

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LOKAL *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN
SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU,
YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Murat YAVUZ

DOKTORA TEZİ

**KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**DIYARBAKIR
ŞUBAT-2010**

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LOKAL *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN
SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU,
YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Murat YAVUZ

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Murat KIZIL
Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ (2. Danışman)**

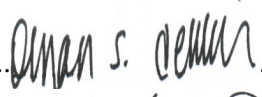
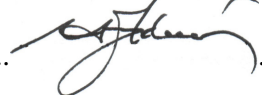

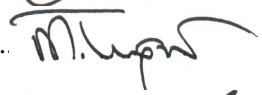

KİMYA ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
ŞUBAT-2010**

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Murat YAVUZ tarafından yapılan “Lokal *Streptomyces* Türlerinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

| | Ünvanı | Adı Soyadı | İmzası |
|----------|--------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Başkan : | Prof. Dr. Ayhan Sıtkı DEMİR..... | |  |
| Üye : | Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN..... | |  |
| Üye : | Doç. Dr. Murat KIZIL (Danışman)..... | |  |
| Üye : | Doç. Dr. Mahmut TOĞRUL..... | |  |
| Üye : | Doç. Dr. Mehmet DOĞRU..... | |  |

Tez Savunma Sınav Tarihi : 26 / 02 / 2010

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ 03 / 2010

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın başından bitimine kadar yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarım için bana gerekli koşulları sağlayan danışmanım Doç. Dr. Murat KIZIL'a teşekkür ederim.

Georg-August Üniversitesi (Göttingen-Almanya), Organik ve Biyomoleküler Kimya Enstitüsü'ndeki laboratuvarına 2007 ve 2008 yıllarının Temmuz-Eylül ayları arasında üçer aylık periyotlar halinde beni davet ederek orada bulunan her türlü olanaktan yararlanmamı sağlayan, bileşiklerin izolasyonunda ve yapılarının aydınlatmasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgmeden paylaşan Prof. Dr. Hartmut LAATSCH'a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Tez İzleme Komitesinde yer alan ve bu çalışmanın bütün aşamalarında her türlü destek, bilgi ve birikimlerini esirgmeden yardımcı olan Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e ve Prof. Dr. Ayhan Sıtkı DEMİR'e, ayrıca değerli katkılarından dolayı Kimya Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarda elde edilen bileşiklerin NMR spektrumlarının yorumlanmasında katkı sağlayan Doç. Dr. Mahmut TOĞRUL'a, bakterilerin izolasyonlarını ve teşhislerini yapan Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a ve Georg-August Üniversitesi'ndeki çalışmalarım sırasında arkadaşlığını ve teknik konulardaki yardımlarını esirgemeyen Friederike LISSY'e teşekkür ederim.

Benden yardımlarını ve arkadaşlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Fikret UYAR, Doç. Dr. Göksel KIZIL, Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL, Dr. Hakkı Murat BİLGİN ve Arş. Gör. Ersin KILINÇ'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP-05-FF-63) ve TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu'na (107T502) teşekkür ederim.

Sevgisini esirgmeden, her zaman yanımda olan, bana güç ve destek veren sevgili Annem Ayişe YAVUZ'a en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TEŞEKKÜR..... | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| AMAÇ | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| TABLolar DİZİNİ..... | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xii |
| RESİMLER DİZİNİ..... | xvii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xviii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK TARAMASI..... | 7 |
| 2.1. ANTİBİYOTİKLERİN TARİHSEL GELİŞİMİ | 7 |
| 2.2. YENİ ANTİBİYOTİK KAYNAKLARININ ARAŞTIRILMASI | 11 |
| 2.3. DOĞAL ÜRÜNLERİN FARMAKOLOJİK ÖNEMİ | 18 |
| 2.4. DOĞAL ÜRÜNLERİN ARAŞTIRILMASINDA BAŞARI İÇİN ANAHTAR FAKTÖRLER..... | 19 |
| 2.5. MİKROORGANİZMALARDA SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİMİ..... | 21 |
| 2.6. YENİ DOĞAL ÜRÜNLERİN KEŞFİ İÇİN FARKLI TARAMA YÖNTEMLERİ..... | 23 |
| 2.7. MİKROORGANİZMA İZOLATLARINDAN YENİ SEKONDER METABOLİTLERİN TARANMASI | 24 |
| 2.7.1. Tarama Metodları ve Yeni Bileşikler..... | 26 |
| 2.7.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Temelli Klasik Tarama..... | 26 |
| 2.7.1.2. <i>Botrytis cinerea</i> Hiflerinde Morfolojik Değişikliklere Neden Olan Antibiyotiklerin Taranması | 27 |
| 2.7.1.3. Yeni Sideroforların Taranması..... | 28 |
| 2.7.1.4. Aktinomisetlere Özgü Hücre Farklılaşması Sürecinde Sekonder Metabolitlerin Taranması | 31 |
| 2.7.1.5. Kendiliğinden Renkli Sekonder Metabolitleri İTK ile Kimyasal Tarama | 32 |
| 2.7.1.6. Floresan Özellikteki Sekonder Metabolitleri İTK ile Kimyasal Tarama..... | 36 |
| 2.7.1.7. İTK ile Kimyasal Tarama ve Ehrlich Reaktifi..... | 38 |
| 2.7.1.8. İTK ile Kimyasal Tarama ve Mavi Tetrazolium Boyar Reaktifi | 39 |
| 2.7.1.9. İTK ile Kimyasal Tarama ve Anisaldehit, Orsinol Reaktifleri..... | 42 |
| 2.7.1.10. İTK ile Kimyasal Tarama ve Vanilin-Sülfürik Asit Reaktifi | 42 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.1.11. Polistiren Reçine Fermantasyonu ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması..... | 43 |
| 2.7.1.12 Fotoiletken Dedektörlü HPLC ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması | 45 |
| 2.7.1.13 Diyot-Array Dedektörlü HPLC ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması | 45 |
| 2.7.2. Yönlendirilmiş Fermantasyon ile Yapısal Çeşitliliğin Artırılması | 54 |
| 2.7.2.1. Safenamisin ve Esmeraldin'lerin Biyomodifikasyonu | 54 |
| 2.7.2.2. Rizoferrinlerin Biyomodifikasyonu..... | 55 |
| 2.8. DEREPLİKASYON KONSEPTİ..... | 57 |
| 2.9. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | 58 |
| 3. MATERYAL VE METOD..... | 71 |
| 3.1. MATERYAL..... | 71 |
| 3.1.1. <i>Streptomyces</i> Türleri | 71 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar | 74 |
| 3.1.3. Kullanılan Kromatografik Teknikler | 76 |
| 3.1.4. Renklendirici Reaktifler..... | 77 |
| 3.1.5. Mikrobiyolojik Materyaller | 78 |
| 3.1.5.1. Kullanılan Mikroorganizmalar | 78 |
| 3.1.5.2. <i>Artemia salina</i> (Brine Shrimp)..... | 78 |
| 3.1.5.3. Kullanılan Besiyerleri..... | 78 |
| 3.1.5.4. Mikroorganizmaların Saklanma Koşulları | 79 |
| 3.1.6. Kullanılan Kimyasallar | 79 |
| 3.2. METOD | 80 |
| 3.2.1. Biyolojik Aktivite Temelli Ön–Tarama İşlemleri | 80 |
| 3.2.1.1. <i>Streptomyces</i> Türlerinin TSB Kültür Ortamında Üretimi..... | 80 |
| 3.2.1.2. Test Edilen Standart Mikroorganizmaların Üretilmesi..... | 80 |
| 3.2.1.3. TSB Besiyerinde Üretilen <i>Streptomyces</i> Türlerinden Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu | 80 |
| 3.2.1.4. Kültür Ortamının İyileştirilmesi | 82 |
| 3.2.1.5. Besiyeri Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi | 83 |
| 3.2.1.6. Disklerin Mikroorganizmalara Uygulanması | 85 |
| 3.2.1.7. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılması | 85 |
| 3.2.2. Biyolojik Aktivite ve Kimyasal Tarama Temelli Ön–Tarama İşlemleri | 86 |
| 3.2.2.1. Biyolojik Tarama..... | 88 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.2.2. Kimyasal ve Farmakolojik Tarama..... | 88 |
| 3.2.2.3. <i>Artemia salina</i> Sitotoksisite Testi..... | 89 |
| 3.2.2.4. Biyootografi Tekniği | 89 |
| 3.2.2.5. Seçilen Türlerin Büyük ölçekte üretimi ve Ekstraksiyonu | 91 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 93 |
| 4.1. <i>STREPTOMYCES</i> TÜRLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE YÖNÜNDEN TARANMASI | 93 |
| 4.2. <i>STREPTOMYCES</i> TÜRLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE VE KİMYASAL TARAMA YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI | 95 |
| 4.3. SEÇİLEN TÜRLERİN ARAŞTIRILMASI..... | 96 |
| 4.3.1. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BA2..... | 96 |
| 4.3.1.1. Fermantasyon ve İzolasyon..... | 96 |
| 4.3.1.2. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BA2'nin ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması..... | 97 |
| 4.3.1.2.1. Aktinomisin D (170)..... | 97 |
| 4.3.1.2.2. Monensin B (171) ve Monensin A (172) | 102 |
| 4.3.1.2.3. Bis(2-etilhegzil)ftalat (173)..... | 107 |
| 4.3.1.3. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BA2'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması | 110 |
| 4.3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması | 110 |
| 4.3.2. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AA50 | 111 |
| 4.3.2.1. Fermantasyon ve İzolasyon..... | 111 |
| 4.3.2.2. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AA50'nin ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması..... | 112 |
| 4.3.2.2.1. Chrysophanol-10,10'-Bianthron (174) | 112 |
| 4.3.2.2.2. Chrysophanol (175)..... | 118 |
| 4.3.2.2.3. Chrysophanol-10,10'-Bianthron (174) ve Chrysophanol (175)'un YPİTK ile Ayrılmaları | 122 |
| 4.3.2.2.4. 2-Acetylchrysophanol (178)..... | 124 |
| 4.3.2.2.5. Siklik Pentapeptit A (179) ve B (180) Karışımı..... | 129 |
| 4.3.2.3. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AA50'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması | 132 |
| 4.3.2.3.1. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi | 132 |
| 4.3.2.3.2. İndirgeme Gücü..... | 134 |
| 4.3.2.3.3. DNA'yı OH Radikaline Karşı Koruma Aktivitesi..... | 135 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.2.3.4. DNA'yı Prooksidan Olarak Kesim Aktivitesi..... | 137 |
| 4.3.3. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BS40 | 139 |
| 4.3.3.1. Fermantasyon ve İzolasyon..... | 139 |
| 4.3.3.2. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BS40'ın Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması..... | 140 |
| 4.3.3.2.1. Carbazomycin G (182) | 140 |
| 4.3.3.2.2. Teleocidin B2 (183) ve İzomer (184) Karışımı | 146 |
| 4.3.3.2.3. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve İzomeri (196)..... | 155 |
| 4.3.3.2.4. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve 14- <i>O</i> -acetylteleocidin İzomer (196) Karışımı (MYBS40E2-A) için Hidroliz Deneyi..... | 163 |
| 4.3.3.3. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BS40'tan İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması | 164 |
| 4.3.3.3.1. Antimikrobiyal ve Mortalite Yönünden Araştırılması | 164 |
| 4.3.4. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AS42 | 165 |
| 4.3.4.1. Fermantasyon ve İzolasyon..... | 165 |
| 4.3.4.2. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AS42'nin Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması..... | 166 |
| 4.3.4.2.1. Siklik Pentapeptit A (179) ve B (180) Karışımı..... | 166 |
| 4.3.4.3. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AS42'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması | 174 |
| 4.3.4.3.1. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması | 174 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 175 |
| 6. TABLOLAR VE RESİMLER | 184 |
| 7. İLAVELER..... | 200 |
| İlaveler I. Renklendirici Reaktiflerin Bileşimi..... | 200 |
| İlaveler II. Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimi. | 201 |
| İlaveler III. Yapay Deniz Suyunun (YDS) Bileşimi (10 L Musluk Suyunda)..... | 204 |
| İlaveler IV. BBM için Gerekli Çözeltilerin Bileşimi. | 205 |
| 8. KAYNAKLAR..... | 206 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 232 |

AMAÇ

Bu çalışmada temel amaç olarak, oldukça farklı kimyasal gruplara ait sekonder metabolitleri üretebilme yeteneğine sahip aktinomisetlerin *Streptomyces* cinsine ait olan bakterilerden yeni, özellikle de biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve kimyasal yapılarının aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda çalışma aşağıdaki sıraya göre dört temel bölüme ayrılabilir.

a) Bakteriyel sekonder metabolitlerin biyolojik ve kimyasal olarak taranması;

Biyolojik ve kimyasal tarama metodları ile biyolojik veya genetik olarak ilgi çekici mikroorganizma suşlarının taranması avantajlıdır. *Streptomyces*'lerden elde edilecek ham ekstraktlar, biyolojik taramalar için başlıca disk agar difüzyon yöntemine göre antibakteriyel, antifungal ve antialgal aktivite yönünden ve brine shrimp yöntemine göre ise sitotoksosite yönünden test edilecektir. Kimyasal taramalarda ise, metabolitlerin kalitatif veya yarı-kantitatif olarak belirlenebilmesi için renklendirici reaktifler ile İTK kromatogramlarının boyanması veya HPLC tekniğinden temel olarak yararlanılacaktır.

b) Sekonder metabolitlerin izolasyonu;

Biyolojik ve kimyasal tarama sonucu belirlenen ilgi çekici türler için optimum üretim koşulları (besiyeri, pH, sıcaklık ve fermantasyon süresi) belirlendikten sonra yeterli miktarda saf metabolit elde edebilmek için büyük ölçekte fermantasyon gerçekleştirilecektir. Elde edilen metabolit ekstraktlara, kolon kromatografisi, İTK, PİTK, moleküler elek kromatografisi ve HPLC gibi çeşitli kromatografik teknikler uygulanarak saf bileşikler izole edilecektir. Biyolojik aktif bileşiklerin tanımlanmasında biyootografi ve direk biyoassay temelli fraksiyonlandırma yöntemi denenecektir.

c) Sekonder metabolitlerin moleküler yapılarının aydınlatılması;

Sekonder metabolitlerin yapılarının aydınlatılması kombine spektrofotometrik yöntemlerle özellikle 1D NMR (^1H ve ^{13}C) ve 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC gibi) ile UV, IR ve MS gibi spektroskopik tekniklerin yanında AntiBase, Doğal Ürünler Sözlüğü ve Chemical Abstract gibi veri bankaları kullanılarak izole edilen saf metabolitlerin moleküler yapıları aydınlatılacaktır.

d) Saf olarak izole edilen bileşiklerin biyolojik açıdan değerlendirilmesi;

İzole edilen yeni ve saf metabolitler, farklı biyolojik aktiviteler yönünden değerlendirilecektir. Bu aşamada, ham ekstraktlar için uygulanan yöntemler uygulanacaktır.

ÖZET

Son yıllarda yeni hastalıkların gelişmesi ve mevcut antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizma türlerinin ortaya çıkması nedeniyle, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar insan sağlığını küresel ölçekte tehdit etmektedir. Bu durum yeni biyolojik aktif metabolitlerin keşfini zorunlu kılmaktadır. Mikrobiyal sekonder metabolitler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin kaynaklarından birini teşkil ederler. *Actinomycetales* ordusuna dahil olan *Streptomyces* türleri, çoğu biyolojik olarak aktif olan sekonder metabolitleri üretebilme özelliğine sahip yetenekli mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen ve ticari öneme sahip sekonder metabolitlerden başlıcaları antibakteriyel, antifungal ve antitümör ajanlardır. Yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için *Streptomyces* gibi iyi bilinen ve yetenekli mikroorganizmalarda yeni bileşiklerin taranması temel stratejilerden biridir.

Bu amaçlar doğrultusunda, endemik bitkilerin kök çevresi topraklarından izole edilip 16S rRNA genleri kullanılarak teşhisleri yapılmış olan 67 *Streptomyces* ve 1 *Nocardiopsis* türünün ham ve farklı organik çözücülerdeki ekstraktlarının Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilerin ve *Candida albicans* mayasının üremesi üzerine etkisi *in vitro* olarak test edildi. Biyolojik aktivite temelli ön-tarama işlemleri sırasında denenen bu 68 türden 25 kadarının test mikroorganizmalarının üremeleri üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu belirlendi. Biyolojik olarak aktif olan bu türlerin ham ekstraktlarının, İTK kromatogramlarının çeşitli renklendirici reaktiflerden yararlanılarak belirlendiği kimyasal taramalar sonucunda ilgi çekici türler belirlendi. Optimum üretim koşullarında yeteri miktarda sekonder metabolit elde etmek için biyolojik ve kimyasal taramalar sonucu tespit edilen *Streptomyces* sp. BA2, *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. BS40 ve *Streptomyces* sp. AS42 kodlu ilgi çekici türlerden büyük ölçekte üretildi. Elde edilen metabolit ekstraktlara, kolon kromatografisi, İTK, PİTK, moleküler elek kromatografisi ve HPLC gibi çeşitli kromatografik teknikler uygulanarak saf bileşikler izole edildi. ¹H NMR ve ¹³C NMR teknikleri başta olmak üzere 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC gibi) ile UV, IR ve MS gibi spektroskopik tekniklerin yanında AntiBase, Doğal Ürünler Sözlüğü ve Chemical Abstract gibi veri bankaları kullanılarak saflaştırılan sekonder metabolitlerin yapıları aydınlatıldı.

Streptomyces sp. BA2'den bilinen bileşikler olan, aktinomisin D (170), monensin B (171) ve monensin A (172) karışımı ile *bis*(2-etilhegzil)ftalat (173) saflaştırılıp yapıları aydınlatıldı. Klinik olarak bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan aktinomisin D (170) ile doğal poliyeter iyonofor antibiyotikler olduğu bilinen monensin B (171) ve A (172) karışımının test mikroorganizmalarının üremesi üzerine antimikrobiyal aktivitesi test edildi. Aktinomisin D (170) ve monensin B (171) ve A (172) karışımının yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlendi.

Streptomyces sp. AA50'den, daha önce bazı *Streptomyces* türlerinden izole edildiği rapor edilmiş olan chrysophanol (175) ile 2-acetylchrysophanol (178) ve daha önce çeşitli bitkilerden izole edilmiş olan fakat ilk kez bu çalışmada bir mikroorganizmadan izole edilen chrysophanol-10,10'-bianthron (174) bileşikleri saflaştırıldı. Ayrıca endotelin reseptör antagonisti oldukları bilinen siklik pentapeptit A (179) ve siklik pentapeptit B (180) bileşikleri karışım halinde izole edildi. İzole edilen bu bileşiklerden chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175)'un DPPH radikal söndürme aktivitesi, indirgeme gücü gibi antioksidan özelliklerinin yanında ayrıca agaroz jel elektroforezi kullanılarak bu bileşiklerin DNA'yı OH radikaline karşı koruma aktivitesi ile DNA'yı prooksidan olarak kesim aktivitesi araştırıldı.

Streptomyces sp. BS40'tan ise carbazomycin G (182) ile bilinen bileşik olan teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımı ile iki yeni teleocidin türevi olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (195) ve 14-*O*-acetylteleocidin B2 izomer (196) karışımı izole edildi. Çalışmalar esnasında, ciltte güçlü iritasyona ve vezikül oluşumuna neden olduğu görülen 14-*O*-acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının *Artemia salina* L. larvaları üzerine 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında % 100 sitotoksik aktivite sergilediği tespit edildi.

Streptomyces sp. AS42'den ise, endotelin reseptör antagonisti oldukları bilinen ve bu çalışmada ayrıca AA50 suşundan da izole edilmiş olan siklik pentapeptit A (179) (siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-)) ve siklik pentapeptit B (180) (siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-)) bileşikleri izole edilerek yapıları 1D ve 2D NMR tekniklerinin yanında HPLC-ESI-MS²/MS³ tekniği kullanılarak aydınlatıldı.

Anahtar Kelimeler : *Streptomyces*, Doğal ürünler, Sekonder metabolit izolasyonu, Yapı aydınlatması, Antimikrobiyal aktivite, Antioksidant aktivite.

ABSTRACT

In recent years, bacterial and fungal infections threaten human health worldwide, due to the development of new diseases and evidence of microorganisms resistant against to the presently used antibiotics. This situation requires discovery of new biologically active metabolites. Microbial secondary metabolites, having special structures and biological activities represent one of the productive sources of natural compounds. *Streptomyces* species, which is included in *Actinomycetales* order, are talented microorganisms having property of producing secondary metabolites most of which are biologically active. The main secondary metabolites isolated from these microorganisms which have commercial value are antibacterial, antifungal and antitumor agents. Screening of new compounds from well known and talented microorganisms such as *Streptomyces*, is one of the basic strategies for discovery of novel biologically active metabolites.

For this purpose, effects of crude and different organic extracts which were obtained previously from 67 *Streptomyces* and one *Nocardiopsis* species that isolated from soil around root of endemic plants and identified by using 16S rRNA genes were tested *in vitro* on growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria and that of *Candida albicans* yeast. It was determined that 25 of the 68 species tested during pre-screening processes based on biological activity have a preventive effect on the growth of test microorganisms. The interesting species were selected from these biologically active species according to the results obtained from chemical screening in which crude extracts of species were estimated by using TLC stained with different staining reagents. In order to obtain sufficient amount of pure secondary metabolites under optimum culture conditions, the interesting species encoded *Streptomyces* sp. BA2, *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. BS40 and *Streptomyces* sp. AS42 that determined by biological and chemical screening, were cultured on a large-scale. Different chromatographic methods such as column chromatography, TLC, PTLC, molecular exclusion chromatography and HPLC were applied to purify these extracts. The structures of pure secondary metabolites were elucidated by ^1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopic method and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC) and UV, IR and MS as well as several database such as AntiBase, Dictionary of Natural Products and Chemical Abstract.

From the terrestrial *Streptomyces* sp. BA2, mixture of known compounds monensin B (**171**) and monensin A (**172**) and actinomycin D (**170**) and *bis*(2-ethylhexyl)phthalate (**173**) were isolated and their structure were elucidated. Antimicrobial activity of actinomycin D (**170**), which is used clinically for the treatment of some cancer types, and monensin B (**171**) and monensin A (**172**) mixture, which is a well-known representative of naturally polyether ionophore antibiotics, were investigated for their antimicrobial activity on proliferation of test microorganisms. It was shown that actinomycin D (**170**) and the mixture of monensin B (**171**) and monensin A (**172**) exhibited high antimicrobial activity.

Chrysophanol (**175**) and 2-acetylchrysophanol (**178**) which were previously isolated from some *Streptomyces* species, and chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) which was formerly isolated from several plants but firstly isolated from microorganisms in this study are purified. Moreover, cyclic pentapeptide A (**179**) and cyclic pentapeptide B (**180**), which are known as endothelin-binding inhibitors, were isolated as a mixture. DNA cleavage protection activity of the chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) and chrysophanol (**175**) and DNA cleavage activity against OH radicals were studied by using Agarose Gel Electrophoresis. The antioxidant properties such as DPPH radical scavenging activity and reducing power of these compounds were also studied.

Carbazomycin G (**182**) and mixture of teleocidin B2 (**183**) and isomer of teleocidin B2 (**184**) and mixture of novel teleocidin derivatives 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) and 14-*O*-acetylteleocidin B2 isomer (**196**) were also isolated from *Streptomyces* sp. BS40. Mixture of 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) and 14-*O*-acetylteleocidin B2 isomer (**196**) showed 100 % cytotoxic activity in the concentration range of 0.1 to 10 µg/mL on brine shrimp (*Artemia salina* L.). It was observed that this mixture cause strong skin irritation and vesication.

Cyclic pentapeptide A (siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-) (**179**) and cyclic pentapeptide B (siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-) (**180**), which are endothelin receptor antagonists, were isolated as a mixture from the terrestrial *Streptomyces* sp. AS42 and characterized by 1D NMR and 2D NMR and HPLC-ESI-MS²/MS³ techniques. This mixture of cyclic pentapeptide A and B were also isolated from *Streptomyces* sp. AA50 in the beginning.

Keywords : *Streptomyces*, Natural products, Isolation of secondary metabolite, Structure elucidation, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.

