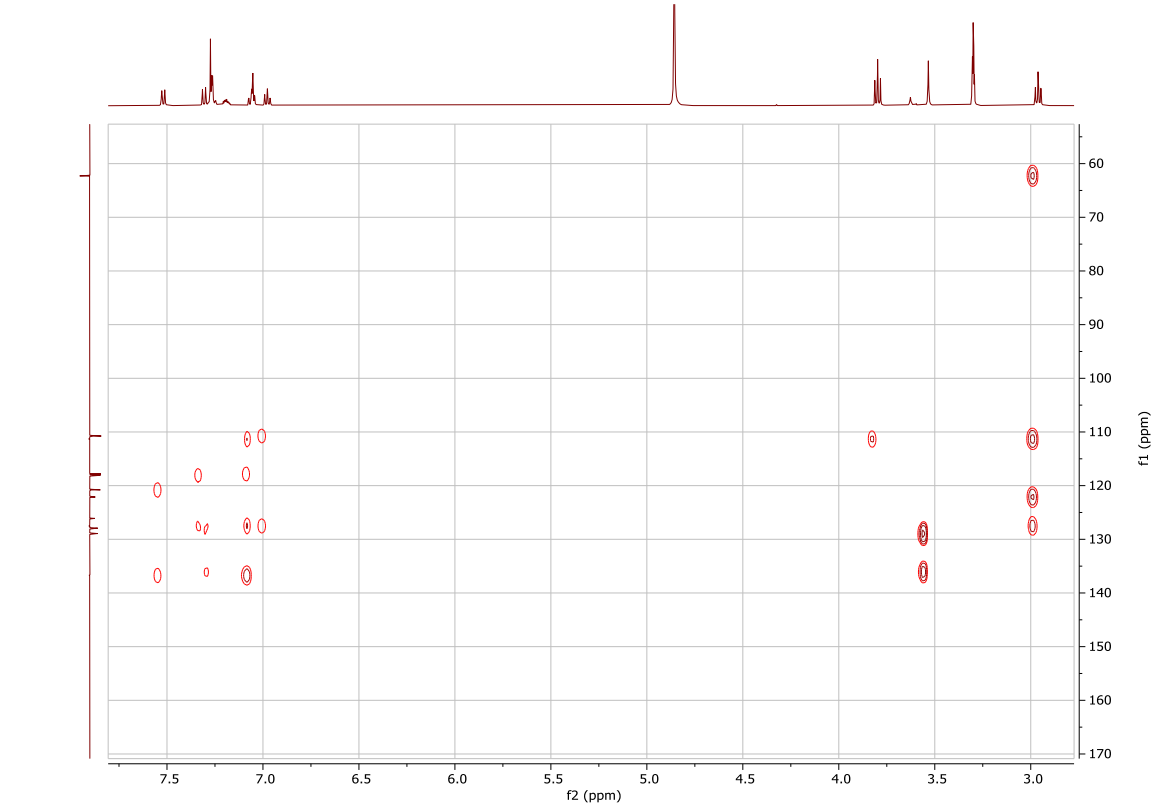
Şekil 125. Triptofole ait ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



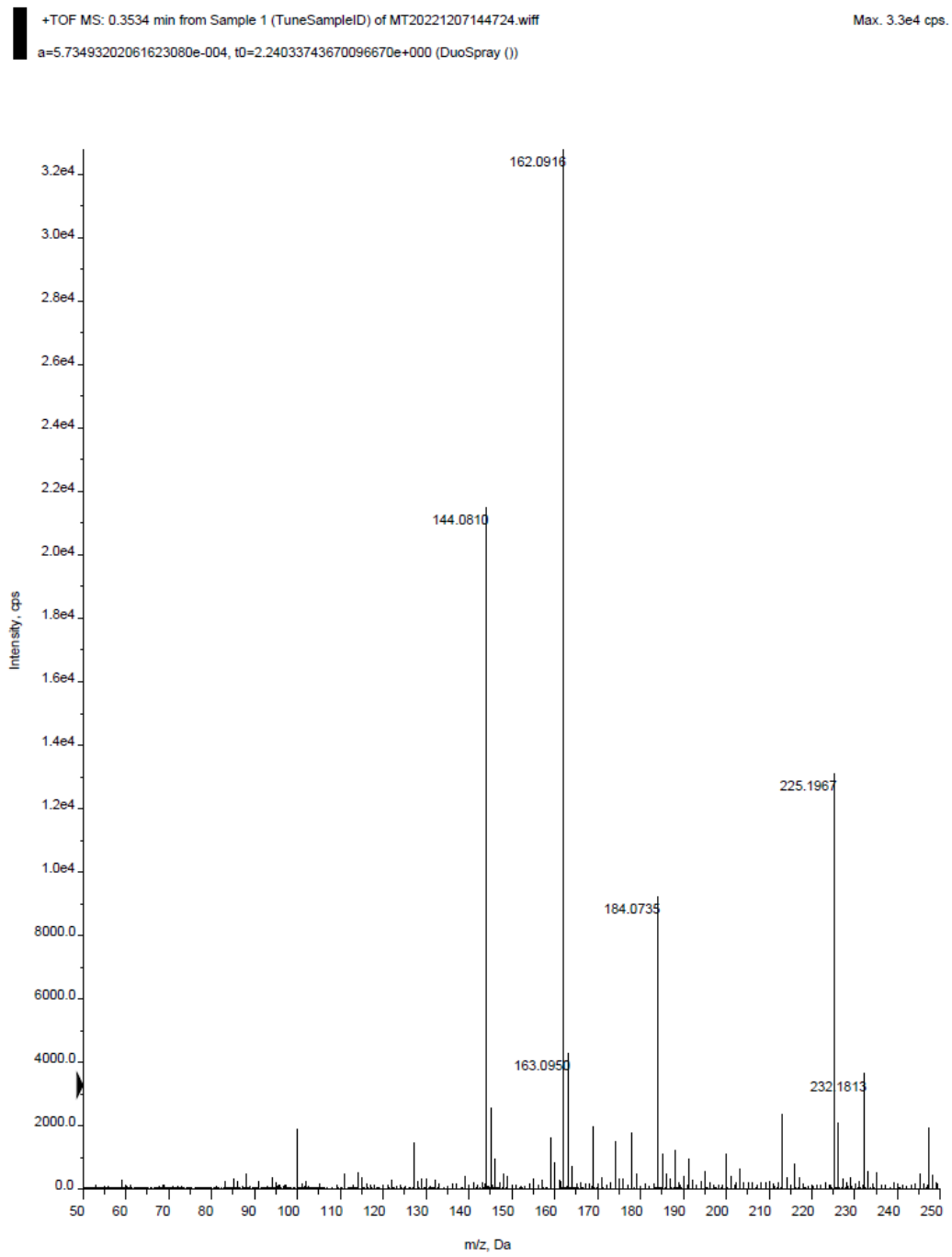
Şekil 126. Triptofole ait ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 127. Triptofole ait HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).

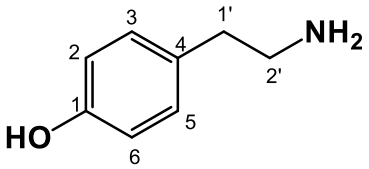


Şekil 128. Triptofole ait HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 129. Triptofole ait LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Tiramin (17)



Şekil 130. Tiramin.

Bileşik beyaz toz görünümlüdür. ^{1}H-NMR, DEPT, ^{13}C-NMR ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri ile elde edilen verilerle bileşik, tiramin (4-(2-aminoetil)fenol) (tirozamin) (Şekil 130) olarak belirlenmiştir (Şekil 131-136).

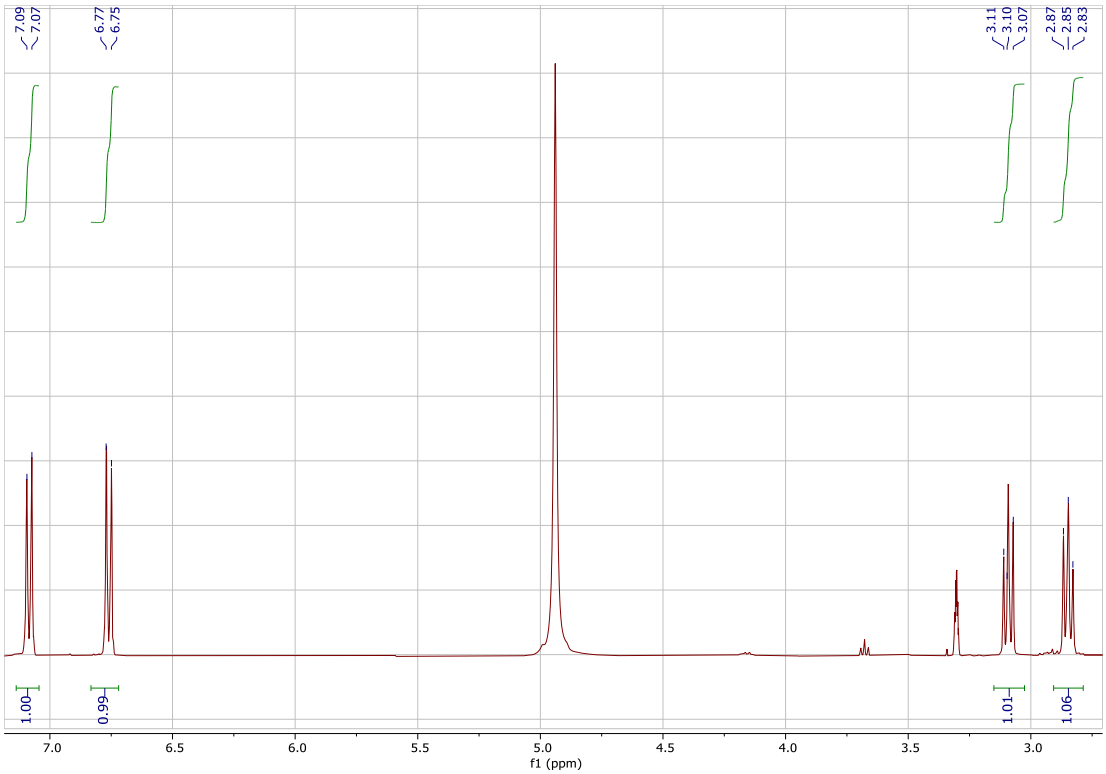
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3058 (=C-H gerilmesi), 3017 (-C-H gerilmesi), 1516 (C=C).

^{1}H-NMR, δ_H (ppm, CD_3OD, 400 MHz) 7.06 (d, *J*=8.9 Hz, 2H, H-2, H-6), 6.76 (d, *J*=8.9 Hz, 2H, H-3, H-5), 3.09 (t, *J*=5.7 Hz, 2H, H-2'), 2.85 (t, *J*=6.2 Hz, 2H, H-1').

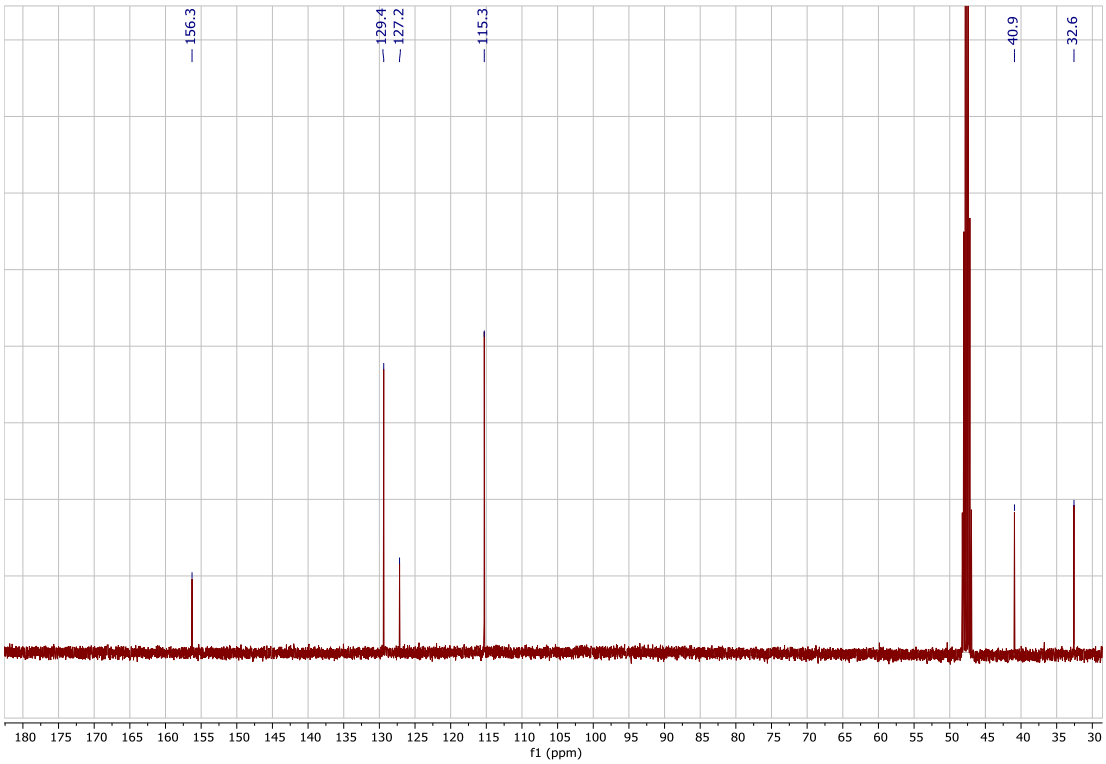
^{13}C-NMR, δ_C (ppm, CD_3OD, 100 MHz) 169.5 (C-1), 156.6 (C-4), 129.4 (C-2, C-6), 115.3 (C-3, C-5), 40.9 (C-2'), 32.6 (C-1').

Bileşiğe ait HMBC spektrumundan (Şekil 135) H-1' protonlarının 115.3 ppm'de (C-3, C-5) sinyal veren karbonlarla korelasyon gösterirken 6.76 ppm'de gözlenen protonların (H-3 ve H-5), 169.5 ppm'de sinyal veren (C-1) karbon ve 156.6 ppm'de sinyal veren karbon atomu (C-4) ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. 7.06 ppm'de sinyal veren H-2 ve H-6 protonları ile 156.6 ppm'de sinyal veren karbon atomu (C-4) ile korelasyonu gözlenmiştir. Elde edilen veriler dahilinde bileşiğin yapısı tiramin olarak açıklanmıştır. Spektral veriler literatür ile uyum göstermektedir (175).

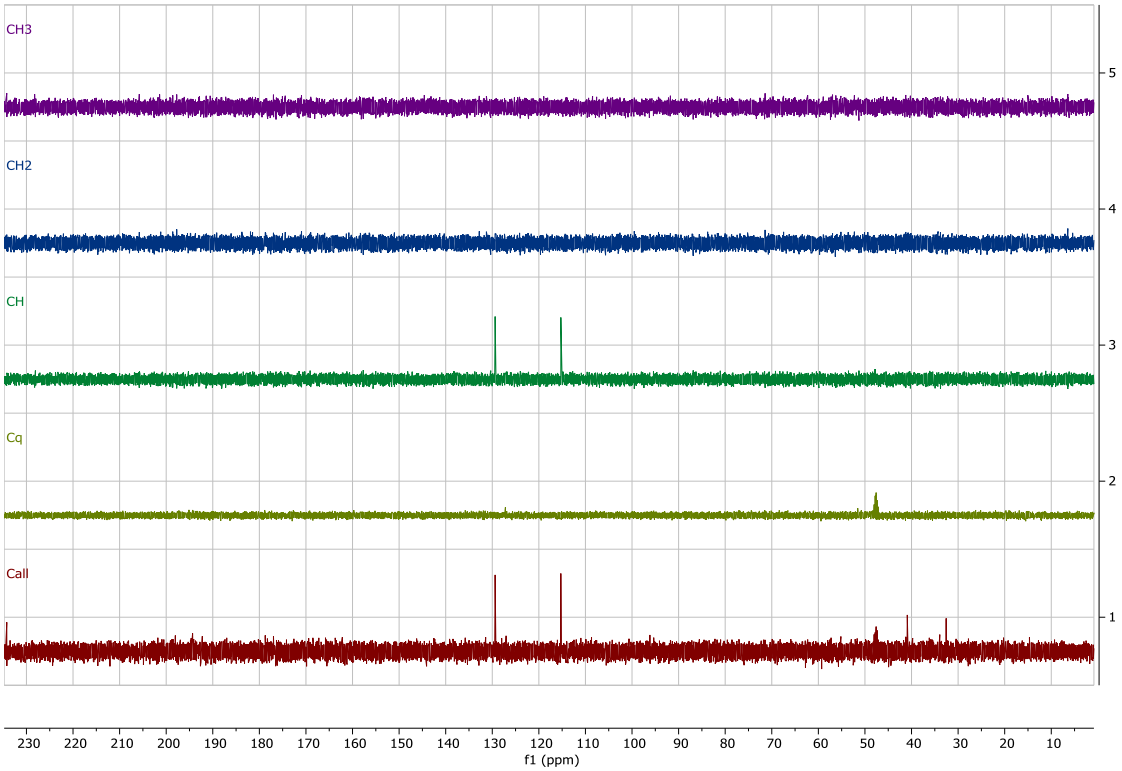
LC-Q-TOF kütle spektrumunda (Şekil 136) $C_8H_{11}NO$ formülüne karşılık gelen bileşiğin moleküler iyon piki *m/z* 138.0913 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. Bileşiğin $C_8H_{11}NO$ formülü için teorik değer 138.0919 olarak hesaplanmıştır.



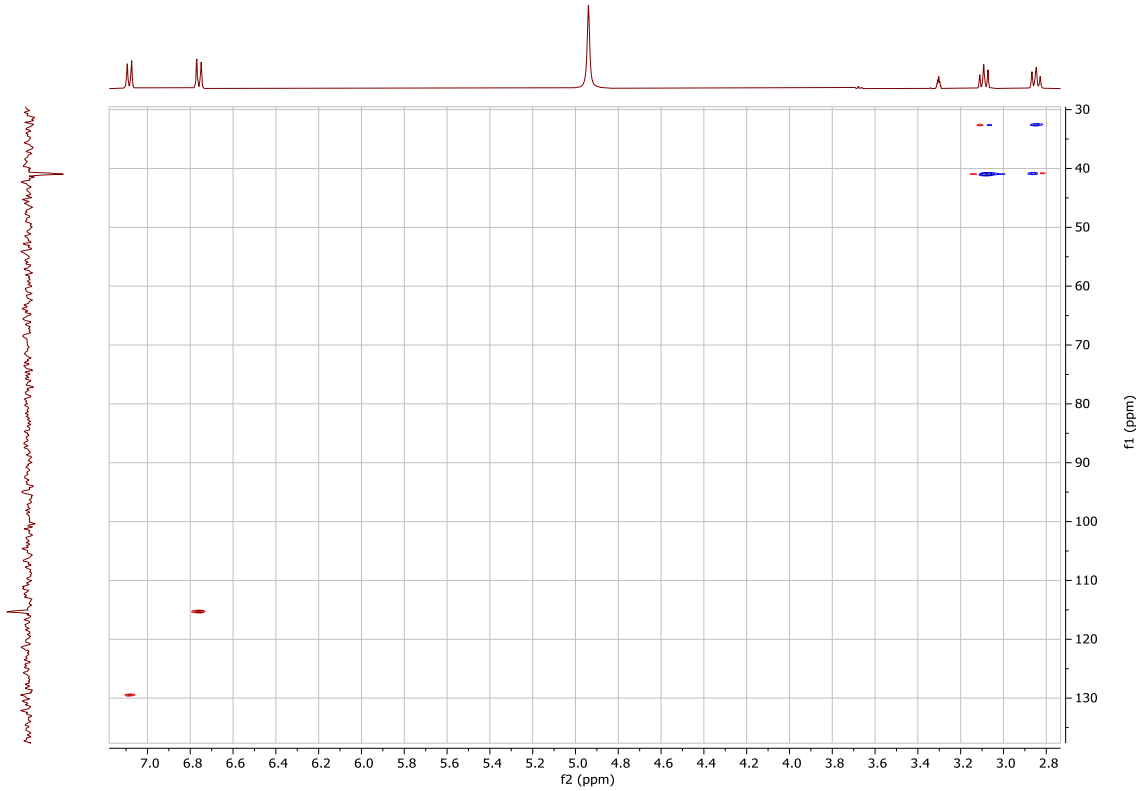
Şekil 131. Tiramin bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



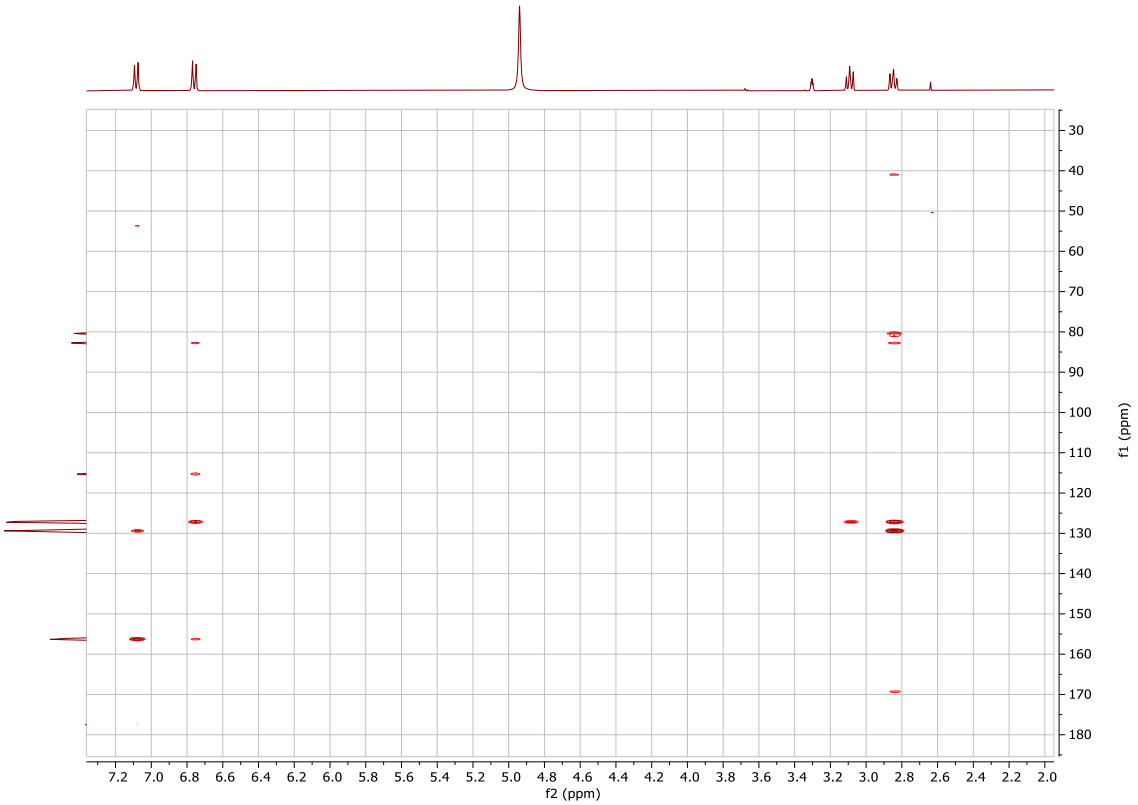
Şekil 132. Tiramin bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).