TABLolar DİZİNİ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Tablo 2.1. Yıllara göre tedavide kullanılan yeni antibakteriyel ilaç sınıflarının özeti..... | 8–9 |
| Tablo 2.2. 2004 yılında ABD’de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda bakteri dirençliliğinin yaygınlık oranı | 11 |
| Tablo 4.1. Test edilen mikroorganizmalara karşı standart antibiyotiklerin etkisi | 94 |
| Tablo 4.2. Aktinomisin D (170)’nin fizikokimyasal özellikleri ve ¹ H, ¹³ C NMR verileri . | 101 |
| Tablo 4.3. Monensin B (171) ve monensin A (172)’nin ¹³ C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, 125 MHz, CDCl ₃) | 106 |
| Tablo 4.4. <i>Bis</i> (2-etilhegzil)ftalat (173)’ın fizikokimyasal özellikleri ve ¹ H, ¹³ C NMR verileri | 109 |
| Tablo 4.5. Aktinomisin D (170) ile monensin B (171) ve A (172) karışımının standart mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları | 110 |
| Tablo 4.6. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175)’un fizikokimyasal özellikleri | 117 |
| Tablo 4.7. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175)’un ¹³ C ve ¹ H NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, CDCl ₃) | 121 |
| Tablo 4.8. 2-Acetylchrysophanol (178)’un ¹³ C NMR (125 MHz) ve ¹ H (300 MHz) kimyasal kayma değerleri (ppm, CDCl ₃)..... | 128 |
| Tablo 4.9. Carbazomycin G (182)’nin fizikokimyasal özellikleri | 145 |
| Tablo 4.10. Carbazomycin G (182)’nin ¹³ C NMR (125 MHz) ve ¹ H (300 MHz) kimyasal kayma değerleri (ppm, DMSO- <i>d</i> ₆) | 145 |
| Tablo 4.11. Teleocidin B2 (183), teleocidin izomeri (184), 14- <i>O</i> -acetylteleocidin B2 (195) ve 14- <i>O</i> -acetylteleocidin izomeri (196)’nin ¹³ C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, 125 MHz, CDCl ₃)..... | 162 |
| Tablo 4.12. Yeni teleocidin izomerler karışımı (MYBS40E2-A)’nın % mortalite aktivitesi..... | 164 |
| Tablo 4.13. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180)’nin ¹ H NMR ²⁹¹ ve ¹³ C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 169 |
| Tablo 4.14. Siklik pentapeptit A (179) ve siklik pentapeptit B (180)’nin ESI MS ² ve MS ³ [M+H] ⁺ fragment iyonlarının değerlendirilmesi | 172 |
| Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen <i>Streptomyces</i> ’lerin biyolojik taramalarının sonuçları..... | 185–189 |
| Tablo 6.2. M ₂ besiyerinde üretilen <i>Streptomyces</i> ’lerin biyolojik taramalarının sonuçları..... | 190–191 |
| Tablo 6.3. M ₂ besiyerinde üretilen rizosferik <i>Streptomyces</i> izolatlarının ham ekstraktlarının biyolojik taranması (Agar difüzyon testi ve Mortalite testi). | 192–194 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 2.1. 2004 yılında temel antibiyotik sınıflarının dünya piyasasındaki satış oranları | 12 |
| Şekil 2.2. ABD’de kullanılan yeni antibakteriyel ajanların yıllara göre dağılımı..... | 15 |
| Şekil 2.3. Ocak–1981 ile Haziran–2006 yılları arasında piyasaya çıkan farmakolojik öneme sahip doğal ürünlerin oranı | 18 |
| Şekil 2.4. Biyoaktif bileşikleri üreten mikroorganizmaların metabolik kapasitelerinin ortaya çıkarılması için işbirliği yaklaşımı..... | 19 |
| Şekil 2.5. Mikrobiyal kaynaklı doğal ürünlerden ilaç keşfi için araştırma yöntemleri | 20 |
| Şekil 2.6. Primer ve sekonder metabolit metabolizmalarının bağlantıları | 22 |
| Şekil 2.7. <i>Streptomyces</i> sp. HJ02’nin pridini parçaladığı olası metabolik yol | 69 |
| Şekil 3.1. <i>Streptomyces</i> türlerinin yaşam döngülerinin şematik gösterimi | 72 |
| Şekil 3.2. 50 mL’lik TSB kültür ortamında üretilen <i>Streptomyces</i> türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri | 81 |
| Şekil 3.3. <i>Streptomyces</i> türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri..... | 82 |
| Şekil 3.4. 125 mL’lik M ₂ kültür ortamında üretilen <i>Streptomyces</i> türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri | 83 |
| Şekil 3.5. 125 mL’lik M ₂ kültür ortamında üretilen AR6, AS41, AS42, BSH46, CA16 ve CS43 kodlu <i>Streptomyces</i> türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri | 84 |
| Şekil 3.6. 1 L’lik M ₂ kültür ortamında üretilen <i>Streptomyces</i> türlerinin genel tarama işlemleri | 87 |
| Şekil 3.7. Biyootografi metodunun şematik gösterimi..... | 90 |
| Şekil 4.1. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BA2’nin sekonder metabolitlerinin araştırılması.... | 96 |
| Şekil 4.2. Aktinomisin D (170)’nin ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃) | 98 |
| Şekil 4.3. Aktinomisin D (170)’nin ¹³ C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃) | 99 |
| Şekil 4.4. Aktinomisin D (170)’nin HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu | 99 |
| Şekil 4.5. 50 µM’lık Aktinomisin D (170)’nin UV spektrumu (CH ₂ Cl ₂) | 100 |
| Şekil 4.6. Aktinomisin D (170)’nin FT-IR spektrumu (KBr pellet)..... | 100 |
| Şekil 4.7. Monensin B (171) ve A (172) karışımının ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 102 |
| Şekil 4.8. Monensin B (171) ve A (172) karışımının ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl ₃)..... | 103 |
| Şekil 4.9. Monensin B (171) ve A (172)’nin HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu | 103 |
| Şekil 4.10. Monensin B (171) ve A (172)’nin HR-ESI-MS spektrumu | 104 |
| Şekil 4.11. 10 mg/mL’lik monensin B (171) ve A (172) karışımının UV spektrumu (CH ₂ Cl ₂)..... | 104 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Şekil 4.12. Monensin B (171) ve A (172) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet)..... | 105 |
| Şekil 4.13. <i>Bis</i> (2-etilhegzil)ftalat (173)'ın (+) ESI-MS spektrumu..... | 107 |
| Şekil 4.14. <i>Bis</i> (2-etilhegzil)ftalat (173)'ın ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 108 |
| Şekil 4.15. <i>Bis</i> (2-etilhegzil)ftalat (173)'ın ¹³ C/APT NMR spektrumu (75 MHz, CDCl ₃). .. | 108 |
| Şekil 4.16. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AA50'nin sekonder metabolitlerinin araştırılması | 111 |
| Şekil 4.17. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃)..... | 113 |
| Şekil 4.18. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un ¹³ C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃)..... | 113 |
| Şekil 4.19. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 114 |
| Şekil 4.20. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃)..... | 114 |
| Şekil 4.21. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃)..... | 114 |
| Şekil 4.22. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu | 115 |
| Şekil 4.23. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HR-ESI-MS spektrumu | 115 |
| Şekil 4.24. 100 µM'lık chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un UV-vis spektrumu (MeOH) | 116 |
| Şekil 4.25. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un FT-IR spektrumu (KBr pellet) | 116 |
| Şekil 4.26. Chrysophanol (175)'un ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃)..... | 118 |
| Şekil 4.27. Chrysophanol (175)'un ¹³ C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃)..... | 119 |
| Şekil 4.28. Chrysophanol (175)'un HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu | 119 |
| Şekil 4.29. 50 µM'lık Chrysophanol (175)'un UV-vis spektrumu (MeOH)..... | 120 |
| Şekil 4.30. Poliketit biyosentetik yoldan chrysophanol (175)'un biyosentezi | 120 |
| Şekil 4.31. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un YPİTK kromatogramı | 122 |
| Şekil 4.32. Chrysophanol (175)'un YPİTK kromatogramı | 123 |
| Şekil 4.33. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175) karışımının YPİTK kromatogramı | 123 |
| Şekil 4.34. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175)'un 3D YPİTK kromatogramı | 123 |
| Şekil 4.35. 2-Acetylchrysophanol (178)'un ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 124 |
| Şekil 4.36. 2-Acetylchrysophanol (178)'un ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl ₃)..... | 125 |
| Şekil 4.37. 2-Acetylchrysophanol (178)'un DCI-MS spektrumu (NH ₃)..... | 125 |
| Şekil 4.38. 2-Acetylchrysophanol (178)'un H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl ₃) .. | 126 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.39. 2-Acetylchrysophanol (178)'un HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃) | 126 |
| Şekil 4.40. 2-Acetylchrysophanol (178)'un HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃) | 126 |
| Şekil 4.41. 50 µM'lık 2-Acetylchrysophanol (178)'un UV-vis spektrumu (MeOH)..... | 127 |
| Şekil 4.42. 2-Acetylchrysophanol (178)'un HMBC korelasyonu | 128 |
| Şekil 4.43. Siklik pentapeptit karışımının (179, 180) ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 129 |
| Şekil 4.44. Siklik pentapeptit karışımının (179, 180) ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 130 |
| Şekil 4.45. Siklik pentapeptit karışımının (179, 180) ESI-MS spektrumu..... | 130 |
| Şekil 4.46. Siklik pentapeptit karışımının (179, 180) HPLC kromatogramı..... | 131 |
| Şekil 4.47. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve pozitif kontrollerin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi | 133 |
| Şekil 4.48. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174), chrysophanol (175) ve pozitif kontrollerin Fe ³⁺ ü Fe ²⁺ ye indirgeme aktivitesi | 134 |
| Şekil 4.49. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un Fenton reaksiyonu ile oluşan OH radikallerinin pBluescript M13+ plasmid DNA'sına verdiği hasarı önleyici etkisinin araştırılması | 136 |
| Şekil 4.50. Chrysophanol (175)'un Fenton reaksiyonu ile oluşan OH radikallerinin pBluescript M13+ plasmid DNA'sına verdiği hasarı önleyici etkisinin araştırılması | 136 |
| Şekil 4.51. Chrysophanol-10,10'-Bianthron (174)'un Cu ²⁺ varlığında pBluescript M13+ plasmid DNA'sını kesim etkisinin araştırılması | 138 |
| Şekil 4.52. Chrysophanol (175)'un Cu ²⁺ varlığında pBluescript M13+ plasmid DNA'sını kesim etkisinin araştırılması | 138 |
| Şekil 4.53. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. BS40'ın sekonder metabolitlerinin araştırılması | 139 |
| Şekil 4.54. Carbazomycin G (182)'nin ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 141 |
| Şekil 4.55. Carbazomycin G (182)'nin ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 141 |
| Şekil 4.56. Carbazomycin G (182)'nin H,H COSY spektrumu (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 142 |
| Şekil 4.57. Carbazomycin G (182)'nin HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 142 |
| Şekil 4.58. Carbazomycin G (182)'nin HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 142 |
| Şekil 4.59. 100 µM'lık Carbazomycin G (182)'nin UV spektrumu (MeOH)..... | 143 |
| Şekil 4.60. Carbazomycin G (182)'nin FT-IR spektrumu (KBr pellet) | 143 |
| Şekil 4.61. Carbazomycin G (182)'nin ESI-MS spektrumu..... | 144 |
| Şekil 4.62. Carbazomycin G (182)'nin HR-ESI-MS spektrumu..... | 144 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Şekil 4.63. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 147 |
| Şekil 4.64. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl ₃)..... | 148 |
| Şekil 4.65. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının H,H COSY spektrumu (600 MHz, CDCl ₃)..... | 149 |
| Şekil 4.66. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının HSQC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, CDCl ₃)..... | 149 |
| Şekil 4.67. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının HMBC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, CDCl ₃)..... | 149 |
| Şekil 4.68. 0,02 mg/mL'lik teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının UV spektrumu (CH ₂ Cl ₂)..... | 150 |
| Şekil 4.69. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet)..... | 150 |
| Şekil 4.70. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının ESI-MS spektrumu..... | 151 |
| Şekil 4.71. Teleocidin B2 (183) ve izomer (184) karışımının HR-ESI-MS spektrumu..... | 151 |
| Şekil 4.72. Teleocidinlerin biyosentezinin şematik gösterimi..... | 153 |
| Şekil 4.73. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının ¹ H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 155 |
| Şekil 4.74. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl ₃)..... | 157 |
| Şekil 4.75. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin (195) ve izomer (196) karışımının H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl ₃)..... | 158 |
| Şekil 4.76. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin (195) ve izomer (196) karışımının HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃)..... | 158 |
| Şekil 4.77. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin (195) ve izomer (196) karışımının HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl ₃)..... | 158 |
| Şekil 4.78. 0,02 mg/mL'lik 14- <i>O</i> -acetylteleocidin (195) ve izomer (196) karışımının UV spektrumu (CH ₂ Cl ₂)..... | 159 |
| Şekil 4.79. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet)..... | 159 |
| Şekil 4.80. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının (+) ESI-MS spektrumu | 160 |
| Şekil 4.81. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının HR-ESI-MS spektrumu | 160 |
| Şekil 4.82. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımının HPLC kromatogramı..... | 161 |
| Şekil 4.83. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B2 (195) ve izomer (196) karışımı için hidroliz işlemleri..... | 163 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Şekil 4.84. Rizosferik <i>Streptomyces</i> sp. AS42'nin sekonder metabolitlerinin araştırılması | 165 |
| Şekil 4.85. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 166 |
| Şekil 4.86. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının ¹³ C NMR spektrumu (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 167 |
| Şekil 4.87. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının H,H COSY spektrumu (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) | 168 |
| Şekil 4.88. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının HSQC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 168 |
| Şekil 4.89. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının HMBC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 168 |
| Şekil 4.90. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının ESI-MS spektrumu..... | 170 |
| Şekil 4.91. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının HR-ESI-MS spektrumu.... | 170 |
| Şekil 4.92. Siklik pentapeptit A (179)'nin (a) ESI MS ² ve (b) ESI MS ³ spektrumu..... | 171 |
| Şekil 4.93. Siklik pentapeptit B (180)'nin (a) ESI MS ² ve (b) ESI MS ³ spektrumu..... | 171 |
| Şekil 4.94. 0,02 mg/mL'lik siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının UV spektrumu (DMSO) | 172 |
| Şekil 4.95. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet)..... | 173 |

RESİMLER DİZİNİ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resim 3.1. Farklı büyüme aşamalarında <i>Streptomyces</i> hücrelerinin görünümü | 73 |
| Resim 6.1. <i>E. coli</i> ATCC 25922'nin üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi | 195 |
| Resim 6.2. <i>S. aureus</i> ATCC 25923'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi | 195 |
| Resim 6.3. <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615'in üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi | 195 |
| Resim 6.4. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi..... | 196 |
| Resim 6.5. <i>B. subtilis</i> ATCC 11774'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi | 196 |
| Resim 6.6. <i>C. albicans</i> ATCC 10231'in üremesi üzerine antifungal amfoterisin B (AFB)'nin etkisi..... | 196 |
| Resim 6.7. <i>C. albicans</i> ATCC 10231'in üremesi üzerine negatif kontrollerin etkisi | 196 |
| Resim 6.8. <i>E. coli</i> ATCC 25922'nin üremesi üzerine BAH26 ekstraktının etkisi..... | 197 |
| Resim 6.9. <i>S. aureus</i> ATCC 25923'ün üremesi üzerine BA2 ekstraktının etkisi | 197 |
| Resim 6.10. <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615'in üremesi üzerine BA2 ekstraktının etkisi | 197 |
| Resim 6.11. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853'ün üremesi üzerine BA2 ekstraktının etkisi..... | 197 |
| Resim 6.12. <i>S. aureus</i> ATCC 25923'ün üremesi üzerine CS44 ekstraktının etkisi | 197 |
| Resim 6.13. <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615'in üremesi üzerine CS44 ekstraktının etkisi | 197 |
| Resim 6.14. <i>C. albicans</i> 'ın üremesi üzerine BSH50 ekstraktının etkisi | 198 |
| Resim 6.15. <i>C. albicans</i> 'ın üremesi üzerine CS43 ekstraktının etkisi | 198 |
| Resim 6.16. <i>Streptomyces</i> sp. BA2'den elde edilen ham ekstraktın biyootografi metodu ile <i>S. aureus</i> üzerine olan etkisi. | 198 |
| Resim 6.17. <i>Streptomyces</i> türlerinden elde edilen ham ekstraktların kimyasal tarama metodu ile araştırılması (Ehrlich's reaktifi püskürtüldükten sonra 254 nm altında kromatogramların görüntüsü). | 198 |
| Resim 6.18. <i>S. aureus</i> ATCC 25923'ün üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi..... | 199 |
| Resim 6.19. <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615'in üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi..... | 199 |
| Resim 6.20. <i>B. subtilis</i> ATCC 11774'ün üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi..... | 199 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------|
| α | : optik rotasyon (optical rotation) |
| δ | : kimyasal kayma (chemical shift) (NMR için) |
| ϵ | : molar absorblama katsayısı (UV-vis için) |
| ν | : dalga sayısı (IR için) |
| \$ | : Amerikan Doları |
| 1D | : tek boyutlu (NMR için) |
| 2D | : iki boyutlu (NMR için) |
| 3D | : üç boyutlu (YPİTK için) |
| 6-APA | : 6-aminopenisilanik asit |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| Ac | : asetil |
| AFB | : amfoterisin B |
| AIDS | : acquired immune deficiency syndrome |
| Ala | : alanin |
| AMC | : amoksisilin/klavulonik asit |
| APT | : attached proton test |
| ATCC | : Amerikan tip kültür koleksiyonu |
| BHA | : bütillenmiş hidroksianisol |
| BHT | : bütillenmiş hidroksitoluen |
| bp | : kaynama noktası (boiling point) |
| br | : geniş (broad) (spektral) |
| C | : sitozin |
| CA | : Chemical Abstract |
| CD | : circular dichroism |
| cm^{-1} | : dalga sayısı (wavenumber(s)) (IR için) |
| ^{13}C NMR | : karbon-13 nükleer manyetik rezonans |
| COSY | : correlated spectroscopy |
| D, L | : dextrorotatory, levorotatory |
| d | : dublet (spektral) |
| DAD | : diyot array dedektör |
| DCI | : doğrudan kimyasal iyonlaştırma (direct chemical ionisation) |
| DCM | : diklorometan |

| | |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| DMSO | : dimetil sülfoksit |
| DNA | : deoksiribonükleik asit |
| DNP | : Doğal Ürünler Sözlüğü (Dictionary of Natural Products) |
| DPPH | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| <i>E, Z</i> | : Entgegen (German, “opposite”), Zusammen (German, “together”) |
| EDTA | : etilendaimintetraasetik asit |
| ESIMS | : electron spray ionisation mass spectrometry |
| EtOAc | : etil asetat |
| FT | : fourier transform |
| G | : guanin |
| g | : gram |
| GC | : gaz kromatografisi |
| Glu | : glutamik asit |
| HIV | : human immuno deficiency virus |
| HMBC | : heteronuclear multiple bond connectivity |
| HMQC | : heteronuclear multiple quantum coherence |
| ¹ H NMR | : proton nükleer manyetik rezonans |
| HPLC | : yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| HRMS | : yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (high resolution mass spectrometry) |
| HSQS | : heteronuclear single quantum coherence |
| HTS | : yüksek hızlı seri tarama (high throughput screening) |
| Hz | : hertz |
| Ile | : izoleüsin |
| ILV | : indolactam V |
| IC ₅₀ | : % 50 inhibitör konsantrasyonu |
| IPM | : imipenem |
| IR | : kırmızı ötesi (Infrared) |
| İTK | : ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography “TLC”) |
| <i>J</i> | : eşleşme sabiti (coupling constant) (NMR için Hz cinsinden) |
| L | : litre |
| LD | : öldürücü doz (lethal dose) |
| Leu | : leüsin |
| lit. | : literatür |
| LN | : linear form (DNA için) |

| | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| m | : multipler (spektral) |
| M ⁺ | : parent molekular ion |
| m/z | : kütle/yük oranı (mass-to-charge-ratio) |
| MDR | : çoklu ilaç direnci (multi drug resistant) |
| Me | : metil |
| MeOH | : metanol |
| Met | : metiyonin |
| MIC | : minimum inhibitör konsantrasyonu |
| MHz | : megahertz |
| mL | : mililitre |
| mM | : milimolar (milimol/litre) |
| mmol | : milimol |
| mol | : mol |
| M.Ö. | : Milattan Önce |
| mp | : erime noktası |
| MRSA | : metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>) |
| MRSE | : metisiline dirençli <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| MS | : kütle spektroskopisi (mass spectrometry; molecular sieves) |
| M.S. | : Milattan Sonra |
| N.C.C.L.S. | : National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NET | : netilmisin |
| nM | : nano molar |
| NMR | : nükleer manyetik rezonans |
| <i>o-, m-, p-</i> | : <i>ortho-, meta-, para-</i> |
| OC | : open circular form (DNA için) |
| OFX | : ofloksasin |
| OSMAC | : bir suş pek çok bileşik (One Strain MAny Compounds) |
| PİTK | : preparatif ince tabaka kromatografisi |
| PDF | : bakteriyel peptid deformilaz |
| PKC | : protein kinaz C |
| PKS | : poliketit sentaz |
| ppm | : milyonda bir (part(s) <i>per</i> million) |
| PRSP | : penisiline dirençli <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| q | : kuartet (spektral) |

| | | |
|----------------------|---|-----------------------------------------------------------------|
| <i>R, S</i> | : | <i>Rectus</i> (Latin, “right”), <i>Sinister</i> (Latin, “left”) |
| <i>R_f</i> | : | alıkonma faktörü (retention factor) (İTK için) |
| RNA | : | ribonükleik asit |
| rRNA | : | ribozomal RNA |
| rpm | : | reciprocations per minute |
| s | : | singlet (spektral) |
| SAR | : | yapı aktivite ilişkisi (structure activity relationship) |
| SC | : | supercoiled form (DNA için) |
| t | : | triplet (spektral) |
| TAE | : | tris-asetit asit-EDTA (tampon çözelti) |
| TCA | : | trikloroasetik asit |
| TMS | : | terametilsilan |
| Trp | : | triptofan |
| TSB | : | tryptone soya broth |
| UV | : | mor ötesi (ultraviyole) |
| WHO | : | Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) |
| Val | : | valin |
| vis | : | görünür alan |
| VRE | : | vankomisine dirençli enterokoklar |
| VRSA | : | vankomisine dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> |
| YPİTK | : | yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi |

1. GİRİŞ

Doğal ürünler; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilen kimyasal bileşiklerdir. Doğal ürünler kimyası, yüksek yapılı canlılar veya mikroorganizmalardan yeni tıbbi ilaçların keşfine öncülük eden yeni ürünlerin izolasyonu, biyosentezi ve yapısal tanımlanması ile ilgilidir.¹

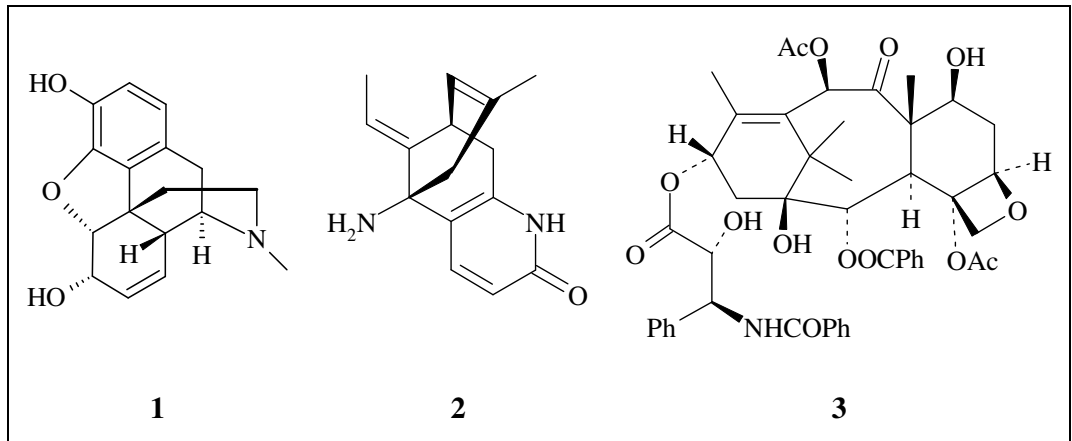
Doğal ürünler kimyası geçen yarım asırdan bu yana gelişmeye devam etmektedir. Doğal ürünler, kimyasal farklılıkları ve hastalıklara karşı çeşitli biyoaktivitelerinden dolayı farmakolojik araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanısıra, düşük maliyetleri ve kolay temin edilebilirliklerinden dolayı, doğal ham ürünler özellikle az gelişmiş ülkelerde tıbbi amaçlı faydalanılan önemli bir kaynağı oluşturmaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin, tedavi için temelde geleneksel tıba bağlı olan bitkisel ilaçları kullandığı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir.²

Geleneksel tıp genelde bitkisel kökenlidir ve hastalıkları tedavi edici tıbbi ajan olarak spesifik bitkilerden hazırlanan doğal ürünlerin kullanımının insanoğlunun çok eski tarihlerine dayandığı tahmin edilmektedir. M.Ö. 30. yüzyıla ait erken Çin yazılı kaynaklarında özellikle bitkilerin köklerinden faydalandığı yazılmaktadır.³ Binlerce yıldır, özellikle Asya, Mısır ve Antik Yunan'da bitki ve hayvanların bazı kısımlarından faydalanarak elde edilen, oldukça farklı doğal materyallerin karışımlarını içeren çeşitli minerallerin veya kendi hazırladıkları ham ekstraktların kullanıldığı bilinmektedir.⁴ Bitkilerin bilimsel olarak sınıflandırılması Theophrastus (M.Ö. 370-285) ile başlamış ve Dioscorides tarafından yazılan "*De Materia Medica*" (M.S. 77)'da tıbbi amaçlı olarak 600'ü aşkın bitkinin kullanıldığı belirtilmiştir.⁵ Daha sonra İbn al-Baitar (1197-1248) "*Corpus of Simples*" adlı eserinde 1.400'den fazla ilacı ve tıbbi bitkiyi listelemiştir.⁶ Tıbbi bitkilerle tedavi kültür ve geleneğe dayanmaktadır. Anadolu halkının yabani bitkileri ilaç olarak kullanışı çok eski devirlere kadar uzanmaktadır. Kırsal bölgelerde ilaç hazırlamak için genellikle çevrede yetişen veya yetiştirilen bitkiler kullanılmaktadır. Bitkilerin organizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana araştırılmaya devam edilmektedir.⁷⁻⁹

İlk saflaştırılan ticari doğal ürün olan morfin (1) 1806'da afyon bitkisinden izole edildi ve analjezik ilaçların üretimi 1826'da E. Merck, Darmstadt, Almanya firması tarafından gerçekleştirildi. Günümüze kadar, kanserin son aşamasındaki şiddetli

ağrılardan ıstırap çeken hastaları tedavi etmek için morfinden başka hiçbir alternatif ilaç bulunamadı.¹⁰ Geçen yüzyılda, kimyacılar geleneksel tıpta kullanılan materyallerden çok sayıda biyolojik aktif bileşik keşfettiler. Çin’de, geleneksel Çin tıbbında kullanılan 11.146 çeşit bitkiden 10.000’den fazla bileşik izole edilip yapıları aydınlatılmıştır.¹¹

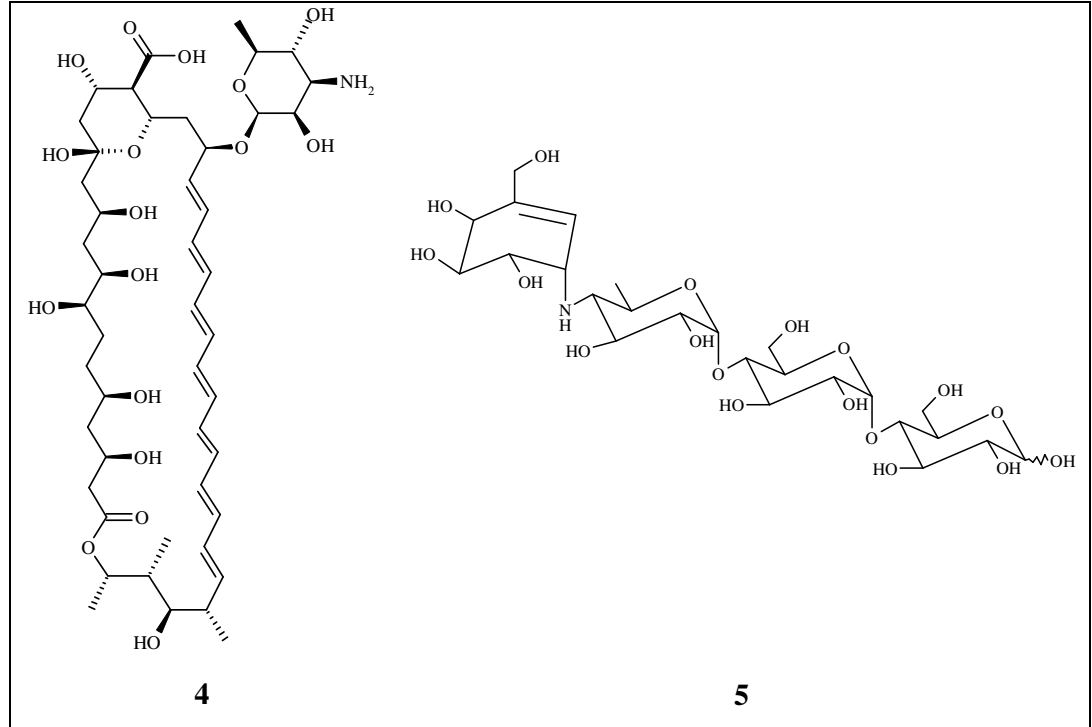
Modern ilaçlar üzerine geleneksel Çin tıbbının etkisini gösteren bir örnek huperzin A (**2**)’dir. Bu alkaloid, 1986 yılında Çin’de bir araştırma grubu tarafından *Huperzia serrata* bitkisinden izole edilmiştir.¹² Alzheimer, inflamasyon ve ateşe karşı geleneksel Çin tıbbında yüzlerce yıldır bu bitkiler kullanılmaktadır. Huperzin A (**2**)’nın oldukça güçlü antikolinesteraz aktivitesinin yanı sıra çarpıcı bir biçimde hafıza ve öğrenme verimini artırıcı etkiye sahip olduğu tıbbi çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle, Alzheimer hastalığının tedavisi için klinik aday olarak görülmektedir.¹³ Bu bitkinin verimli hale gelebilmesi ve tam olarak gelişmesi için 8-10 yıl kadar süreye ihtiyaç olmasından dolayı, araştırmacılar 100’den fazla türevini sentezlemişlerdir. Bunun yanında yapı aktivite ilişkisi (SAR “Structure Activity Relationship”) de çalışılmaktadır. Biyoassay verileri, doğal (–)-huperzin A enantiyomerinin antikolinesteraz aktivitesinin IC₅₀ değerinin 44,5 nM olduğunu, buna karşın sentetik (+)-huperzin A enantiyomerinin sadece 1/33 kat kadar kuvvetli olduğunu göstermiştir.¹⁴



Bitkilerden izole edilen doğal ürünlere verilebilecek muhtemelen en bilinen örnek olarak, ilk kez 1967 yılında batı porsuk ağacının gövdesinin kabuğundan izole edilen¹⁵ ve 1982’den beri klinik bir sitotoksik madde olarak kullanılan taksol (**3**) verilebilir. Paklitaksol (**3**) bir diterpen esteridir ve birçok asimetrik merkeze sahiptir.

Klinik uygulamalarda kullanılan ve mitoz bölünmede iğ iplikcikleri formasyonlarını inhibe eden diğer antimikrotübül ajanlar (vinkristin, kolşisin) gibi, taksol da mikrotübüllerin bir arada tutulmalarını sağlayarak depolimerizasyona karşı dayanıklılığın artmasını sağlayıp hücre replikasyonunu inhibe etmektedir. Bu sebepten dolayı antilösemik ve tümör inhibisyon bileşiği olarak kullanılmaktadır.¹⁶

Mikroorganizmalar ve özellikle de bakteriler kimyanın ve hatta tıbbi bilimlerin gelişmesinde önemli bir role sahiptir. Alexander Fleming tarafından 1928’de penisilinin keşfedilmesi, mikroorganizmaların da klinik olarak kullanılan doğal ürünlerin zengin bir kaynağını oluşturduğunu gösteren antibiyotikler çağının habercisi olmuştur.¹⁷ Penisilinin keşfinden beri mantarlar ve özellikle toprak bakterileri üzerine yapılan yoğun çalışmalar, mikroorganizmaların yapısal olarak eşsiz ve farmasötik olarak önemli biyoaktif maddeler için zengin bir kaynak olduğunu göstermektedir.¹⁸ Çünkü birçok antibiyotik, bakteriler (özellikle aktinomisetler), funguslar ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Antibakteriyel olan; daptomis, sefalosporin, streptomisin antifungal olan; amfoterisin B (**4**) ve griseofulvin antiviral olan; asiklovir antitümör olan; aktinomisin D, doksorubisin ve ayrıca antidiyabetik olan asarboz (**5**) gibi birçok sekonder metabolit tıpta çok önemli bir rol oynamaktadır.¹⁹

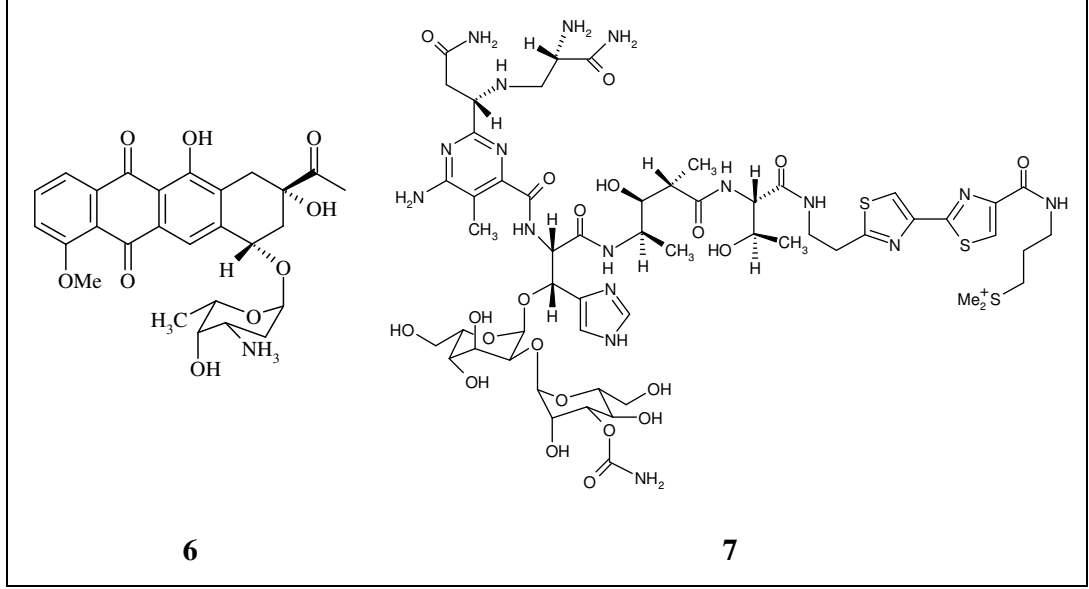


Çeşitli çalışmalar mikroorganizmalardan elde edilen sekonder metabolitlerin oldukça farklı yapılara sahip olduğunu göstermektedir. Mikroorganizma kaynaklı metabolitler bitki temelli metabolitlerle karşılaştırıldıklarında çok daha ilgi çekici biyoaktivite sergilemektedirler. Bitkilerdeki tekdüze alkaloidlerin yerine, mikroorganizmalar, kimyasal yapıları oldukça farklı sınıflara ait olan maddeleri üretirler. Bunlar; poliketidler (siklosporin A), terpenler, polisakkaritler (asarboz (5))¹⁰, polieter benzeri maddeler ve ayrıca indoller, peptidler, piroller, glikopeptitler gibi azot içerikli bileşikler şeklinde sıralanabilir.⁴

Son yıllarda hızlı bir şekilde antibiyotiklere dirençli türlerin ortaya çıkmasından dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi olarak tehdit etmektedir. Özellikle hastane enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecalis*'den *Staphylococcus aureus*'a kadar birçok patojenik bakterinin şu anda kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir.²⁰ Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) hastalardan izole edilen *Streptococcus pneumoniae*'ların % 34'ünün penisiline, *Haemophilus influenzae*'ların % 32'sinin ampisiline, *Moraxella catarrhais*'lerin ise % 92'sinin penisilin ve eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur.²¹ Bakteri enfeksiyonlarına ek olarak fungal enfeksiyonların (özellikle dermatoloji ile ilgili olanlar) ölüme sebebiyet veren en büyük faktör olduğu saptanmıştır.²² Pfaller ve Wenzel (1992), ABD'de kan kültürlerinden en fazla izole edilen üçüncü mikroorganizma türünün *Candida* türleri olduğunu belirlemişlerdir.²³ Bunun da ötesinde, immün baskılayıcı kemoterapi alan ve doku transferi yapılmış hastalarda; *Candida*, *Aspergillus* ve *Fusarium* enfeksiyonlarından ölüm oranı oldukça yüksektir. Antifungal ajanlar insan ve hayvan hastalıklarının yanısıra, bitki ve ekinlerin korunmasında, gıda endüstrisi ve ağaç işlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Enfekte olan ökaryot konak ile patojen mantar arasındaki biyokimyasal benzerlikten dolayı mevcutta kullanılan antifungal tedavinin toksisitesi bulunmaktadır ve fırsatçı fungusların sebep olduğu mikozisin artması yeni antifungal antibiyotiklerin keşfi için cesaret vermektedir.

Mikrobiyal sekonder metabolitler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin bir kaynağını teşkil ederler. Mikrobiyal fermantasyonla üretilen bu ürünler veya bunların kimyasal türevleri, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde, tarım ve çiftçilikte güncel olarak kullanılmaktadır.²⁴⁻²⁶ Literatürde (lit.) farklı habitatlardan izole edilmiş ve biyoaktif

bileşikleri test edilmiş yeni *Streptomyces* türleri ve bileşikleri ile ilgili oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. *Streptomyces peuceticus*'un ürettiği daunomisin (6) ve *Streptomyces verticillus*'un ürettiği bleomisin A₂ (7) antitümör etkileri olduğu bilinen biyoaktif bileşiklerdir. Bu çalışmalara gün geçtikçe yenileri eklenmektedir.



Aktinomisetler, on yıllardan beridir oldukça çeşitli antimikrobiyal metabolitlerin önemli bir kaynağı olmaya devam etmektedir. Ticari ve tıbbi açıdan kullanışlı doğal antimikrobiyal ajanların yaklaşık olarak üçte ikisinin aktinomisetlerden izole edildiği ve bu ajanların hemen hemen % 75'nin *Streptomyces* türleri tarafından üretildiği bildirilmiştir.^{27,28} Yeni antibiyotiklerin taranması doğrultusundaki çalışmalar, farklı toprak ve su örneklerinden yeni *Streptomyces* türlerinin izolasyonuna doğru yönelmektedir. Uygun izolasyon stratejileri benimsenmediği sürece yeni metabolitlerin izolasyon şansı düşüktür.^{29,30} Bu stratejiler arasında, endemik bitki köklerindeki topraklar gibi keşfedilmemiş bölgelerden seçici kültür ortamları kullanılarak izolasyon yapılması önemli bir yer tutmaktadır.³¹ Özellikle rizosfer topraklarının antibakteriyel aktiviteye sahip olan aktinomisetler açısından zengin bir kaynak olduğu gösterilmiştir.³²

Streptomyces cinsinin en önemli özelliği geniş varyetede sekonder metabolit üretebilme yeteneğidir.³³ Bu sekonder metabolitler, antimikrobiyal kullanımlarına ek olarak, immün baskılayıcılar (rapamisin, ascomisin), antikanser (daunomisin (6), bleomisin (7), daktinomisin, doksorubisin, staurosporin) ve antifungal (amfoterisin B

(4), nistatin) ajanlar, herbisid (fosfinothrisin) ve antihelmintik (avermektin, milbemisin) olarak ve aynı zamanda diyabet tedavisinde (asarboz (5)) kullanılmaktadır. Antimikrobiyallerin dünya marketlerindeki yıllık pazarı 25 milyar dolardan daha fazladır ve yıllık % 5 oranında artış gösterdiği tahmin edilmektedir.² *Streptomyces coelicolor* ve *Streptomyces avermitilis*'in genom projelerinin tamamlanması, bu türlerin genomlarında sekonder metabolitlerin biyosentetik genlerini taşıyan büyük gen kümelerinin bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu gen kümelerinin içerisinde daha önceden tanımlanmış sekonder metabolitlerin biyosentetik genlerinin yanı sıra, henüz doğada keşfedilmemiş ve tanımlanamayan ürünler için de genler mevcuttur.^{34,35} Bir matematiksel modellemeye göre de *Streptomyces* türleri tarafından sentezlenen tüm antibakteriyel ajanların şimdiye kadar yalnızca % 3'ü rapor edilmiştir.³⁶ Bu da yeni teknolojiler kullanılarak keşfedilecek çok büyük miktarda muhtemel yeni ilaçların olduğunu düşündürmektedir.

Streptomyces türlerinin uzun süreden beri biyoaktif bileşikler açısından yoğun olarak taranmış olmasına rağmen, bu cinse ait nadir türlerin keşfedilmemiş metabolik ürünler içerdiği tahmin edilmektedir.³⁷ Farklı habitatlardan yeni *Streptomyces* türlerinin ve doğal biyoaktif bileşiklerinin taranması gibi stratejiler lokal türlerin genetik potansiyellerini ortaya çıkarmak açısından önem arz etmektedir.

Son yıllarda aktinomisetler ve özellikle *Streptomyces* cinsine dahil üyelerinin; izolasyonu, karakterizasyonu, antimikrobiyal ve antitümör etki gösteren biyoaktif bileşiklerinin keşfi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Farklı habitatlardan gerek yeni türlerin gerekse lokal izolatların izolasyonu yaklaşımını hedef alan çalışmalarda, yeni antimikrobiyal ve antitümör ajanlar elde edilmiş olup her geçen gün bulunan yeni bileşik sayısı artmaktadır. Ticari ve medikal açıdan faydalı olabilecek yeni bileşiklerin keşfedilmesine yönelik araştırmalar, yeni *Streptomyces* türlerinin izolasyonuna doğru yönelmektedir. Bu amaç doğrultusunda, endemik bitki köklerindeki topraklar gibi keşfedilmemiş bölgelerden izolasyon yapılması, yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için önemli bir stratejidir.

Ülkemiz pek çok endemik bitki türünü de kapsayan zengin bir vejetasyona sahiptir. Bundan dolayı, endemik bitkilerin rizosfer topraklarından antimikrobiyal biyoaktif sekonder metabolit üretme kapasitesine sahip *Streptomyces* türlerinin izolasyonu, yeni metabolitlerin ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. ANTİBİYOTİKLERİN TARİHSEL GELİŞİMİ

Antibiyotikler, doğal kaynaklardan izole edilen düşük molekül ağırlıklı (<2000 Dalton) sekonder metabolitler ve bu metabolitlerin kimyasal veya biyosentez yoluyla üretilen türevleri olarak tanımlanmaktadır. Bu maddeler düşük konsantrasyonlarda, tümör hücreleri gibi yüksek yapılı organizmaların gelişimi ile bakteri, mantar ve virüs gibi patojenler üzerinde inhibisyon etkisi göstermesinden dolayı bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.^{38,39} Doğal ürünlerin tamamı antibiyotik olarak kullanılamaz. İzole edilen doğal ürünlerin birçoğunun görevi hala tam olarak bilinmemekle birlikte pek çoğu mikroorganizmalar arasında sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır. En çok çalışılan bakteriyel hücre içi öncü maddelerden biri olan A-faktör (γ -butirolakton), *Streptomyces griseus*'da streptomisin üretimini uyarmasının yanısıra ayrıca pigmentlerin ve miselyumların oluşumundan da sorumludur.⁴⁰

Primer ve sekonder metabolizma arasında ayırım yapmak kolaydır. Primer metabolitler, yaşam sürecinde önemli olan Krebs döngüsündeki karboksilli asitler, α -amino asitler, karbonhidratlar, yağlar, proteinler ve nükleik asitler gibi geniş bir aralıktaki maddelerden oluşmaktadır. Sekonder metabolitler temelde yaşam için gerekli olmayan fakat kesinlikle yaşamın sürdürülmesinde katkısı olan ve genellikle belirli biyolojik gruplar için karakteristik ürünlerdir.⁴¹

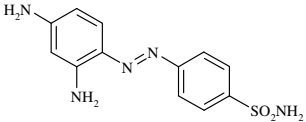
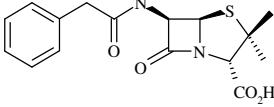
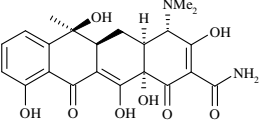
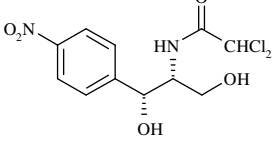
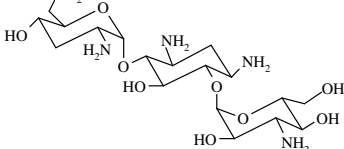
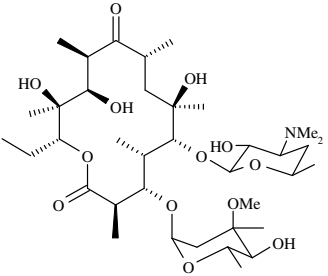
Penicillium notatum ile katı besiyeri üzerindeki *Staphylococcus* sp.'nin kontaminasyonunun ardından *Staphylococcus* sp.'nin kuvvetli inhibisyonu ile oluşan meşhur kaza Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesine yol açmıştır.⁴² Penisilin, insanlar için bulaşıcı özellik gösteren birçok hastalığa yol açan iki Gram-pozitif bakteri, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*'a karşı inhibitör etki göstermektedir. Penisilin tıpta kullanımı ile ilgili öncü çalışmalarından dolayı 1945 yılında Fleming, Chain ve Florey'e tıp alanında Nobel ödülü verilmiştir.^{43,44} O tarihten beri mantarlar, diğer bakteriler ve aktinomisetler gibi değişik mikroorganizmalardan pek çok antibiyotik izole edilmiştir.

Bütün sanayileşmiş toplumlarda tıbbi ihtiyaçları karşılayabilme becerisi ilaç endüstrisinin gelişmişliği ile paralellik gösterir. Yaşamı tehdit eden bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilen ticari antibiyotikler tedavide oldukça büyük öneme sahiptirler. Geçtiğimiz yüzyılda antibakteriyel ajanların araştırılması ve

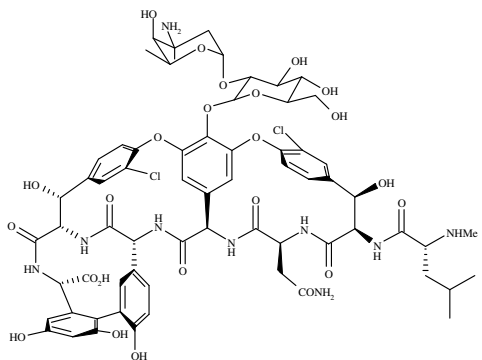
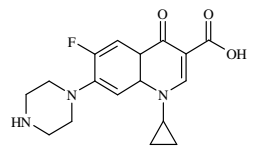
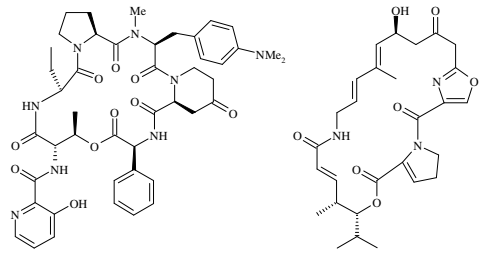
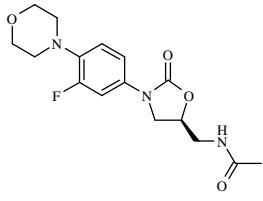
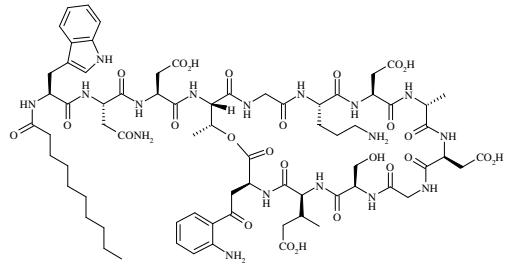
geliştirilmesinde önemli başarılar sağlanmıştır. 1935 ve 1940'lı yıllarda ilk olarak sülfonamidlerin (prontosil (**8**)) ve penisilinlerin (penisilin G (**9**)) piyasaya sürülmelerinden beri bakteriyel enfeksiyonlara bağlı ölüm oranlarında ciddi bir azalma olduğu tespit edilmiştir.⁴⁵

Antibakteriyel ajanların birçoğu Tablo 2.1'de görüldüğü gibi doğal ürünler veya bunların yarı-sentetik türevleridir.⁴⁶

Tablo 2.1. Yıllara göre tedavide kullanılan yeni antibakteriyel ilaç sınıflarının özeti.⁴⁶

| Yıl | Grup | Hedef | Örnek | Yapı |
|------|--------------------------|---------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1935 | Sülfonamidler (Sentetik) | Folat Metabolizması | Prontosil |  <p style="text-align: center;">8</p> |
| 1940 | β -Laktamlar | Hücre Duvarı | Penisilin G |  <p style="text-align: center;">9</p> |
| 1949 | Poliketitler | Protein Biyosentezi | Tetrasiklin |  <p style="text-align: center;">10</p> |
| 1949 | Fenilpropanoidler | Protein Biyosentezi | Kloramfenikol |  <p style="text-align: center;">11</p> |
| 1950 | Aminoglikozidler | Protein Biyosentezi | Tobramisin |  <p style="text-align: center;">12</p> |
| 1952 | Makrolidler | Protein Biyosentezi | Eritromisin A |  <p style="text-align: center;">13</p> |

Tablo 2.1. Yıllara göre tedavide kullanılan yeni antibakteriyel ilaç sınıflarının özeti (devamı).

| Yıl | Grup | Hedef | Örnek | Yapı |
|------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1958 | Glikopeptitler | Hücre Duvarı | Vankomisin |  <p style="text-align: center;">14</p> |
| 1962 | Kinolonlar (Sentetik) | DNA Replikasyonu | Siprofloksasin |  <p style="text-align: center;">15</p> |
| 1962 | Streptograminler | Protein Biyosentezi | Pristinamisin (I _A + II _A) |  <p style="text-align: center;">16 17</p> |
| ... | | | | |
| 2000 | Oksazolidinonlar (Sentetik) | Protein Biyosentezi | Linezolid |  <p style="text-align: center;">18</p> |
| 2003 | Lipopeptitler | Bakteriyel Membran | Daptomisin |  <p style="text-align: center;">19</p> |

1970'lerin başından itibaren mevcut terapiler yeterli görülmele birlikte yeni antibiyotiklere olan ihtiyaç da sorgulanmaya başlanmıştır.⁴⁵ Birkaç onyıllık aradan sonra oksazolidinonlar (linezolid **(18)**)⁴⁷ lipopeptitler (daptomisin **(19)**)⁴⁸ gibi ilk ve gerçek kimyasal gruplar geliştirilmeye başlanmıştır.

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları dünya çapında ölümlerin ikincil ana nedenidir ve gelişmiş ülkelerde ise üçüncü sırada yer almaktadır.⁴⁹ ABD'de, bakteriler, enfeksiyona bağlı ölümlerin en yaygın etkenidir.⁵⁰ Antibiyotiklerin her vakada etkili olmasıyla birlikte belli mikroorganizmalar için tedavi seçeneklerinin oluşturulmaya başlanması hedeflenmiştir.⁵¹ Son geliştirilen ilaçlar artık tedavide ilk seçenek olarak kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı hastanelerde dirençli mikroorganizmaların gelişmesi ve hızlı bir biçimde yayılmasıyla saat başa dönmüştür.⁵² Böylece özellikle patojenlerin bir veya birden fazla antibiyotiğe karşı direnç geliştirme yetenekleri oluşmuş ve bu patojenler tüm dünyaya yayılmıştır.⁵³ Bu beklenmedik direnç gelişimi antibiyotik kullanımının sonucu oluşmuş ve her antibiyotiğin yaşam süresini ve etkinliğini kısıtlamıştır. Doğru antibiyotik kullanımı direnci azaltmakla birlikte, bu durumu tam olarak önleyemeyecektir. Bu problem ancak yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesiyle çözüme kavuşturulabilecektir.⁴⁶ Sonuç itibariyle birçok ilaç firması antibakteriyel alanlarda yeni antibiyotiklerin üretimi için hızlı bir biçimde çalışmaktadır.

Doğal ürünlerin çoğu ilaç kimyası için oldukça iyi birer başlangıç noktasıdır. Şimdiye kadar, sadece penisilin G **(9)**, tetrasiklin **(10)**, eritromisin A **(13)** vankomisin **(14)** ve daptomisin **(19)** gibi birkaç saf doğal ürün tıbbi olarak kullanılabilir özelliklere sahip ilaç olarak tedavi aşamasında çok önemli rol oynamaktadır. Siprofloksasin **(15)** ve linezolid **(18)** ise izole edilen doğal ürünler örnek alınarak geliştirilmiş sentetik ilaçlardır.^{54,55}

Mikroorganizmalardan son 60 yılda yaklaşık olarak 35.000 doğal ürün elde edilmiştir. Bu bileşiklerden 10.000'den fazlası biyolojik olarak aktiftir, 8.000'den fazlası ise antibiyotik ve antitümör ajan özelliğindedir.^{18,56-58} Günümüzde 100'ün üzerinde mikrobiyal ürün, klinik olarak antibiyotik, antitümör ilaç ve zirai kimyasal olarak kullanılmaktadır.

2.2. YENİ ANTİBİYOTİK KAYNAKLARININ ARAŞTIRILMASI

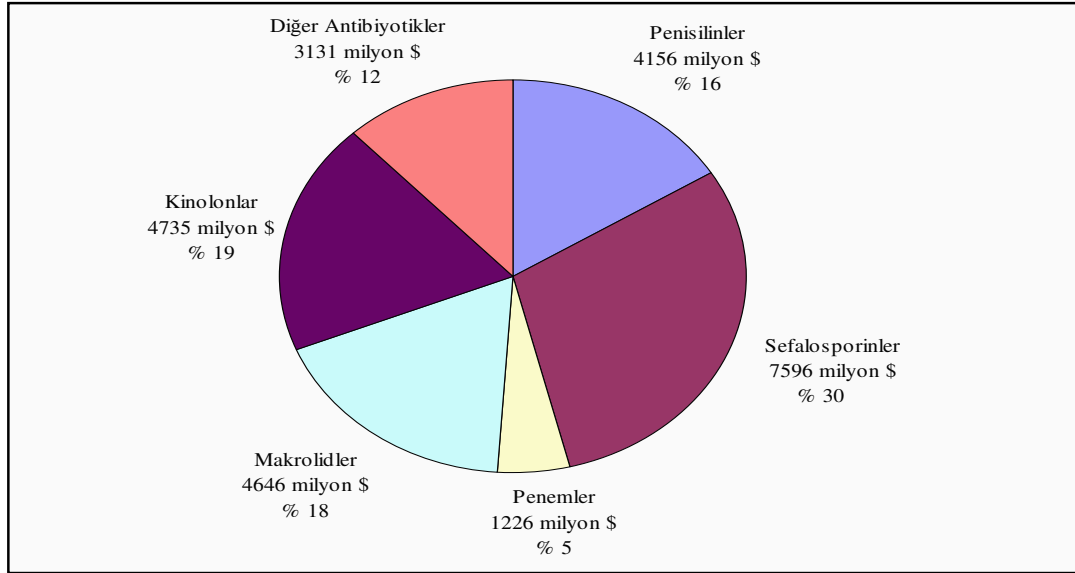
Antibiyotikler, mikroorganizmaların bir metabolitini veya herhangi bir sentez yolunu engeller, DNA sentezini bloke edebilir veya seçilmiş enzimlerin transkripsiyonunu yada diğer hücre fonksiyonlarını baskılayabilir. Antibiyotiklerin ilk keşfedildikleri yıllarda tüm hastalıkların üstesinden gelineceği düşünülmekteydi. Bununla birlikte aynı antibiyotiğin uzun süre kullanımı ile daha fazla etki göstermediği ve böylece bulaşıcı mikroorganizmanın mutasyon ile kendini modifiye ettiği anlaşıldı.⁴⁶

Antibiyotik varlığında mikrobiyal popülasyon üzerinde oluşan evrimsel baskı sonucu dirençli mikroorganizmalar gelişebilmektedir.⁵⁹ Bakteriler, antibakteriyel ilacın enzimatik deaktivasyonu,⁶⁰ hedef proteinin değiştirilmesi⁶¹ ve antibiyotiğin hücre içine girişinin sınırlandırılması⁶² şeklindeki birçok mekanizmayla antibiyotiklerin öldürücü etkilerini sınırlandırabilir.⁶³ Yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal enfeksiyonlar Gram-pozitif bakteriler arasındaki direnç gelişiminin başlıca nedeni olarak görülmektedir.⁶⁴ Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA),⁶⁵ vankomisine dirençli enterokoklar (VRE)⁶⁶ penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)^{67,68} gibi Gram-pozitif bakteriler en göze çarpan direnç geliştirmiş patojenler olarak sıralanabilir. Metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)⁶⁹ vakaları hızlı bir biçimde artış göstermektedir. Tablo 2.2’de 2004 yılında ABD’de hastane kaynaklı antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç gelişme oranları görülmektedir.^{46,70}

Tablo 2.2. 2004 yılında ABD’de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda bakteri dirençliliğinin yaygınlık oranı.⁷⁰

| Antibiyotik | Patojen | Direnç [%] |
|--------------------------|-----------------------------|------------|
| Metisilin | <i>S. aureus</i> | 59,5 |
| | Koagülaz-Negatif Stafilokok | 89,1 |
| Vankomisin | Enterokok | 28,5 |
| 3. Kuşak Sefalosporinler | <i>Enterobacter spp.</i> | 31,1 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 31,9 |
| | <i>E. coli</i> | 5,8 |
| İmipenem | <i>K. pneumoniae</i> | 20,6 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 21,1 |
| Kinolonlar | <i>P. aeruginosa</i> | 29,5 |

Bulaşıcı hastalıklar ve kullanılan ilaçlara karşı görülen direnç durumları, her yıl 17 milyon yaşama mal olmaktadır.⁷¹ Özellikle hastane ortamlarından kaynaklanan çoklu ilaç direnci (MDR “Multi Drug Resistant”)⁷² dünya çapında yaygınlık gösterirken, başarısız tedavi sayısında artış buna paralel olarak da yüksek tedavi maliyeti meydana gelmektedir. Genellikle antibiyotiklerin gereksiz kullanımı, yetersiz hijyen koşulları, yaşlanma oranındaki artış ve teşhis yetersizliği bakteriyel direnci ve bunun sonucu olarak da ekonomik maliyeti artırmaktadır.⁷³ Antibiyotik satışları dünya ilaç pazarında oldukça önemli bir yere sahiptir. Şekil 2.1’de temel antibiyotik sınıflarının 2004 yılında dünya piyasasındaki satış oranları ve maliyetleri görülmektedir.⁷⁴



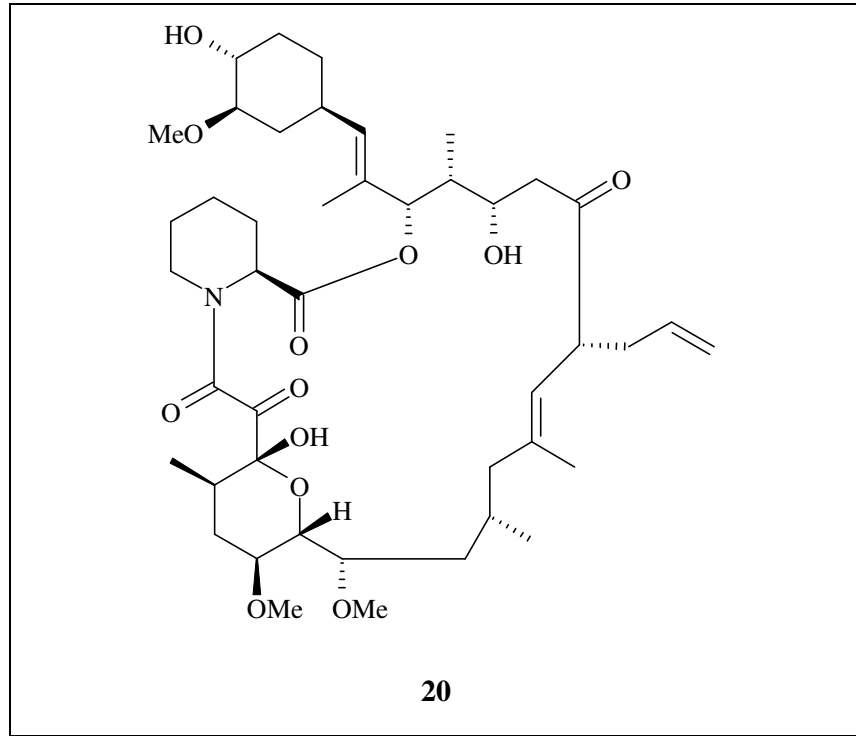
Şekil 2.1. 2004 yılında temel antibiyotik sınıflarının dünya piyasasındaki satış oranları.

Ticari olarak piyasada yüksek satış oranlarına sahip antibiyotiklere yanıt alınamayan vakalarda vankomisin (14) ve linezolid (18) gibi son geliştirilen antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır.⁷⁵ Vankomisin (14), bakterilerin hücre duvarının oluşumundan sorumlu enzimlere kuvvetli bağlanma eğilimi gösterir ve MDR gösteren patojen bakterilere karşı savunma ajanı olarak kullanılmaktadır. Fakat bazı *Staphylococcus aureus* suşlarının (VRSA)⁷⁶ aminoglikopeptit olan vankomisin (14)’e karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, yeni ilaçların keşfinde, sentetik yaklaşımlara ilave olarak yeni antibiyotik kaynaklarının araştırılması ve özellikle biyolojik olarak aktif mikrobiyal ürünler üzerine odaklanan uluslararası çalışmaların

yanı sıra yeni doğal kaynakların keşfi için de dünya çapında araştırmalar devam etmektedir.⁷⁷

Sentetik bir ilaç olan linezolid (**18**), vankomisin (**14**) yerine kullanılmaktadır. Bu ilaç, bakteriyel ribozomların 30S-alt ünitesi üzerine etki ederek aktiflik göstermektedir. Linezolid (**18**) bakteriyel protein sentetaz enziminin fonksiyonel başlatıcı kompleksinin oluşumunu bloke etmektedir.⁷⁸

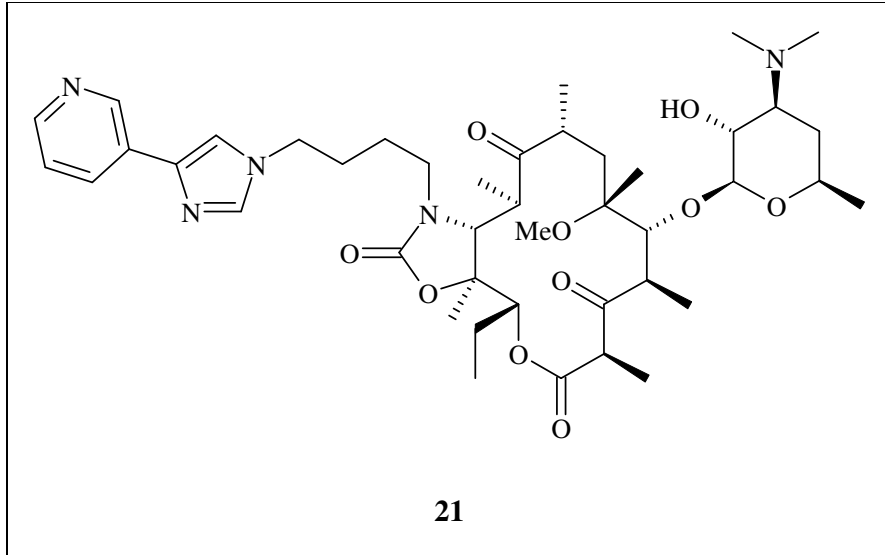
1983'den beri immünosupresan ajan olarak kullanılan siklosporin A, organ nakillerini kolaylaştırmaktadır.⁷⁹ Bu tarihten dört yıl sonra, Japon Fujisawa şirketi yeni bir immünosupresan ajan olan FK506'yı (**20**) izole etmiştir. Bu madde *Streptomyces tsukubaensis*'in kültür ortamında T-hücrelerinden interlökin-2 salınım inhibitörlerinin etkisinin taranması sırasında keşfedildi.⁸⁰ Yüz kat daha fazla aktif olan bu yapı siklosporin A'nın yerini almıştır.



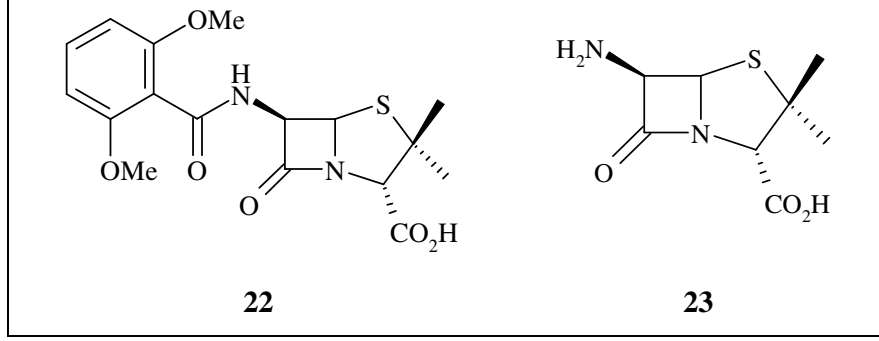
Biyotransformasyon teknikleriyle doğal ürünlerin yeni biyoaktif türevleri elde edilebilir. Bilinen bileşiklerin yeni türevleri; esterifikasyon, indirgenme, yükseltgenme, demetilasyon veya canlı organizmaların enzimlerinin kullanıldığı glikolizasyon gibi metodlardan faydalanılarak sentezlenebilir.⁴⁶ Fakat bu işlemler pek çok basamak

gerektiren kimyasal reaksiyonlar üzerinden gerçekleştiği için zaman alıcıdır ve bir çok kimyasal kullanılmasından dolayı ekonomik olarak maliyetli ve yan ürün oluşmasından dolayı düşük verimle gerçekleşmektedir.

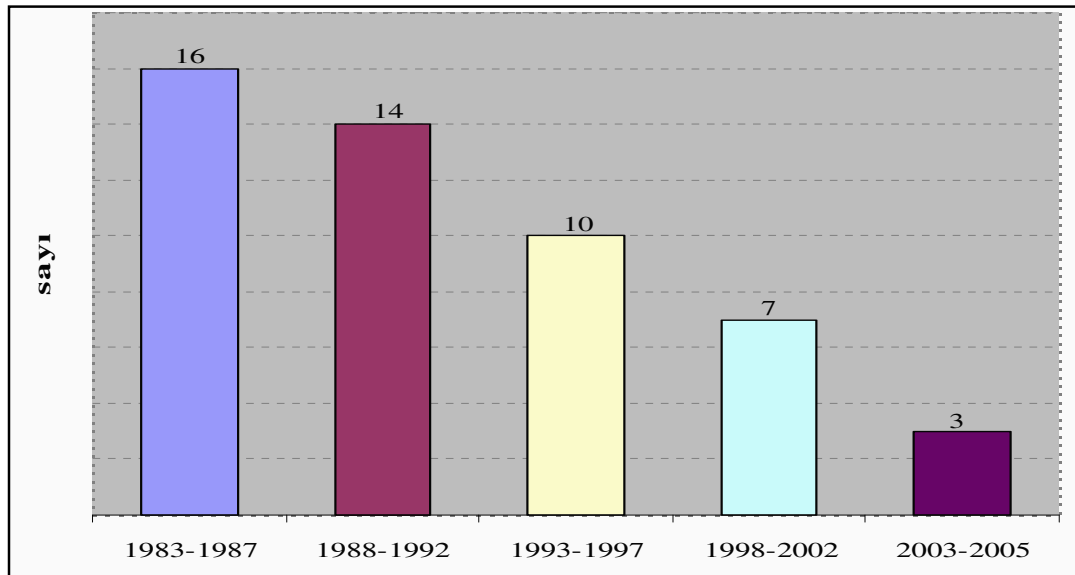
Klasik kimyasal sentez veya yarı-sentezler reseptör ve protein çalışmalarındaki gelişmelere bağlı olarak, kimya ve ilaç dizaynı yaklaşımlarıyla farklı moleküler yapılar elde edilebilmektedir. Bazı antibiyotiklerin farmakolojik özelliklerinin optimize edilebilmesi için doğal ürünlerin bilinen yapılarının yeniden modifiye edilmesi gerekmektedir. Örneğin 1952’de *Streptomyces erythreus*’dan⁸¹ izole edilen makrolid grubu bir antibiyotik olan eritromisin A (**13**)’daki deoksihekzos şekeri (cladinose) yerine 3-keto alt ünitesinin geçmiş olduğu ketolid türevi telitromisin (**21**) yarı sentetik bir ilaçtır.⁸² Telitromisin (**21**)’in MIC değeri makrolidlerden 10-40 kat daha düşüktür.⁸³ Ketolidler, makrolid ve diğer antibiyotiklere karşı direnç gösteren *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* gibi Gram-pozitif veya Gram-negatif koklara karşı çok iyi inhibisyon etkisine sahip yeni bir antibiyotik sınıfını oluştururlar.^{84,85} Telitromisin (**21**) 2001 yılından beri yeni bir antibiyotik olarak Almanya’da kullanılmaktadır.