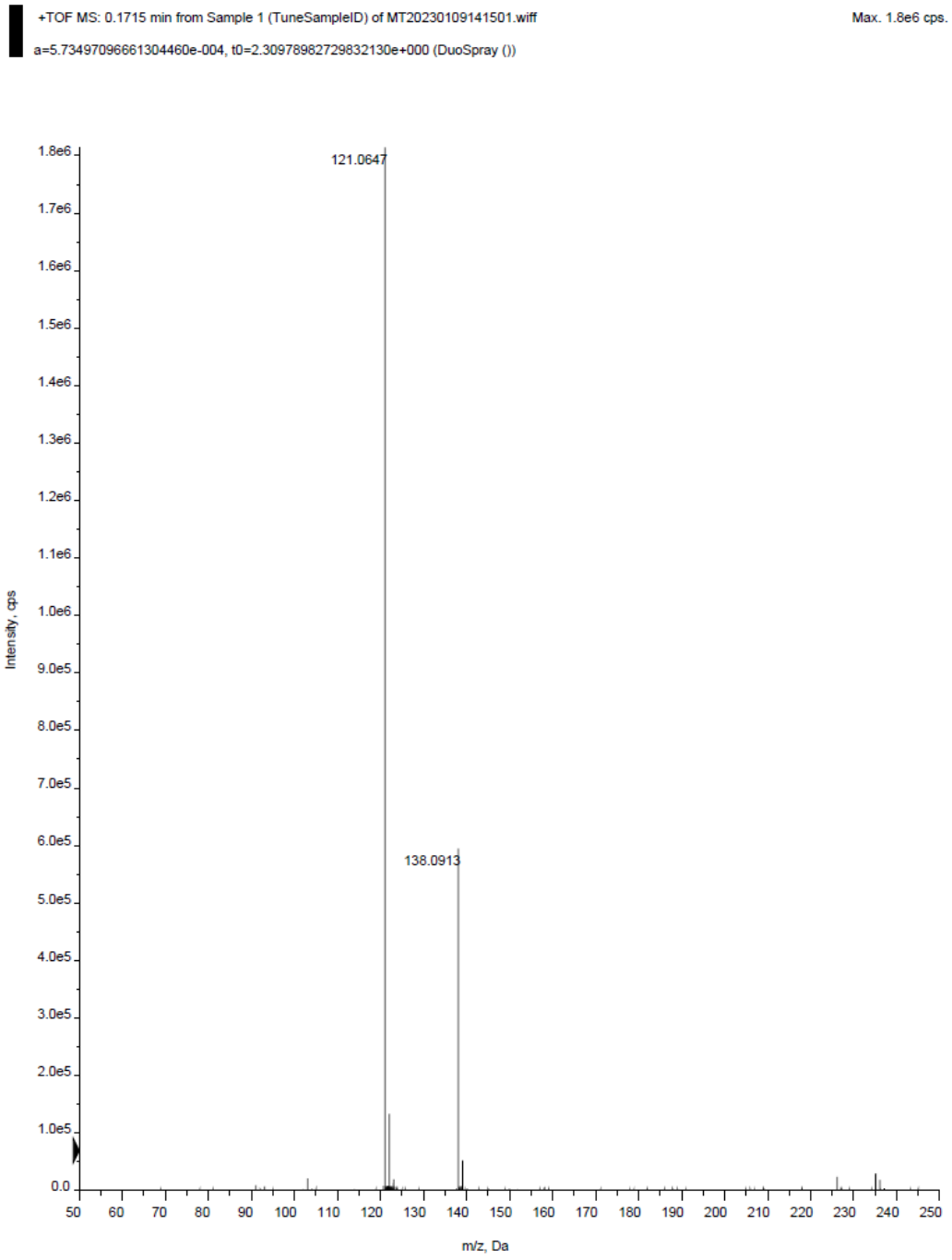
Şekil 133. Tiramin bileşiğinin DEPT spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).



Şekil 134. Tiramin bileşiğinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 135. Tiramin bileşiğinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 136. Tiramin bileşiğinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

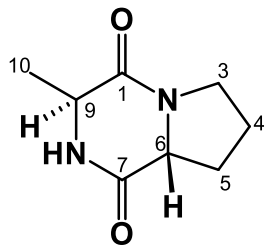
S. ovatiporus'tan İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

DCM ekstresi (897.1 mg) ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında siklo-D-prolin-L-alanin (20), L-prolin (21), siklo-L-prolin-L-tirozin (22), siklo-D-prolin-L-valin (23), siklo-L-prolin-L-valin (24), siklo-L-prolin-L-metiyonin (25), siklo-D-prolin-L-izolösin (26), siklo-L-prolin-L-izolösin (27), siklo-L-prolin-D-lösin (28) ve siklo-L-prolin-L-fenilalanin (29) olmak üzere on (10) saf bileşik izole edilmiştir. Siklo-L-prolin-L-tirozin (22), siklo-L-prolin-L-valin (24) ve siklo-L-prolin-L-fenilalanin (29) bileşiği daha önce *S. seymenliensis*'ten, siklo-D-prolin-L-valin (23) bileşiği daha önce *S. iconiensis*'ten elde edilip yapısının açıklanması nedeniyle spektrumlara yeniden yer ayrılmamıştır.

EtOAc ekstresi ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında (391.1 mg) siklo-D-prolin-L-alanin (30), vidarabin (31), L-triptofan (32) ve siklo-L-prolin-L-tirozin (33) olmak üzere dört (4) bileşik izole edilmiştir. Siklo-D-prolin-L-alanin (30) bileşiği aynı mikroorganizmanın DCM ekstresinden, L-triptofan (32) bileşiği daha önce *S. iconiensis*'ten ve siklo-L-prolin-L-tirozin (33) bileşiği *S. seymenliensis*'ten elde edilmiş ve bileşiklerin yapılarının açıklanmış olması dolayısıyla spektrumlar tekrar gösterilmemiştir.

BuOH ekstresi (5.9 g) ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında siklo-D-prolin-L-alanin (34), vidarabin (35), L-triptofan (36) ve siklo-L-prolin-L-tirozin (37) olmak üzere dört (4) bileşik izole edilmiştir. L-triptofan (36) bileşiği *S. iconiensis*'ten ve siklo-L-prolin-L-tirozin (37) bileşiği *S. seymenliensis*'ten izole edilip yapıları açıklandığı için spektrumlara yeniden yer verilmemiştir.

Siklo-D-Prolin-L-Alanin (20)



Şekil 137. Siklo-D-prolin-L-alanin.

İzole edilen bileşik beyaz toz görünümlüdür. İzole edilen bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri yardımıyla elde edilen verilerle siklo-D-prolin-L-alanin (Şekil 137) olarak belirlenmiştir (Şekil 138-141).

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3286 (NH gerilmesi), 2983 (-C-H gerilmesi), 1652 (C=O gerilmesi).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 138), amino asitlerin spesifik *α*-hidrojen bölgesinde görülen iki sinyal bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu göstermektedir. 4.25 ppm'de (t, *J*=3.7 Hz, 1H) gözlenen *α*-hidrojeninin (H-6) bağlı olduğu karbon atomunun (C-6) 59.1 ppm değerinde sinyal verdiği HSQC spektrumunda (Şekil 139) gözlenmiştir. 1.90 ppm (m, 1H, H-4a), 2.01 ppm (m, 1H, H-4b), 2.03 ppm (m, 1H, H-5a), 2.31 ppm (m, 1H, H-5b) ve 3.51 ppm'de (m, 2H, H-3) yer alan sinyallerin metilen protonlarına ait sinyaller olduğunun belirlenmesiyle dipeptit yapısındaki amino asitlerden birinin prolin olduğu anlaşılmıştır.

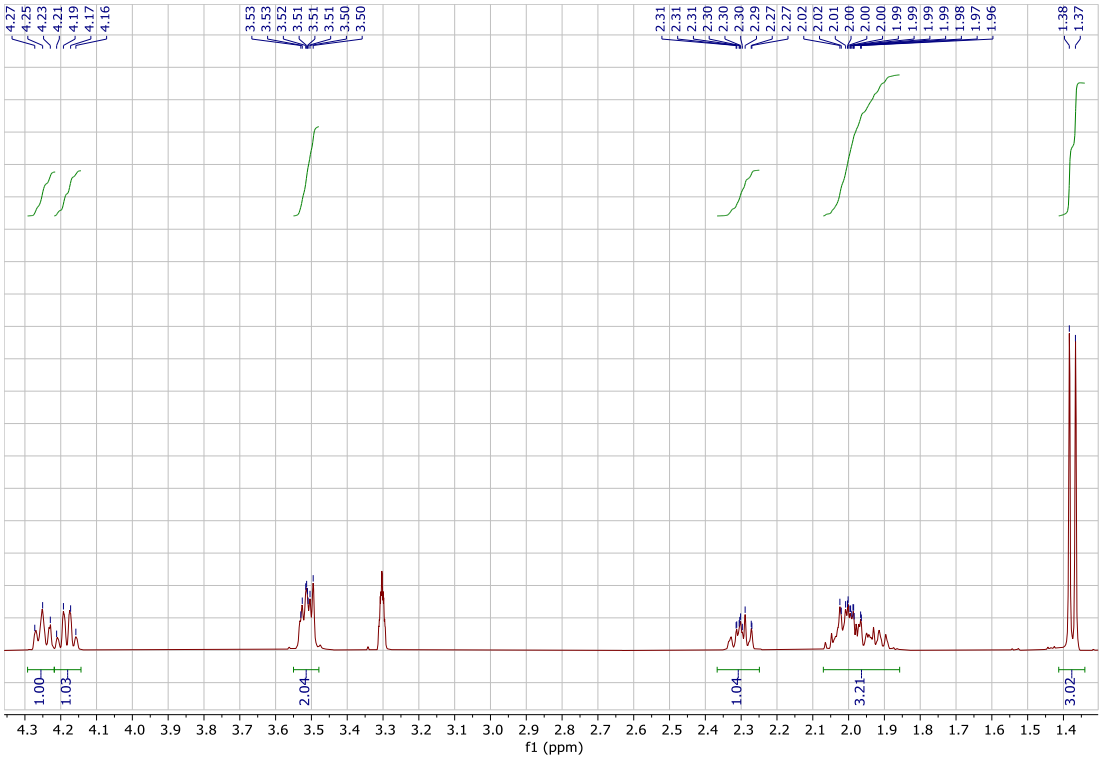
Bileşiğin 4.18 ppm'de (q, *J*=13.8, 6.9 Hz, 1H, H-9) sinyal veren diğer bir *α*-hidrojeninin bağlı olduğu karbon atomunun, HSQC spektrumundan 51.5 ppm'de (C-9) sinyal verdiği bulunmuştur. HMBC spektrumunda (Şekil 140) *α*-hidrojeni (H-9) ile 14.6 ppm (C-10, -CH_3) karbon atomu ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. 1.38 ppm'de (d, *J*=7.0 Hz, 3H, H-10) sinyal veren metil protonun dublet yarılma göstermiş olması bu amino asidin alanin olduğunu ifade etmektedir. Bu verilerden yararlanılarak molekülün yapısı siklo-D-prolin-L-alanin olarak açıklanmıştır. Spektral verilerden sağlanan bilgiler literatür ile uyumludur (176).

Şekil 141'de verilen bileşiğe ait LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_8H_{12}N_2O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki *m/z* 169.0971 $[M+H]^+$ olarak

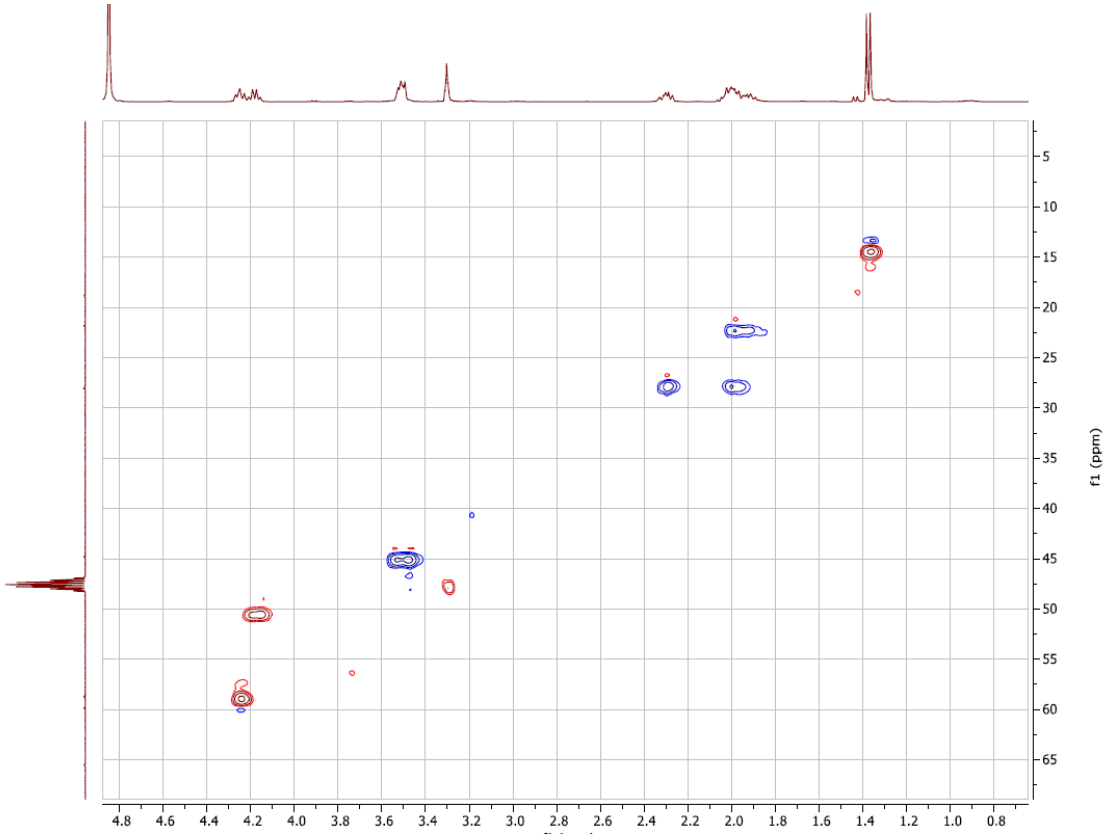
görülmüştür. Bileşiğin $C_8H_{13}N_2O_2$ kapalı formülü için teorik değer 169.0977 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 13. Siklo-D-prolin-L-alaninin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

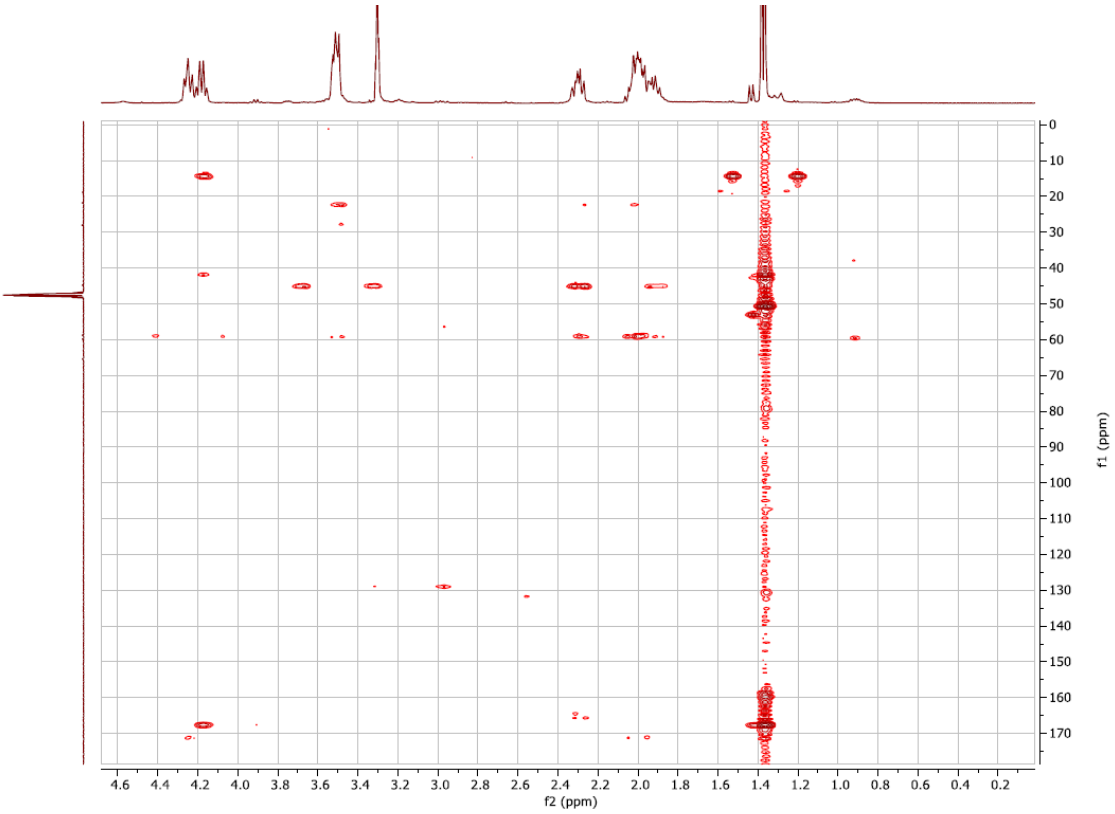
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	167.6	-
2 (N)	-	-	-
3	3.51 (m, 2H)	45.2	C-5
4	1.90 (m, 1H) 2.01 (m, 1H)	22.3	C-6, C-3
5	2.03 (m, 1H) 2.31 (m, 1H)	28.0	C-3
6	4.25 (t, *J*=3.7 Hz, 1H)	59.1	C-7
7	-	171.5	-
8 (N)	-	-	-
9	4.18 (q, *J*=13.8, 6.9 Hz, 1H)	50.5	C-1, C-10
10	1.38 (d, *J*=7.0 Hz, 3H)	14.6	C-1, C-9