Doğal ürünlerden elde edilen antibiyotiklerin ilk sınıfını oluşturan β -laktamların bir türevi olan metisilin (**22**), 6-aminopenisilanik asit (**23**)’ten (6-APA)⁸⁶ yarı-sentetik olarak üretilen bir antibiyotiktir. Kimyasal modifikasyon yoluyla elde edilen metilsilin (**22**)’nin dayanıklılığı doğal penisilin G (**9**)’ye nazaran çok daha fazladır.



Doğal ürün çalışmaları zaman alıcı ve pahalı işlemler olmasına rağmen, ilaç firmaları için ciddi kazançlar elde ettikleri bir alan olması ve aynı zamanda insanoğlunun sağlıklı bir yaşam sürmesi için gerekli materyallerin potansiyel kaynağını oluşturması bakımından önemli bir yere sahiptir. Bu sebepten dolayı yeni ilaçların keşfi ve dizaynı üzerine çalışmalar oldukça yoğun bir biçimde devam etmektedir. Şekil 2.2’de ABD’de 1983-2005 yıllarında piyasaya çıkan yeni antibakteriyel ajanların yıllara göre dağılımları görülmektedir.^{49,87} Cragg ve arkadaşları bir çalışmalarında 1983 ve 1994 yılları arasında insanlığın kullanımına sunulan yeni antibiyotik ve antikanser ilaçlarının % 60’ından fazlasının doğal ürünlerden veya bunların türevlerinden hazırlandığını göstermişlerdir.⁸⁸ En çok satılan 30 ilaçtan 9’u doğal üründür.⁸⁹ Antibiyotik pazarının dünya çapında yıllık 25 milyar \$ civarında olduğu ve her yıl yaklaşık olarak % 5 oranında artış gösterdiği tahmin edilmektedir.²



Şekil 2.2. ABD’de kullanılan yeni antibakteriyel ajanların yıllara göre dağılımı.

Son yıllarda kimyacılar, ilgi çekici biyolojik ve farmasötik özelliklere sahip yeni metabolitlerin izolasyonu için alternatif bir kaynak olarak potansiyel su altı mikroorganizmalarına yönelmektedir.^{90,91} Bakteriyel kaynaklı metabolitlerin çoğu aktinomisetler olarak adlandırılan Gram-pozitif toprak bakterilerinden izole edilmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalar, mikroorganizmalardan elde edilen sekonder metabolitlerin yapısal olarak oldukça farklı çeşitlilik sergilediğini ve bitki kaynaklı sekonder metabolitler ile karşılaştırıldıklarında çok ilginç biyoaktiviteler gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bitkilerden elde edilen tekdüze alkaloidlerin yerine mikroorganizmalar; poliketitler (FK506 (**20**)), terpenler, polisakkaritler, polieterler ve azot içeren bileşikler (indoller, peptitler, piroller, glikopeptitler) gibi farklı kimyasal sınıflara ait birçok bileşik üretirler.⁹²

Şu ana kadar mikroorganizmalardan 34.400'den fazla sekonder metabolit izole edilmiştir.⁹³ Bitki ve hayvanlardan izole edilen doğal ürünlerin sayısı bu sayının beş katından daha fazladır. Bununla birlikte bu yapılar çoğunlukla peptitler, terpenler, steroidler ve flavonoidler ile sınırlıdır.⁹⁴

Yeryüzünün % 70'inden ve yer kabuğunun hacminin % 90'ından fazlası okyanuslardan oluşmaktadır. Mikrobiyolojik olarak, okyanuslar büyük boyutlarda ve olağan dışı sıcaklık, basınç ve tuzluluk şartlarında oldukça zengin yaşam çeşitliliği göstermektedir. Bu sıra dışı koşullara mikroorganizmaların uyum sağlama stratejisi, karada yaşayan mikroorganizmaların ürettiği bileşikden farklı yeni doğal ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Karboimit diklorür fonksiyonlitesi ($-N=CCl_2$) ve sulfamat (OSO_2-NHR) grubu sadece su altı doğal ürünlerinde bulunmaktadır.⁹⁵

Bununla birlikte, okyanusların mikrobiyal çeşitliliği hala tam olarak anlaşılammıştır. Su altı bakterilerinin ve mantarların % 5'inden daha azının bilindiği tahmin edilmektedir. Buna paralel olarak, su altı bakterilerinin doğal ürünleri üzerine yapılan çalışmalar, aktinomisetler veya mantarlar üzerine yapılan çalışmalara göre nispeten daha azdır. Okami,⁹⁶ mikroorganizmalardan elde edilen kimyasal bileşikler ile ilgili problemleri ve potansiyelleri belirlemiş, ayrıca Fenical¹⁸ ise bilinen 50'ye yakın kimyasal ile ilgili detayları özetlemiştir.

Su altı bakterilerinin, süngerlerden izole edilen bileşiklerde olduğu gibi karada yaşayan bakterilerden farklı bileşikler üretebileceği tahmin edilmektedir. Su altı

mikroorganizmalarının çoğu metaboliti özellikle de *Streptomyces* olmak üzere karasal orjinli olan türler ile çok büyük benzerlikler göstermiş olmaları dolayısıyla bu mikroorganizmanın gerçekte su altı mikroorganizması olup olmadığına karar vermek kolay değildir. Bu da bir su altı mikroorganizmasının tanımlanmasındaki temel zorluklardan birini oluşturmaktadır. Son zamanlarda, su altı mikrobiyal Pikoplankton'ların, henüz izole edilip kimyasal yapıları araştırılmamış çok miktarda nadir tür içerdiği belirlenmiştir.^{97,98} Gerçek su altı bakterilerinin ve ilgili kaynakların bu şekilde bulunabileceği umulmaktadır. Fenical, yeni tanımladığı *Salinospora* cinsinin sadece denizlerde bulunan nadir bir aktinomiset olduğunu ortaya koymuştur.⁹⁹ Detaylar bilinmediğine göre, su altı bakteriyel izolatların, su altı bakterileri yerine su altı kaynaklı bakteriler olarak isimlendirilmesi pratik nedenler ile tavsiye edilmektedir.

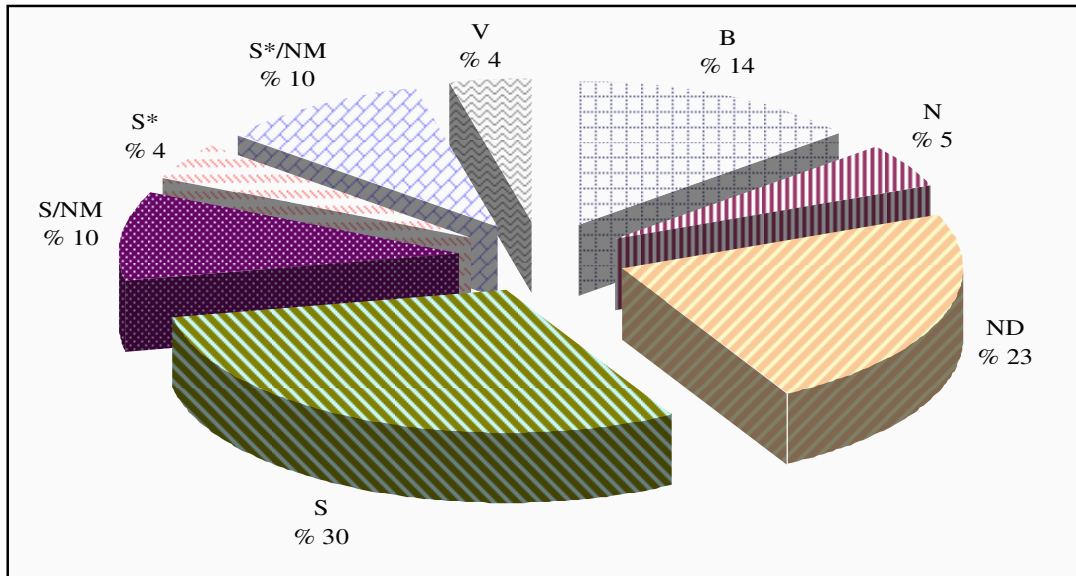
Yeni doğal ürünlerin keşfedilmesinde kaynak olarak mikroorganizmaların kullanılmasının büyük avantajları vardır. Temelde bir bakteri hücresi, bakterilerin üretilmesi için yeterlidir ve fermentasyon, mevsim ve iklimden bağımsız olarak gerçekleştirilebilir. Bir diğer avantajı da “öncül yönelimli biyosentez” (precursor-directed biosynthesis) olarak bilinen ve uygun ara ürünler ile besleyerek kolayca bilinen suşlardan yeni metabolitler izole edilebilir. Zeeck ve çalışma grubu besi ortamını (besin kaynakları), havalandırma koşulları, pH, ışık, inkübasyon süresi veya sıcaklık, gibi kültür ortamının koşulları değiştirilerek “bir suştan pek çok bileşiğin” (OSMAC “One Strain MAny Compounds”) izole edilebileceğini göstermişlerdir.¹⁰⁰ Örneğin *Streptomyces griseoviridus* Tü 3634 suşu'nun farklı besiyeri ortamlarında değişik açıl ve fenil α -L-ramnopiranozidler üretmiş olduğu gösterilmiştir.¹⁰¹

1988 yılında klinik vakalarda VRE ve çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli tıbbi vakaların görünme sıklığı ihmal edilebilir düzeylerin üzerine çıkmıştır. Alzheimer, MS ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi hastalıklar şu ana kadar yeterli biçimde tedavi edilememiştir ve bu tür vakalarda artış eğilimi görülmektedir. HIV gibi yeni patojenler ise dünya çapında çok hızlı bir yayılma göstermektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere yeni biyoaktif doğal ürünlerin ve yeni kaynakların araştırılması sürecinde, tıbbi ilaç keşfine öncülük etmesi açısından kimyacılar, mikrobiyologlar, biyokimyacılar ve farmakologlara önemli ve acil görevler düşmektedir.¹⁰²

2.3. DOĞAL ÜRÜNLERİN FARMAKOLOJİK ÖNEMİ

Daha önce verdiğimiz örneklerden de anlaşılacağı gibi doğal ürünler farmakolojik olarak oldukça büyük öneme sahiptir. Newman ve Cragg tarafından yapılan bir araştırmada, 1981–2006 yılları arasında 25 yılı aşkın bir zaman diliminde piyasaya sürülen 1184 yeni farmakolojik ajandan sadece % 30'luk bir dilimin pür kimyasal sentez yoluyla elde edilen ilaç olmasına karşın % 70'lik dilimin ise doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler veya bu bileşiklerden yola çıkılarak elde edilen türevlerden oluştuğunu ortaya koymuşlardır.¹⁰³

Bu çalışmada yer alan farmakolojik maddeler Şekil 2.3'te görüldüğü gibi şu şekilde gruplandırılmıştır; “**B**” biyolojik olarak herhangi bir hücre kültüründen/organizmadan direk veya biyoteknolojik olarak izole edilmiş 45'den daha fazla amino asit kalıntısına sahip peptit veya proteinler, “**N**” direk izole edildiği şekliyle kullanılan doğal ürünler, “**ND**” doğal ürünlerin türevi veya yarı sentetik modifikasyonla elde edilen bileşikler, “**S**” tamamiyle sentetik olarak elde edilmiş bir ilaç (sıklıkla var olan bir ajanın modifikasyonu veya rastgele tarama sırasında bulunan ilaçlar), “**S***” sentetik olarak üretilen fakat farmakofor olarak bir doğal ürün temel alınarak geliştirilen ilaçlar, “**V**” aşular ve “**NM**” Doğal ürün etkisini taklit eden ürünler (“Natural product mimic”) şeklinde kodlanmıştır.

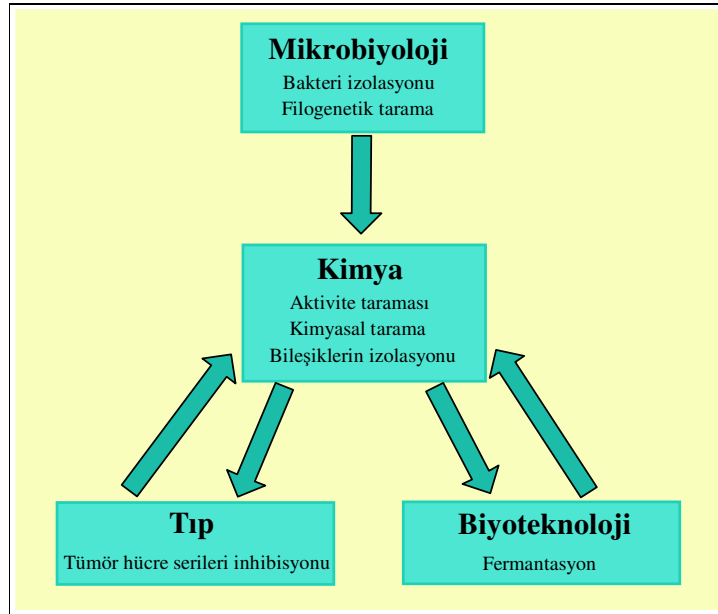


Şekil 2.3. Ocak–1981 ile Haziran–2006 yılları arasında piyasaya çıkan farmakolojik öneme sahip doğal ürünlerin oranı.¹⁰³

2.4. DOĞAL ÜRÜNLERİN ARAŞTIRILMASINDA BAŞARI İÇİN ANAHTAR FAKTÖRLER

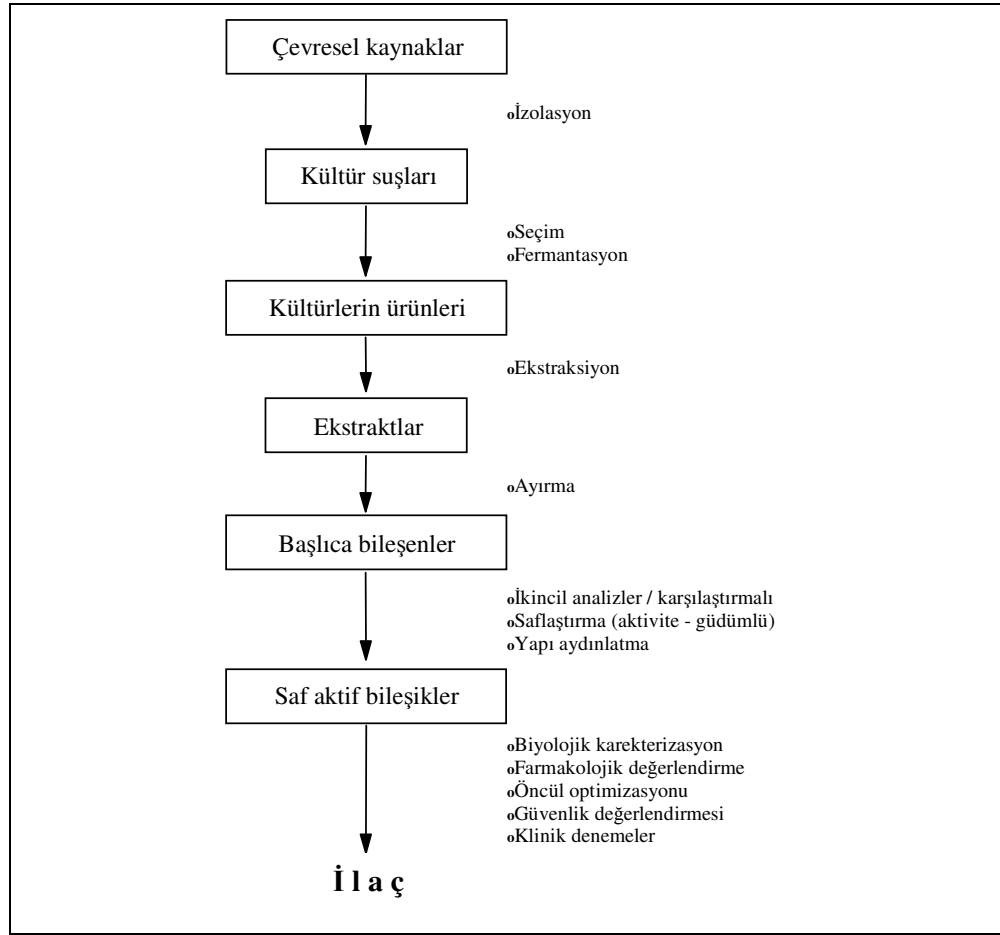
Doğal kaynaklardan biyolojik aktiviteye sahip yeni bileşiklerin elde edilmesi için yapılan araştırmalar, hastalıkların tedavisinde oldukça büyük bir rol oynayan klinik olarak kullanışlı ilaçların pek çoğunun keşfine öncülük etmektedir. Yapılan pek çok araştırma, doğal ürünlerin oldukça farklı kimyasal yapılaraya sahip olma potansiyellerinden dolayı yeni ilaçların keşfedilmesi ve geliştirilmesi üzerinde oldukça önemli etkiye sahip olduğunu göstermiştir.^{77,88}

Bu işlemlerin gerçekleştirilmesi sırasında bakterilerin izolasyonu ve teşhisi için mikrobiyoloji, üretim koşullarının geliştirilmesi için biyoteknoloji, tümör hücrelerine karşı aktivitelerinin incelenmesi için tıp ve bileşiklerin taranması, izolasyonu ve yapıların aydınlatılması için kimya alanında çalışmaların yapılması gerekmektedir. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi bu işlemler dizinin gerçekleştirilebilmesi, disiplinler arası işbirliğini şart koşmaktadır.



Şekil 2.4. Biyoaktif bileşikleri üreten mikroorganizmaların metabolik kapasitelerinin ortaya çıkarılması için işbirliği yaklaşımı.

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi, mikrobiyal kaynaklı doğal ürünlerden yeni biyoaktif metabolitin keşfindeki başarı, istenilen metabolitin üretimini artırmak için uygun koşullar altında mikroorganizmanın üretilmesini gerektirir. Bu metabolitler ekstrakte edilip, test edildikten sonraki aşamalarda, bileşik orijinal karışımdan izole edilmek ve tanımlanmak zorundadır. Bu işlemler sırasında uygulanan bütün stratejiler, basamaklardaki karşılaşılabilecek problemlerin nasıl çözülebileceği, verimin nasıl artırılacağı ve başka yöntemlerde olduğu gibi olası potansiyel sorunların nasıl çözüme kavuşturulabileceği, yoğun çalışma gerektiren bir işlemler dizisidir.¹⁰⁴



Şekil 2.5. Mikrobiyal kaynaklı doğal ürünlerden ilaç keşfi için araştırma yöntemleri.

Literatürde farklı habitatlardan izole edilmiş ve biyoaktif bileşikleri test edilmiş yeni *Streptomyces* türleri ve bileşikleri ile ilgili oldukça fazla çalışma bulunmaktadır.

2.5. MİKROORGANİZMALARDA SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİMİ

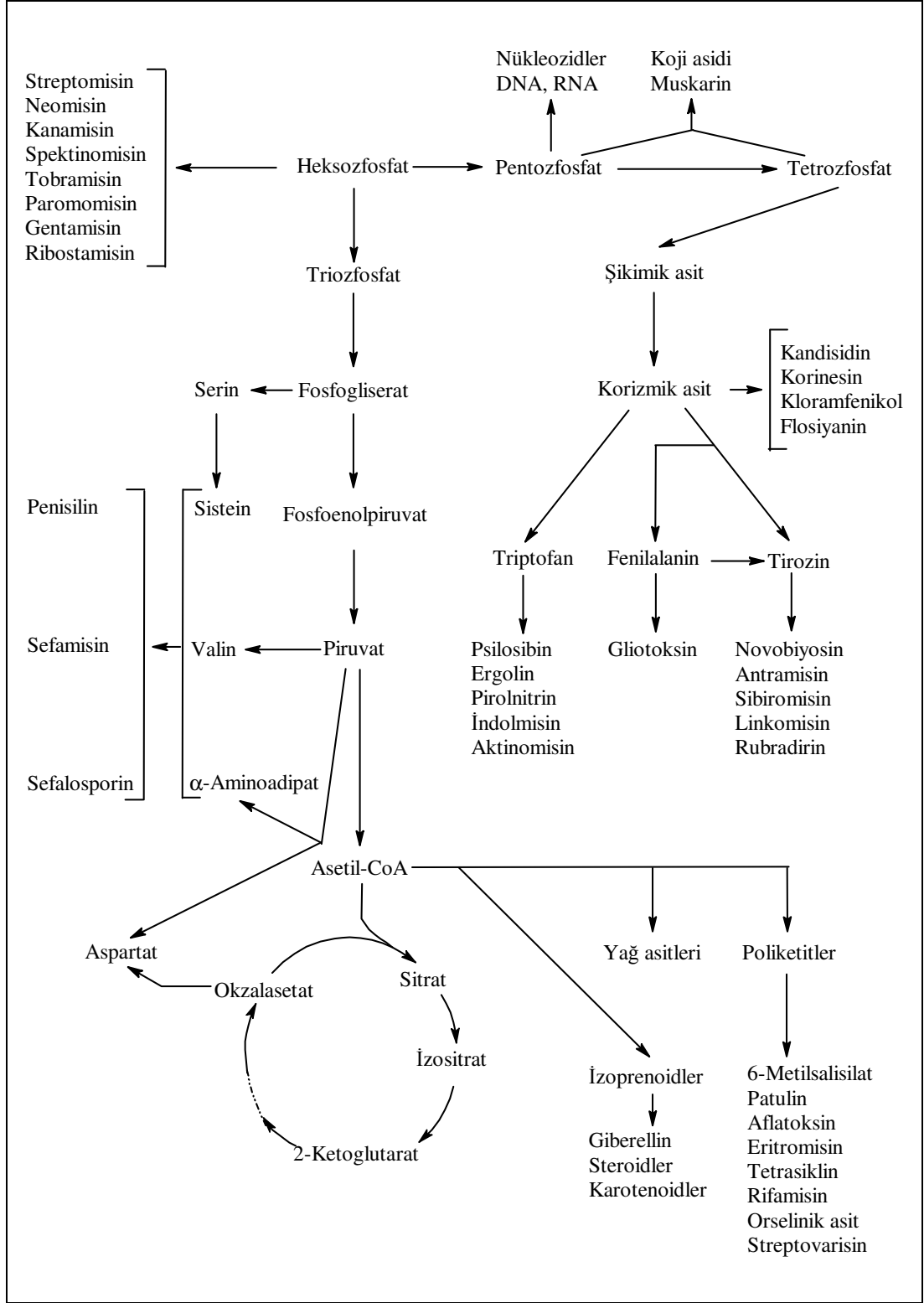
Sekonder metabolitlerin bir çoğunun, kendilerini üreten mikroorganizmanın metabolizmasındaki fonksiyonları ile biyosentez ve regülasyon mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.¹⁰⁵ Bununla birlikte sekonder metabolitlerin; bakteriler, mantarlar, amipler, bitkiler, böcekler ve çok sayıda hayvana karşı savunma silahı olarak kullanım alanları mevcuttur. Ayrıca metal taşıyıcı ajan olma özelliklerinin yanında bitkiler, nematotlar, böcekler ve yüksek yapılı hayvanlar ile mikroorganizmalar arasında simbiyotik ilişkinin kurulması gibi birçok fonksiyonları bilinmektedir.¹⁰⁶ Bugüne kadar 34.000'den fazla mikrobiyal sekonder metabolit tespit edilmiş olmasına rağmen bu metabolitlerden çok azı uygulama alanı bulmuştur.⁹³ Sekonder metabolitlerin çoğu bitki koruma ve hayvan beslemede kullanılırken pazar payı açısından terapötik amaçla kullanılan antibiyotikler en önemli grubu oluşturmaktadırlar.

Bu kadar çok sayıda sekonder metabolitin hiçbir fonksiyonu olmadığını iddia etmek gerçekçi bir yaklaşım olmaz. Sekonder metabolitler ve olası fonksiyonlarına ilişkin birçok düşünce ve hipotez geliştirilmiştir. Bunlardan önemlilerini aşağıdaki ana başlıklar altında toplayabiliriz;¹⁰⁵

- Sekonder metabolitler primer metabolitlerin dönüşüm ürünleridir.
- Bazı sekonder metabolitler kör barsak gibi düşünülebilir. Biyolojik evrim sürecinde fonksiyonsuz kalmışlardır.
- Sekonder metabolitler detoksifikasyon (zehirsizleştirme) mekanizmasının ürünleridir. Bazı sekonder metabolitlerin kendi oluşum ara metabolitlerinden daha düşük toksisiteye sahip olmaları bu tezi doğrulamaktadır.
- Sekonder metabolitler inhibe edilmiş bir büyümenin sonucu oluşurlar. Sekonder metabolitler genellikle üremenin olmadığı fazlarda sentezlenir.
- Sekonder metabolizmada biyokimyasal evrime ait birçok bilgi saklıdır.

Sekonder metabolitler oldukça kompleks yapılara sahip bileşiklerdir. Bu bileşiklerin metabolik olarak sentezinde, normal metabolizmanın üzerine en azından ilave birkaç basamak gerekmektedir. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi sekonder metabolitlerin primer metabolitler ile ilişkisi mevcuttur.

Primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkinin belirlenmesi biyoteknolojik açıdan istenilen sekonder metabolitin üretiminin artırılmasına da olanak sağlamaktadır.



Şekil 2.6. Primer ve sekonder metabolit metabolizmalarının bağlantıları.

2.6. YENİ DOĞAL ÜRÜNLERİN KEŞFİ İÇİN FARKLI TARAMA YÖNTEMLERİ

Penisilin ve aktinomisinlerin keşfi “antibiyotiklerin taranmasında” yeni araştırma olanaklarına öncülük etmiştir. Yeni biyolojik bileşikler keşfetmek için, ham ekstraktlar kimyasal tarama, çeşitli biyolojik veya farmakolojik tarama yaklaşımları ile değerlendirilebilir. Sonrasında, endüstriyel ölçekli “Yüksek Hızlı Seri Tarama” (HTS “High Throughput Screening”) yönteminde olduğu gibi oldukça yüksek duyarlılık avantajı ve fazla sayıda örneğin aynı anda taranması avantajlarını sağlayan yöntemlerden faydalanılarak biyolojik aktif bir bileşiği taramak için odaklanılabilir.¹⁰⁷ Fakat bu işlemlerde diğer hedeflere karşı aktivite gösterebilecek olan yeni bileşikler gözden kaçırılabilir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için Zähler, Zeeck ve diğer araştırma grupları 1980’de sistematik tarama metodları araştırmaya başlamışlardır.¹⁰⁸ İnce tabaka kromatografisi (İTK) tabakaları üzerindeki metabolitlerin kromatografik özelliklerinin, ayrıca bilinen reaksiyon koşulları altında boyar reaktiflere karşı olan kimyasal reaktiviteleri ile reaksiyon koşullarının belirlendiği böylece bir sekonder metabolit numunesinin parmak izinin tanımlandığı bir veri bankası oluşturulmuştur.¹⁰⁹ Bu metodun kullanıldığı bütün metabolitler ilk kez izole edilip ve bilinmeyen bileşiklerin biyolojik testleri yapılmıştır. Elbette bilinen bileşikler sık sık izole edilip yapıları hızlı bir biçimde aydınlatılmıştır.¹⁰⁸

Kütle spektroskopisi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) cihazlarının duyarlılıklarının artması ile birlikte çeşitli doğal ürünlerin veribankalarının kullanılabilirliklerinin yaygınlaşması ve aynı zamanda diyet array dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC–DAD), HPLC–MS, HPLC–NMR–MS veya MS ile konbine gaz kromatografisi (GC–MS) sistemlerinin kullanılması kimyasal tarama yaklaşımlarını geliştirmiştir. Bu yöntemler ham ekstraktlardan izole edilen bir bileşiğin yeni olup olmadığını araştırmaya olanak sağlar. Böylece, bilinen bileşiklerin tekrar tekrar izolasyonuna engel olunabilir.

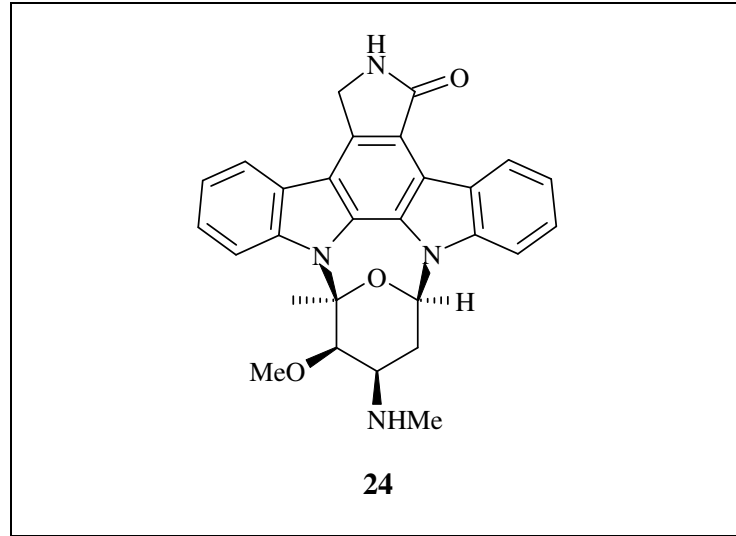
2.7. MİKROORGANİZMA İZOLATLARINDAN YENİ SEKONDER METABOLİTLERİN TARANMASI

Başlangıçta sekonder metabolitlerin taranması işlemleri antibakteriyel bileşikler üzerinde yoğunlaştırılmıştı. Daha sonraları antifungal, antiviral ve antitümör aktivite taramaları şeklinde genişletildi ve günümüzde insan tıbbi ihtiyaçlarının karşılanması, hayvan sağlığı ve bitki koruma gibi alanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.¹¹⁰ Mikroorganizmaların ürettiği doğal ürünlerin olduğu gibi kullanımı fikri, bütün uygulama alanlarındaki yeni hedeflerin gelişmesiyle birlikte yeni öncü bileşiklerin taranması şekline dönüşmüştür. Yeni öncü bileşiklerin en önemli kaynağı doğa ve özellikle de mikroorganizmaların sekonder metabolitleri olarak görülmektedir.¹¹¹ Doğadan izole edilen yeni öncü bileşikler kimyasal sentez alanında veya türevlendirme yaklaşımlarında kullanılabilir. Yeni sekonder metabolitlerin taranmasının son 15 yılda çekiciliği artmış ve daha iyi kavranmaya başlanmıştır.

Farmakolojik ve tarımsal alanlarda kullanışlı bileşiklerin taranması üzerine yaklaşık 100 yeni test sistemi tanımlanmıştır.¹¹² Bu *in vitro* yöntemler klasik antibiyotik taramalarından farklıdır ve anahtar enzimler veya reseptörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yöntemler;

- Mikrobiyal örnek veya ekstraktlarda bulunan proteazlar, protein reseptörlerinin veya enzimlerin degradasyonuna yol açması sebebiyle yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır.
- Tüm mikrobiyal kültürlerde, ara metabolizmadaki değişken konsantrasyonlarda bulunan metabolitlere duyarlı çeşitli yöntemler vardır.
- Yöntemler osmotik koşullara, enfeksiyonlara ve pH değerindeki değişmelere duyarlıdır.
- Yöntemler bir basamaktaki belirli bir kesin koşul için seçicidir ve tüm basamakları kapsamaz.
- Geliştirilen yeni metodların tümü otomatik robot taramaları için uygun değildir.
- Yöntemlerin oldukça büyük bir çoğunluğu hala bilinen bileşiklere duyarlıdır.
- Hedef yönelimli yöntemlerin hiç biri mikrobiyal kültür veya ekstraktlardaki kimyasal çeşitliliği tespit etmeye uygun değildir.

Prof. Fiedler ve Prof. Zähler öncülüğündeki oldukça geniş kolobratif bir araştırma grubu, mikroorganizma kaynaklı yeni sekonder metabolitlerin taranması işlemlerinde sadece klasik antibakteriyel aktivite temelli yaklaşım değil aynı zamanda yeni sideroforların belirlenmesi ve farklı ayırım yöntemlerini kapsayan antifungal aktivite güdümlü tarama işlemlerinin geliştirilmesini gerçekleştirmişlerdir. Buna rağmen yeni izole edilen aktinomiset suşlarının sekonder metabolitlerinin saptanmasında fizikokimyasal metodları ana tarama stratejisi olarak kullanmışlardır. İTK ve çeşitli reaktiflerle renklendirme temelli tarama yöntemi ilk olarak Hamao Umezawa tarafında “kimyasal tarama” olarak tanımlanmıştır.¹¹³ Bundan birkaç yıl sonra Satoshi Omura bu yöntemle antifungal ve antihipertansif bir ajan olan staurosporin (**24**)’i tespit etmiştir.¹¹⁴ Hans Zähler izole edilen suşların kültür koşullarının varyasyonlarını, örnek hazırlama ve boyama reaktifleri ile ilişkili olan bu metodu modifiye etmiş^{115,116} ve çalışmalarında biyolojik aktivite temelli yaklaşıma ikincil sırada yer vermişlerdir.¹¹⁰



Hans-Peter Fiedler’in saflaştırılan sekonder metabolitlerin kimyasal çeşitliliğinin tespit edilmesinde yardımcı olması için, bilgisayar destekli diyot array dedection ile yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-DAD) cihazının kombine olduğu ve antibiyotikler ile diğer doğal ürünlerin bir veri bankasının bulunduğu HPLC ve UV-görünür alan absorbans spektrum kütüphanesi (HPLC-UV-vis Database)’ni oluşturması bu alanda oldukça önemli bir çığır açmıştır.¹¹⁷ Bu etkili metod, UV-görünür alan

spektrum verilerinin karşılaştırılması ile ham ekstraktlarda bilinen bileşiklerin erken dönemde tanımlanmasını veya bileşiğin sınıflandırılmasını sağlamaktadır. HPLC-DAD tarama tekniğinin etkinliği Prof. Jörg Metzger tarafından HPLC-ESI-MS analizi ile genişletilmiştir. Moleküler kütle ile ilgili bilgilerin yer aldığı kimyasal veri bankalarına ticari olarak erişim imkanı daha kesin araştırmalar yapmaya olanak sağlamıştır.

Yapılan çalışmalardaki temel stratejik amaç izole edilebilen ve biyolojik aktivitesi test edilen yeni bir bileşik saptamak ve böylece sekonder metabolit aktivitesini değerlendirmektir. Kimyasal taramanın bir diğer avantajı da çalışmalarda saf bileşik test etmeye olanak sağlamasıdır. Birçok test sistemi mikrobiyal kültürler veya ham ekstraktlarla karşılaştırılabilir olmaktan çok uzaktadır ve saf bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen saf bileşiklerin ne tür bir biyolojik aktivitesinin mevcut olduğunu tespit etmek için genelde ilaç veya tarım biyolojisi şirketleriyle ortaklaşa işbirliği yoluna gidilmektedir.

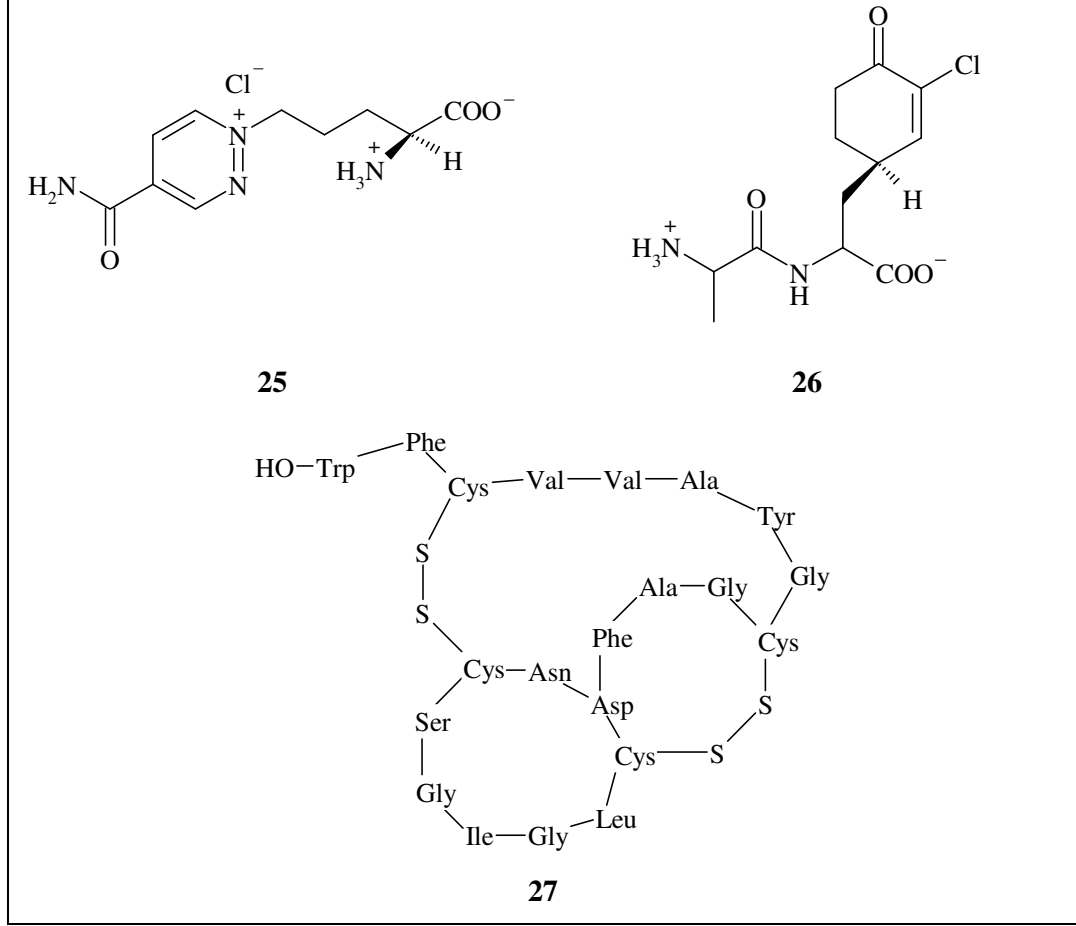
Sekonder metabolitlerin yapı aktivite ilişkisinin analizinde orijinal bileşik sayısını doğrudan fermantasyon, besleme veya üretim fazında öncül modifikasyonu ve bloke edilmiş mutant kullanarak artırmak mümkündür.

2.7.1. Tarama Metodları ve Yeni Bileşikler

2.7.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Temelli Klasik Tarama

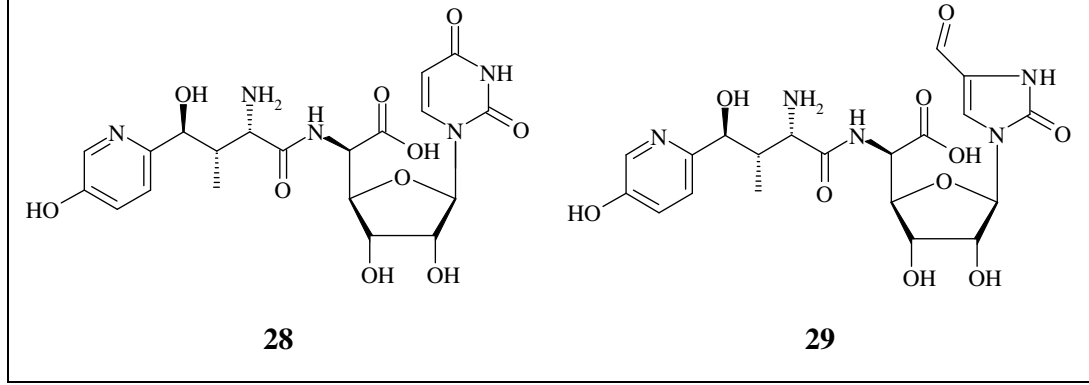
Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, maya veya filamentli mantarlarca üretilen antimikrobiyal ajanların saptanmasında 1988'den beri klasik agar pleyt difüzyon yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntemle *Streptomyces violaceoniger* sp. *griseofuscus* Tü 2557'den pridazomisin (**25**)¹¹⁸ ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633'den ise klorotetain (**26**)¹¹⁹ bulunmuştur. Her iki antibiyotikte seçici antifungal aktivite göstermektedir. Pridazomisin (**25**) daha önce mikrobiyal sekonder metabolitlerde tanımlanmış pridazin halkası içermektedir ve klorotetain (**26**) ise alışılmadık bir biçimde klorlanmış amino asit içeren bir dipeptittir.

Bacillus subtilis'in büyümesi üzerine inhibisyon etkisi olabilecek ajanların araştırılması için yapılan bir tarama esnasında *Streptomyces griseoflavus* Tü 4072'den aborisin (**27**) adında yeni bir peptit antibiyotik keşfedilmiştir.¹²⁰

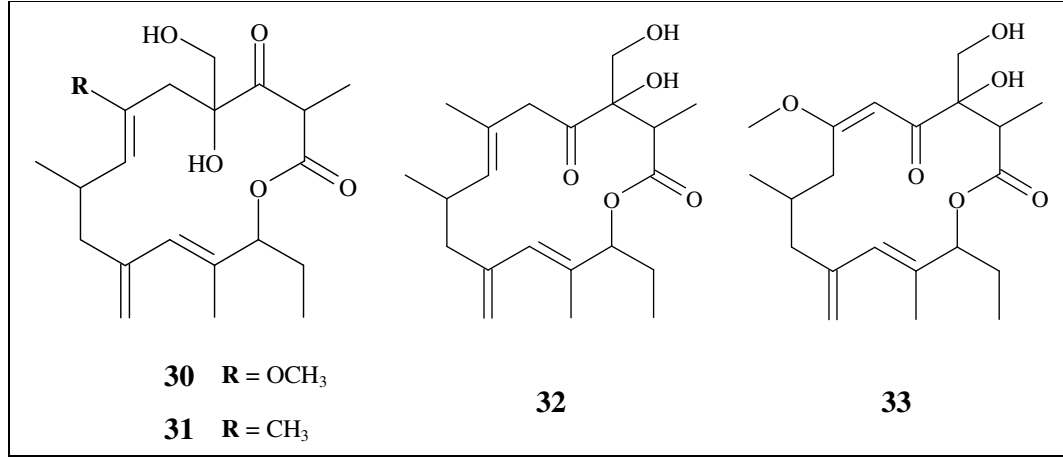


2.7.1.2. *Botrytis cinerea* Hiflerinde Morfolojik Değişikliklere Neden Olan Antibiyotiklerin Taranması

Bu yöntem hem *Botrytis cinerea*'nın büyümesinin inhibisyonu hem de “kabarma etkisi” (bulging effect) olarak adlandırılan hiflerinin morfolojik değişiklikleri üzerine temellenmiştir. Bu çalışma vasıtasıyla polien antibiyotikler varlığında antifungal aktivite maddeleri bulunmuştur. Prof. Zahner'in grup çalışmalarında analize edilen en önemli antibiyotik nikkomisin Z (**28**) ve X (**29**)'dir.¹²¹ Nikkomisin Z (**28**) kitin sentaz enziminin güçlü bir inhibitörüdür ve insanlar için toksik değildir. BAYER AG firması tarafından yıllarca akarimid olarak tarımsal kullanımı için derin araştırmalara tabi tutulmuştur fakat çok pahalı olması ve bitki koruma uygulamalarındaki kısıtlılığı nedeniyle 1984 yılında araştırmalar durdurulmuştur. Nikkomisin Z (**28**) 1994 ile 1998 yılları arasında ABD'de bir ilaç şirketi tarafından histoplasmosis, blastomikozis ve koksidoimikozis tedavisinde antimikotik bir ajan olarak geliştirilmiştir.



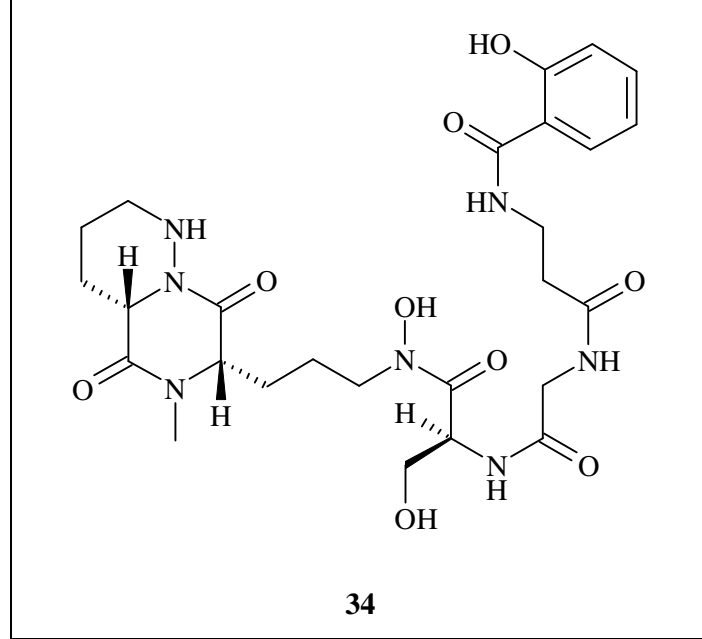
Botrytis yönteminden faydalanılarak antifungal aktiviteye sahip dört yeni makrolid grubu antibiyotik olan galbonolide A–D (**30–33**) keşfedilmiştir.^{122,123}



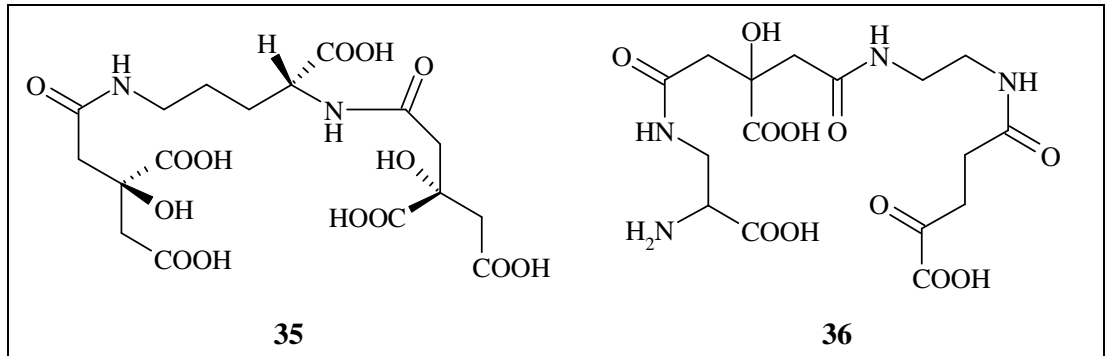
2.7.1.3. Yeni Sideroforların Taranması

Laktobasiller dışında tüm diğer mikroorganizmalar demir içeren enzimlerini desteklemek için dışardan demir takviyesine bağımlıdırlar. Fe⁺³ iyonlarının sudaki çözünürlüğünün oldukça düşük olmasından dolayı bütün mikroorganizmalar oldukça etkin demir şelatlayıcı bileşikler ve spesifik demir tutucu sistemler geliştirmektedirler. Demir şelatlayıcı bileşiklere trihidroksamatlar, katekoller, trikarboksilatlar ve demir şelatlayabilen diğer bileşikler örnek olarak verilebilir. Mikroorganizmalardan oldukça farklı yapılara sahip yeni şelatlayıcı bileşikler izole edilmiştir.

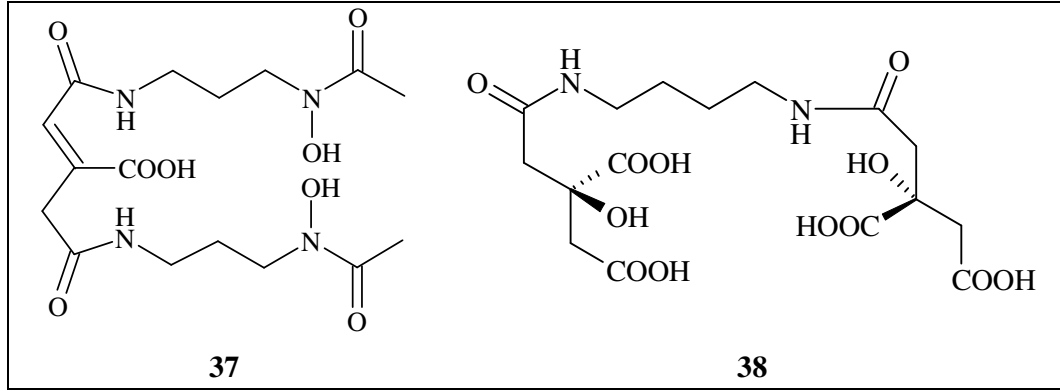
Maduraferrin (**34**) bir HPLC çalışması sırasında belirlenip *Actinomadura madurae* DSM 43067 suşundan izole edilmiştir.¹²⁴ Bu bileşiğin kompleks oluşturan merkezinde bir salisilikamit kısmı, bir hidroksamik asit grubu ve bir tane de asit hidrazid grubu bulunmaktadır.



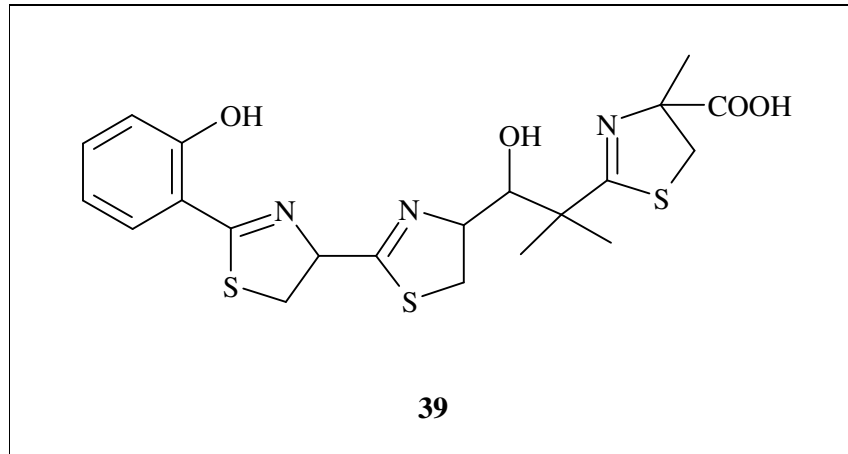
Yüksek oranda hidrofilik karaktere sahip karboksilat tipi siderofor olan stafiloferrin A (**35**) ve B (**36**), demirin güçlü bir biçimde kısıtlanmış olduğu koşullar altında üretilen *Staphylococcus hyicus* DSM 20459'dan izole edilmiştir.¹²⁵⁻¹²⁸ Her iki bileşikte güçlü demir düzenleyicidir. Stafiloferrin A (**35**) amino bağı ile D-ornitin üzerinden bağlı iki molekül sitrik asit içerirken, stafiloferrin B (**36**) 2,3-diaminopropiyonik asit, sitrat, etilendiamin ve 2-ketoglutarik asitten oluşmaktadır.



Bacillus sp. strain DSM 6940'dan şizokinen'in yanısıra yeni dihidroksamat siderofor olan akonitatın sitrat ile yer değiştirdiği şizokinen B (**37**) izole edilmiştir.¹²⁹ Yeni bir karboksilat tipi siderofor olan rizoferrin (**38**) *Rhizopus microsporus*'tan ve farklı tür *Mucorales* mantarlarından izole edilmiştir.^{130,131} Rizoferrin (**38**) yapısal olarak stafiloferrin A (**35**) ile benzerlik göstermektedir. Stafiloferrin A (**35**)'daki D-ornitin köprüsünün yerini rizoferrin (**37**)'de putreskin almıştır.



Güçlü virülen olan *Yersinia enterocolitica* H1852a suşundan yersiniabaktin (**39**) adında bir siderofor izole edilmiştir.¹³² Bu yeni bileşik bir benzen ile bir tiyazolidin ve iki tane de tiyazolin halkasından meydana gelmektedir. Demir ve galyum gibi üç değerlikli kasyonlarla oldukça sağlam kompleksler oluşturmaktadır.

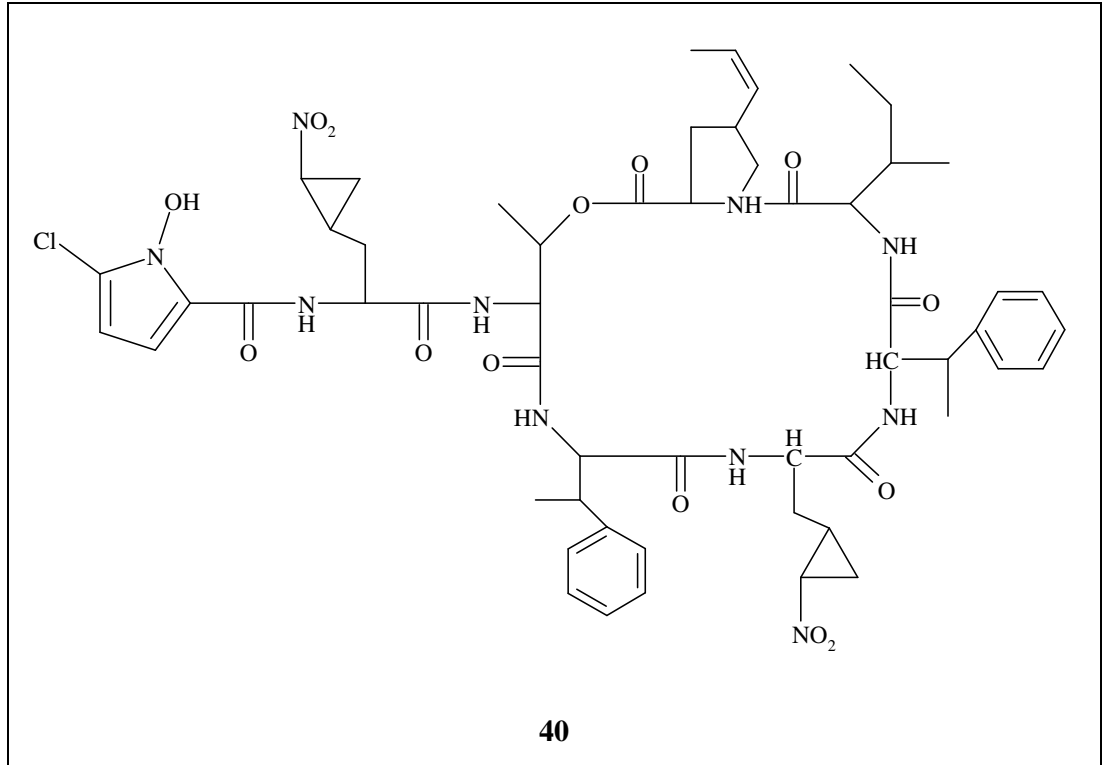


Bu metodla ayrıca ferriksamin tipi siderofor olmayan fungal ferrikrom-hekzapeptitler de izole edilmiştir.¹³³

2.7.1.4. Aktinomisetlere Özgü Hücre Farklılaşması Sürecinde Sekonder Metabolitlerin Taranması

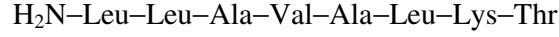
Aktinomisetler karmaşık farklılaşma oluşumları ile karakterize edilebilirler. Bu süreçleri etkileyen metabolitlerle ilgili araştırmalar yaygın önem arz etmektedir. Çünkü bu çalışmalar aktinomisetlerin yaşam döngülerinin düzenlenmesi ile ilgili fikir vermektedir.

Prof. Zähler'in ekibindeki Prof. Heinz Wolf *Streptomyces*'lerde hava misellerinin oluşumunu uyarıcı bileşikler saptamaya yarayan bir tarama sistemi geliştirilmiş ve *Streptomyces griseoflavus* W-384'den yeni bir peptid-lakton antibiyotik olan hormaomisin (**40**)'i izole etmiştir.^{134,135} Hormaomisin (**40**) bu mikroorganizmalarda sadece hava misellerinin oluşumunun uyarılmasından sorumlu değil aynı zamanda antibiyotik üretiminin başlatılmasına da neden olmaktadır.

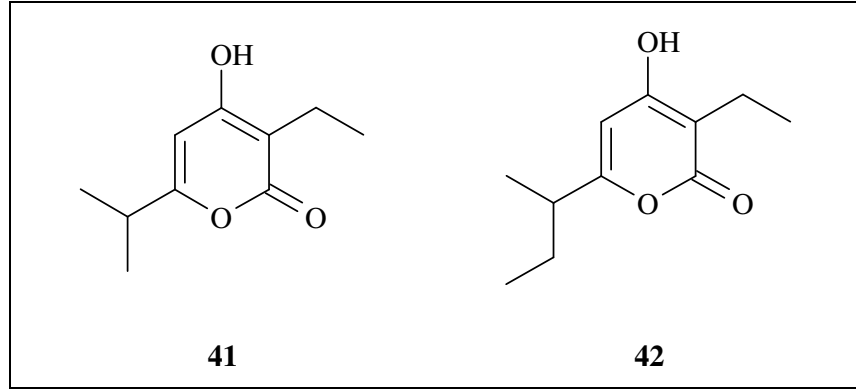


Germisidin A (**41**) ve B (**42**) *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551'den izole edilmiştir.¹³⁶ Germisidin A (**41**) *Streptomyces* türlerinde spor germinasyonunun ilk bilinen otodüzenleyici inhibitörüdür.

Prof. Fiedler'in ekibi nikkomisin üreten *Streptomyces tendae* Tü 901/8c'den streptofaktin adında yeni bir peptit izole etmiştir. Bu biyosurfaktan *Streptomyces*'lerde hava misellerinin gelişiminde yapısal bir rol oynar ve kolonilerin çevresini saran su film tabakasının yüzey gerilimini azaltarak hava hiflerinin yukarı doğru dikleşmesini destekler. Kütle spektrometri sonuçları ve amino asit analizi şu peptit kısmını gösterir,



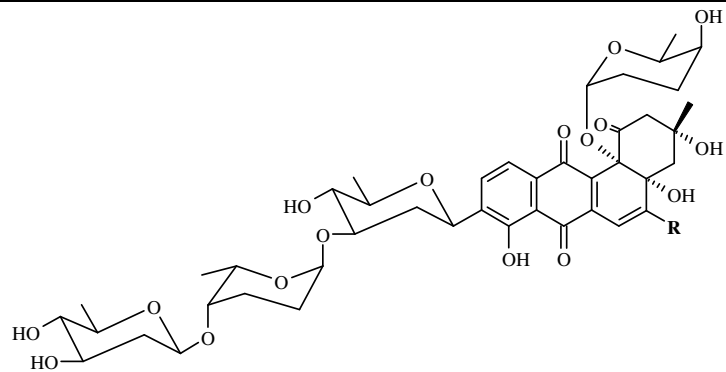
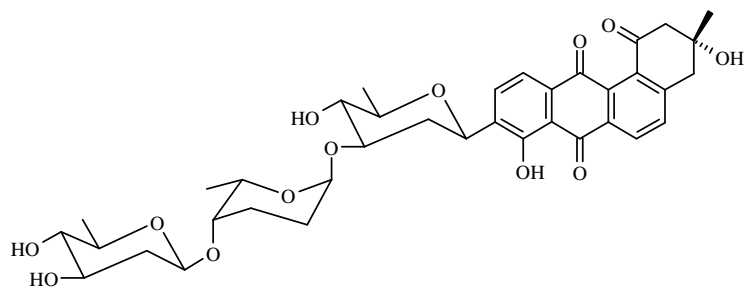
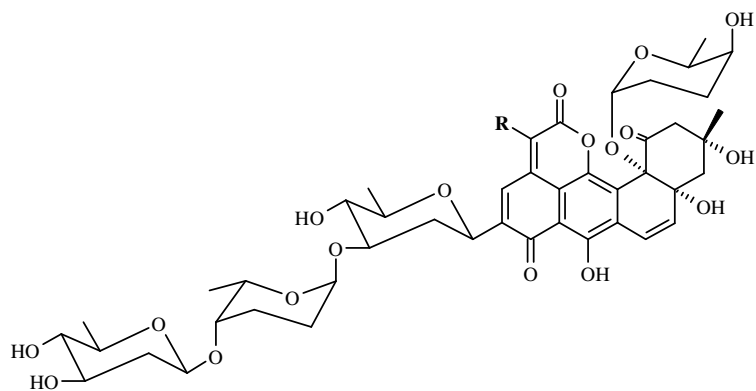
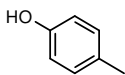
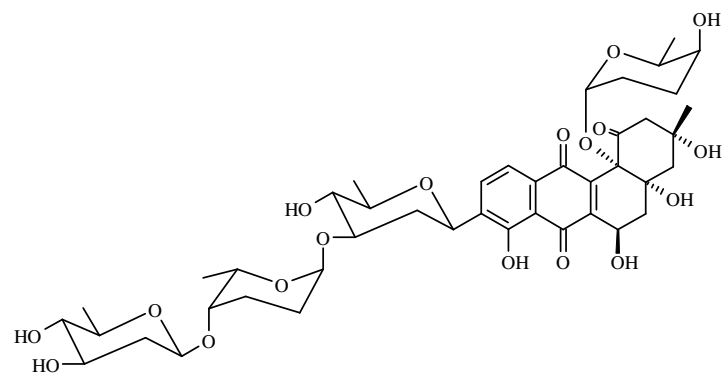
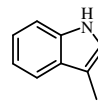
ve ayrıca yeri tam olarak belirlenememiş ikinci bir valin kalıntısı içeren 1021 daltonluk moleküler kütle sahiptir. Streptofaktin yapısal ve otodüzenleyici fonksiyonları tanımlanmış ilk peptittir.¹³⁷



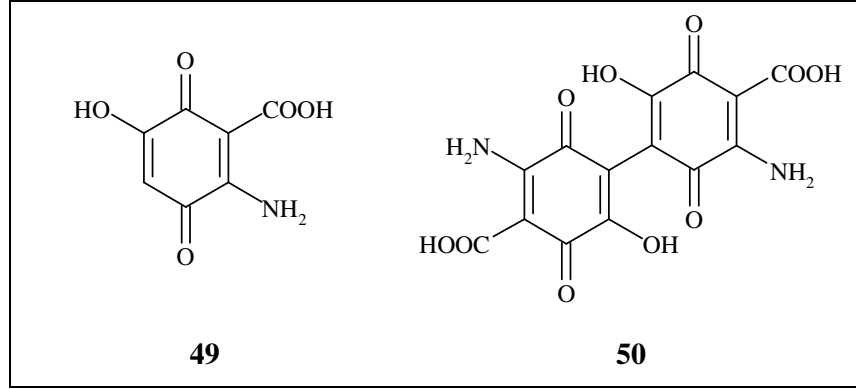
2.7.1.5. Kendiliğinden Renkli Sekonder Metabolitleri İTK ile Kimyasal Tarama

Streptomyces suşlarının miselleri ve kültür filtratlarından elde edilen konsantre ekstraktlar silika jel kaplı İTK tabakaları yardımıyla ayrılabilirler. Her bir suştan elde edilen ekstraktın İTK üzerinde renkli görülen spotları araştırılabilir. Bu yöntem çeşitli yeni antraquinon, fenazin ve polien antibiyotiklerin belirlenmesine olanak sağlamıştır.