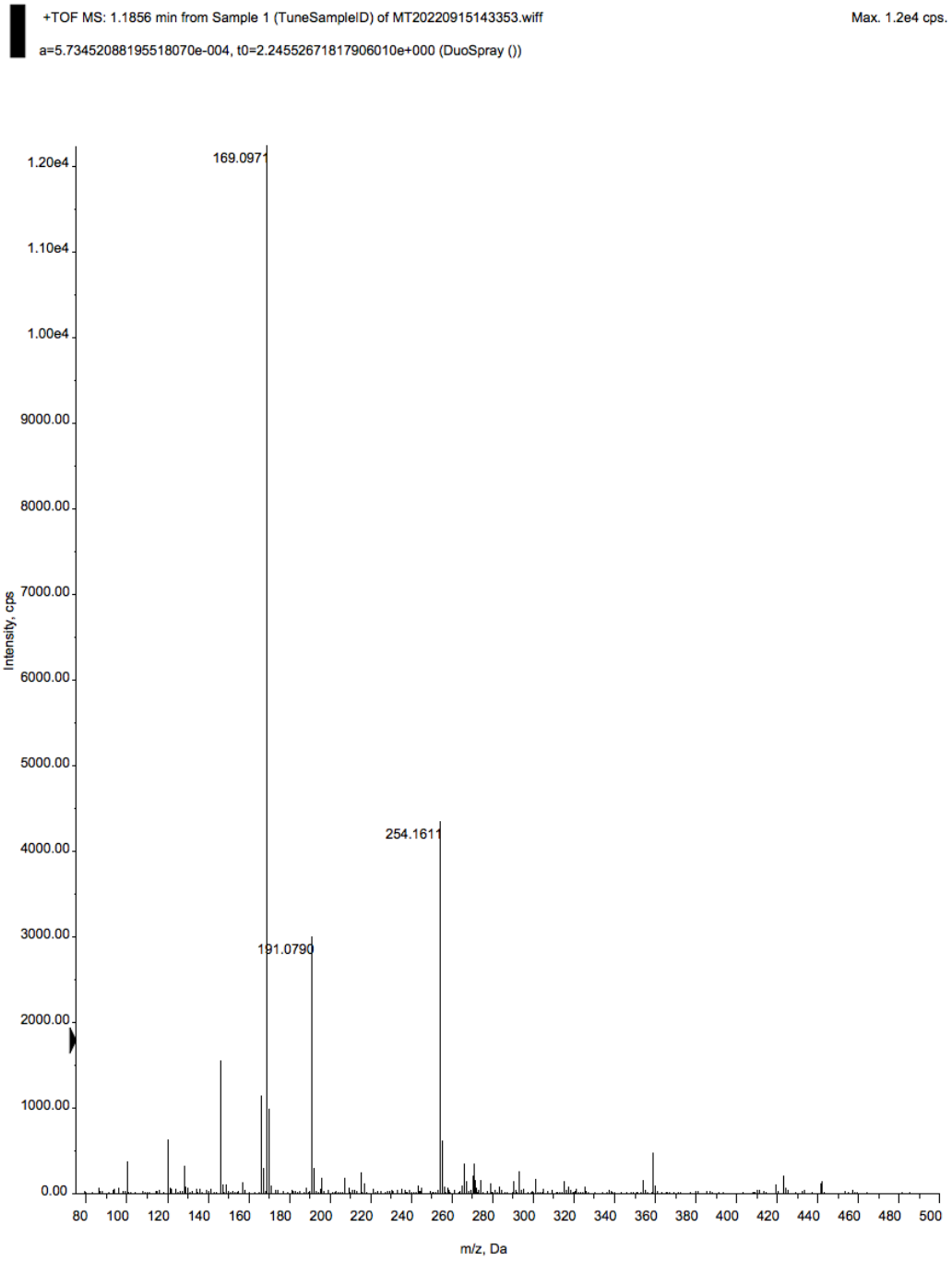
Şekil 138. Siklo-D-prolin-L-alaninin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 139. Siklo-D-prolin-L-alaninin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).

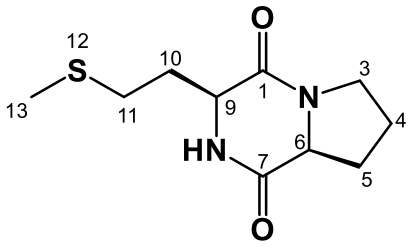


Şekil 140. Siklo-D-prolin-L-alaninin HMBC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 141. Siklo-D-prolin-L-alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu.

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



Şekil 142. Siklo-L-prolin-L-metiyonin.

Bileşiğin görünümü açık sarı renkli toz şeklindedir. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri uygulanarak elde edilen verilerle siklo-L-prolin-L-metiyonin (Şekil 142) olarak belirlenmiştir (Şekil 143-146).

IR V_{max} (cm^{-1}): 3348 (N-H), 2993 (C-H gerilmeleri), 2581 (S-H gerilmesi), 1638 ve 1680 (C=O), 1478 (CH_2 eğilmeleri).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 143) amino asitlerin *α*-hidrojenlerine ait sinyal bölgesinde 4.28 ppm (t, *J*=8.9 Hz, 1H, H-9) ve 4.25 ppm (t, *J*=8.4 Hz, 1H, H-6) değerlerinde iki adet sinyal gözlenmiştir. Gözlenen sinyaller izole edilen bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu göstermektedir. 1.96 ppm (m, 2H, H-4), 2.09 ppm (m, 1H, H-5a), 2.31 ppm (m, 1H, H-5b) ve 3.52 ppm (m, 2H, H-3) değerlerinde sinyal veren protonların HSQC spektrumundan (Şekil 144) metilen protonu sinyalleri olduğunun anlaşılmasıyla dipeptit yapısındaki amino asitlerden birinin prolin olduğu belirlenmiştir.

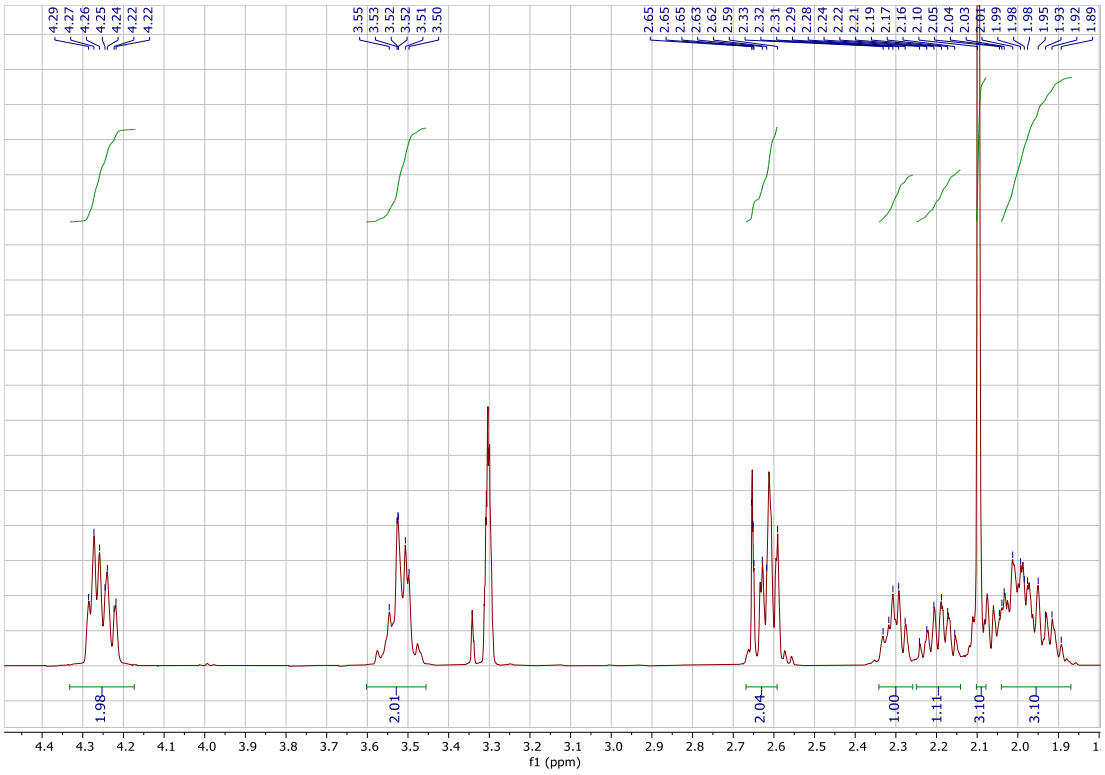
Bileşiğin içerdiği diğer *α*-hidrojeninin (H-9) bağlı olduğu karbonun (C-9) HSQC spektrumundan 55.2 ppm'de sinyal verdiği gözlenmiştir. HSQC spektrumunda 1.96 ppm (m, 1H, H-10a), 2.19 ppm (m, 1H, H-10b) ve 2.62 ppm'de (m, 2H, H-11) sinyal veren protonların metilen protonları olduğu görülmüştür. Metil protonların 2.10 ppm (H-13) değerlerinde singlet sinyal vermesi ve metil karbonun (C-13) 15.2 ppm'de sinyal vermesi bileşiğin yapısındaki diğer amino asidin metiyonin olduğunu ifade etmektedir. Spektrumlardan edinilen tüm bilgiler ışığında bileşiğin yapısı siklo-L-prolin-L-metiyonin olarak aydınlatılmıştır. Bileşiğin aydınlatılan yapısı literatür ile uyum göstermektedir (177).

Şekil 146'da verilen LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{10}H_{16}N_2O_2S$ kapalı

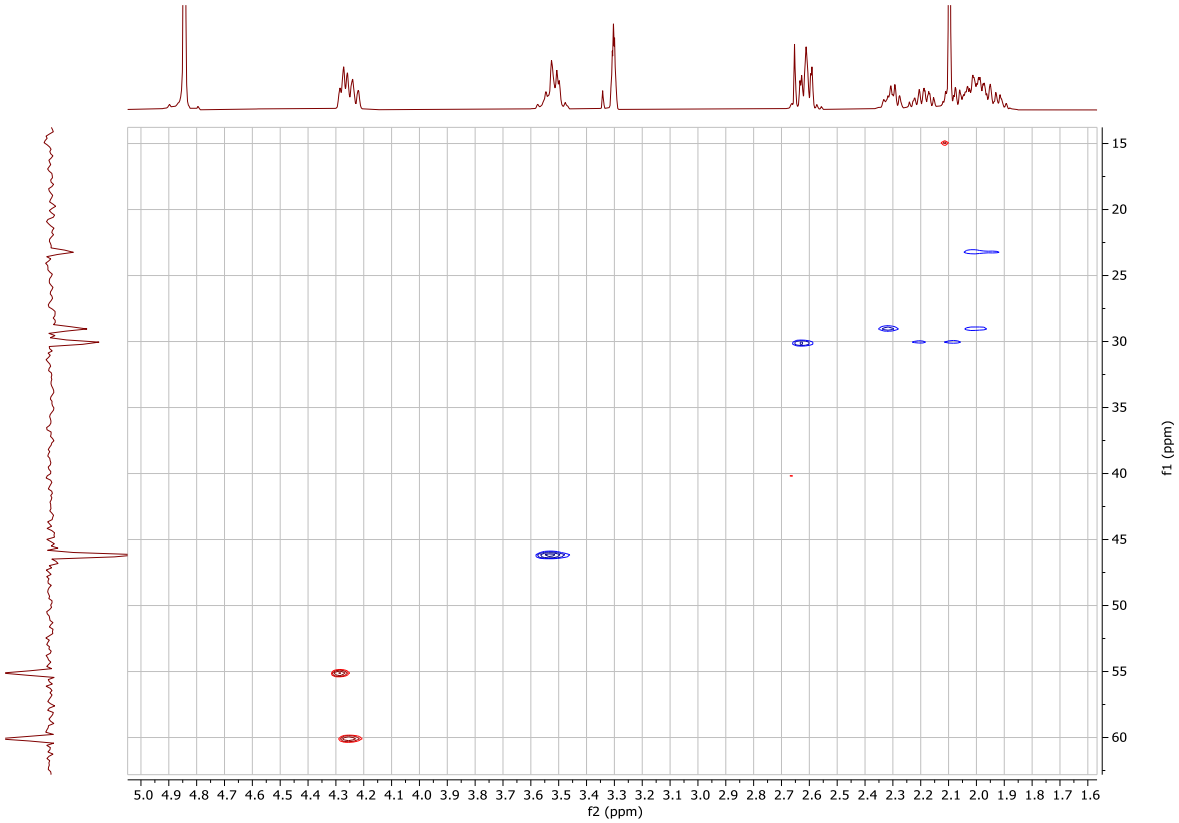
formülü ile ifade edilen moleküler iyon piki *m/z* 229.1019 $[M+H]^+$ olarak verilmiştir. $C_{10}H_{16}N_2O_2S$ bileşiği için teorik değer 229.1010 olarak hesap edilmiştir.

Tablo 14. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	167.7	-
2	-	-	-
3	3.52 (m, 2H)	46.5	C-4, C-5
4	1.96 (m, 2H)	23.2	C-3, C-5, C-6
5	2.09 (m, 1H) 2.31 (m, 1H)	30.0	C-3, C-4, C-6
6	4.25 (t, *J*=8.4 Hz, 1H)	60.2	C-5, C-7
7	-	173.0	-
8 (N)	-	-	-
9	4.28 (t, *J*=8.9 Hz, 1H)	55.2	C-1, C-10, C-11
10	1.96 (m, 1H) 2.19 (m, 1H)	29.0	C-1, C-9, C-11
11	2.62 (m, 2H)	30.1	C-9, C-10, C-13
12 (S)	-	-	-
13	2.10 (s, 3H)	15.2	C-11



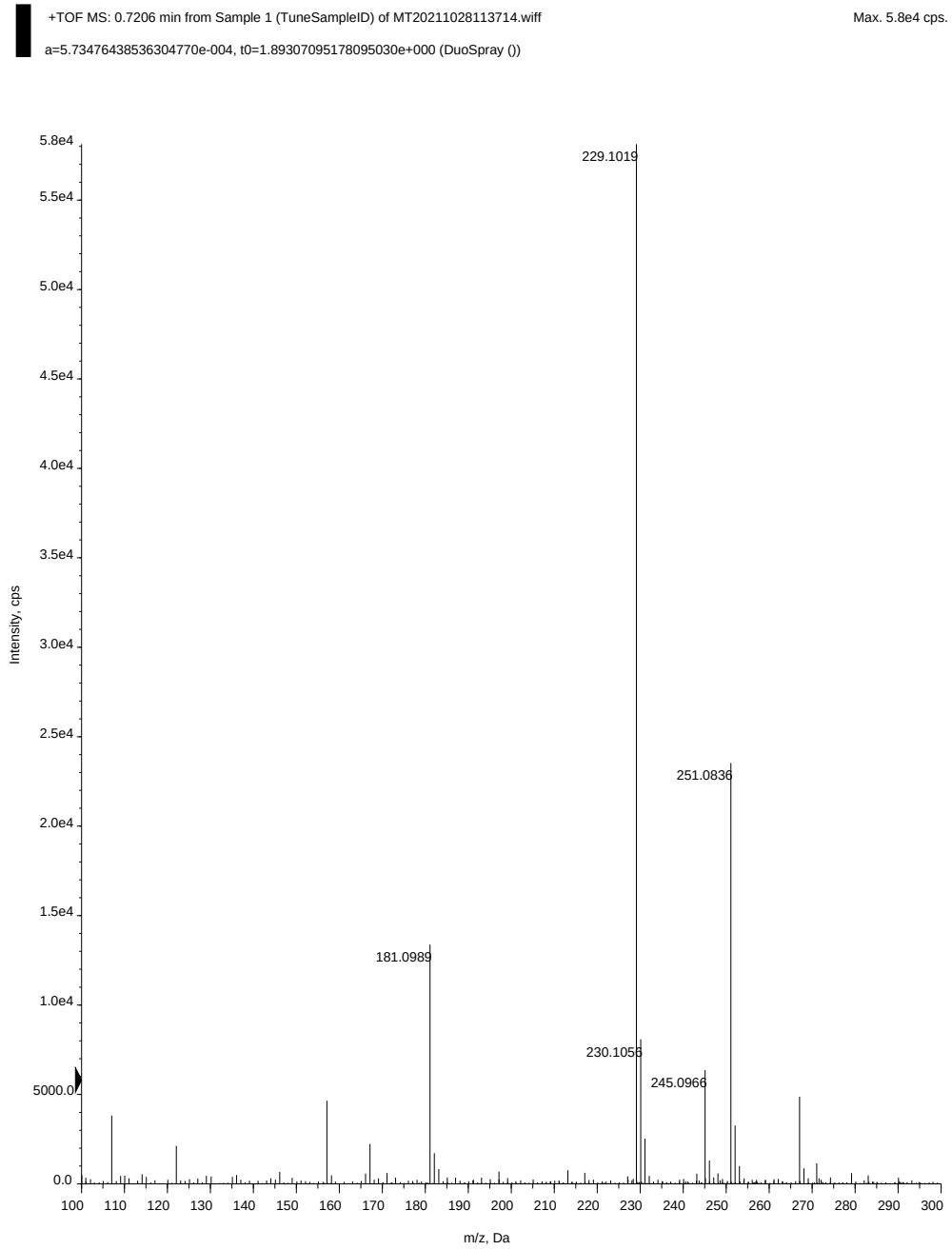
Şekil 143. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 144. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).

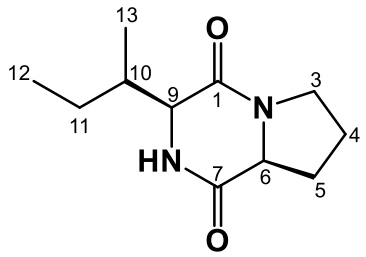


Şekil 145. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin HMBC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 146. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-L-Prolin-L-İzolösin (27)



Şekil 147. Siklo-L-prolin-L-izolösin.

İzole edilen bileşik beyaz amorf toz görünümündedir. Bileşiğin yapısı alınan ^{1}H-NMR, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri yardımıyla elde edilen verilerle siklo-L-prolin-L-izolösin (Şekil 147) olarak belirlenmiştir (Şekil 148-151).

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3295 (NH gerilmesi), 3068 (C=C), 2875 (C-H gerilmesi), 1656 (C=O), 1424 (CH_2, CH_3 eğilmesi).

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 148) *α*-hidrojenlerden birisinin 4.19 ppm'de (dd, *J*=9.7, 6.4 Hz, 1H, H-6) sinyal verdiği belirlenirken, diğer *α*-hidrojenine ait sinyal 4.06 ppm'de (brs, 1H, H-9) gözlenmektedir. Spektrumda 1.94 ppm (m, 1H, H-5a), 2.33 ppm (m, 1H, H-5b), 1.94 ppm (m, 1H, H-4a), 2.02 ppm (m, 1H, H-4b) ve 3.52 ppm'de (m, 2H, H-3) yer alan prolin amino asidi için karakteristik sinyaller olması ve HSQC spektrumundan (Şekil 149) metilen sinyalleri olduğunun anlaşılmasıyla bileşiğin yapısındaki amino asitlerden birisinin prolin olduğu belirlenmiştir.

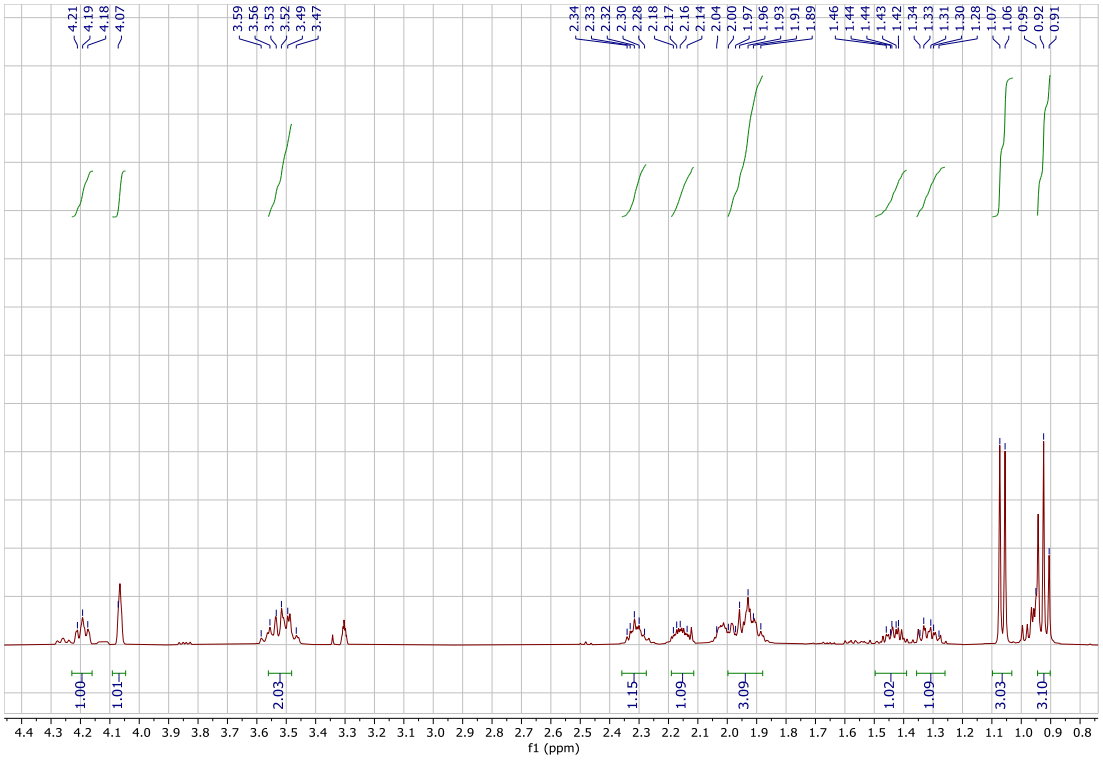
4.06 ppm'de (H-9) sinyal veren *α*-hidrojeninin bağlı olduğu karbon değeri HSQC'den 61.0 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. 2.17 ppm'de sinyal veren protonun (m, 1H, H-10) bağlı olduğu karbon değeri HSQC spektrumundan 37.1 ppm (C-10), 1.32 (m, 1H, H-11a) ve 1.44 ppm'de (m, 1H, H-11b) sinyal veren geminal protonların bağlı olduğu karbon değeri ise 25.2 ppm'de (C-11) gözlenmiştir. 0.92 ppm'de (t, *J*=7.5 Hz, 3H, H-12) sinyal veren metil (-CH_3) protonuna bağlı bulunan karbon sinyali 12.3 ppm (C-12) değerinde, 1.07 ppm'de sinyal veren diğer metil protonuna (t, *J*=7.3 Hz, 3H, H-13) bağlı karbon (C-13) 15.5 ppm değerinde sinyal vermiştir. H-12 protonunun triplet yarılma ve H-13 protonunun dublet yarılma göstermesi terminal metillerin sırasıyla -CH_2CH_3 ve -$CHCH_3$ şeklinde bağlandığını göstermektedir.