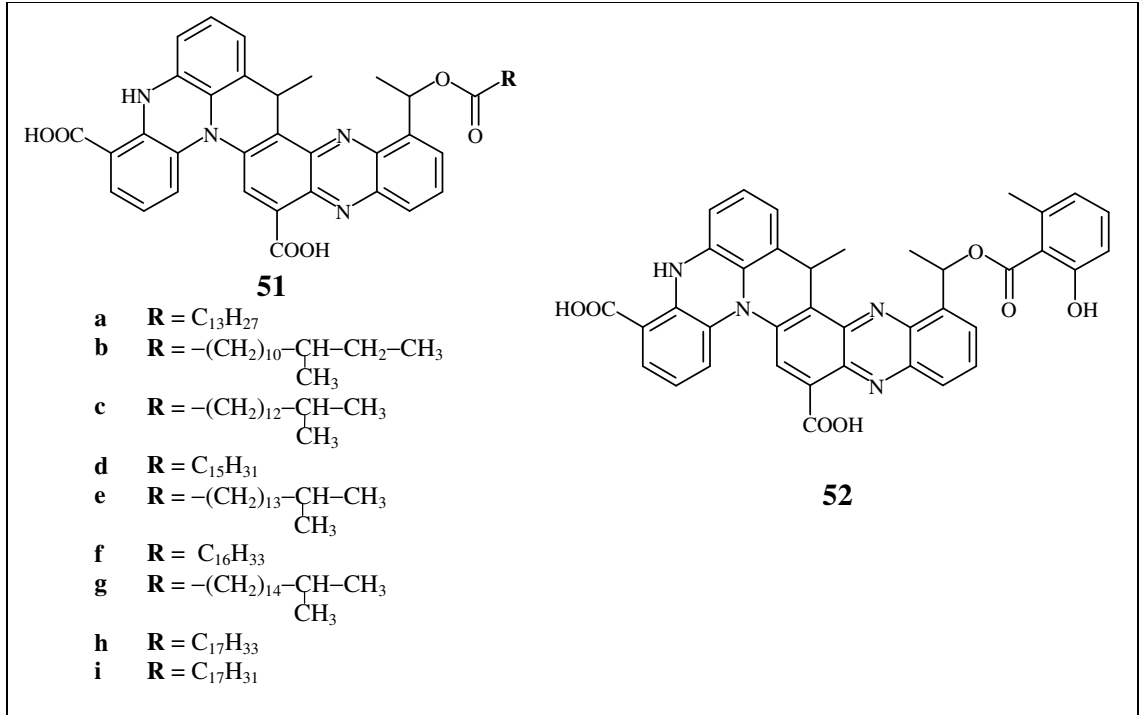
En önemli sekonder metabolit olan Urdamisin A–F (**43–48**) bileşiklerinin keşfi bu metod ile gerçekleştirilmiştir. *Streptomyces fradiae* Tü 2717'nin ürettiği bu yeni angusiklin antibiyotikler Gram-pozitif bakterilere karşı biyolojik aktivite ve murin L1210 lösemi kök hücrelerine karşı güçlü bir sitotoksik aktivite göstermektedir.^{138–142}

**43** R = H**48** R = SCH₃**44****45** R =**46** R =**47**

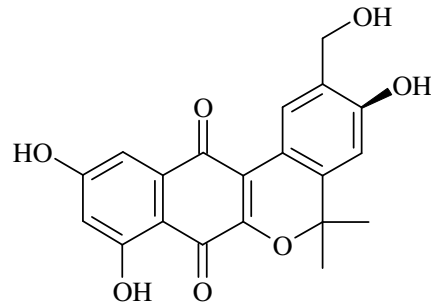
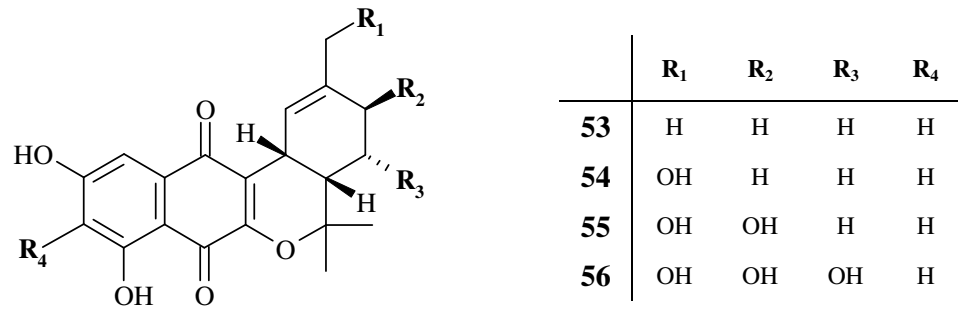
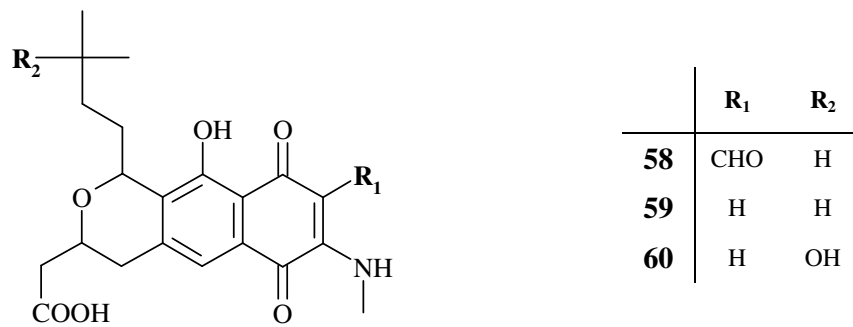
Streptomyces griseoflavus ssp. *thermodiastaticus* Tü 2484'den izole edilen ve herhangi bir biyolojik aktivitesi gözlemlenmemiş para-kinon metabolitleri olan cinnakinon (**49**) ve di-cinnakinon (**50**) bileşikleri izole edilmiştir.^{143,144}



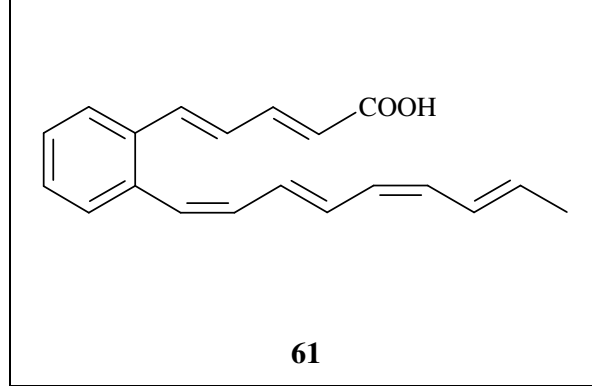
Koyu yeşil renkli olan Esmeraldin A (**51**) ve B (**52**) bileşikleri *Streptomyces antibioticus* 2706 suşundan izole edilmiştir. Sefanik asit familyasının iki fenazin kalıntısının kondensasyonu sonucu oluşan bu bileşiklerin hiç biri antibakteriyel aktivite göstermemiştir fakat esmeraldin B (**52**), çeşitli tümör hücre serilerine karşı sitotoksik aktivite göstermiştir.¹⁴⁵



Streptomyces violaceus Tü 3556'dan izole edilen yeni naftokinon kompleksi naftgeranın A–D (**53–56**) bileşikleri ile naftgeranın (**57**) bileşiği izole edilmiştir. Naftgeranın A (**53**) ve B (**54**)'nin zayıf antibakteriyel ve antifungal etki göstermesine karşın A (**53**), B (**54**) ve C (**55**) türlerinin değişik tümör hücrelerine karşı orta düzeyde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Tü 3556 suşunun yeni naftokinon bileşikleri olan nafteritrin D–F (**58–60**)'yi de ürettiği saptanmıştır.¹⁴⁶

**57**

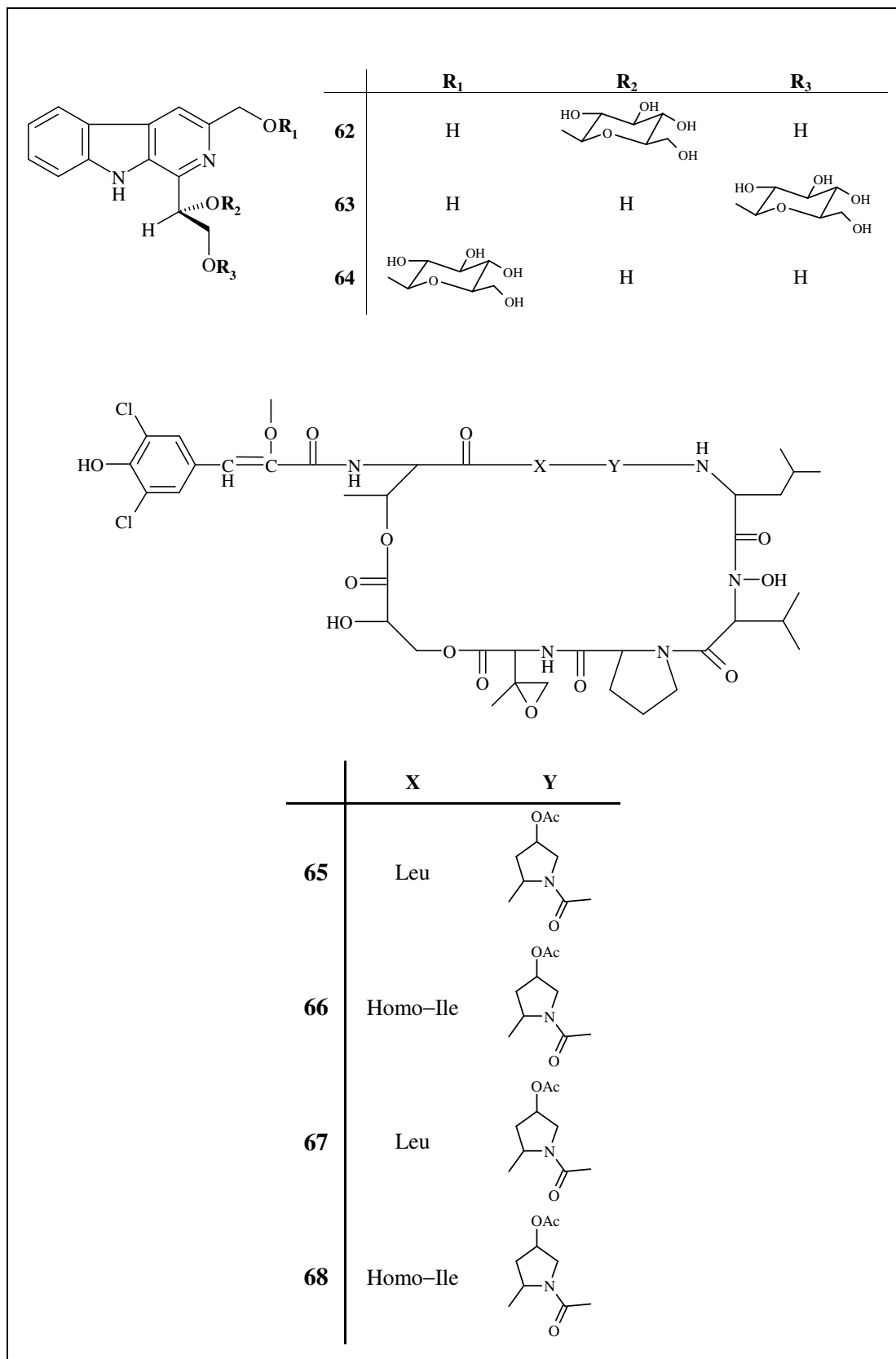
Bacillus subtilis'e karşı antibakteriyel aktivite gösteren açık yeşil renkli polien karboksilik asit olan serpentin (**61**) *Streptomyces* sp. Tü 3851'den izole edilmiştir. Bu moleküllerde benzen halkasının molekülün ortasına yakın oluşu bu molekül yapılarını önemli kılmaktadır.¹⁴⁷



2.7.1.6. Floresan Özellikteki Sekonder Metabolitleri İTK ile Kimyasal Tarama

UV ışığı altında İTK tabakaları üzerinde mavi floresan özellik gösteren iki yeni metabolit belirlenmiştir. *Streptomyces parvulus* Tü 2480'den izole edilen Tü 2480 F₂ (**62**), Tü 2480 F₃ (**63**) ve Tü 2480 F₄ (**64**) olarak adlandırılan floresan piridindolol glikosid bileşiklerinde herhangi bir biyolojik aktivite gözlenmemiştir.¹⁴⁸

Streptomyces antibioticus ssp. *griseorubinosus* Tü 1661'den izole edilen ve yeni siklopeptit antibiyotik grubunun üyeleri olan floresan karaktere sahip depsiklorin A–D (**65–68**) bileşiklerinin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı biyolojik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.^{149,150}

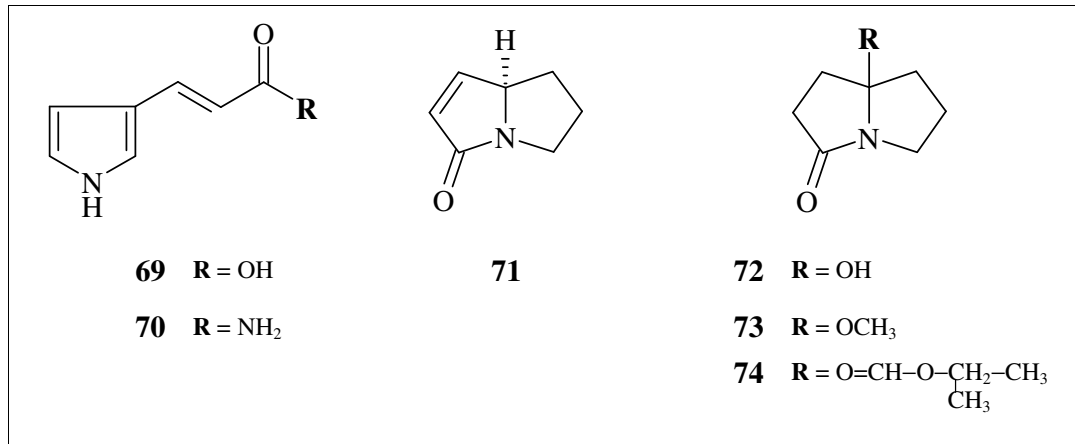


2.7.1.7. İTK ile Kimyasal Tarama ve Ehrlich Reaktifi

Ehrlich reaktifi genel olarak primer aminler ile reaksiyon verir ve İTK tabakası üzerinde birkaç saniye içerisinde kırmızı-viyole zonlar oluşturur.

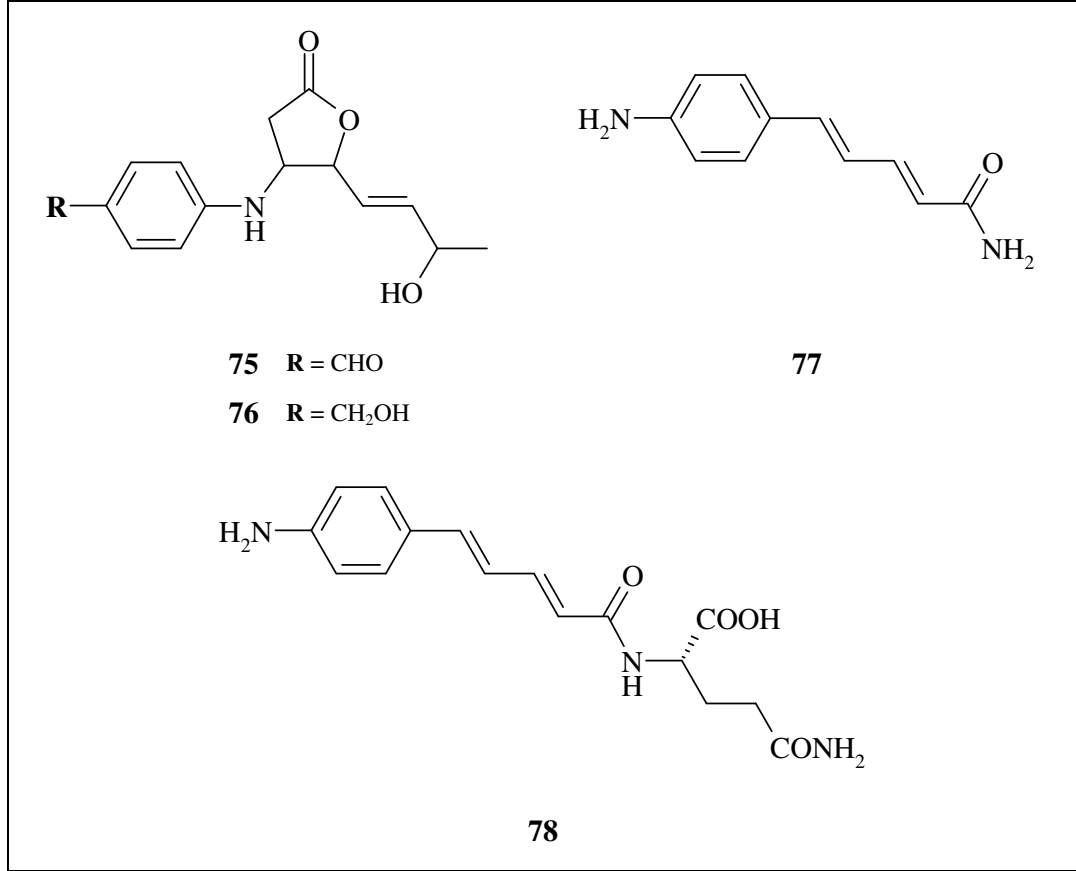
Bu reaktif, piridindolol glikozidlerini üreten *Streptomyces parvulus* Tü 2480'den izole edilen ve aktif olmayan pirol-3-il-2-propenoik asit (**69**) ile pirol-3-il-2-propenamid (**70**) sekonder metabolitlerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.¹⁵¹

Pirolam grubu *Streptomyces olivaceus* Tü 3082'nin biyosentetik olarak ürettiği dört yeni pirolizidinon'lardan (pirolam (**71**), pirolam A-C (**72-74**)) oluşmaktadır. Antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermemelerine karşın buğday ve pirinç fidelerine karşı zayıf herbisidal aktivite göstermektedirler. Pirolam (**71**), *Brachydanio rerio* balığının embriyonik gelişimini etkilemektedir.¹⁵²



Streptomyces viridochromogenes Tü 2580'nin ürettiği obsurolide A₂ (**75**) ve A₃ (**76**), phosphodiesteras inhibitörlerinin yeni bir sınıfını oluşturmakta, aynı zamanda bakteri, maya ve lifli mantarların büyümesine karşı herhangi bir inhibisyon göstermemektedir.¹⁵³

Streptomyces sp. Tü 3946'dan izole edilen yeni fenilpentadienamid'ler (5-(4-aminofenil)penta-2,4-dienamid (**77**) ve N²-[5-(4-aminofenil)penta-2,4,dienoil]-L-glutamin (**78**)) Ehrlich reaktifi ile İTK tabaka üzerinde portakal renkli bir bant olarak belirlenmiştir. Her iki sekonder metabolit de antibakteriyel ve antifungal etki göstermemektedir.¹⁵⁴

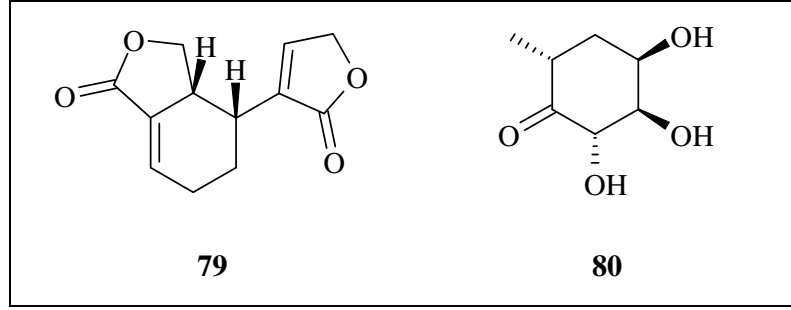


2.7.1.8. İTK ile Kimyasal Tarama ve Mavi Tetrazolium Boyar Reaktifi

Mavi tetrazolium boyar reaktifi, steroidler ve indirgeyici bileşikler için oldukça spesifik bir türevlendirici reaktiftir. Etkileştikleri bileşikler ile İTK tabakası üzerinde ışık altında mavi veya viyole renkli zonlar oluşmasını sağlar.

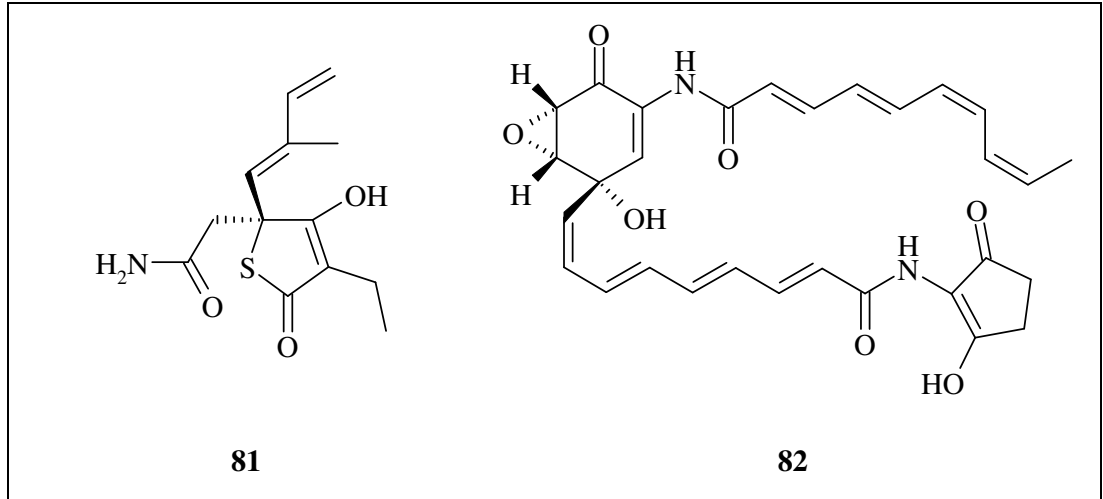
Mavi tetrazolium reaktifi kullanılarak *Streptomyces aurantiogriseus* Tü 3149'dan izole edilen bir bileşik yeşil-portakal renkli bir bant halinde belirlenmiştir. *Streptomyces glaucescens*'te hava misellerinin ve spor oluşumunun uyarılmasını sağlayan bileşik differolid (**79**) olarak isimlendirilmiştir. İzole edilen bu bileşik bakteri, maya ve lifli mantarların büyümesi üzerine herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir.¹⁵⁵

Mavi tetrazolium reaktifi ile renkli bir bant oluşturan bir diğer bileşik olan (2*S*,3*R*,4*R*,6*R*)-2,3,4-trihidroksi-6-metilsikloheksanon (**80**) *Streptomyces albus* Tü 3226 ve *Streptomyces phaeochromogenes* ssp. *venezuelae* Tü 3154'den izole edilmiş, bakteri ve mantarlara karşı biyolojik aktivite göstermemiştir.¹⁵⁶

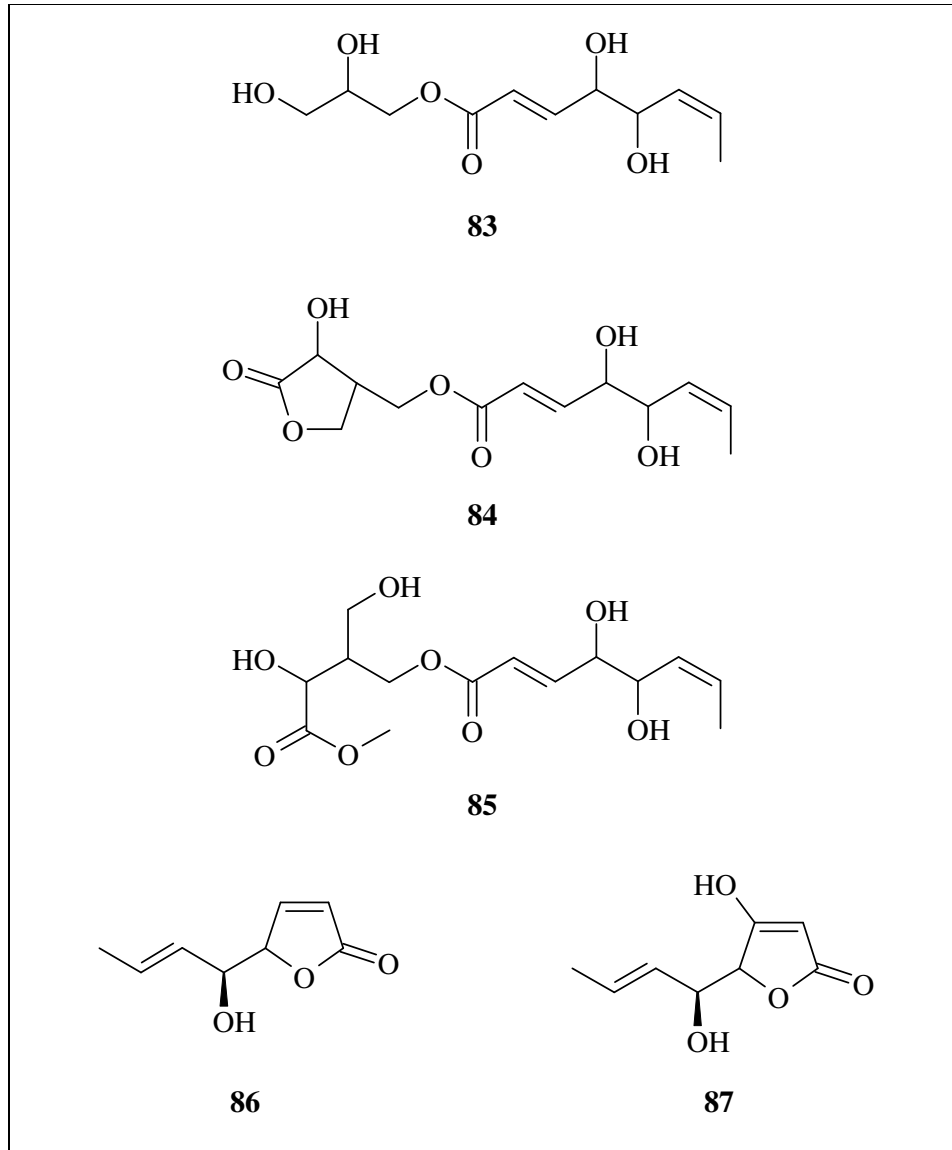


Streptomyces olivaceus Tü 3010'dan tiyotetronik asit yapısındaki doğal bileşiklerin yeni bir üyesi olan (2*S*)-4-etil-2,5-dihidro-3-hidroksi-2-[(1*E*)-2-metil-1,3-butadienil]-5-okzo-2-thienilasetamid (tiyotetronik asit Tü 3010 (**81**)) izole edilmiştir. Bu bileşiğin özellikle *Streptomyces* suşlarına karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.¹⁵⁷

Streptomyces griseoflavus Tü 2880'den manumisin grubunun yeni üyesi olan açık yeşik renkli colabomisin A-C izole edilmiştir. Mavi tetrazolium ile kahverengi bant, vanilin-sülfürik asit ile koyu viyole ve molibdatfosforik asit ile siyah bantlar vermesi izole edilen bileşiklerin indirgeyici özellikte olduğunu göstermektedir. Ana bileşik olan colabomisin A (**82**) Gram-pozitif bakterilere karşı biyolojik olarak aktiftir ve murin L1210 lösemi kök hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermektedir.^{158,159}



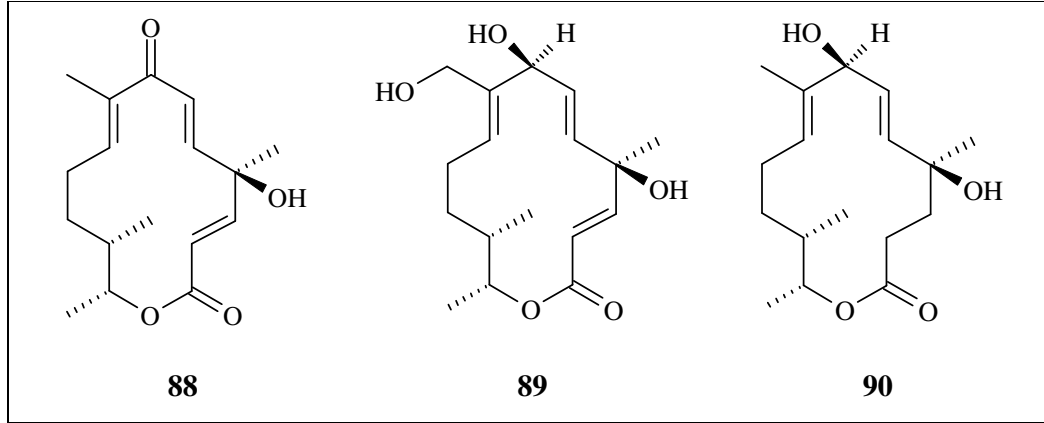
Prof. Fiedler'in Hoechst AG ile işbirliği içerisinde yapmış olduğu çalışmalarda *Streptomyces griseoviridis* FH-S 1832 ekstraktlarındaki 7 Musasin bileşiğini İTK ile belirlemişlerdir. Bileşiklerin mavi tetrazolium klorürle mavi-viyole renkli bir bant oluşturduğu, anisaldehit, orsinol ve Ehrlich reaktifleri ile de renkli bantlar verdikleri tespit edilmiştir. Bu yedi bileşikten altısının yeni bileşik olduğu belirlenmiştir. Musasin A–F (**83–87**) olarak adlandırılan bu bileşiklerden musasin C (**85**)'nin *Caenorhabditis elegans* ve *Trichostrongylus colubriformis*'e karşı anthelmintik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.¹⁶⁰



2.7.1.9. İTK ile Kimyasal Tarama ve Anisaldehit, Orsinol Reaktifleri

Şekerler, steroidler ve terpenler anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile belirlenebilir. Bu reaktif ile püskürtme işleminden sonra İTK tabakaları ısıtıldığında koyu sarı renkli zemin üzerinde viyole, mavi, yeşil gibi çok değişik renkte bantların oluştuğu görülmektedir.