Böylece bileşiğin yapısında yer alan diğer amino asidin izolösin olduğu anlaşılarak bileşiğin yapısı siklo-L-prolin-L-izolösin olarak belirlenmiştir. Spektral verileri literatür verileri ile uyum göstermektedir (178).

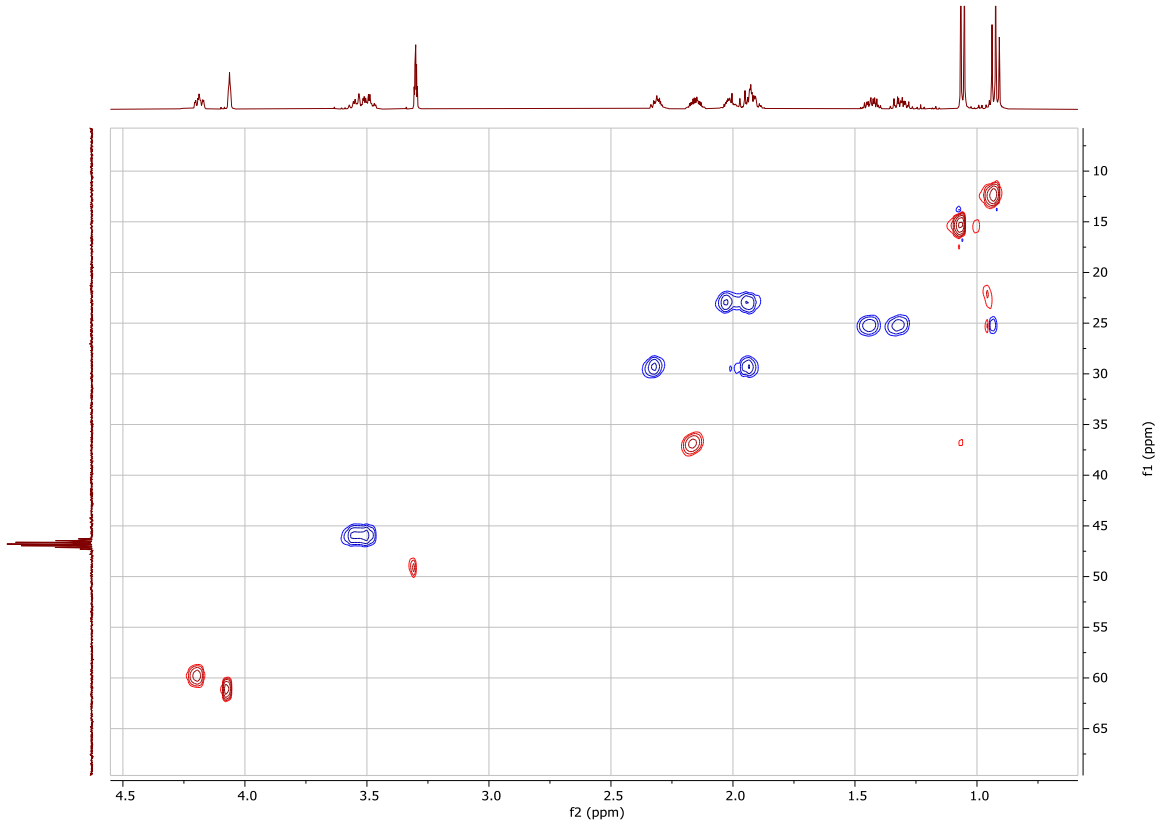
Bileşiğe ait LC-Q-TOF kütle spektrumu incelendiğinde (Şekil 151) $C_{11}H_{18}N_2O_2$ formülü için moleküler iyon piki *m/z* 211.1456 $[M+H]^+$ olarak gözlenmiştir. $C_{11}H_{18}N_2O_2$ için teorik değer 211.1402 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 15. Siklo-L-prolin-L-izolösinin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	170.0	-
2 (N)	-	-	-
3	3.52 (m, 2H)	45.9	C-4, C-5, C-6
4	1.94 (m, 1H) 2.02 (m, 1H)	23.0	C-6
5	1.94 (m, 1H) 2.33 (m, 1H)	29.2	C-3, C-4, C-6, C-7
6	4.19 (dd, *J*=9.7, 6.4 Hz, 1H)	59.6	C-5
7	-	166.2	-
8 (N)	-	-	-
9	4.06 (brs, 1H)	61.0	C-11, C-13, C-10, C-7
10	2.17 (m, 1H)	37.1	C-9, C-11
11	1.31 (m, 1H) 1.44 (m, 1H)	25.2	C-9, C-11, C-13
12	0.92 (t, *J*=7.3 Hz, 3H)	12.3	C-10, C-11
13	1.07 (d, *J*=7.2 Hz, 3H)	15.5	C-1, C-11, C-10, C-9



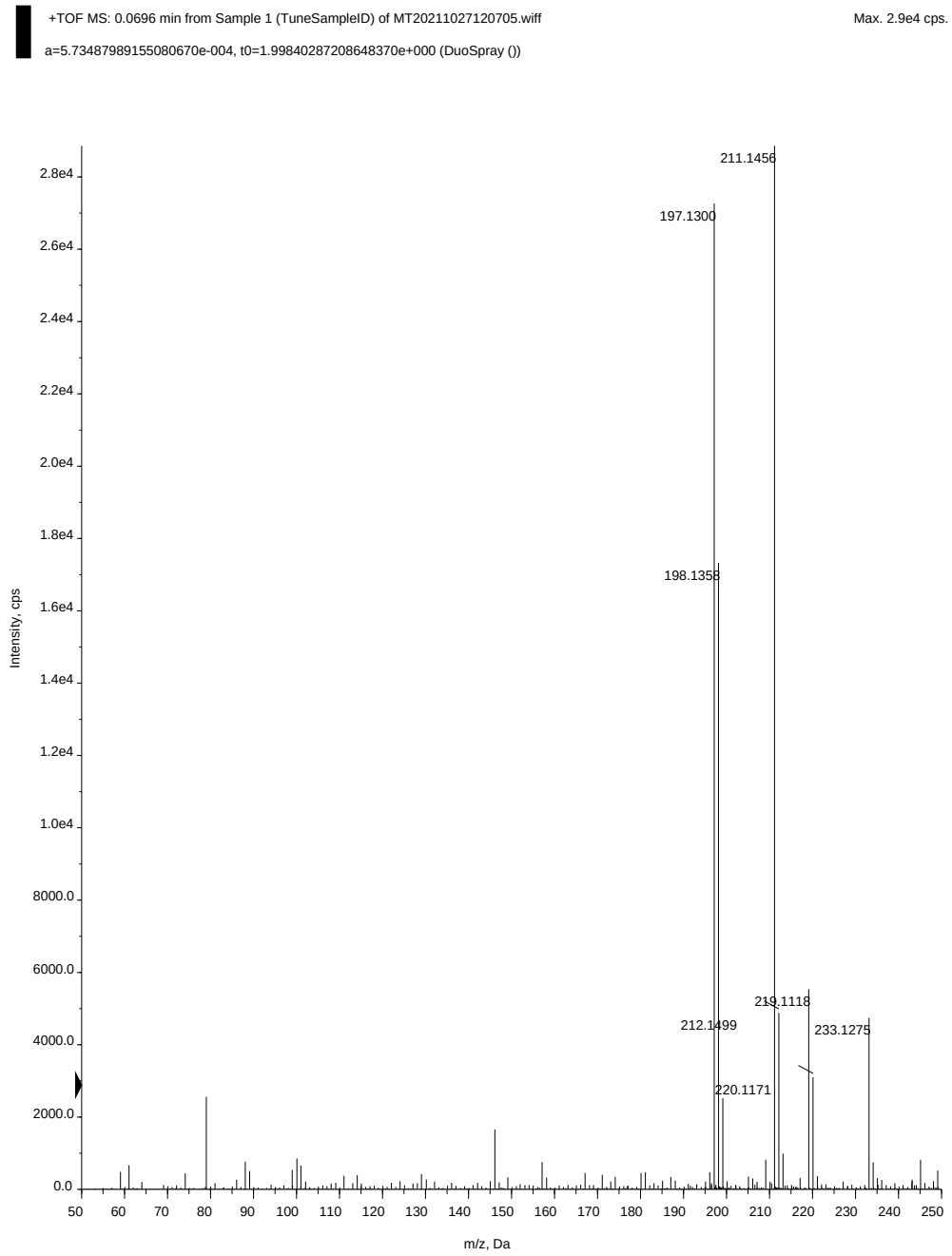
Şekil 148. Siklo-L-prolin-L-izolösinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 149. Siklo-L-prolin-L-izolösinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).

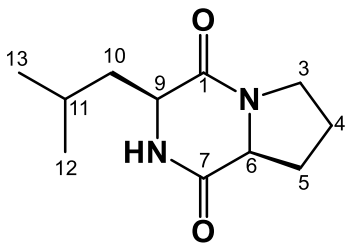


Şekil 150. Siklo-L-prolin-L-izolösinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 151. Siklo-L-prolin-L-izolösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Siklo-L-Prolin-D-Lösin (28)



Şekil 152. Siklo-L-Prolin-D-Lösin.

Bileşik krem renkli ve amorf formdadır. ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT ve LC-Q-TOF kütle spektroskopik teknikleri yardımıyla elde edilen veriler ile, siklo-L-prolin-D-lösin (Şekil 152) olarak bulunmuştur (Şekil 153-156).

IR (ATR) V_{max} (cm^{-1}) 3282 (NH gerilmesi), 2948, 2874 (C-H gerilmesi), 1648 (C=O), 1468, 1428 (C-H eğilmesi).

^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 153) göz önüne alındığında amino asitlerin *α*-hidrojen bölgesinde iki adet sinyal fark edilmektedir. Bu durum bileşiğin dipeptit yapısında olduğunu anlatmaktadır.

α-hidrojenlerden birisinin 4.25 ppm'de (dd, *J*=9.3, 6.9 Hz, 1H, H-6) diğer α-hidrojeninin 4.12 ppm'de (t, *J*=5.8 Hz, 1H, H-9) sinyal verdiği görülmektedir. HSQC spektrumundan (Şekil 154) H-6 protonunun 58.9 ppm'de (C-6) sinyal veren karbona bağlı olduğu belirlenmiştir. ^{1}H-NMR spektrumunda 2.04-2.30 ppm (m, 2H, H-5), 1.99 ppm (m, 2H, H-4) ve 3.50 ppm'de (m, 2H, H-3) sinyallerin görüldüğü tespit edilmiştir. Prolin için karakteristik metilen karbonlarına ait sinyaller 22.3 ppm (C-4), 27.7 ppm (C-5) ve 45.0 ppm'de (C-3) gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda bileşiğin yapısında yer alan amino asitlerden birisinin prolin olduğu anlaşılmıştır.

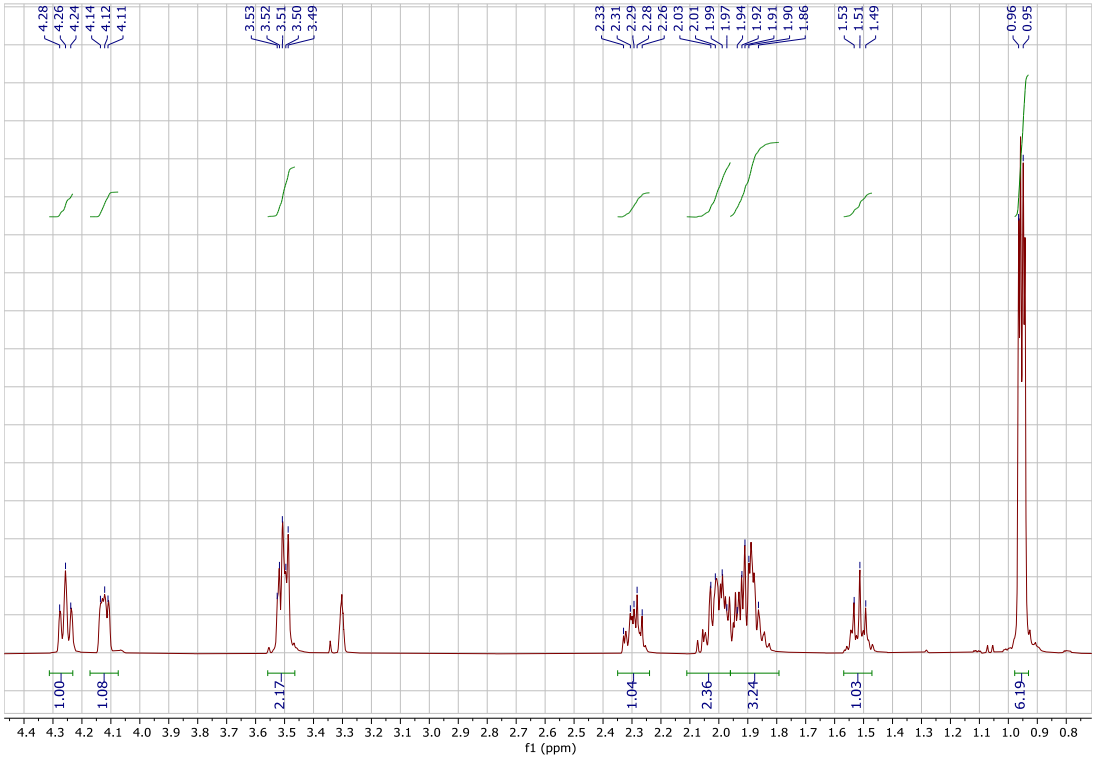
H-9 protonun bağlı olduğu karbon değeri HSQC spektrumundan 53.2 ppm (C-9) olarak belirlenmiştir. ^{1}H-NMR spektrumundan 0.95 ppm'de (d, *J*=7.5 Hz, 6H, H-12 ve H-13) sinyal veren metil protonlarının bağlı olduğu karbon değeri HSQC spektrumundan 20.8 ppm olarak belirlenmiştir. HSQC spektrumunda proline ait metilen sinyalleri dışında 38.0 ppm'de (C-10) bir metilen grubunun daha sinyallerinin gözlenmiş olması bileşikte yer alan diğer amino asidin lösin olduğunu göstermektedir. 1D ve 2D NMR verileri değerlendirilerek bileşiğin siklo-L-prolin-D-lösin olduğu belirlenmiştir. Spektral veriler literatür ile uyumludur (164).

LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{11}H_{18}N_2O_2$ için moleküler iyon piki *m/z*

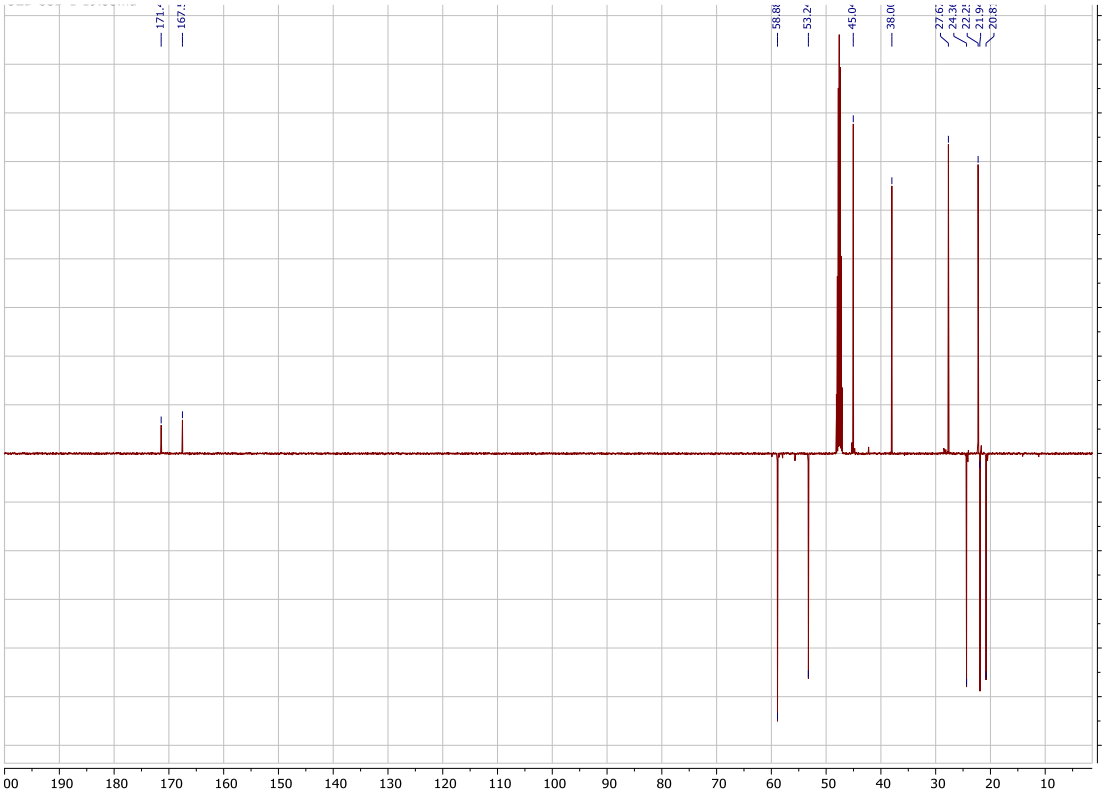
211.1481 $[M+H]^+$ değerinde gözlenmiştir. $C_{11}H_{18}N_2O_2$ kapalı formülü için teorik değer 211.1402 olarak hesaplanmıştır (Şekil 156).

Tablo 16. Siklo-L-prolin-D-lösinin 1D NMR değerleri (CD_3OD, 500 MHz).

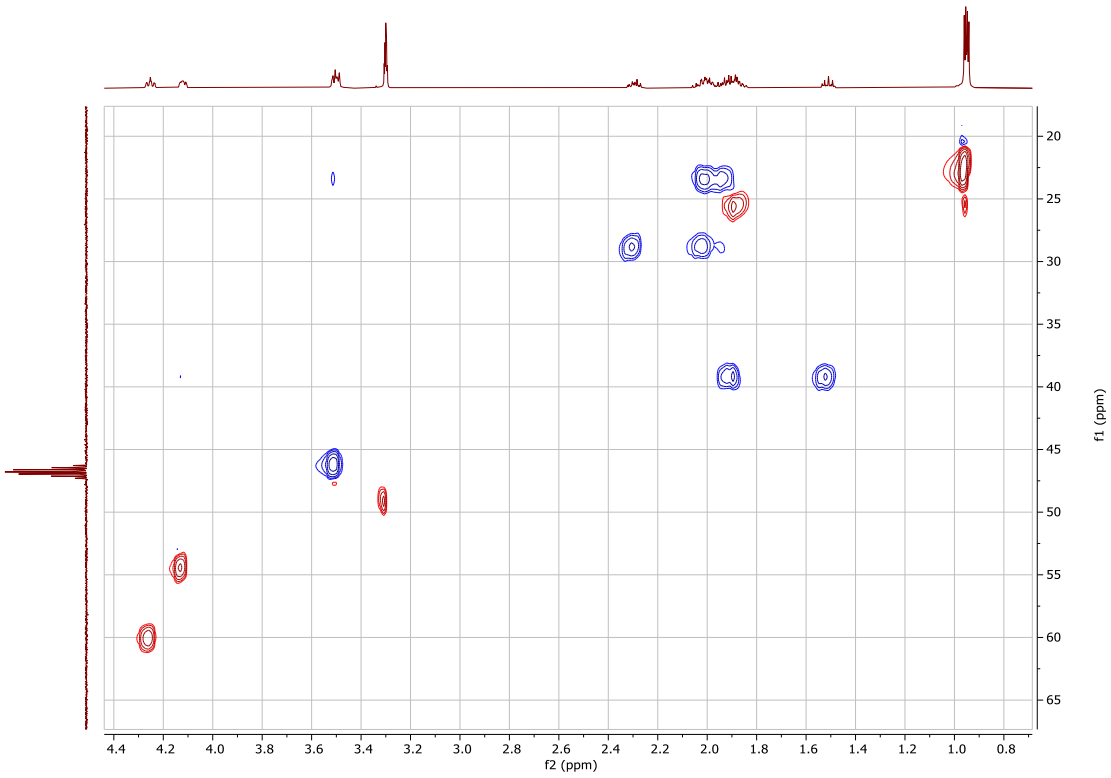
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	171.4
2 (N)	-	-
3	3.50 (m, 2H)	45.0
4	1.99 (m, 2H)	22.3
5	2.04 (m, 1H) 2.30 (m, 1H)	27.7
6	4.25 (dd, *J*=9.3, 6.9 Hz, 1H)	58.9
7	-	167.5
8 (N)	-	-
9	4.12 (t, *J*=5.8 Hz, 1H)	53.2
10	1.51 (m, 1H) 1.92 (m, 1H)	38.0
11	1.86 (m, 1H)	24.4
12-13	0.95 (d, *J*=7.5 Hz, 6H)	20.8



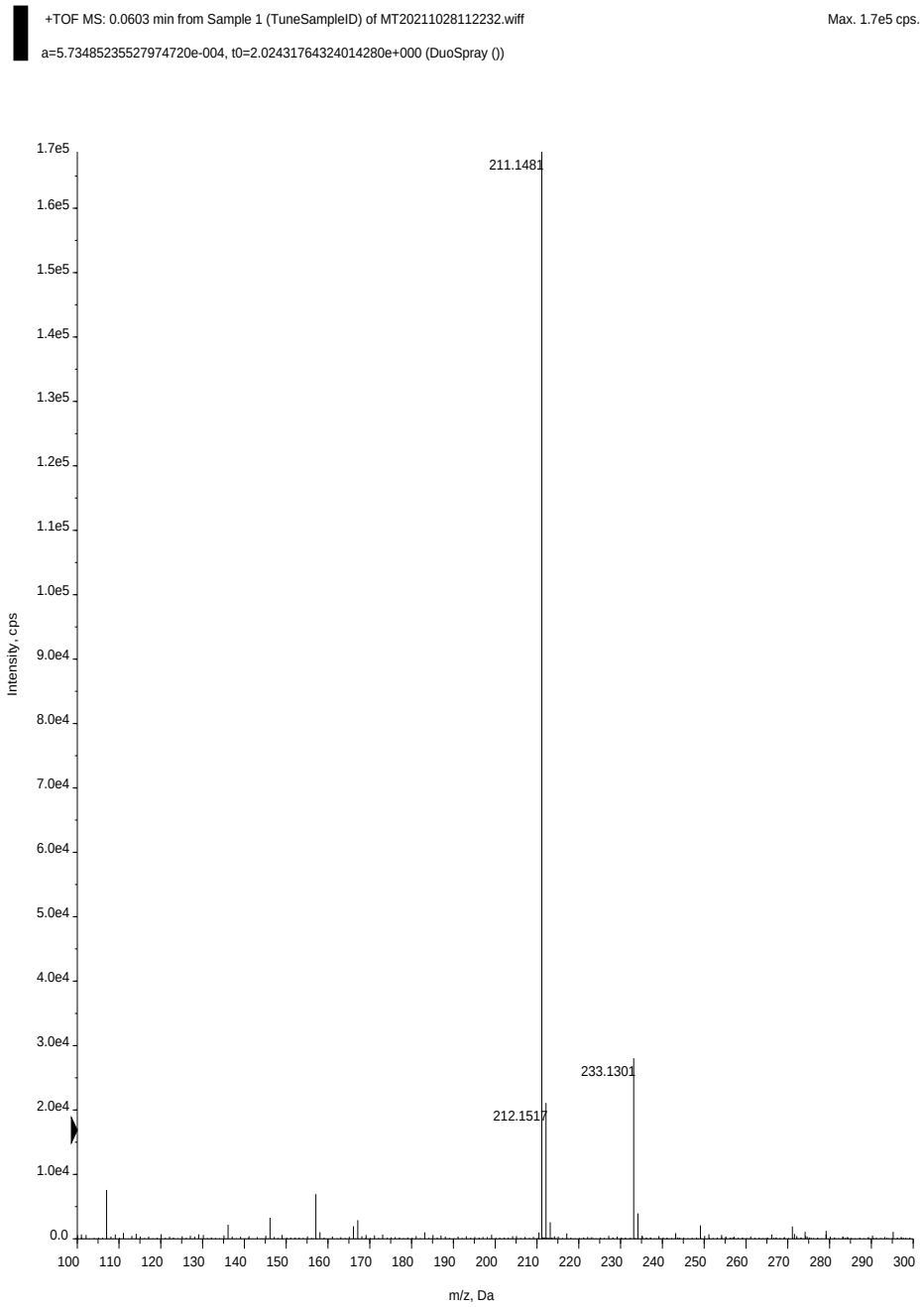
Şekil 153. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 154. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 100 MHz).

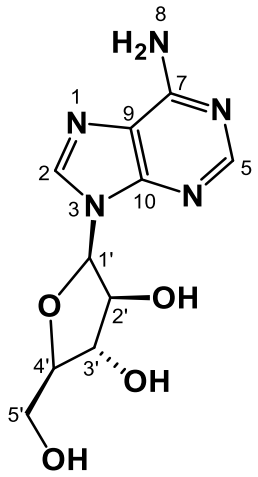


Şekil 155. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 400 MHz).



Şekil 156. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

Vidarabin (31)



Şekil 157. Vidarabin.

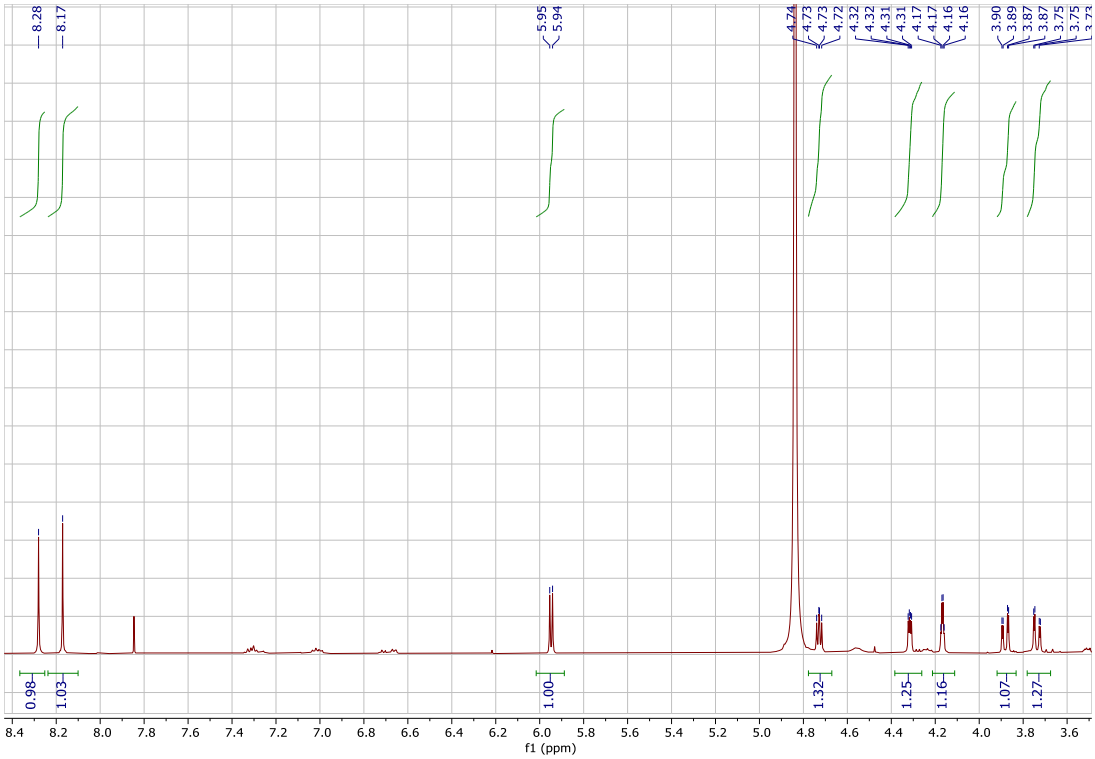
Bileşik beyaz amorf toz görünümündedir. İzole edilen bileşiğin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-APT, HSQC, HMBC ve LC-Q-TOF-MS ile elde edilen verilerle vidarabin (9-*β*-D-arabinofuranozil adenin, Ara-A) (Şekil 157) olarak belirlenmiştir (Şekil 158-162).

^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 158), 8.1-8.3 ppm civarında sadece iki adet singlet gözlenmesi yapıda çok sayıda heteroatom içeren aromatiklik varlığına işaret etmiştir. 8.28 ppm ve 8.17 ppm'de singlet sinyal veren protonların 121.3 ppm (C-9), 150.1 ppm (C-10) ve 157.7 ppm'de (C-7) sinyal veren üç adet kuaterner karbon atomu ile HMBC korelasyonu gözlenmektedir (Şekil 161). ^{1}H-NMR spektrumunda şeker bölgesinde gözlenen sinyallerin ^{13}C-NMR değerleri 60-90 ppm aralığında gözlenmiştir. Bu kayma değerleri, bağlı şekerin arabinofuranoz olduğunu göstermiştir. Anomerik hidrojenin verdiği 5.95 ppm'de gözlenen *J*=6.4 Hz'lik dublet, şekerin *β*-konfigürasyonda olduğunu kanıtlamaktadır. Arabinofuranoz ve hetero atom içeren aromatik halka varlığı birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin nükleozid yapısında olabileceği düşünülmüştür. Veriler detaylı bir şekilde incelendiğinde bileşiğin yapısı arabinofuranozil adenin (vidarabin) olarak açıklanmıştır. Spektral veriler literatür ile uyum göstermektedir (179).

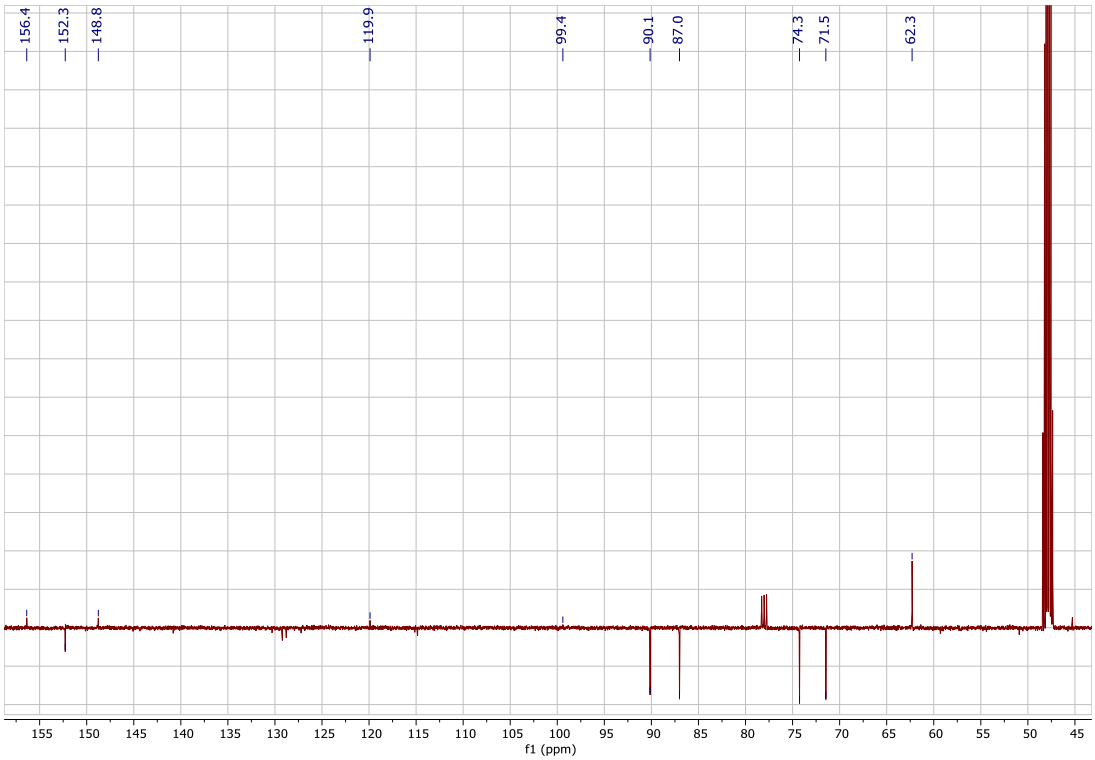
LC-Q-TOF kütle spektrumunda $C_{10}H_{13}N_5O_4$ için iyon pikinin *m/z* 268.1041 $[M+H]^+$ değerinde olduğu görülmüştür. Bileşiğe ait $C_{10}H_{13}N_5O_4$ kapalı formülü için teorik değer 268.1046 olarak hesaplanmıştır (Şekil 162).

Tablo 17. Vidarabinin 1D ve 2D NMR değerleri (CD_3OD, 400 MHz).

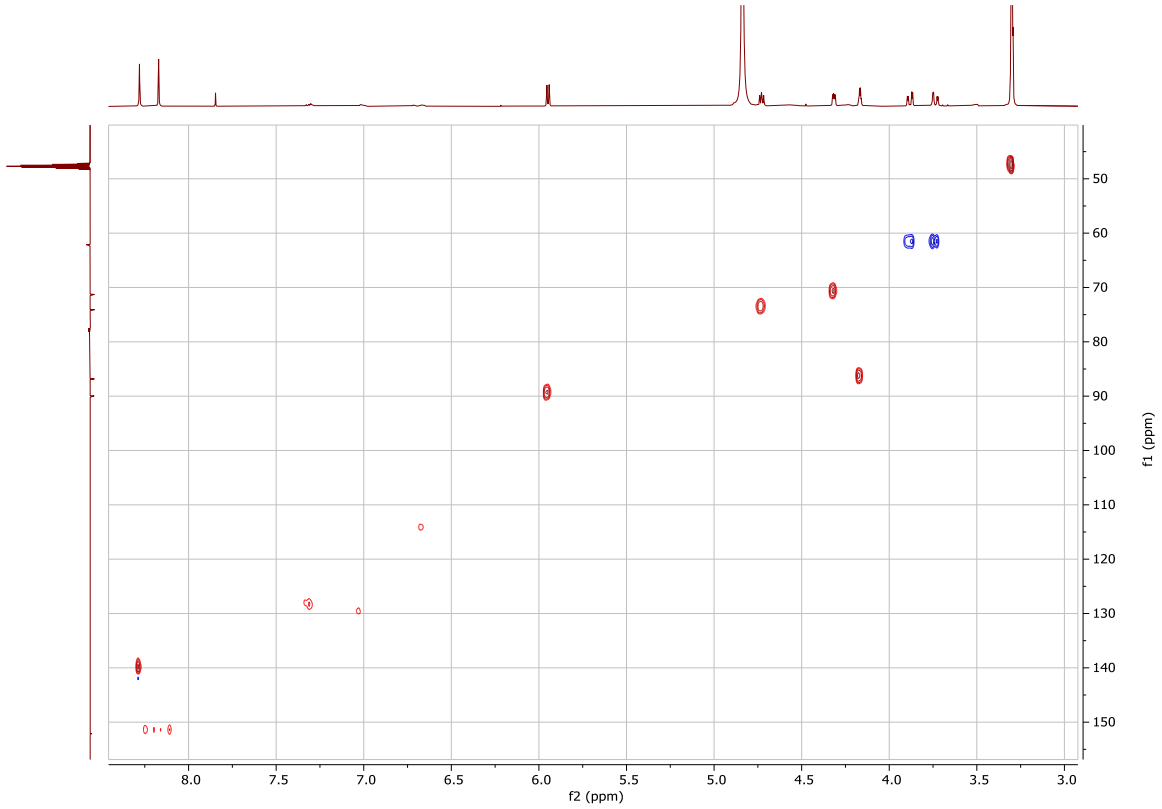
Atom No	δ ^{1}H (ppm, Hz, integral)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC
1 (N)	-	-	-
2	8.28 (s, 1H)	144.2	C-9, C-10
3 (N)	-	-	-
4 (N)	-	-	-
5	8.17 (s, 1H)	153.6	C-7, C-10
6 (N)	-	-	-
7	-	157.7	-
8 (NH_2)		-	-
9	-	121.3	-
10	-	150.1	-
1'	5.95 (d, *J*=6.4, 1H)	91.5	C-2, C-10, C-2'
2'	4.73 (dd, *J*= 6.4, 5.0, 1H)	75.6	C-1'
3'	4.32 (dd, *J*=5.0, 2.5, 1H)	72.8	C-1'
4'	4.17 (dd, *J*=5.0, 2.5, 1H)	88.4	C-3', C-5'
5'	3.98 (dd, *J*=12.6, 2.5, 1H) 3.73 (dd, *J*=12.6, 2.5, 1H)	63.7	C-3', C-4'



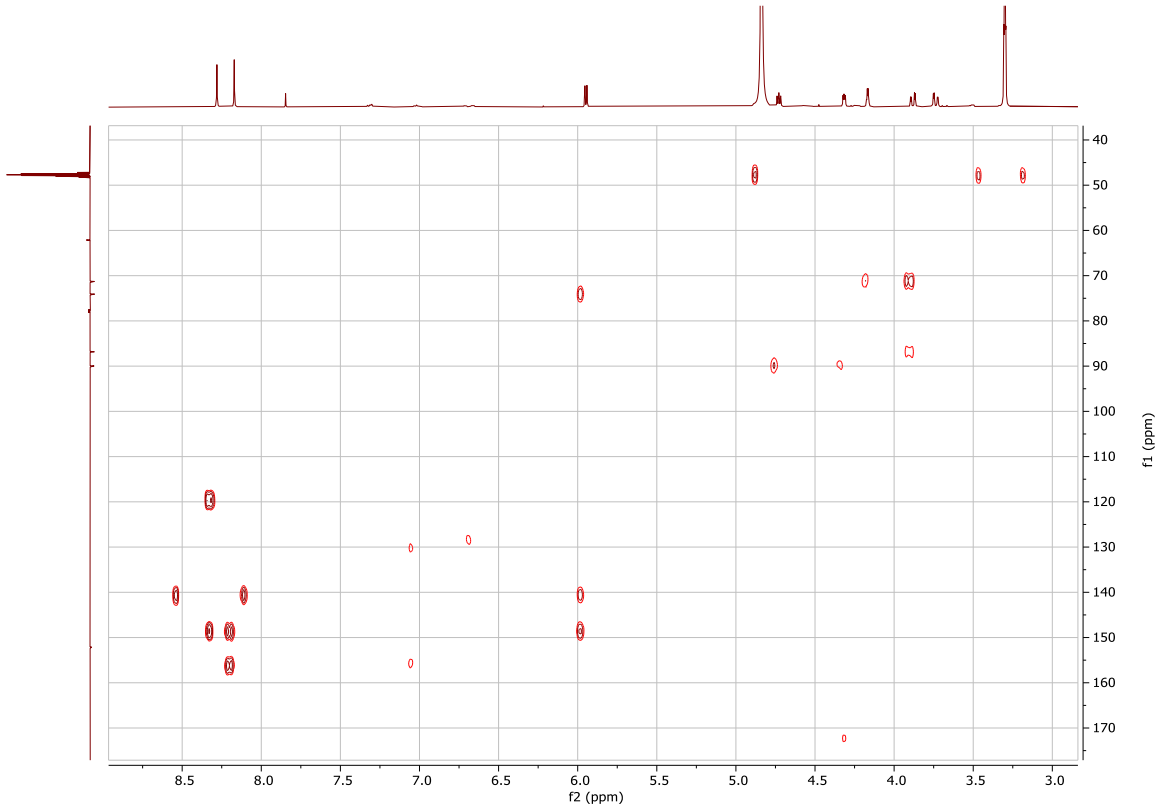
Şekil 158. Vidarabinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