Mavi tetrazolium klorür ile İTK tabakası üzerinde mavi viyole musacin bantlarının görüldüğü *Streptomyces griseoviridis* FH-S 1832'den elde edilen ekstraktın İTK tabakası anisaldehit ve orsinol reaktifi ile renklendirildiğinde daha düşük R_f değerli başka spotlar oluşmuştur. Bu spotlarda Sineromisin B'ye ek olarak makrolid antibiyotiklerin sineromisin grubuna ait üç yeni üyesi olan Dehidrosineromisin B (**88**), Oksisineromisin B (**89**) ve 2,3-dihidrocineromisin B (**90**) izole edilmiştir. Bu bileşikler Gram-pozitif bakterilere karşı zayıf aktivite göstermiş olup başka herhangi bir biyolojik aktivite göstermediği belirlenmiştir.¹⁶⁰



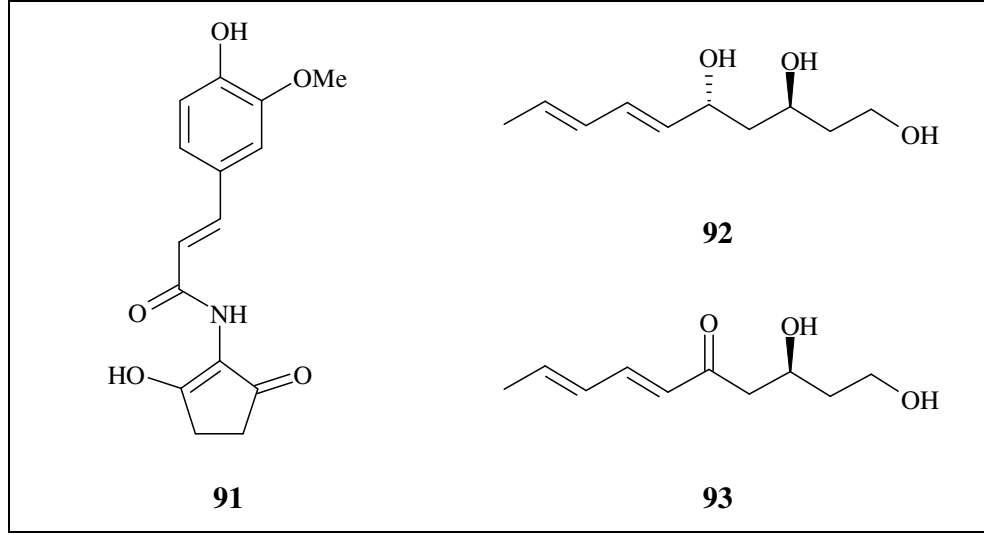
2.7.1.10. İTK ile Kimyasal Tarama ve Vanilin-Sülfürik Asit Reaktifi

Vanilin-sülfürik asit nispeten spesifik olarak yüksek yapılı alkoller, fenoller ve steroidler ile reaksiyon vermekte ve İTK tabakasında donuk zemin üzerine renkli bantlar oluşturmaktadır.

Colabomisin bileşiklerini üreten *Streptomyces griseoflavus* Tü 2880 suşunun misellerinden 2880-II (**91**) olarak adlandırılan bir diğer bileşik İTK tabakası üzerinde vanilin-sülfürik asit reaktifi ile koyu kahverenk oluşturan bir spot olarak belirlenmiştir.

Ferulik asit benzeri olan bu bileşik antibakteriyel ve antifungal etki göstermemektedir.¹⁶¹

(3*S*,8*E*)-1,3-dihidroksidek-8-en-5-on bileşiği üreticisi *Streptomyces fimbriatus* Tü 2335'ten izole edilen (3*S*,5*R*,6*E*,8*E*)-deka-6,8-dien-1,3,5-triol (**92**) ve (3*S*,6*E*,8*E*)-1,3-dihidroksideka-6,8-dien-5-on (**93**) bakteri ve mantarlara karşı inaktiftir.¹⁶²

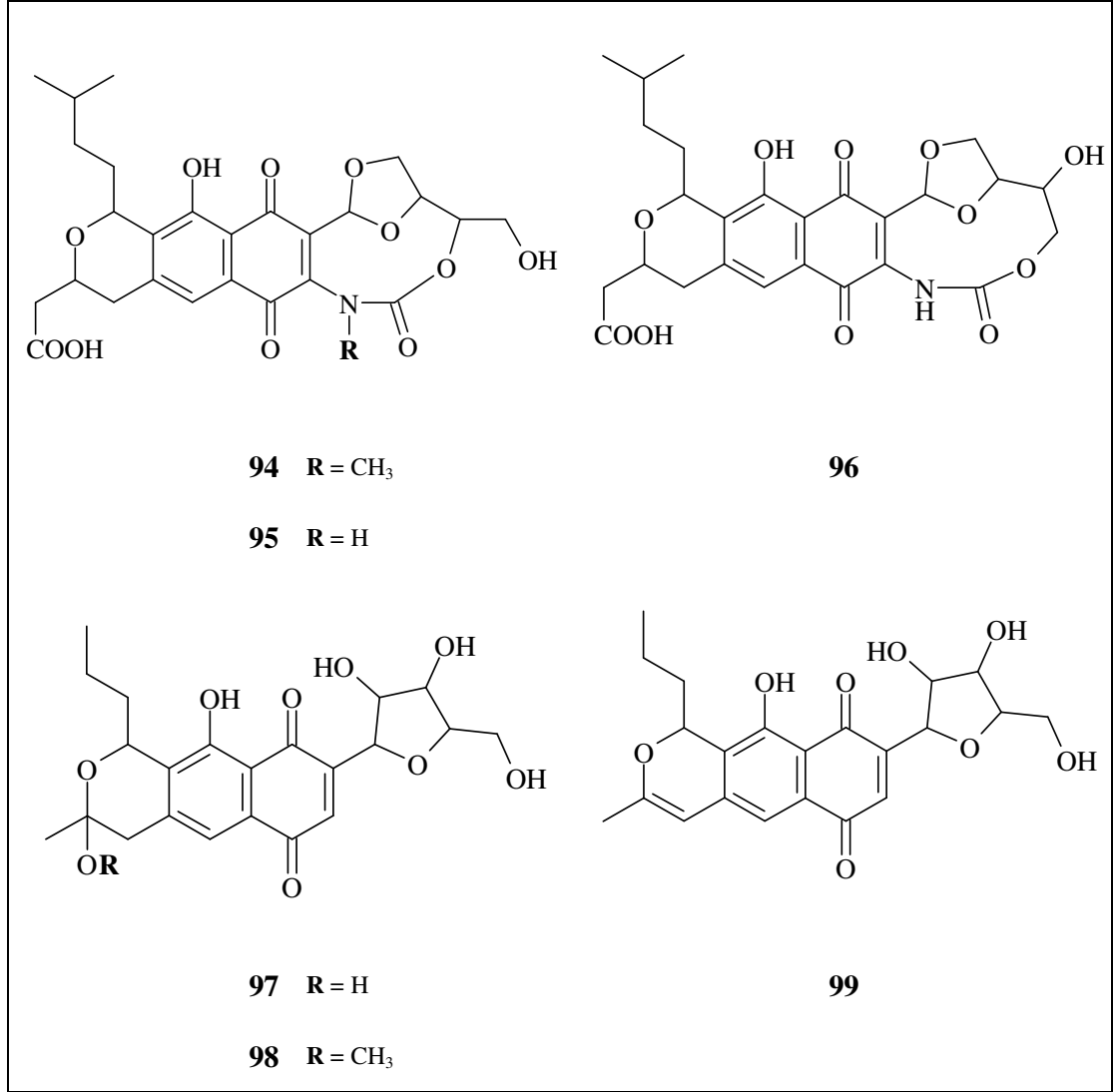


2.7.1.11. Polistiren Reçine Fermantasyonu ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması

Mikroorganizmanın büyümüş olduğu kültür ortamına tercihen büyüme fazının sonunda eklenen apolar karakterdeki XAD-16 veya XAD-1180 polistiren reçineleri kararsız ara ürünleri veya mikroorganizmanın ürettiği bir metabolitin üretimini uyarıcı bileşiklerin adsorpsiyonuna olanak sağlar.

Naftreanin ve nafteritrin bileşiklerini üreten *Streptomyces violaceus* Tü 3556 suşunun üretildiği kültür ortamına 36. saatten sonra XAD-1180 ilave edildiği zaman yeni seri nafteritrin A-C (**94-96**) bileşiklerini sentezlediği tespit edilmiştir. Ana bileşik olan nafteritrin A (**94**) ve B (**95**) Gram-pozitif bakterilere karşı biyolojik aktivite gösterirken mantarlara karşı zayıf bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir.¹⁶³

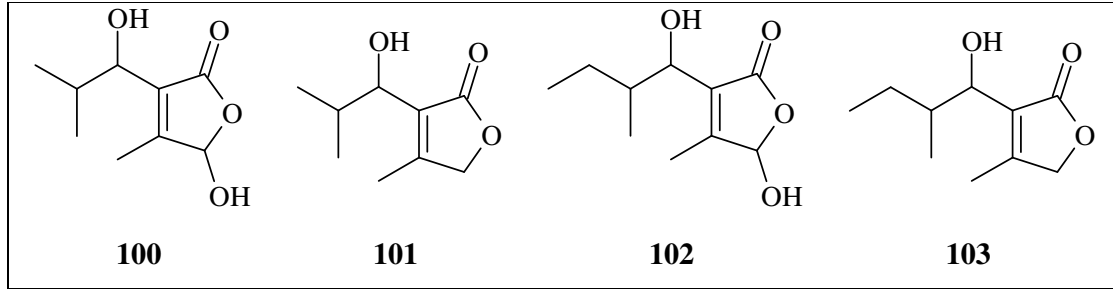
Aynı şartlar altında fermante edilen *Streptomyces exfoliates* Tü 1424'ün ürettiği eksfoliamisin (**97**), 3-O-metileksfoliamisin (**98**) ve anhidroeksfoliamisin (**99**) adındaki üç yeni naftokinon antibiyotiklerinin Gram-negatif bakterilere ve mantarlara karşı duyarlılık göstermezken Gram-pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır.^{164,165}



2.7.1.12 Fotoiletken Dedektörlü HPLC ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması

Fotoiletkenlik dedektörü UV spektroskopisinden tamamen farklı bir tanıma ünitesine sahiptir ve HPLC ile analiz edilecek mikroorganizma ekstraktları ve kültür filtratlarındaki yeni sekonder metabolitlerin tayinine olanak sağlamaktadır.

Nokardamine'in yanı sıra klorotirisin, juglomisin A ve B, ketomisin, nikkomisin Z (**28**) ve J bileşiklerini üreten *Streptomyces antibioticus* Tü 99 fotoiletkenlik dedektörlü HPLC ile yeniden taranmıştır. Bu metod ile Tü 99-1 (**100**), Tü 99-2 (**101**), Tü 99-3 (**102**) ve Tü 99-4 (**103**) olarak adlandırılan dört yeni bütenolid tayin edilmiştir. Bu bileşiklerin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı zayıf bir antibiyotik aktivite ve *Serratia marcescens*'ten elde edilen kitinaz enzimine karşı ise zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁶⁶

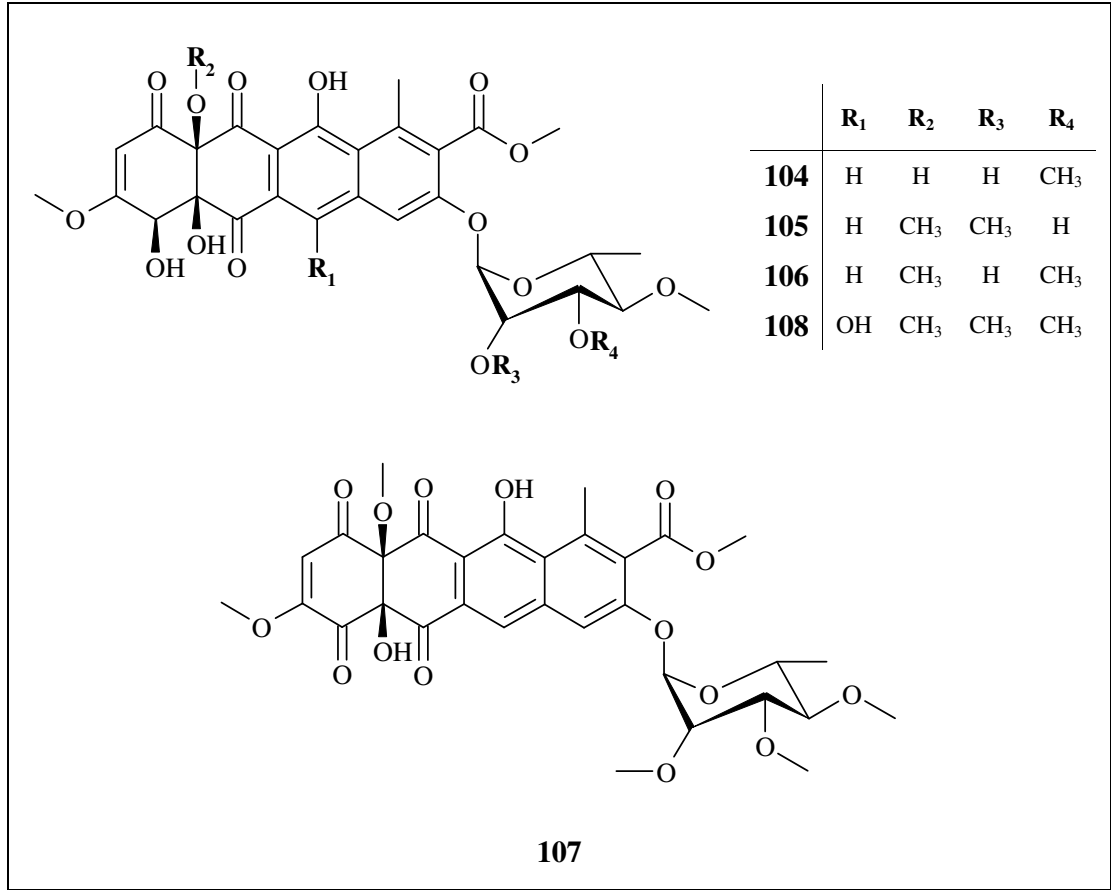


2.7.1.13 Diyot-Array Dedektörlü HPLC ile Yeni Sekonder Metabolitlerin Taranması

Bu metod klasik kimyasal tarama prosedürünün modifikasyonu olarak ortaya çıkmıştır. Günümüzde, bilgisayar destekli DAD ile kombine oldukça etkin ters faz HPLC (HPLC-DAD) tekniği, İTK ve renklendirici reaktiflerle yapılan kimyasal taramanın yerini almış durumdadır. Ticari olarak satılan antibiyotikler ve doğal bileşik kimyası alanında çalışan araştırma gruplarının aktinomiset suşlarının yeni izolatlarından elde ettikleri ham ekstraktlar ve kültür filtratlarından izole etmiş oldukları sekonder metabolitler, HPLC'de standardize edilebilmektedir. Referans ve biyolojik örneklerin UV-vis spektrumları ve alıkonma zamanları, HPLC-UV-vis veri bankalarının kütüphanelerinde kaydedilmiş durumdadır.¹¹⁷ Bu teknikten ilk olarak

biyosentetik metabolizmanın ara ürünlerinin tayini ile bloke mutantların karakterizasyonunda faydalanılmaktaydı ve 1990'dan beri yeni izole edilmiş mikroorganizmalardan yeni sekonder metabolitlerin belirlenmesinde kullanılan bir tarama metodu haline geldi.

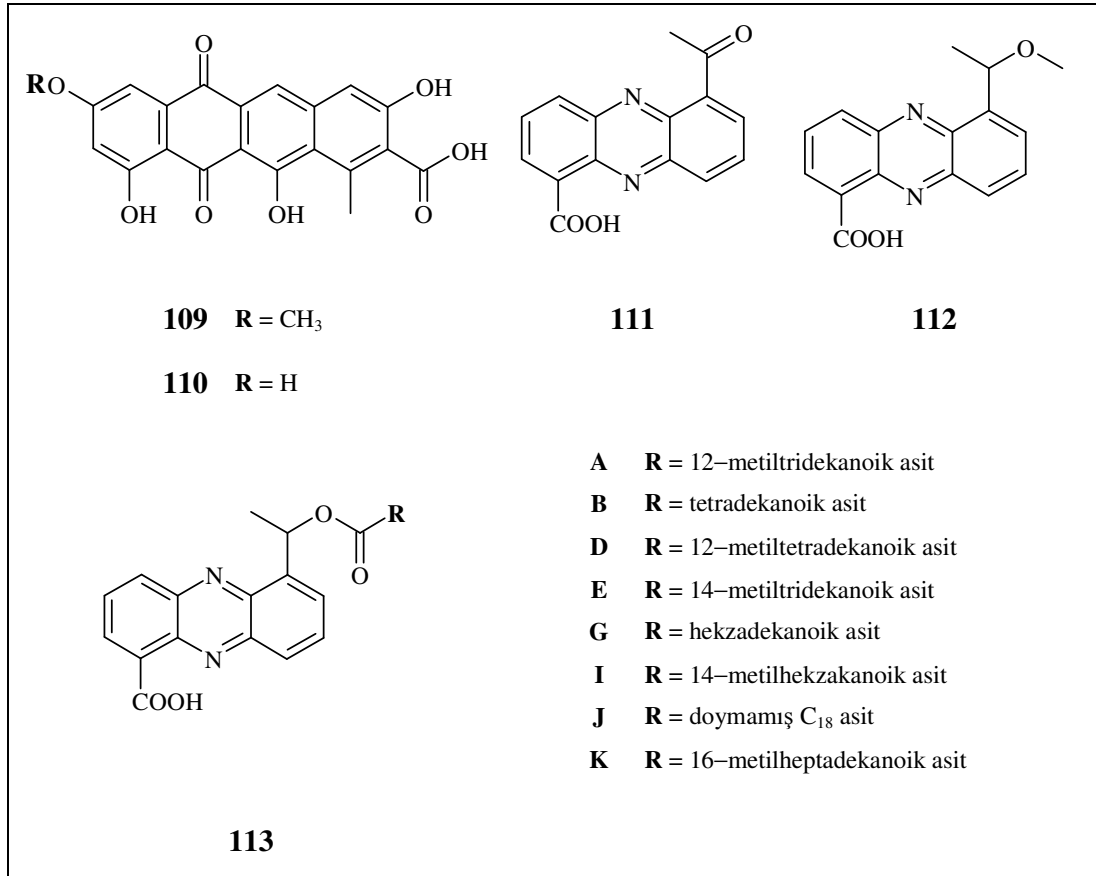
Streptomyces olivaceus Tü 2353'ün ham ekstraktından beş tane yeni bileşik olan elloramisin B-F (**104-108**), HPLC-DAD ile tayin edilmiş ve yapıları belirlenmiştir. Elloramisin'lerin tamamının *Streptomyces*'lere karşı güçlü aktivite gösterdiği bilinmektedir. Gram-pozitif bakterilere karşı daha az metillenmiş olan elloramycin B (**104**)'nin en iyi aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir.^{167,168}



Elloramisin bileşiklerini de üreten *Streptomyces olivaceus* Tü 2353-R'nin bloklanmış bir mutantından yeni tetrasenomisin B₃ (**109**) ve D₃ (**110**) bileşikleri izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Ana bileşik B₃ (**109**) Gram-pozitif ve Gram-negatif

bakterilere karşı antibiyotik olarak aktivite göstermezken D₃ (**110**) *Bacillus subtilis* ve *Arthrobacler aureescens*'e karşı orta düzeyde aktivite göstermektedir.¹⁶⁹

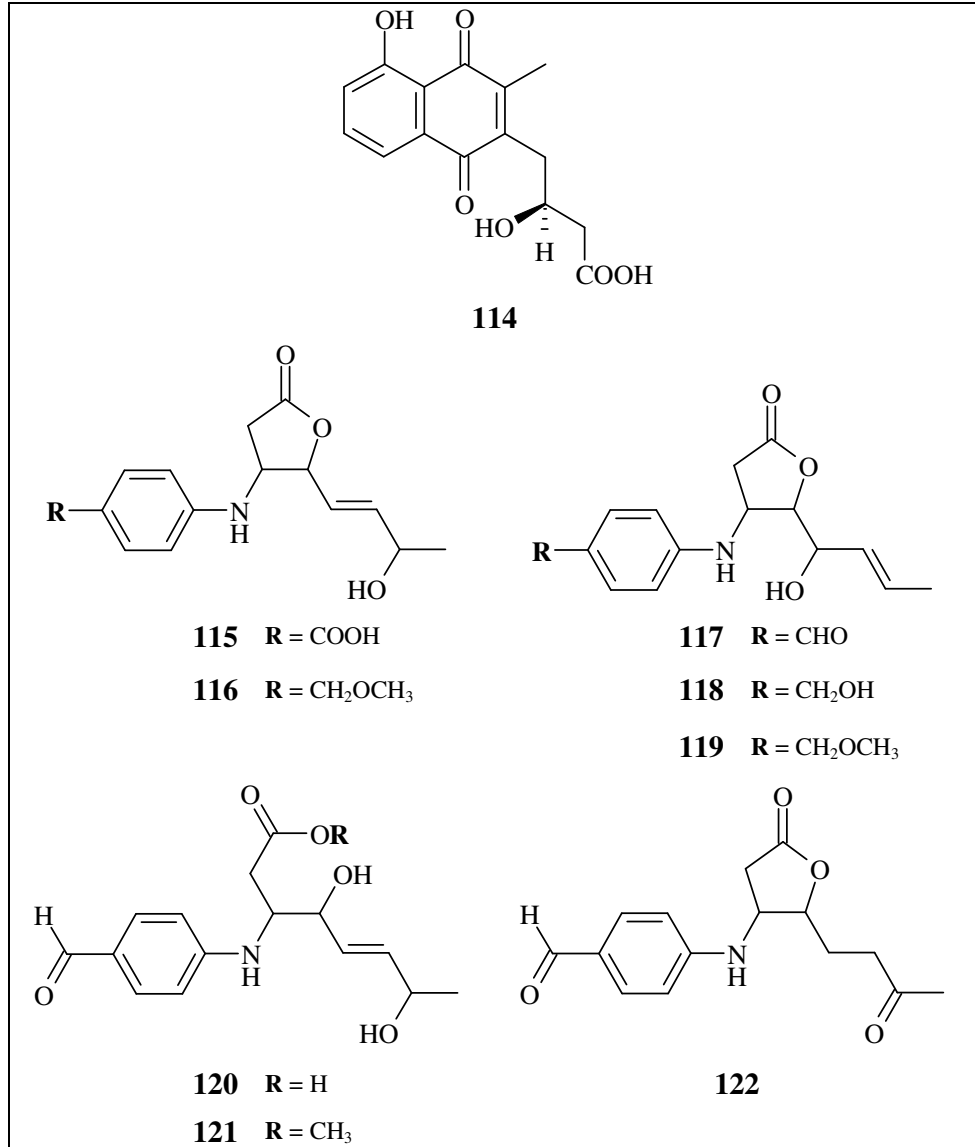
Yedi adet fenazin bileşiği *Streptomyces antibioticus* Tü 2706'dan izole edilmiştir. Safenamisin, safenik asit ve tubermisin B'nin haricinde üç yeni fenazin, 6-asetilfenazin-1-karboksilik asit (**111**), safenik asit metil eter (**112**) ve sekiz farklı yağ asiti esterinin bağlandığı bir safenil grubu (safenil yağ asidi esterleri (**113**)) HPLC-DAD ile tayin edilmiştir.¹⁷⁰



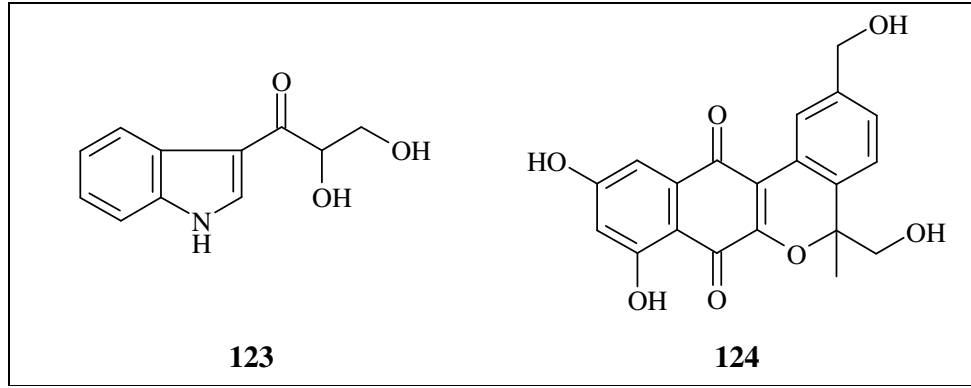
HPLC-DAD ile yapılan bir diğer başarılı çalışmada ise *Streptomyces tendae* Tü 901 mutantlarından yeni nikkomisin bileşikleri tanımlanmıştır. Nikkomisin'lerin biyosentetik yoluna yeni bakış açısı getirilmesinde ve yapı aktivite ilişkileri üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşmasına olanak sağlayan bu metod ile 20 yeni nikkomisin bileşiği tanımlanmıştır.¹⁷¹⁻¹⁷⁸ Nikkomisin bileşiklerini üreten *Streptomyces tendae* Tü 901 suşu modifiye edilmiş besiyeri ortamında üretildiğinde juglomisin grubunun bir

üyesi olan juglomisin Z (**114**)'yi sentezlemiştir. Bu gibi naftokinon antibiyotikler mayalara, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı biyolojik aktivite göstermektedir.¹⁷⁹

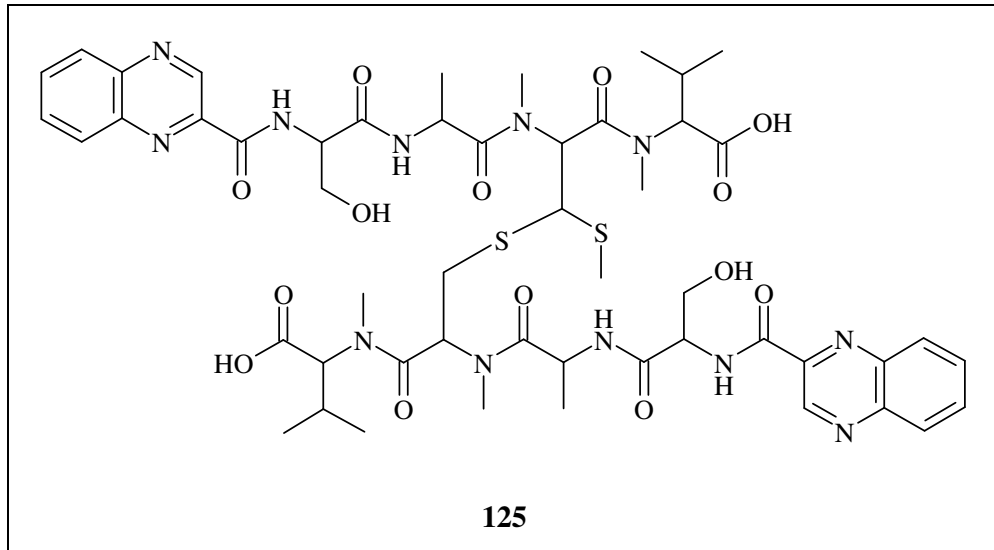
Streptomyces viridochromogenes Tü 2580'den ana bileşik olarak izole edilen obskurolid A₂ ve A₃'ün haricinde sekiz yeni obskurolid (A₁ (**115**), A₂ (**116**) B₂ (**117**), B₃ (**118**), B₄ (**119**), C (**120**), C₂ (**121**) ve D₂ (**122**)) izole edilerek tanımlanmıştır. Fosfodisterez aktivitesi deneylerinde en aktif obskurolid'in B₄ olduğu belirlenmiştir. Obskurolid'lerin tamamının bakteri, maya ve lifli mantarların büyümesi üzerine inhibe edici herhangi bir etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.^{153,180}



Naftgeranın üreten *Streptomyces violaceus* Tü 3556'dan tubermisin B ve 1-fenazinkarboksilat'ın yanı sıra daha önce doğal ürün olarak izole edilmemiş olan 1-(3-indolil)-2,3-dihidroksiopropan-1-on (**123**) ile naftgeranın F (**124**) bileşiği de izole edilmiştir. Naftgeranın F (**124**), naftgeranın C gibi Gram-pozitif bakterilere karşı benzer bir antibakteriyel aktivite gösterirken, 1-(3-indolil)-2,3-dihidroksiopropan-1-on (**123**) ise herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir.¹⁸¹