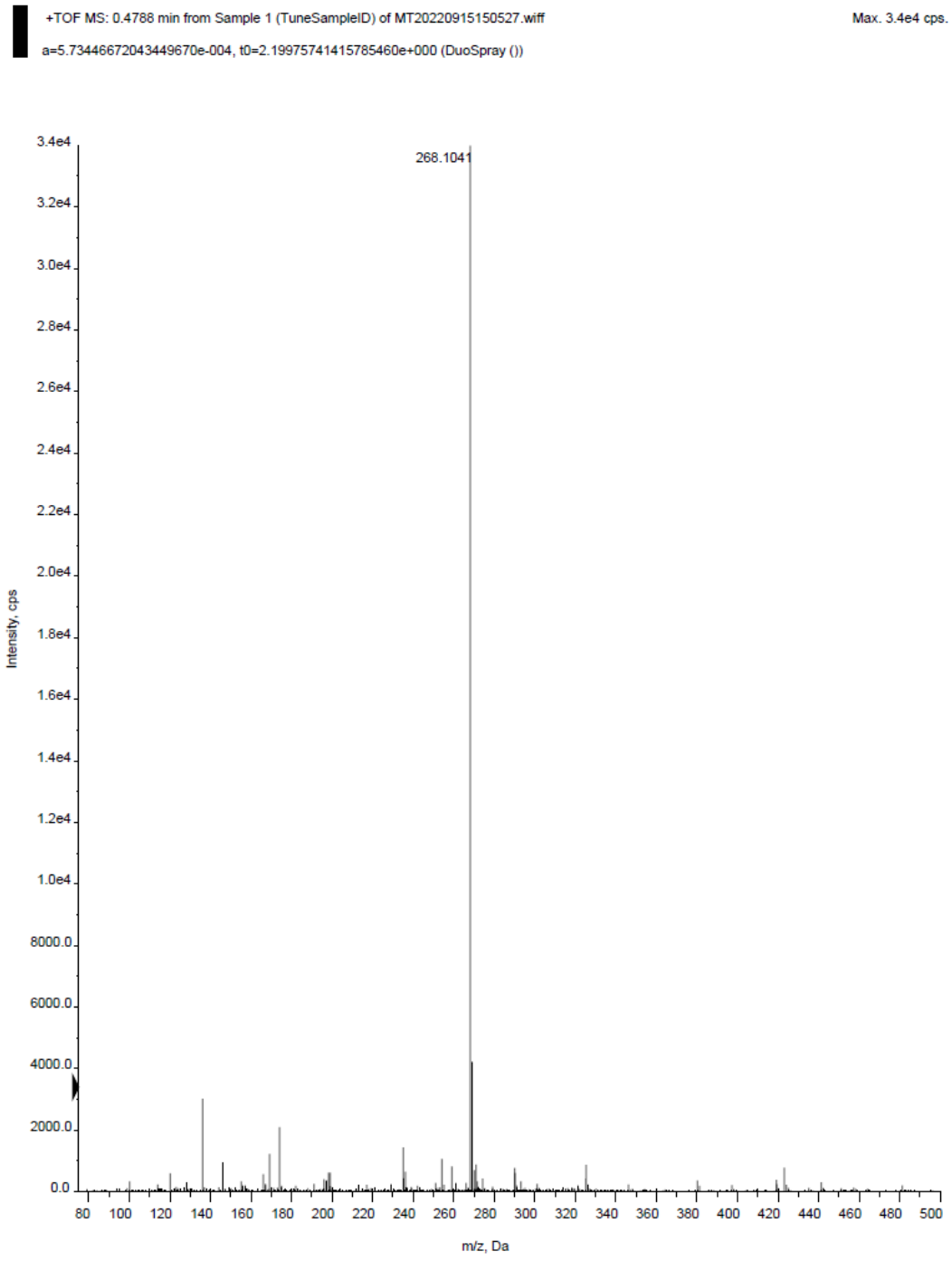
Şekil 159. Vidarabinin ^{13}C-APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz).



Şekil 160. Vidarabinin HSQC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



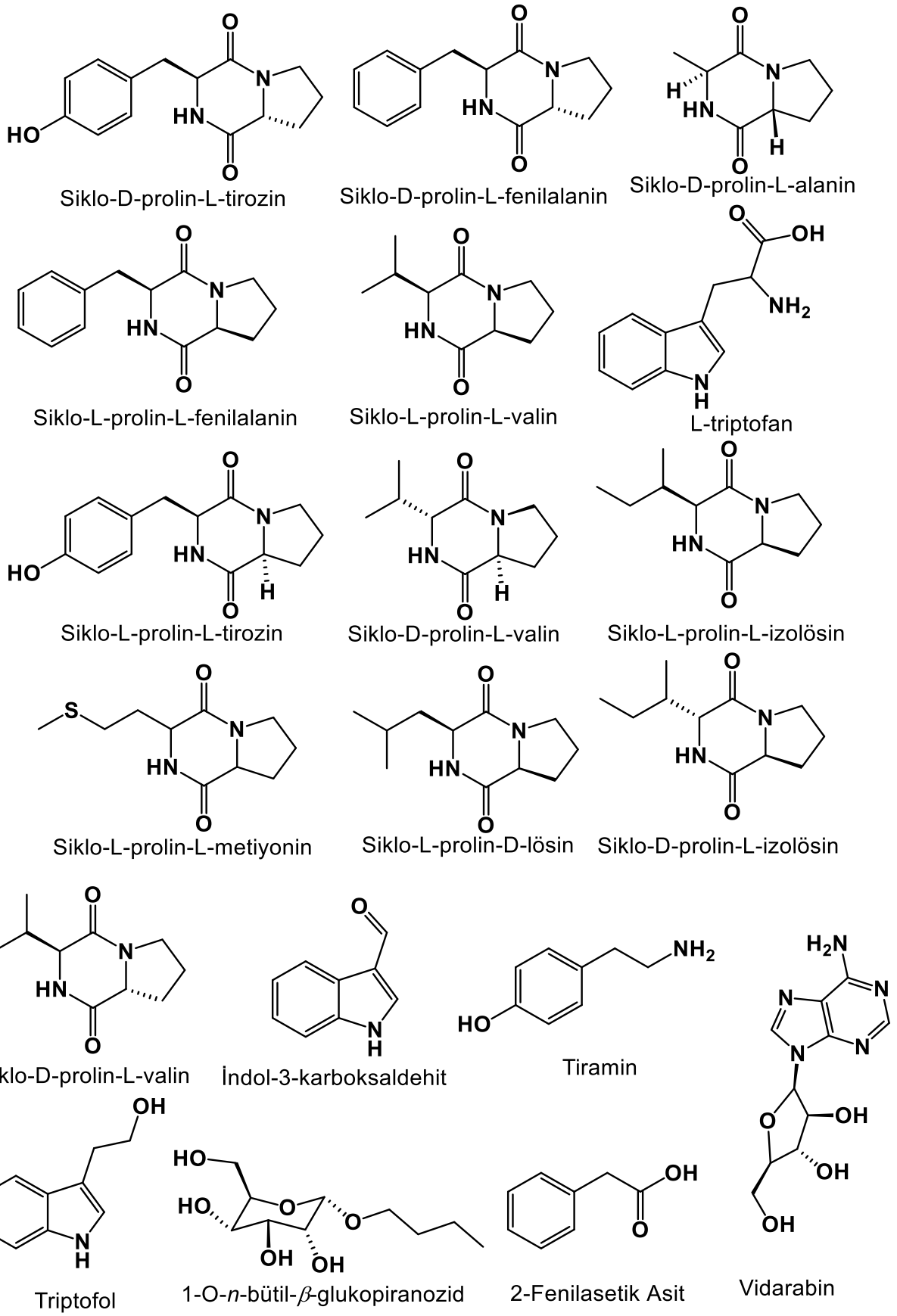
Şekil 161. Vidarabinin HMBC spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).



Şekil 162. Vidarabinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.

SONUÇLAR

S. iconiensis, S. seymenliensis ve *S. ovatisporus* mikroorganizmaları kullanılarak izolasyonu yapılan bileşiklerin tek boyutlu NMR (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{13}C-APT), iki boyutlu NMR (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) spektrumları ve LC-Q-TOF kütle spektrumları incelenerek molekül yapıları aydınlatılmıştır. İzole edilen bileşiklerin yapıları Şekil 163'te verilmiştir.



Şekil 163. İzole edilen bileşiklerin molekül yapıları.

İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLERİN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ

Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

Mikroorganizmalardan izole edilen bileşiklerin antiproliferatif etkinlikleri HeLa (Rahim ağzı), MCF-7 (Meme kanseri) hücre hatlarıyla MEF (fare embriyo fibroblast) sağlıklı hücre hattına karşı test edilmiştir. Antiproliferatif aktivite sonuçları GraphPad Prism version 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, California, ABD) uygulaması ile IC_{50} değerlerini hesaplamak üzere değerlendirilmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. İzole edilen bileşiklerin MEF, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarına karşı gösterdiği IC_{50} değerleri (µM).

	IC_{50} (µM)			
Bileşik	**MEF**	**HeLa**	**MCF-7**	**Kaynak**
Siklo-D-prolin-L-fenilalanin	NA	14.9	84.2	102.0 µM (MCF-7) (179)
Siklo-L-prolin-L-fenilalanin	NA	53.5	133.9	20 µM kons. %36 inh. (HeLa-S3) (180)
Siklo-L-prolin-D-valin	NA	92.0	26.3	-
Siklo-D-prolin-L-valin	NA	13.9	187.7	-
Siklo-L-prolin-L-valin	NA	13.4	26.8	20 µM kons. %60 inh. (HeLa-S3) (180) 510.2 µM kons. %33.3 inh. (HeLa-S3) (181)
Siklo-L-prolin-L-tirozin	NA	103.8	55.5	-
Siklo-D-prolin-L-tirozin	NA	15.7	19.7	-
Siklo-L-prolin-L-izolösin	NA	55.8	51.1	27 µM (MCF-7) (182) 20 µM kons. %45 inh. (HeLa-S3) (180)
Siklo-D-prolin-L-izolösin	6.8	17.1	21.4	-
Siklo-L-prolin-D-lösin	7.9	29.1	66.8	20 µM kons. %52 inh. (HeLa) (181)
Siklo-L-prolin-L-metiyonin	7.3	17.5	17.9	-
Siklo-D-prolin-L-alanin	63.4	16.9	42.5	-
Vidarabin	529.7	225.3	36.3	-
1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid	NA	NA	NA	-
cis-platin	8.6	14.5	14.7	12.8 (HeLa) (183) 5.75 (MCF-7) (184)

NA: Aktif değil.

HeLa hücre hattına karşı gerçekleştirilen antiproliferatif aktivite testlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Tablo 18) en etkili yedi bileşik, 13.4, 13.9, 14.9, 15.7, 16.9, 17.1, 17.5 µM IC_{50} değeri ile sırasıyla siklo-L-prolin-L-valin, siklo-D-prolin-

L-valin, siklo-D-prolin-L-fenilalanin, siklo-D-prolin-L-tirozin, siklo-D-prolin-L-alanin, siklo-D-prolin-L-izolösin, siklo-L-prolin-L-metiyonin olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar test standardı *cis*-platin'e ait IC_{50} değeri (14.5 μM) ile kıyaslandığında söz konusu bileşiklerin aktivitesinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Üstelik siklo-L-prolin-L-valin, siklo-D-prolin-L-valin, siklo-D-prolin-L-fenilalanin, siklo-D-prolin-L-tirozin bileşiklerinin sağlıklı fare embriyo fibroblast hücre hatlarına (MEF) karşı toksisite göstermemesi, bu bileşiklerin seçici aktivite gösterdikleri anlamına gelmektedir. Kemoterapi ajanlarında istenen en önemli özelliklerden biri sağlıklı hücrelere zarar vermemesi olduğu için elde edilen bu sonuç değerlidir. Siklo-L-prolin-D-lösin, siklo-L-prolin-L-fenilalanin ve siklo-L-prolin-L-izolösin bileşiklerinin ise orta derecede antiproliferatif etki gösterdikleri görülmüştür.

MCF-7 hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite testlerinde en etkili beş bileşiğin 17.9, 19.7, 21.4, 26.3, 26.8 μM IC_{50} değeri ile sırasıyla siklo-L-prolin-L-metiyonin, siklo-D-prolin-L-tirozin, siklo-D-prolin-L-izolösin, siklo-L-prolin-D-valin ve siklo-L-prolin-L-valin olarak tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hatlarına karşı aktvite sergileyen bu bileşiklerden siklo-D-prolin-L-tirozin, siklo-L-prolin-L-valin ve siklo-L-prolin-D-valin bileşikleri sağlıklı MEF hücre hatlarına karşı toksisite göstermezken siklo-L-prolin-L-metiyonin ve siklo-D-prolin-L-izolösin bileşiklerinin MEF hücre hatlarına karşı toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Siklo-D-prolin-L-alanin, siklo-L-prolin-L-izolösin, siklo-L-prolin-L-tirozin ve siklo-L-prolin-D-lösin bileşiklerinin ise orta derecede antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarına karşı iyi veya orta derecede belirgin bir aktivite göstermiş olan 12 bileşikten 7'sinin sağlıklı hücre hatlarına (MEF) karşı toksisite göstermemiş olması, siklodipeptit (diketopiperazin) yapısındaki bu bileşiklerin potansiyel kemoterapi ajanı olarak *in vivo* çalışmalarla desteklendiği takdirde kanser tedavisinde kullanılmak üzere umut vadettiği görülmektedir.

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Mikroorganizmalardan izole edilen bileşiklerin antimikrobiyal etkinlik testleri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, P. *aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATTC 10231 mikroorganizmalarına karşı gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bileşiklerin antimikrobiyal

etkinliğin değerlendirilmesinde minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Test sonuçlarından elde edilen veriler Tablo 19'da gösterilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, *Staphylococcus aureus* üzerine sadece indol-3-karboksaldehit bileşiğinin orta derecede antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Vidarabin ve siklo-L-prolin-L-valin bileşikleri *Enterococcus faecalis*'e karşı diğer bileşiklere göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Triptofol, 2-fenilasetik asit ve tiramin haricindeki tüm bileşiklerin *E. coli*'ye karşı az ila orta seviyede antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin, siklo-L-prolin-L-tirozin, siklo-D-prolin-L-alanin, siklo-L-prolin-L-valin, siklo-D-prolin-L-valin, siklo-D-prolin-L-izolösin, L-prolin, triptofol ve tiramin bileşikleri *P. aeruginosa* üzerine yine orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterirken, *Candida albicans*'a karşı ise L-prolin ve tiramin bileşiklerinin diğer bileşiklere kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 19. Antimikrobiyal aktivite sonuçları (µg/mL).

	A	B	C	D	E
Bileşikler	MİK (µg/mL)				
Siklo-L-prolin-D-lösin Siklo-D-prolin-L-fenilalanin	*	*	128	*	64
Siklo-L-prolin-L-fenilalanin Siklo-L-prolin-L-tirozin	*	*	128	64	64
Vidarabin	*	32	64	*	*
Siklo-D-prolin-L-alanin	*	64	64	64	64
Siklo-L-prolin-L-valin	*	32	64	64	64
Siklo-D-prolin-L-valin Siklo-D-prolin-L-izolösin	*	64	64	64	*
L-Prolin	*	64	64	64	16
Triptofol	*	64	*	64	64
1-O-*n*-bütil-*β*-gluopiranozid	*	64	64	*	64
2-fenilasetik asit	*	64	*	*	*
Tiramin	*	64	*	64	32
İndol-3-karboksaldehit	64	64	64	*	64
Meropenem	0.0015	0.5	0.0625	0.25	-
İmipenem	<0.125	1	0.25	1	-
Seftazidim	2	-	0.125	8	-
Ampisilin	0.25	0.125	8	-	-
Vankomisin	0.5	2	-	-	-
Gentamisin	0.25	4	0.5	0.5	-
Siprofloksasin	0.5	2	0.0156	0.125	-
Flukonazol	-	-	-	-	0.125

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, B: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, C: *E. coli* ATCC 25922, D: *P. aeruginosa* ATCC 27853, E: *Candida albicans* ATTC 10231.

*: DMSO'nun etkisi dışında antimikrobiyal bir etki gözlenmemiştir.

Doğanın ekstrem koşullarında yaşayan mikroorganizmaların diğer canlılardan farklı olarak savunma sistemleri bulunmadığından, sadece ürettikleri kimyasallar sayesinde kendilerini koruyabilmektedirler. Toksik moleküller üreterek, aynı yaşam ortamında rekabet içinde yaşadıkları diğer mikroorganizmaları yok etmek isterken, ürettikleri bu sitotoksik bileşiklerin seçiçi davranarak kendilerine zarar vermemesini de sağlarlar. Bu sayede mikroorganizmaların ürettiği bileşiklerin, diğer doğal kaynaklardan izole edilenlere göre seçici sitotoksisite sergilemek gibi üstünlüğü söz konusudur. Mikroorganizmalardan elde edilen bileşiklerin bu üstün özelliği, mikroorganizmaların ürettiği metabolitlerin izole edilmesini, yapılarının aydınlatılmasını, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerinin taranmasını daha da gerekli kılmaktadır. Bu nedenle zorlu fiziksel koşullarda yaşayan, hiç çalışılmamış mikroorganizma türleri ile çalışılarak henüz keşfedilmemiş ve biyoaktif özellikler sergileyen bileşikleri araştırmak, belki de ilaç keşif çalışmalarında en fazla üzerinde durulması ve araştırılması gereken bir konu olarak farmakognozi ve doğal ürünler kimyası alanında önemini korumaktadır.

ÖZET

Dünya genelinde en önemli sağlık problemleri olarak görülen kanser vakalarındaki artış ve antimikrobiyal ajanların bilinçsiz kullanımı sonucu ortaya çıkan dirençli enfeksiyonlar sonucu antikanser ve antimikrobiyal ajanlara olan ihtiyaç da giderek artmaktadır. Hala keşfedilmeye devam eden yeni türleriyle aktinomisetler, antikanser ve antimikrobiyal biyoaktif metabolitlerin sonsuz kaynağıdır.

Bu tez çalışmasında aktinomisetlerden *Streptomyces* cinsine ait üç yeni türden antiproliferatif ve antimikrobiyal metabolitlerin keşfedilmesi amaçlanmıştır. Daha önce çalışılmamış ve ülkemiz su ekosistemlerinden izole edilmiş aktinomisetlerin farklı besi yerlerinde küçük ve orta ölçekte fermantasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda XAD-16 reçinesi kullanılarak besi yerinden metabolitlerin ekstraksiyonu yapılarak ham ekstre elde edilmiştir. Ekstrelerin HPLC analizleri yapılarak metabolit içeriği belirlenmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre optimum üreme görülen besi yerlerinde mikroorganizmaların büyük ölçekte fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda XAD-16 reçinesi kullanılmış ve ham ekstre elde edilmiştir. Ham ekstreler su ile seyreltilip hekzan, diklorometan, etil asetat ve bütanol ile ekstrakte edilmiş ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Tüm fraksiyonlardan HPLC ile metabolitler izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin 1D (^{1}H-NMR, ^{13}C-APT), 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY ve NOESY) spektrumları ve LC-Q-TOF kütle spektrumları incelenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. *S. iconiensis*'ten 8, *S. seymenliensis*'ten 9 ve *S. ovatisporus*'tan 12 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin antiproliferatif ve antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiş olup özellikle siklodipeptit yapısındaki

bileşiklerin antiproliferatif aktivitesi yüksek bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, siklodipeptitler, diketopiperazinler, antimikrobiyal aktivite, antiproliferatif aktivite.

INVESTIGATION OF NEW ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE COMPOUNDS FROM LAKE ACTINOMYCETES

SUMMARY

The need for anticancer and antimicrobial agents is gradually increasing as a result of the increase in cancer cases and resistant infections resulting from the unconscious use of antimicrobial agents, which are seen as the most important health problems worldwide. With new species still being discovered, actinomycetes are an endless source of anticancer and antimicrobial bioactive metabolites.

In this thesis, it is aimed to discover antiproliferative and antimicrobial metabolites from three new species of *Streptomyces* genus of actinomycetes. Small and medium scale fermentation of actinomycetes, which have not been studied before and isolated from aquatic ecosystems of our country, have been achieved in different media. At the end of the incubation period, the crude extract was obtained by extraction of metabolites from the media using XAD-16 resin. The metabolite content of the extracts was determined by HPLC analysis. According to the results of the analysis obtained, largescale fermentation of microorganisms was provided in the media with optimum growth. At the end of the incubation period, XAD-16 resin was used and the crude extract was obtained. The crude extracts were diluted with water, extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol, and

fractionated by solid phase extraction (SPE). Metabolites were isolated from all fractions by HPLC. The 1D (^{1}H-NMR, ^{13}C-APT), 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY and NOESY) spectra and LC-Q-TOF mass spectra of the isolated compounds were examined and their structures were elucidated. 8 compounds from *S. iconiensis*, 9 from *S. seymenliensis* and 12 from *S. ovatisporus* were isolated. The antiproliferative and antimicrobial activities of the isolated compounds were tested, and the antiproliferative activity of the compounds in the cyclodipeptide structure was found to be high.

Key words: *Streptomyces*, cyclodipeptides, diketopiperazines, antimicrobial activity, antiproliferative activity.

KAYNAKLAR

1. Niu G, Li W. Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance. Trends Biochem Sci 2019;44:961–72.

2. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J Antibiot 2012:65(8);385-95.

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

4. Watve M G, Tickoo R, Jog M M, Bhole B D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. Arch Microbiol 2001;176(5):386-90.

5. Newman D J, Cragg G M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. J Nat Prod 2004;67:1216–38.

6. World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization.

7. Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod 2016;79:629-61.

8. Baker W, van den Broek A, Camon E, Hingamp P, Sterk P, Stoesser G, Tuli M A. The EMBL nucleotide sequence database. Nucleic Acids Res 2000;28:19–23.

9. Newman D J, Cragg G, Snader K M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. J Nat Prod 2003;66:1022–37.

10. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Rev Infect Dis 1980:129–39.

11. Proksch P, Edrada R, Ebel R. Drugs from the seas–current status and microbiological implications. Appl Microbiol Biotechnol 2002;59(2):125-34.

12. Mehbub M F, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. Mar Drugs 2014;12(8):4539–77.

13. Cragg G M, Newman D J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl Chem 2005;77:7–24.

14. Ding T, Yang L J, Zhang W D, Shen Y H. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. RSC Adv 2019;9(38):21964-88.

15. Maplestone R A, Stone M J, Williams D H. The evolutionary role of secondary metabolites-A review. Gene 1992;115:151–7.

16. Dewick P M. Medicinal Natural Products: A Biosynthentic Approach, 2nd ed.; John Wiley and Son: West Sussex, UK, 2002:520.

17. Figueiredo A C, Barroso J G, Pedro L G, Scheffer J J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Frag J 2008;23(4):213-26.

18. Patridge E, Gareiss P, Kinch M S, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. Drug discov 2016;21(2):204-7.

19. Demain A L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 1999;52(4):455-63.

20. United States Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention 2013. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.

21. Davies D S C. Annual report of the chief medical officer: infections and the rise of antimicrobial resistance. Lancet 2013;381:1606–9.

22. Demain A L, Sánchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot 2009;62:5-16

23. Rashad F M, Fathy H M, El-Zayat A S, Elghonaimy A M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiol Res 2015;175:34–47.

24. Williamson N, Brian P, Wellington E M H. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. Anton Leeuw Int J 2000;78:315–21.

25. Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod 2007;70:461-77.

26. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol Res 2014;169:262–78.

27. Jensen P R, Mincer T J, Williams P G, Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Anton Leeuw Int J 2005;87:43-8.

28. Raja A, Prabakarana P. Actinomycetes and drug-an overwiew. Am J Drug Discov Dev 2011;1(2):75-84.

29. Lam K S. New aspects of natural products in drug discovery. Trends in Microbiol 2007;15:279-89.

30. Wainwright M. Streptomycin: discovery and resultant controversy. Hist Philos Life Sci 1991;97-124.

31. Bentley S D, Chater K F, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis G L, Thomson N R, James K D, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* a3 (2). Nature 2002;417:141–7.

32. Cragg G M, Newman D J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochim Biophys Acta 2013;1830:3670–95.

33. Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 2012;75:311–35.

34. Cohen F L, Tartasky D. Microbial Resistance to Drug Therapy: A Review. Am J Infect: Control 1997;25:51-64.

35. Waksman S A. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. Science 1953;118(3062):259-66.

36. Vandenbrouche-Grauls C M. The Threat of Multiresistant Microorgamisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12(1);27-30.

37. Barlett J G, Froggtt J W. Antibiotic Resistance. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121:392-6.

38. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage W P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be?. Evol Appl 2015:8;240–7.

39. Davin-Regli A, Bolla J M, James C E, Lavigne J P, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. Curr Drug Targets 2008;9:750–9.

40. Umezawa H. Enzyme Inhibitors of Microbial Origin. University of Tokyo Press Tokyo, Japan, 1972.

41. Pathom-Aree W, Stach J E M, Ward A C, Horikoshi K, Bull A T, Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) Mariana Trench. Extremophiles 2006;10(3):181-9.

42. Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod 2016;79:629–61.

43. Dalhoff A, Janjic N, Echols R. Redefining penems. Biochem Pharmacol 2006;71:1085–95.

44. Strains Producing Special Compounds or Enzymes-DSMZ. Available online: https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/SpecificCatalogues/Production.pdf (Erişim Tarihi: 28 Kasım 2022).

45. DSMZ-Production, Transformation, Enzyme Studies. Available online: https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/dsmz-production-strains.pdf (Erişim Tarihi: 28 Kasım 2022).

46. Liras P, Demain A. Chapter 16 Enzymology of *β*-Lactam Compounds with Cephem Structure Produced by Actinomycete. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2009;458:401–29.

47. Neuman M, De Simone C. Vademecum degli Antibiotici ed Agenti Chemioterapici Antinfettivi. Marrapese 1994.

48. Maslow M J, Portal-Celhay C. 27-rifamycins. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. (8th ed.) Bennett J E, Dolin R, Blaser M J, Eds. Philadelphia, PA, USA, 2015;339–49.

49. Lancini G, Grandi M. Biosynthesis of ansamycins. In Biosynthesis; Springer: Berlin/Heidelberg Germany 1981:12–40.

50. Wilson M C, Gulder T A M, Mahmud T, Moore B S. Shared biosynthesis of the saliniketals and rifamycins in *Salinispora arenicola* is controlled by the sare 1259-encoded cytochrome P450. J Am Chem Soc 2010;132:12757–65.

51. Williams J, Sefton A. Comparison of macrolide antibiotics. J Antimicrob Chemother 1993;31:11–26.

52. Kaneko T, Dougherty T J, Magee T V. 7.18-macrolide antibiotics. In Comprehensive Medicinal Chemistry II. Taylor J B, Triggle D J. Eds. Elsevier: Oxford, UK 2007:519–566.

53. Matsuhashi Y, Ogawa H, Nagaoka K. The enzymatic interconversion between midecamycin A1 and A3. J Antibiot 1979;32:777–9.

54. Horan A C, Brodski B C. *Micromonospora rosaria* sp. Nov., nom. Rev., the rosaramicin producer. Int J Syst Evol Microbiol 1986;36:478–80.

55. Weber J M, Wierman C, Hutchinson C R. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. J Bacteriol 1985;164:425–33.

56. Miller E S, Woese C R, Brenner S. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. Strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. Nov., sp. Nov Int J Syst Evol Microbiol 1991;41:363–8.

57. Li J, Kim S G, Blenis J. Rapamycin: One drug, many effects. Cell Metab 2014; 19:373–9.

58. Spížek J, Rezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. Appl Microbiol Biotechnol 2004;64:455–64.

59. Lee Y, Lee M -J, Choi Y -E, Chun G -T, Jeong Y -S. Optimization of cultivation medium and fermentation parameters for lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis*. Biotechnol Bioprocess Eng 2014;19:1014–21.

60. Spížek J, Rezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. Biochem Pharmacol 2017; 133:20–8.

61. Bibikova M, Singal E, Ivanitskaia L, Zhdanovich I. Production of lincomycin by *Micromonospora halophytica* culture. Antibiot Chemoterapy 1989;34:723–6.

62. Kuznetsov V, Bushueva O. Effect of the temperature of preservation of lyophilized actinomycete spores (producers of streptomycin and lincomycin) on their viability and variability. Antibiotiki 1974;1:690.

63. Nelson M L, Levy S B. The history of the tetracyclines. Ann N Y Acad Sci 2011;1241:17–32.

64. Gualerzi C O, Brandi L, Fabbretti A, Pon C L. Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ USA 2013.

65. Alexander G, Joseph L. Production of Tetracycline and Substituted Tetracyclines. U.S. Patent US2712517A, 5 July 1955.

66. Li H, Ye R, Lin G, Zhu D, Mao Q. Protein expression analysis of a high-demeclocycline producing strain of *Streptomyces aureofaciens* and the roles of CtcH and CtcJ in demeclocycline biosynthesis. Bioresour Bioprocess 2016;3:46.

67. Kotra L P, Haddad J, Mobashery, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3249–56.

68. Huddleston A S, Cresswell N, Neves M, Beringer J E, Baumberg S, Thomas D I, et. al. Molecular detection of streptomycin-producing Streptomycetes in brazilian soils. Appl Environ Microbiol 1997;63:1288–97.

69. Kharel M K, Basnet D B, Lee H C, Liou K, Woo J S, Kim B-G, et al. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius*. FEMS Microbiol Lett 2004;230:185–90.

70. Gonzalez R, Islas L, Obregon A -M, Escalante L, Sanchez S. Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea*: Stimulatory effect of ammonium. J Antibiot 1995;48:479–83.

71. Hancock R E W, Chapple D S. Peptide antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1317–23.

72. Binda E, Marinelli F, Marcone G L. Old and new glycopeptide antibiotics: Action and resistance. Antibiotics 2014;3:572–94.

73. Martin W J, Heilman E R, Nichols D B, Wellman W E, Geraci J E. Streptonivicin (albamycin): a new antibiotic; preliminary report. Proc Staff Meet Mayo Clin 1955;30(23):540-51.

74. Steffensky M, Mühlenweg A, Wang Z -X, Li S -M, Heide L. Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1214–22.

75. Mast Y, Wohlleben W. Streptogramins—Two are better than one!. Int J Med Microbiol 2014;304:44–50.

76. Lundstrom T S, Sobel J D. Vancomycin, trimethoprimsulfamethoxazole, and rifampin. Infect Dis Clin N Am 1995;9(3):747-67.

77. Rubio S, Martínez-Cámara S, de la Fuente J L, Rodríguez-Sáiz M, Barredo J L. Strain improvement program of *Streptomyces roseosporus* for daptomycin production. In Antimicrobial Therapies: Methods and Protocols. New York, NY: Springer US 2021:351-63.

78. Anderle C, Stieger M, Burrell M, Reinelt S, Maxwell A, Page M, Heide L. Biological activities of novel gyrase inhibitors of the aminocoumarin class. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1982–90.

79. Vickers A A, Chopra I, O'neill A J. Intrinsic novobiocin resistance in *Staphylococcus saprophyticus*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:4484–5.

80. Silver L L. Fosfomycin: Mechanism and resistance. Csh Perspect Med 2017;7:252-62.

81. Rogers T O, Birnbaum J. Biosynthesis of fosfomycin by *Streptomyces fradiae*. Antimicrob Agents Chemother 1974;5:121–32.

82. Kuzuyama T. Fosfomycin biosynthesis and self-resistance mechanism of the producing organism *Streptomyces wedmorensis*. Actinomycetologica 1998;12:71–4.

83. Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics 2020 CA. Cancer J Clin 2020;70:7–30.

84. Are C, McMasters K M, Giuliano A, Yanala U, Balch C, Anderson B O, et al. Global forum of cancer surgeons: Perspectives on barriers to surgical care for cancer patients and potential solutions. Ann Surg Oncol 2019;26:1577–82.

85. Collaboration G B o D C. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncol 2019;5:1749–68.

86. Sharma P, Allison J P. The future of immune checkpoint therapy. Science 2015;348(6230):56–61.

87. Ji H, Yang X. Microbial-Based Cancer Therapy Bugs as Drugs: History & the essential role of medical imaging. Cancer Treat Res Commun 2021;28:100436.

88. Oelschlaeger T A. Bacteria as tumor therapeutics?. Bioeng Bugs 2010;1(2):146–7.

89. Forbes N S, Robert S. Coffin, Deng L, Evgin L, Fiering S, Giacalone M, et al. White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. J Immunother Cancer 2018;6(1):78.

90. Wei M Q, Mengesha A, Good D, Anne J. Bacterial targeted tumour therapydawn of a new era. Cancer Lett 2008;259(1):16–27.

91. Cragg G, Newman D. Nature: A vital source of leads for anticancer drug development. Phytochem Rev 2009;8;313–31.

92. Harris F, Dennison S R, Singh J, Phoenix D A. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. Med Res Rev 2013;33(1):190–234.

93. Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides - challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. Chem Phys Lipids 2011;164(8):766–81.

94. Yang Q Z, Wang C, Lang L, Zhou Y, Wang H, Shang D J. Design of potent, nontoxic anticancer peptides based on the structure of the antimicrobial peptide, temporin-1CEa. Arch Pharm Res 2013;36(11):1302–10.

95. Arcamone F. Doxorubicin: anticancer antibiotics. Elsevier. 2012.

96. Di Marco A, Gaetani M, Orezzi P, Scarpinato B M, Silvestrini R, Soldati M, et al. ‘Daunomycin’, a new antibiotic of the rhodomycin group. Nature 1964;201(4920):706-7.

97. Shenkenberg T D, Von Hoff D D. Mitoxantrone: a new anticancer drug with significant clinical activity. Annals of internal medicine 1986;105(1):67-81.

98. Cersosimo R J. Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent. Clin Pharm 1992;11(2):152-67.

99. Burgert E O, Glidewell O. Dactinomycin in Wilms' tumor. JAMA 1967;199(7):464-8.

100. Deng J, Tian A L, Pan H, Sauvat A, Leduc M, Liu P, et. al. Everolimus and plicamycin specifically target chemoresistant colorectal cancer cells of the CMS4 subtype. Cell death dis 2021;12(11);1-11.

101. Borthwick A D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. Chem Rev 2012;112:3641–716.

102. Bodanszky M. Principles of Peptide Synthesis. 2nd ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York 1993:1–318.

103. Schwyzer R, Iselin B, Rittel W, Sieber P. Synthesen zyklischer Polypeptide. c-Tetraglycyl und c-Hexaglycyl. Über aktivierte Ester VII. Helv Chim Acta 1956;39:872.

104. Kopple K D, Bush C A. Conformations of cyclo-l-his-l-ser, cyclo-l-his-l-asp, and cyclo-l-his-l-his. Tetrahedron Lett 1972;6:483–6.

105. Karie I L. X-ray Analysis: Conformation of Peptides in the Crystalline State. In The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. Gross E, Meienhofer J. Eds. Academic Press: New York 1981;4:4–8.

106. Menegatti S, Hussain M, Naik A D, Carbonell R G, Rao B M. mRNA display selection and solid-phase synthesis of Fc-binding cyclic peptide affinity ligands. Biotechnol Bioeng 2013;110:857–70.

107. Sammes P G. Naturally occurring 2, 5-dioxopiperazines and related compounds. Prog Chem Org Nat Prod 1975;51:118.

108. Ovchinnikov Yu A, Ivanov V T. Conformational states and biological activity of cyclic peptides. Tetrahedron 1975;31(18):2177-209.

109. Szafranek J, Palacz Z, Grzonka Z. A comparison of electron impact and field ionization spectra of some 2, 5-diketopiperazines. Mass Spectrom 1976;11(9):920-30.

110. Asiri I A M, Badr J M, Youssef D T A. Penicillicinacine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-drived fungus *Penicillium vinaceum*. Phytochem Lett 2015;13:53–8.

111. Ishikawa K, Hosoe T, Itabashi T, Wakana D, Takizawa K, Yaguchi T, Kawai K. Novoamauromine and ent-cycloechinulin: Two new diketopiperazine derivatives from *Aspergillus novofumigatus*. Chem Pharm Bull 2010;58:717–9.

112. Stierle A C, Cardellina J H, II Strobel G A. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:8008–11.

113. Kwon O S, Park S H, Bong-Sik Y, Pyun Y R, Kim C J. Cyclo(D-Pro-L-Val), a Specific *β*-Glucosidase Inhibitor Produced by *Aspergillus* sp. F70609. J Antibiot 2001;54(2):179–81.

114. Giessen T, Marahiel M. The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides. Int J Mol Sci 2014;15:14610–31.

115. Jiang C, Xu L. Actinomycete diversity in unusual habitats. Actinomycetes 1993;4(2):47–57.

116. Wang Y, Tang S K, Li Z, Lou K, Mao P H, Jin X, et. al. *Myceligenerans halotolerans* sp. nov., an actinomycete isolated from a salt lake, and emended description of the genus Myceligenerans. Int J Syst Evol Microbiol 2011;61:974–8.

117. Guan T W, Wu N, Xia Z F, Ruan J S, Zhang X P, Huang Y, et. al. *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. Extremophiles 2011;15:373-8.

118. Anton J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:485–91.

119. Yang C X, Liu Y P, Bao Q H, Feng F Y, Liu H R, Zhang X J, et. al. *Mongoliitalea lutea* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a haloalkaline lake. Int J Syst Evol Microbiol 2012;62:647–53.

120. Tatar D, Sazak A, Guven K, Cetin D. Sahin N. *Amycolatopsis cihanbeyliensis* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a salt mine. Int J Syst Evol Microbiol 2013;63:3739–43.

121. Mutlu M B, Martínez-García M, Santos F, Peña A, Guven K, Antón J. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. FEMS Microbiol 2008;65(3):474-83.

122. Uygun A, Şen E. Tuz gölü havzası ve doğal kaynakları. Geo Bull Turkey 1978;21:113–20.

123. Çamur M Z, Mutlu H. Tuz Gölündeki mineral çökeliminin termodinamik değerlendirimi. Geo Bull Turkey 1995;38:67–73.

124. Dirik K, Erol O. Tuz gölü ve civarının tektonomorfolojik evrimi. Orta Anadolu Türkiye TPJD Özel sayı 2003:27–46.

125. Boone D R, Garrity G M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer-Verlag New York 2001;1:119-66.

126. Grant W D, Gemmell R T, McGenity T J. Halophiles. In Horikoshi K, Grant W D. Eds. Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments, Wiley-Liss Inc 1998:93-132.

127. Singh L S, Mazumder S, Bora T C. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. J Myc Med 2009;19:225–33.

128. Uyeda M. Metabolites produced by actinomycetes – antiviral antibiotics and enzymes inhibitors. Yakugaku Zasshi 2004;128:469–79.

129. Marhuenda-Egea F C, Bonete M J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. Curr Opin Biotechnol 2002;13:385–9.

130. Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. J Mol Microbiol Biotechnol 2008;15:74–92.

131. Baltz R H. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall?. SIM News 2005;55:186–96.

132. Kutzner H J. The family Streptomycetaceae. In: Starr M P, Stolp H. Trüper H G, Balows A, Schlegel H (Eds.). The Prokaryotes. Springer-Verlag Berlin Germany 1981:2028–20.

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

134. Williams S T, Goodfellow M, Alderson G. Genus Streptomyces Waksman and Henrici 1943.339AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Company Baltimore 1989;4:2452–92

135. Wendisch F K, Kutzner H J. The family Streptomycetaceae. In Prokaryotes. Second edition. Ed. by Ballows A. Springer Verlag 1991;1:922-95.

136. Hain T, Ward-Rainey N, Kroppenstedt R M, Stackebrandt E, Rainey F A. Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. Int J Syst Bacteriol 1997;47:202–6.

137. Oskay M. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını. e-Journal of New World Sciences Academy 2009;4:2.

138. Tatar D, Güven K, Spröer C, Klenk H P, Şahin N. *Streptomyces iconiensis* sp. nov. and *Streptomyces smyrnaeus* sp. nov., two halotolerant actinomycetes isolated from a salt lake and saltern. Int J Syst and Evol Microbiol 2014;64:3126–33.

139. Tatar D, Şahin N. *Streptomyces seymenliensis* sp. nov., isolated from soil. Anton van Leeuw 2015;107:411–8.

140. Veyisoğlu A, Çetin D, Bektaş K I, Güven K, Şahin N. *Streptomyces ovatisporus* sp. nov., isolated from deep marine sediment. Int J Syst and Evol Microbiol 2016;66:4856–63.

141. Çoşkun O. Separation Techniques: Chromatography. North Clin Istanbul 2016;3:156–60.

142. Reuhs B L. High-Performance Liquid Chromatography. Food Analysis 2017;213–226.

143. Maranata G J, Surya N O, Hasanah A N. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. Heliyon 2021;7(1).

144. Żwir-Ferenc A, Biziuk M, Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. Polish J of Environ Stud 2006;15(5):677-90.

145. Ng L M, Simmons R. Infrared spectroscopy. Anal Chem 1999;71(12):343-50.

146. Pebay-Peyroula E, Ziegler C, Nury H, Parcy F, Ruigrok R W, Cugliandolo L F (Eds.). From Molecules to Living Organisms: an Interplay Between Biology and Physics: Lecture Notes of the Les Houches School of Physics Oxford University Press 2016;102.

147. Balcı M, Basic ^{1}H- and ^{13}C-NMR Spectroscopy, Elsevier, Amsterdam, 2005, 3-75.

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

149. Jacobsen N E. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken 2007, Chapter 7.

150. Eisenreich W, Bacher A. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. Phytochem 2007;68(22-24):2799-815.

151. Derome A E. Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press Oxford, 1991:186.

152. Jacobsen N E. Two-Dimensional NMR Spectroscopy: HETCOR, COSY, and TOCSY. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology 2007;353-407.

153. Palmer A G, Cavanagh J, Wright P E, Rance M. Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. J Magn Reson 1991;93(1):151–70.

154. Balcı M. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi. ODTÜ Yayıncılık. Ankara. 2011.

155. Weller T C. Carbohydrates Studied by NMR. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition) 2017:158-64.

156. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, et. al. Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. Antibiotics 2022;11(4):427.

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

158. Riss T L, Moravec R A. 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.

159. Galluzzi L. Guidelines for the use andinterpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ 2009;16:1093-107.

160. Niles A L, Moravec R A, Hesselberth P E, Scurria M A, Daily W J, Riss T L. 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.

161. Crouch S P M, Kozlowski R, Slater K J, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods 1993;160:81-8.

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

163. Riss T L, Moravec R A, O'brien M A, Hawkins E M, Niles A. Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis, Handbook Of Assay Development In Drug Discovery. Ed. Minor L K. Florida USA: CRC Press, 2006.

164. Domzalski A, Margent L, Vigo V, Dewan F, Pilarsetty N V K, Xu Y, et. al. Unambiguous Stereochemical Assignment of Cyclo (Phe-Pro), Cyclo (Leu-Pro), and Cyclo (Val-Pro) by Electronic Circular Dichroic Spectroscopy. Molecules 2021;26(19): 5981.

165. Harizani M, Katsini E, Georgantea P, Roussis V, Ioannou E. New chlorinated 2, 5-diketopiperazines from marine-derived bacteria isolated from sediments of the eastern Mediterranean sea. Molecules 2020;25(7):1509.

166. 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. Chem Nat Comp 2010;46(4):583-5.

167. Liao J, Hu X, Yuan C, He H. A new indole alkaloid from the fruits of *Capparis masaikai*. Asian J Chem 2014;26(14):4504-6.

168. Malineni J, Keul H, Möller M. A green and sustainable phosphine-free NHC-ruthenium catalyst for selective oxidation of alcohols to carboxylic acids in water. J Chem Soc, Dalton trans 2015;44(39):17409-14.

169. Yan X, Suzuki M, Ohnishi-Kameyama M, Sada Y, Nakanishi T, Nagata, T. Extraction and Identification of Antioxidants in the Roots of Yacon (Smallanthussonchifolius). J Agricul and Food Chem 1999;47(11):4711–3.

170. Ye F, Cai M H, Chen B, Xiao W, Li X W, Guo Y W. Absolute configuration of (2R, 3R, 6S, 8R)-methyl homononactate, a polyketide from actinomycetes Streptomyces sp. R-527F of the Arctic region. Chem Nat Compd 2018;54(4):821-5.

171. Richard G, Morel S, Willemot R-M, Monsan P, Remaud-Simeon M. Glucosylation of *α*-butyl- and *α*-octyl-d-glucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from Leuconostoc mesenteroides. Carbohydr Res 2003;338(9):855-64.

172. Jantaharn P, Mongkolthanaruk W, Suwannasai N, Senawong T, Boonmak J, Youngme S, McCloskey S. Hypoxylonone, a new oxa-bridged seven-membered ring analog from fungus Hypoxylon cf. subgilvum SWUF15-004. Nat Prod Res 2022;20:1-8.

173. Park G K, Lim J H, Kim S D, Shim S H. Elucidation of antifungal metabolites produced by Pseudomonas aurantiaca IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. J Microbi Biotechnol 2012;22(3):326-30.

174. Guzman-Lopez O, Trigos A, Fernandez F J, Yanez-Morales M J, Saucedo-Castaneda G. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. World J Microbiol Biotechnol 2007;23:1473–7.

175. Jin Y, Xu Y, Huang Z, Zhou Z, Wei X. Metabolite pattern in root nodules of the actinorhizal plant *Casuarina equisetifolia*. Phytochemistry 2021;186:112724.

176. Park S K, Park J W, Lee S Y, Moon S S, Hang I S. Agricultural agent containing 2,5-diketopiperazine derivate as active ingredient. 2011. Industry Academic Cooperation Foundation of Kongju National University.

177. Kumar S N, Mohandas C, Nambisan B. Purification of an antifungal compound, cyclo (l-Pro-d-Leu) for cereals produced by Bacillus cereus subsp. thuringiensis associated with entomopathogenic nematode. Microbiol Res 2013;168(5):278-88.

178. Takaya Y, Furukawa T, Miura S, Akutagawa T, Hotta Y, Ishikawa N, et. al. Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori spirits. J Agric Food Chem 2007;55(1):75 – 9.

179. Jo H, Kim S Y, Kang B H, et al. *Staphylococcus epidermidis* Cicaria, a Novel Strain Derived from the Human Microbiome, and Its Efficacy as a Treatment for Hair Loss. Molecules 2022;27:5136.

180. Youssef D T, Alahdal A M. Cytotoxic and antimicrobial compounds from the marine-derived fungus, *Penicillium* species. Molecules 2018;23(2):394.

181. Lin W X, Xie C L, Zhou M, Xia M L, Zhou T T, Chen H F, et. al. Chemical constituents from the deep sea-derived *Streptomyces xiamenensis* MCCC 1A01570 and their effects on RXR*α* transcriptional regulation. Nat Prod Res 2020;34(10):1461-4.

182. Shaala L A, Youssef D T, Badr J M, Harakeh S M. Bioactive 2 (1 H)-pyrazinones and diketopiperazine alkaloids from a tunicate-derived actinomycete *Streptomyces* sp. Molecules 2016;21(9):1116.

183. Artanti A N, Pujiastuti U H, Prihapsara F, Rakhmawati R. Synergistic Cytotoxicity Effect by Combination of Methanol Extract of Parijoto Fruit (*Medinilla speciosa* Reinw. ex. Bl) and Cisplatin against HeLa Cell Line. IJCC 2020;11(1):16-21.

184. Suberu J O, Romero-Canelón I, Sullivan N, Lapkin A A, Barker G C. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. Chem Med Chem 2014;9(12):2791-7.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Aktinomisetlerin habitatları. 7
Şekil 2. Antibiyotiklerin tarihsel gelişimi. 9
Şekil 3. *β*-laktam antibiyotiklerin temel yapısal çekirdekleri ve aktinomisetler .... tarafından üretilen doğal β-laktam antibiyotiklerin örnekleri. 12
Şekil 4. Doğal ansamisin: rifamisin B. 13
Şekil 5. Aktinomisetler tarafından üretilen makrolidler: Eritromisin A ve ..... Rapamisin. 14
Şekil 6. Doğal linkozamid (linkomisin) ve yarı sentetik linkozamid (klindamisin). 14
Şekil 7. Birinci nesil tetrasiklinler. 15
Şekil 8. Aktinomisetlerin ürettiği aminoglikozid örnekleri. 16
Şekil 9. Vankomisin. 17
Şekil 10. Aktinomisetlerden izole edilen aminokumarin novobiyosin. 18
Şekil 11. Aktinomiset kaynaklı epoksit fosfomisin. 19
Şekil 12. Mikrobiyal bazlı kanser tedavisinin tarihi. 20
Şekil 13. Kanser terapötiklerinin ortak etki mekanizmaları. 21
Şekil 14. Antrasiklin yapılı antitümör bileşikler. 22
Şekil 15. Kromomisin yapılı antitümör bileşikler. 23
Şekil 16. Gramisidin. 24
Şekil 17. Oksitosin. 24
Şekil 18. Siklo-D-triptofan-L-prolin. 26
Şekil 19. Novoamuromin. 26
Şekil 20. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin. 26
Şekil 21. Streptomycetaceae familyası üyelerinin hayat döngüsü. 28
Şekil 22. 28 °C'de, 21 gün inkübasyonu sonunda Modifiye Bennett Agar üzerinde büyütülen *S. iconiensis* suşunun hücrelerinin taranan elektron mikrografı. 30
Şekil 23. 28 °C'de ISP-4 ortamında 14 günlük inkübasyon ile *S. seymenliensis* mikroorganizmasının elektron mikrografı. 30

Şekil 24. 28 ° C'de ISP-4 besi yerinde 14 gün inkübe edilen *S. ovatisporus* mikroorganizmasının görünümü. 31
Şekil 25. AmberLite™ XAD™16N reçinesinin görünümü ve molekül yapısı. 32
Şekil 26. SPE prosedürü. 35
Şekil 27. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için bir sistemin şematik gösterimi. 36
Şekil 28. Farklı besi yerlerinde *S. iconiensis*'in görüntüsü. 47
Şekil 29. *S. iconiensis* mikroorganizmasının üretim basamakları. 48
Şekil 30. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. iconiensis*'in N-Z-Amin besi yerlerinin görüntüsü. 49
Şekil 31. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. iconiensis*'in ISP-2 besi yerlerinin görüntüsü. 49
Şekil 32. *S. iconiensis* mikroorganizmasının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü 50
Şekil 33. Farklı besi yerlerinde *S. seymenliensis*'in görüntüsü. 53
Şekil 34. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının üretim basamakları. 54
Şekil 35. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının orta ölçekli farklı besi yerlerinde görünümü. 55
Şekil 36. N-Z-Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı. 56
Şekil 37. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı 56
Şekil 38. ISP-5 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı 57
Şekil 39. Büyük ölçekte inkübasyon süresi sonunda *S. seymenliensis*'in üretildiği ISP-2 besi yerlerinin görüntüsü. 58
Şekil 40. *S. seymenliensis* ham ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fraksiyonlandırılması. *S. seymenliensis*'in soldan sağa doğru hekzan, DCM, EtOAc ve BuOH fraksiyonları. 59
Şekil 41. Farklı besi yerlerinde *S. ovatisporus*'un görüntüsü. 61
Şekil 42. N-Z-Amin besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı. 62
Şekil 43. ISP-2 besi yerinde çoğalan mikroorganizmalardan elde edilen ekstreye ait HPLC kromatogramı 63
Şekil 44. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının üretim basamakları. 64
Şekil 45. İnkübasyon süresinin sonunda besi yerlerinin görünümü. 64
Şekil 46. İnkübasyon süresinin sonunda besi yerlerinin görünümü. 65
Şekil 47. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının N-Z-Amin besi yeri fermantasyonunda elde edilen ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fraksiyonlandırılması ve elde edilen ekstrenin soldan sağa BuOH, EtOAc, DCM ve hekzan fraksiyonları. 66
Şekil 48. Fermantasyon sonrası her mikroorganizma için ortak izolasyon basamaklarının şematik gösterimi. 68
Şekil 49. Antimikrobiyal aktivite testi yöntemleri. 69
Şekil 50. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol-3-um bromür (MTT) metodu tepkimesi. 72

Şekil 51. N-Z-Amin besi yerinin DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı. 73
Şekil 52. N-Z-Amin besi yerinin etil asetat ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı. 74
Şekil 53. N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı. 75
Şekil 54. N-Z-Amin besi yerinin bütanol ekstresinin SPE-2 fazına ait HPLC kromatogramı. 76
Şekil 55. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı....77
Şekil 56. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-2 fazına ait HPLC kromatogramı....77
Şekil 57. *S. seymenliensis* mikroorganizmasının BuOH ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı....78
Şekil 58. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının DCM ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı.....79
Şekil 59. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının EtOAc ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı....80
Şekil 60. *S. ovatisporus* mikroorganizmasının BuOH ekstresinin SPE-1 fazına ait HPLC kromatogramı....80
Şekil 61. Siklo-D-prolin-L-valin.....84
Şekil 62. Siklo-D-prolin-L-valinin ^{1}H-NMR spektrumu. 86
Şekil 63. Siklo-D-prolin-L-valinin HSQC spektrumu. 87
Şekil 64. Siklo-D-prolin-L-valinin HMBC spektrumu.....87
Şekil 65. Siklo-D-prolin-L-valinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 88
Şekil 66. Siklo-D-Prolin-L-İzolösin. 89
Şekil 67. Siklo-D-prolin-L-izolösinin ^{1}H-NMR spektrumu. 91
Şekil 68. Siklo-D-prolin-L-izolösinin ^{13}C-APT spektrumu.....91
Şekil 69. Siklo-D-prolin-L-izolösinin HSQC spektrumu. 92
Şekil 70. Siklo-D-prolin-L-izolösinin HMBC spektrumu....92
Şekil 71. Siklo-D-prolin-L-izolösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 93
Şekil 72. Siklo-D-prolin-L-fenilalanin. 94
Şekil 73. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin ^{1}H-NMR spektrumu....96
Şekil 74. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin ^{13}C-APT spektrumu. 96
Şekil 75. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin HSQC spektrumu....97
Şekil 76. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin HMBC spektrumu. 97
Şekil 77. Siklo-D-prolin-L-fenilalaninin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 98
Şekil 78. İndol-3-karboksaldehit.....99
Şekil 79. İndol-3-karboksaldehitin ^{1}H-NMR spektrumu. 100
Şekil 80. İndol-3-karboksaldehitin ^{13}C-APT spektrumu. 100
Şekil 81. İndol-3-karboksaldehitin HSQC spektrumu. 101
Şekil 82. İndol-3-karboksaldehitin HMBC spektrumu.....101
Şekil 83. İndol-3-karboksaldehitin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 102
Şekil 84. 2-Fenilasetik asit. 103
Şekil 85. 2-Fenilasetik asitin ^{1}H-NMR spektrumu....104
Şekil 86. 2-Fenilasetik asitin ^{13}C-NMR spektrumu. 104

Şekil 87. 2-Fenilasetik asitin DEPT spektrumu. 105
Şekil 88. 2-Fenilasetik asitin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 106
Şekil 89. L-triptofan. 107
Şekil 90. L-triptofanın ^{1}H-NMR spektrumu. 109
Şekil 91. L-triptofanın ^{13}C-APT spektrumu. 109
Şekil 92. L-triptofanın LC-Q-TOF kütle spektrumu. 110
Şekil 93. Siklo-D-prolin-L-tirozin. 111
Şekil 94. Siklo-D-prolin-L-tirozinin ^{1}H-NMR spektrumu. 113
Şekil 95. Siklo-D-prolin-L-tirozinin ^{13}C-APT spektrumu. 113
Şekil 96. Siklo-D-prolin-L-tirozinin HSQC spektrumu. 114
Şekil 97. Siklo-D-prolin-L-tirozinin HMBC spektrumu. 114
Şekil 98. Siklo-D-prolin-L-tirozinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 115
Şekil 99. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid. 116
Şekil 100. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin ^{1}H-NMR spektrumu. 117
Şekil 101. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin ^{13}C-APT spektrumu. 118
Şekil 102. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin HSQC spektrumu. 118
Şekil 103. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin HMBC spektrumu. 119
Şekil 104. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozidin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 120
Şekil 105. Siklo-L-prolin-L-tirozin. 122
Şekil 106. Siklo-L-prolin-L-tirozinin ^{1}H-NMR spektrumu. 124
Şekil 107. Siklo-L-prolin-L-tirozinin ^{13}C-APT spektrumu. 124
Şekil 108. Siklo-L-prolin-L-tirozinin HSQC spektrumu. 125
Şekil 109. Siklo-L-prolin-L-tirozinin HMBC spektrumu. 125
Şekil 110. Siklo-L-prolin-L-tirozinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 126
Şekil 111. Siklo-L-prolin-L-valin. 127
Şekil 112. Siklo-L-prolin-L-valinin ^{1}H-NMR spektrumu. 129
Şekil 113. Siklo-L-prolin-L-valinin ^{13}C-NMR spektrumu. 129
Şekil 114. Siklo-D-prolin-L-valinin DEPT spektrumu. 130
Şekil 115. Siklo-D-prolin-L-valinin HSQC spektrumu. 130
Şekil 116. Siklo-D-prolin-L-valinin HMBC spektrumu. 131
Şekil 117. Siklo-L-prolin-L-valinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 132
Şekil 118. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin. 133
Şekil 119. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin ^{1}H-NMR spektrumu. 135
Şekil 120. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin ^{13}C-APT spektrumu. 135
Şekil 121. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin HSQC spektrumu. 136
Şekil 122. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin HMBC spektrumu. 136
Şekil 123. Siklo-L-prolin-L-fenilalaninin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 137
Şekil 124. Triptofol. 138
Şekil 125. Triptofole ait ^{1}H-NMR spektrumu. 140
Şekil 126. Triptofole ait ^{13}C-APT spektrumu. 140
Şekil 127. Triptofole ait HSQC spektrumu. 141
Şekil 128. Triptofole ait HMBC spektrumu. 141
Şekil 129. Triptofole ait LC-Q-TOF kütle spektrumu. 142
Şekil 130. Tiramin. 143
Şekil 131. Tiramin bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu. 144
Şekil 132. Tiramin bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu. 144

Şekil 133. Tiramin bileşiğinin DEPT spektrumu.....145
Şekil 134. Tiramin bileşiğinin HSQC spektrumu.....145
Şekil 135. Tiramin bileşiğinin HMBC spektrumu. 146
Şekil 136. Tiramin bileşiğinin LC-Q-TOF kütle spektrumu.....147
Şekil 137. Siklo-D-prolin-L-alanin.....149
Şekil 138. Siklo-D-prolin-L-alaninin ^{1}H-NMR spektrumu.....150
Şekil 139. Siklo-D-prolin-L-alaninin HSQC spektrumu.....151
Şekil 140. Siklo-D-prolin-L-alaninin HMBC spektrumu. 151
Şekil 141. Siklo-D-prolin-L-alanin bileşiğine ait LC-Q-TOF kütle spektrumu. ..152
Şekil 142. Siklo-L-prolin-L-metiyonin. 153
Şekil 143. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin ^{1}H-NMR spektrumu.....154
Şekil 144. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin HSQC spektrumu.....155
Şekil 145. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin HMBC spektrumu. 155
Şekil 146. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin LC-Q-TOF kütle spektrumu.....156
Şekil 147. Siklo-L-prolin-L-izolösin. 157
Şekil 148. Siklo-L-prolin-L-izolösinin ^{1}H-NMR spektrumu. 159
Şekil 149. Siklo-L-prolin-L-izolösinin HSQC spektrumu. 159
Şekil 150. Siklo-L-prolin-L-izolösinin HMBC spektrumu.....160
Şekil 151. Siklo-L-prolin-L-izolösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 161
Şekil 152. Siklo-L-Prolin-D-Lösin. 162
Şekil 153. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin ^{1}H-NMR spektrumu…….....164
Şekil 154. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin ^{13}C-APT spektrumu. 164
Şekil 155. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin HSQC spektrumu.....164
Şekil 156. Siklo-L-Prolin-D-Lösinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 165
Şekil 157. Vidarabin.....166
Şekil 158. Vidarabinin ^{1}H-NMR spektrumu. 168
Şekil 159. Vidarabinin ^{13}C-APT spektrumu.....168
Şekil 160. Vidarabinin HSQC spektrumu. 169
Şekil 161. Vidarabinin HMBC spektrumu.....169
Şekil 162. Vidarabinin LC-Q-TOF kütle spektrumu. 170
Şekil 163. İzole edilen bileşiklerin molekül yapıları. 172

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. İzolasyonu gerçekleştirilen bileşiklerin elde edildiği mikroorganizmalar ve fraksiyonlar. 82
Tablo 2. Siklo-D-prolin-L-valin molekülünün 1D NMR değerleri ve HMBC korelasyonları. 86
Tablo 3. Siklo-D-prolin-L-izolösinin 1D ve 2D NMR değerleri. 90
Tablo 4. Siklo-D-prolin-L-fenilalanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri..... 95
Tablo 5. 2-Fenilasetik asit molekülünün 1D NMR değerleri. 103
Tablo 6. L-triptofan molekülünün ^{1}H-NMR ve ^{13}C-APT değerleri. 108
Tablo 7. Siklo-D-prolin-L-tirozine ait 1D ve 2D NMR değerleri. 112
Tablo 8. 1-O-*n*-bütil-*β*-glukopiranozid molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri. 117
Tablo 9. Siklo-L-prolin-L-tirozine ait 1D ve 2D NMR değerleri. 123
Tablo 10. Siklo-L-prolin-L-valinin 1D ve 2D NMR değerleri. 128
Tablo 11. Siklo-L-prolin-L-fenilalanin molekülünün 1D ve 2D NMR değerleri. . 134
Tablo 12. Triptofole ait 1D ve 2D NMR değerleri. 139
Tablo 13. Siklo-D-prolin-L-alaninin 1D ve 2D NMR değerleri. 150
Tablo 14. Siklo-L-prolin-L-metiyoninin 1D ve 2D NMR değerleri. 154
Tablo 15. Siklo-L-prolin-L-izolösinin 1D ve 2D NMR değerleri. 158
Tablo 16. Siklo-L-prolin-D-lösinin 1D NMR değerleri. 163
Tablo 17. Vidarabinin 1D ve 2D NMR değerleri. 167
Tablo 18. İzole edilen bileşiklerin MEF, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarına karşı gösterdiği IC_{50} değerleri. 173
Tablo 19. Antimikrobiyal aktivite sonuçları. 176

ÖZGEÇMİŞ