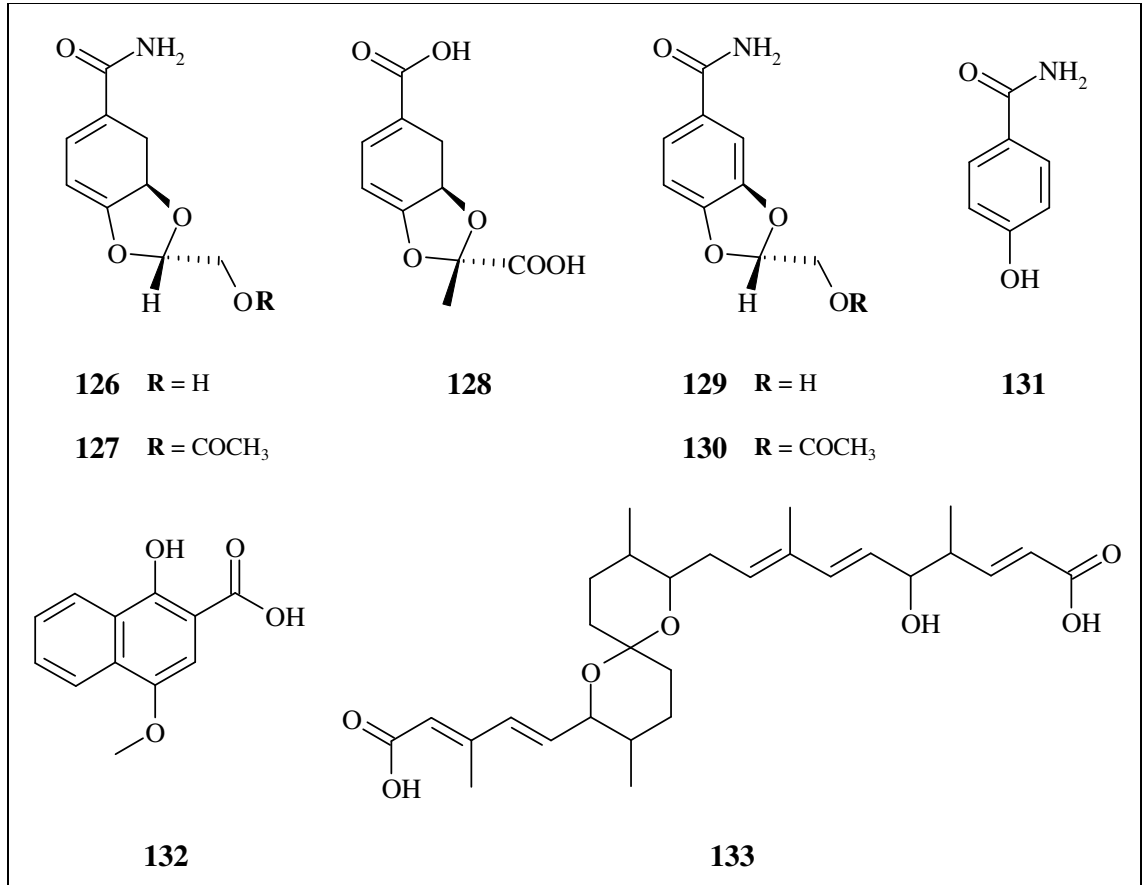
Kinoksalin grubu antibiyotiklerin yeni bir üyesi olan echinoserin (**125**) *Streptomyces tendae* Tü 4301 şuşundan izole edilerek tanımlanmıştır. Bu yeni bileşik echinomisin'in asiklik bir formudur fakat biyosentetik bir öncü madde değildir. Echinoserin (**125**), echinomisin'den daha düşük antibiyotik aktivitesi göstermektedir.¹⁸²



Yeni bir sınıf sekonder metabolit olan dioksolid (dioksolid A (**126**), B (**127**) D (**128**) dehidrodioksolid A (**129**) ve B (**130**))'ler *Streptomyces tendae* Tü 4042'nin kültür filtratlarından izole edilerek tanımlanmıştır. Alışlagelmişin dışında süstitüe olmuş dioksolan halkası içeren dioksolidlerin yanında doğal bir ürün olarak daha önce tanımlanmamış olan para-hidroksibenzamid (**131**)'de tayin edilmiştir. Bu bileşiklerin hiçbirinin Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilere, maya ve lifli mantarlara karşı herhangi bir biyolojik aktivite göstermedikleri belirlenmiştir.¹⁸³

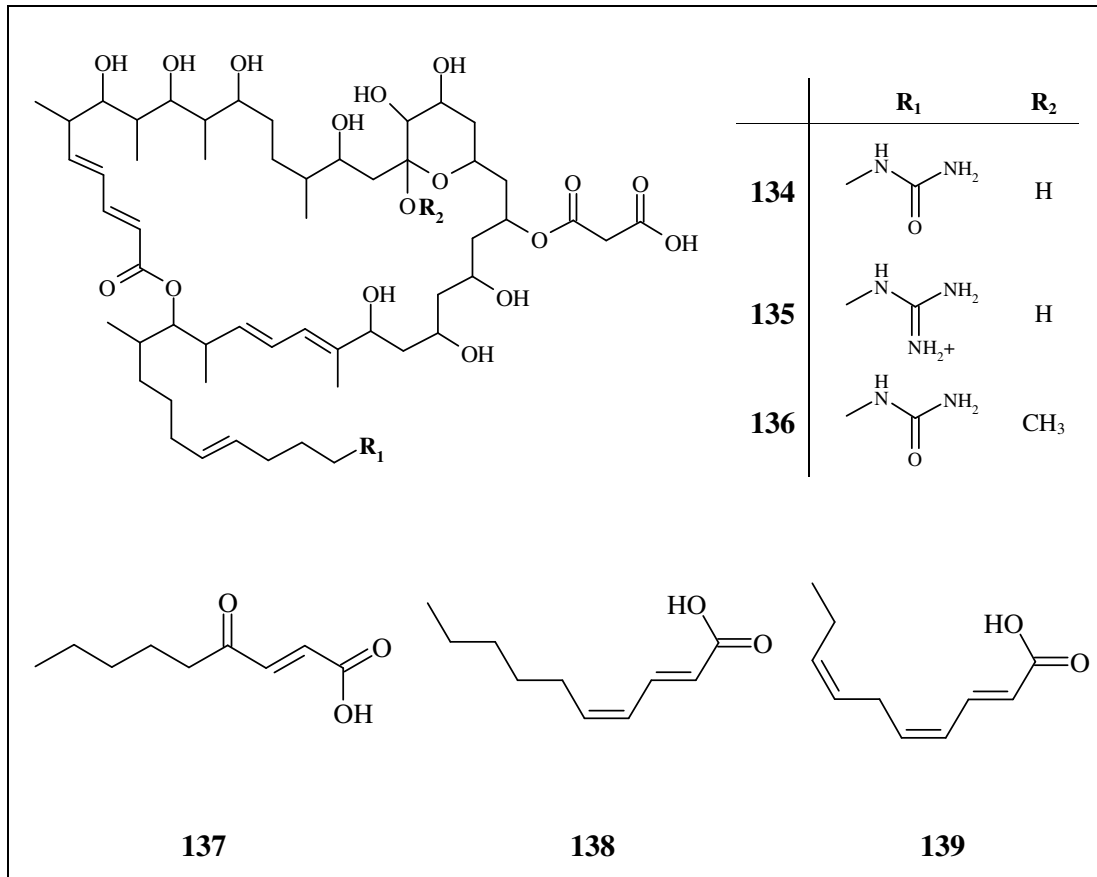
Streptosporangium cinnabarinum ATCC 31213'den izole edilen ve *Lemna minor*'e karşı herbisidal aktivite gösteren 1-hidroksi-4-metoksi-2-naftoik asit (**132**) HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen diğer bir yeni bileşiktir.¹⁸⁴

Yeni bir sekonder metabolit olan spirofungin (**133**) *Streptomyces violaceusniger* Tü 4113 suşunun kültür filtratından saflaştırılmıştır. Poliketit-spiroketal yapısına sahip bu bileşik özellikle mayalar olmak üzere çeşitli antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.¹⁸⁵



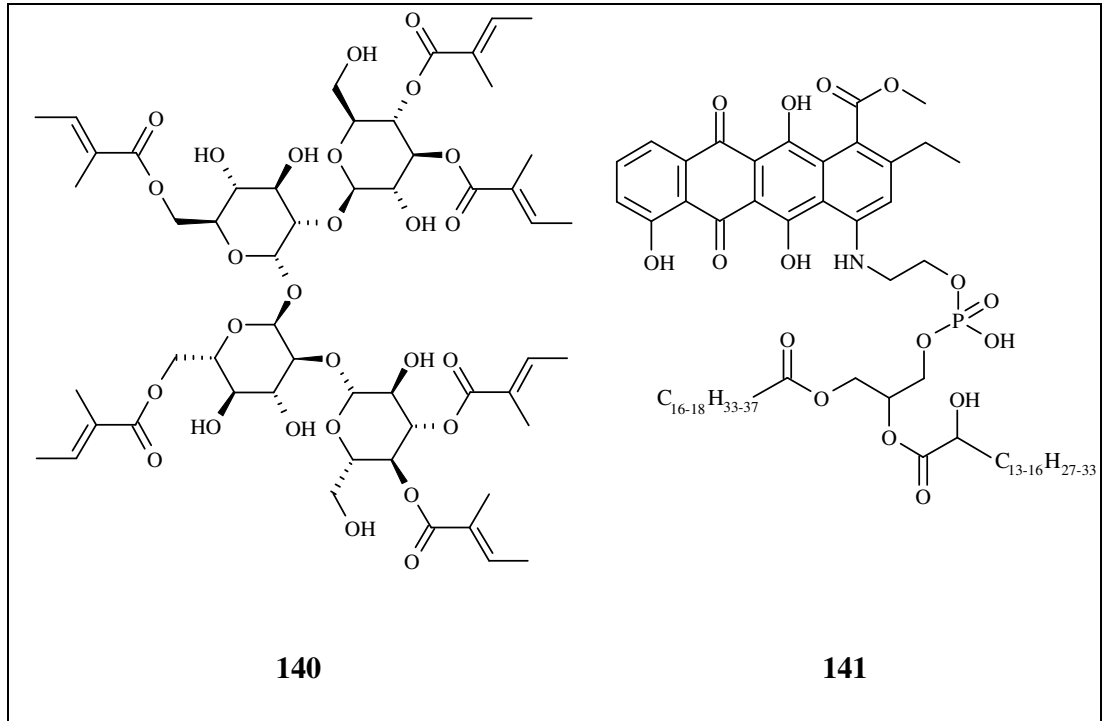
Yeni bir grup olan, 36 üyeli poliol makrolid antibiyotikler olarak kanchanamisin A (**134**), C (**135**) ve D (**136**) *Streptomyces olivaceus* Tü 4018 suşundan izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin antibakteriyel, antifungal etki gösterdikleri ve özellikle *Pseudomonas*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir.^{186,187} Aynı suştan izole edilen ve bir yağ asidi olan (*E*)-4-oksonon-2-enoik asit (**137**) özellikle *Staphylococcus aureus* olmak üzere değişik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat *Paecilomyces variotii* hariç diğer mantarlara ve mayalara karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir.¹⁸⁸

Streptomyces viridochromogenes Tü 6040'ın kültür filtratından (*2E,4Z*)-dekadienoik asit (**138**) ve (*2E,4Z,7Z*)-dekatrienoik asit (**139**) ilk kez doğal ürün izole edilmiştir. Bu yağ asitlerinin *Lemna minor* ile *Lepidium sativum*'a karşı güçlü herbisidal aktivite göstermiş oldukları saptanmıştır.¹⁸⁹

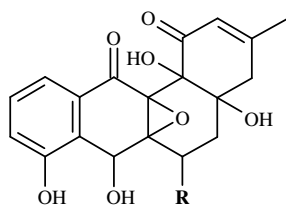


Amycolatopsis sp. NN0 21702 şuşundan tiglolanmış tiglolid (**140**) adında yeni bir bileşik bulunmuştur. Bu sekonder metabolit daha öncesinde aktinomiset şuşlarından izole edilmeyen alışılmışın dışında bir yapısal özellik sergilemektedir. Yapılan biyolojik aktivite denemelerinde herhangi bir biyolojik aktivitesine rastlanmamıştır.¹⁹⁰

Nonomuria sp.'nin misel ekstraktlarının HPLC-DAD ve HPLC-ESI-MS yardımıyla yapılan taramalarında mavi renkli sekonder metabolit olan kyanomisin (**141**) belirlenmiştir. Antrasiklin-fosfotidiletanolamin hibridi olan bu yapı oldukça zayıf antimikrobiyal aktivite sergilemiştir.¹⁹¹

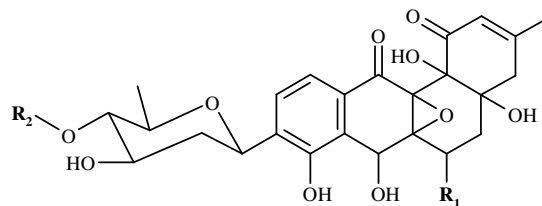


Yeni bir grup olan simosiklinonlar *Streptomyces antibioticus* Tü 6040'ın fermantasyonu sırasında izole edilerek tanımlanmıştır. Bu grup, yeni doğal hibrid poliketit antibiyotiklerden olup tetraen yan zincirli olağan dışı angusiklinon halkası ve bir kumarin halkası içermektedir. UV-vis spektrumları göz önüne alındığında simosiklinon A (**142**), B (**143**), C (**144**) ve D (**145**) serilerine ayrıldığı belirlenmiştir. D (**145**) serisinde yer alan bileşiklerin Gram-pozitif bakterilere ve bazı tümör hücrelerine karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir.¹⁹²⁻¹⁹⁵



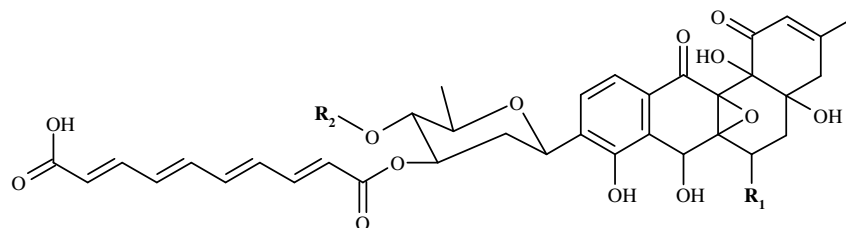
| | R |
|----|----|
| A1 | H |
| A2 | OH |

142



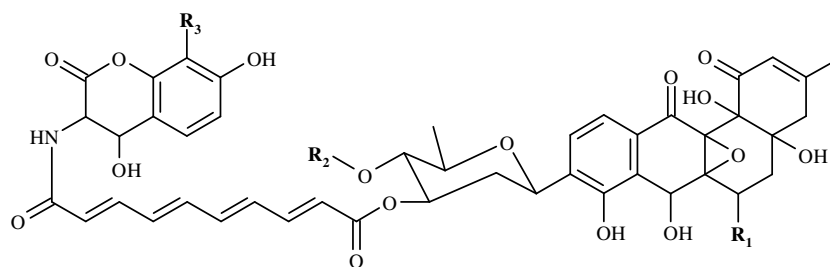
| | R ₁ | R ₂ |
|----|----------------|-------------------|
| B1 | H | H |
| B3 | OH | H |
| B4 | OH | COCH ₃ |

143



| | R ₁ | R ₂ |
|----|----------------|-------------------|
| C2 | OH | H |
| C3 | H | COCH ₃ |
| C4 | OH | COCH ₃ |

144



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|----|----------------|-------------------|----------------|
| D2 | OH | H | H |
| D3 | H | COCH ₃ | H |
| D4 | OH | COCH ₃ | H |
| D6 | OH | H | Cl |
| D7 | H | COCH ₃ | Cl |
| D8 | OH | COCH ₃ | Cl |

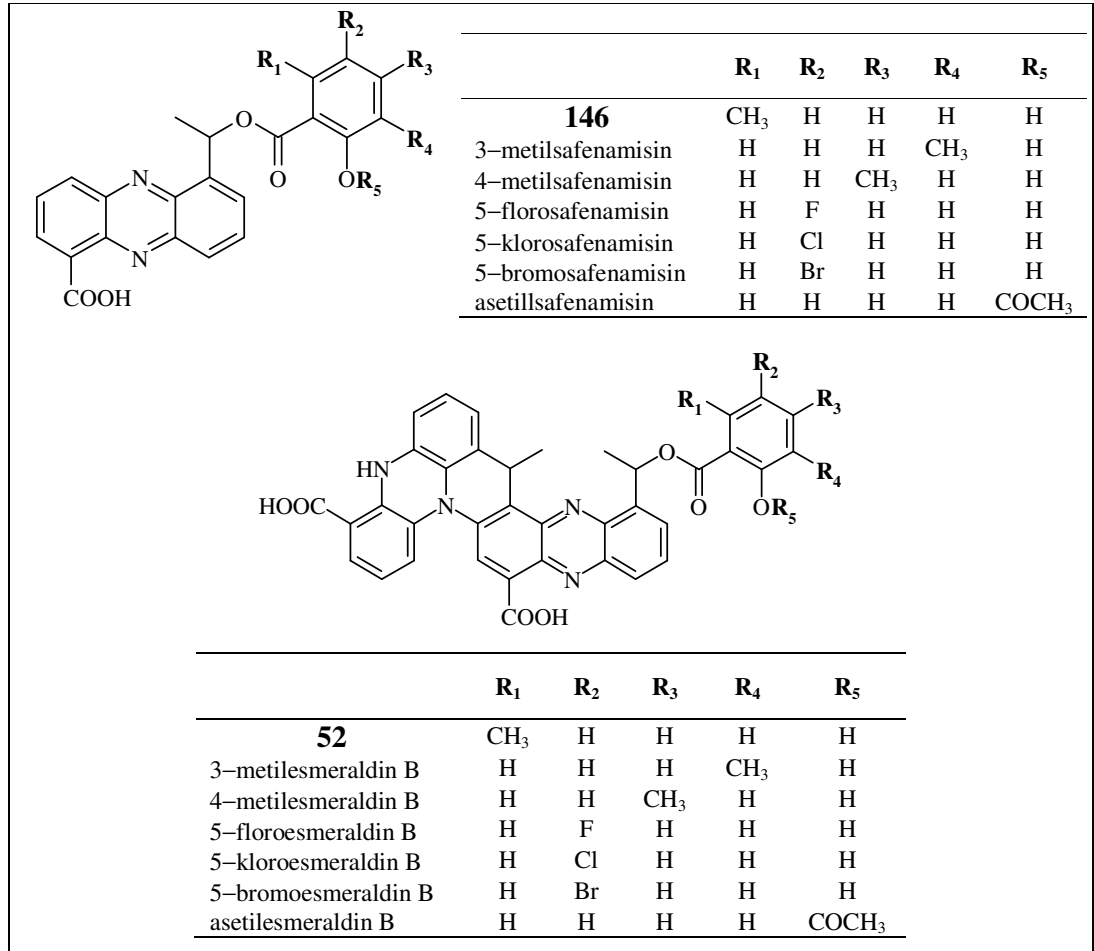
145

2.7.2. Yönlendirilmiş Fermantasyon ile Yapısal Çeşitliliğin Artırılması

2.7.2.1. Safenamisin ve Esmeraldin'lerin Biyomodifikasyonu

Streptomyces antibioticus Tü 2706, antibakteriyel ve antitümör aktivite gösteren ve bir fenazin bileşiği olan safenamisin (**146**) ile sitotoksik aktivite gösteren esmeraldin B (**52**)'yi üretmektedir. Esmeraldin, bir molekül safenik asit ve bir molekül safenamisin'in kondensasyon ürünüdür. Safenamisin, safenik asidin metilsalisilik esteri olduğu için esmeraldin B (**52**)'de aynı metilsalisilik asit yan zincirini içermektedir. Tü 2706 suşu fermantasyon sırasında metilsalisilik asitin türevleriyle beslendiğinde yan zinciri modifiye olmuş esmeraldinler ve safenamisinleri ürettiği belirlenmiştir.

Asetilsalisilik asit, 3-metilsalisilik asit, 4-metilsalisilik asit, 5-florosalisilik asit, 5-klorosalisilik asit ve 5-bromosalisilik asit ile besleyerek yapılan biyomodifikasyon sonucunda altı yeni safenamisin ve altı yeni esmeraldin bileşiği tayin edilmiştir.¹⁹⁶

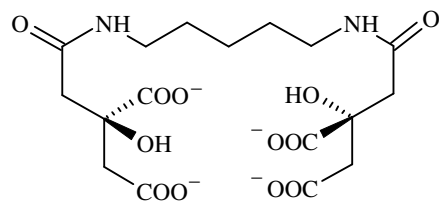


Sefanamisin türevlerinin tamamının değişik oranlarda antibakteriyel etki göstermesine rağmen sadece 4-metilsafenamisin'in, safenamisin (**146**) kadar yüksek aktiviteye sahip olduğu ve üriner mesane karsinoma hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerinin safenamisin (**146**)'den daha düşük olduğu belirlenmiştir. 4-metil- ve 5-floro-esmeraldin B'nin, esmeraldin B (**52**)'ye nazaran daha geniş spektrumlu ve daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Tümör hücrelerine karşı ise 5-metilesmeraldin B'nin, esmeraldin B (**52**)'den daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁹⁶

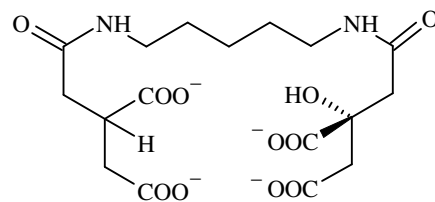
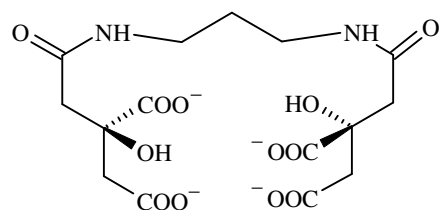
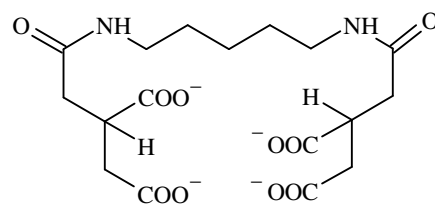
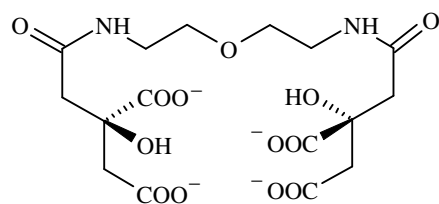
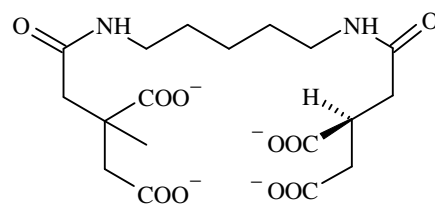
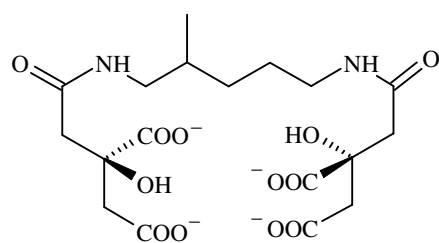
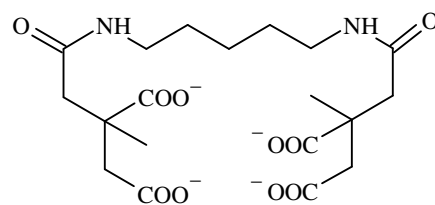
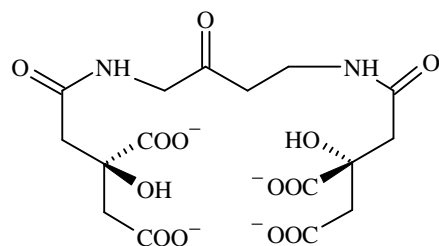
2.7.2.2. Rizoferrinlerin Biyomodifikasyonu

Rizoferrin (**38**), 1,4-diaminobutan üzerinden iki amit bağı ile iki molekül sitrik asidin bağlı olduğu basit bir molekül olmasına rağmen oldukça iyi metal bağlama özelliği ve değişik mikroorganizmalar tarafından kolayca parçalanabilmesinden dolayı biyoteknolojide uygulama potansiyeline sahiptir. *Cunninghamella elegans* mantarının rizoferrin (**38**) üreten biyosentetik enzimlerinin, farklı zincir uzunluğuna sahip diamin bileşikleriyle modifiye sitrik asit moleküllerinin kondensasyonu üzerine spesifik etkisi araştırılmıştır. Diamin iskeletinin zincir uzunluğundaki değişikliklerin enzimler tarafından yeteri kadar ve β -pozisyonundaki fonksiyonel gruplardaki farklılığın ise kabul edilebilir düzeyde tolere edildiği anlaşılmıştır. Bununla birlikte α -amino asitlerin kullanılmasının mümkün olmadığı gözlemlenmiştir. Stafilokok tarafından üretilen stafiloferrin A (**35**)'nin biyosentezinin rizoferrin (**38**)'in biyosentezinden farklı olduğu düşünülmektedir. *Cunninghamella elegans*'ın ne D-ornitin ile beslenmesinin ne de ornitin dekarboksilaz enziminin inhibe edilmesinin stafiloferrin A biyosentezine neden olmadığı anlaşılmıştır. Yönlendirilmiş fermantasyon tekniği ile *Cunninghamella elegans* mantarının diamin grubundaki farklılıklara göre sentezlediği A serisinin (**147**)'de beş farklı bileşiğin olduğu ve 1,5-diaminopentan üzerinden farklı tür sitrik asit moleküllerinin bağlı olduğu B serisinin (**148**)'de ise dört farklı rizoferrin bileşiğini sentezlediği belirlenmiştir. Elde edilen bütün rizoferrin türevlerinin benzer demir şelatlama kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.¹³¹

147

**Homorizoferrin**

148

**Monodesokzirizoferrin****Norrizoferrin****Didesokzirizoferrin****Okzahomorizoferrin****Monometilmonodesokzirizoferrin****2-Metilhomorizoferrin****Dimetildidesokzirizoferrin****2-Okzorizoferrin**

2.8. DEREPLİKASYON KONSEPTİ

Modern metodların var olmasına rağmen, doğal bileşiklerin izolasyonunun ve yapılarının aydınlatılmasının zaman alıcı ve de pahalı işlemler dizini gerektirdiği oldukça açıktır. Bilinen bileşikler ile bilinmeyenleri ayırt edebilmek için “*dereplikasyon*” önemli bir aşamadır ve bilinen bileşiklerin bu sürecin ilk aşamalarında süreç dışı bırakılmasına yardımcı olmaktadır.

Bu metodun temel prensibi karışım içerisindeki bileşenlerin verilerinin literatürlerdeki benzer saf metabolitlerin verileri ile karşılaştırmaktır. İşlem UV veya MS verileri ve HPLC alıkonma zamanlarının uygun referans verileri ile karşılaştırılması temeline dayanmaktadır.¹¹⁷ Referans verilerini oluşturmak için güvenilir örnek var ise, bu metodla sadece az miktarda örnek ile tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek mümkün olabilmektedir. Eğer bilinen analoglardaki benzer kromoforlar ve fragmentler taranan metabolitte mevcutsa, UV verileri ve MS fragmentlerinden bilinmeyen metabolitin tanımlanmasında faydalanılabilir. Bakterilerden izole edilen 1000’den fazla bileşiğin ESI–MS/MS verilerinin bulunduğu veri tabanları mevcuttur. Bakteri kültürlerinden elde edilen ham ekstraktlardaki bilinen doğal bileşikler bu metod yardımıyla kolayca elimine edilebilir. Bu metodların uygulanması yeni biyolojik ve farmakolojik olarak aktif maddelerin bulunmasında oldukça önemlidir.

Tam bir örnek seti elde etmek ve bütün deneysel işlemleri aynı şartlar altında gerçekleştirmek pek mümkün olmadığı için, literatürlerdeki referans verilerinin kullanılması zorunludur. Eğer 1 boyutlu NMR (1D NMR) verileri mevcutsa veritabanı araştırmasından faydalanılarak yapı aydınlatılabilir. Bu durumda maddenin yeteri kadar saf olması gerekmektedir.

Veritabanları ile UV, NMR verileri ve moleküllerle ilgili diğer bilgiler bilgisayar yardımıyla karşılaştırılabilir.¹⁹⁷ Doğal bileşiklerin verilerinin bulunduğu en kapsamlı kaynak, bitkiler dahil tüm doğal kaynaklardan elde edilen metabolitlerle ilgili bilgileri içeren “Doğal Ürünler Sözlüğü” (DNP “Dictionary of Natural Products”)’dür.⁹⁴ Georg–August Üniversitesi Göttingen/Almanya’da Prof. Dr. Hartmut LAATSCH tarafından hazırlanan “AntiBase” veritabanı mikrobiyal ürünlerden elde edilen metabolitlerin dereplikasyon işleminde hızlı ve güvenli bir şekilde kullanılmaktadır.⁹³ Yeni bir bileşik bulunması durumunda veritabanı kullanılarak, bulunan bileşiğin hangi bileşik sınıfına ait olduğu veya nasıl bir molekül iskeletine sahip olduğuna dair oldukça

yararlı ve yol gösterici bilgilere ulaşılabilir. Son olarak Chemical Abstract (CA) dünya çapında verilerin bulunduğu en kapsamlı veri bankasıdır ve nihayetinde bulunan yapının gerçekten yeni olup olmadığına burada yapılacak tarama ile karar verilebilir. Teknik nedenlerden ötürü ana yapının küçük fragmentlerinin araştırılması mümkün değildir.

HPLC–NMR ve HPLC–MS/MS dedeksiyon metodlarındaki güncel gelişmeler son zamanlarda ham bitki ekstraktlarının, biyolojik matrikslerin ve su altı mikroorganizmalarından elde edilen ekstraktların taranmasında yeni stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bileşiklerin çoğu termal olarak kararlı olduğundan dolayı HPLC–ESI–MS/MS tekniği, çok bileşenli bir karışımda yüksek seçicilik ve duyarlılıkla bilinen moleküllerin tanımlanmasında seçilecek metod olarak yerini almıştır.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Saf bileşiklerin mutlak konfigürasyonunu “circular dichroism” (CD) spektroskopisi ile teyit etmek mümkündür.²⁰¹

2.9. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Streptomyces türleri aerobik ve Gram-pozitif saprofitler olup, yoğun olarak vejetatif ve hava miselleri meydana getirmektedirler. Kompleks bir yaşam döngüleri vardır. İyi üreme koşullarında funguslardakine benzer bir şekilde çok hücreli geniş miseller oluştururlar. Besin yetersizliği gibi stres koşullarında bu vejetatif miseller (substrat miselleri) farklılaşarak hava misellerini meydana getirirler.³⁴ Farklılaşmanın bir sonraki adımında, hava misellerinden bölmelerin oluşması ile karakteristik uzun artrospor zincirleri meydana gelir.²⁰² Henüz tanımlanmayan bir sinyal yardımıyla sporlar yeniden germine olmaya başlar.³⁴

Aktinomisetler, doğal polimerleri parçalama yeteneklerinden ötürü toprak ekolojisinde önemli bir rol oynarlar. Mezofilik ve termofilik aktinomisetler, parçalayabilecekleri selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi bitki polimerlerinin bulunduğu bölgelerde oldukça aktiflerdir. Topraktaki diğer yararlı aktiviteleri ise fungal hastalıklara karşı aktivitelerinin olmasından dolayıdır. Kök çevresi (rizosfer)’nde bulunan aktinomisetlerin gerek kalitatif gerekse kantitatif olarak önemli olduğu ve bitki köklerini patojenlerin istilasına karşı koruduğu gösterilmiştir.²⁰³

Şimdiye kadar keşfedilmiş doğal antibiyotiklerin çoğu aktinomisetler tarafından üretilmiş olup bu kullanışlı antibiyotikler için taramalar hala devam etmektedir.²⁰⁴ Aktinomisetler içerisinde *Streptomyces* cinsinin türleri geniş varyetede ve mükemmel kapasitede biyoaktif madde üreticisi olarak dikkat çekmektedirler. Bu nedenle nadir bulunan ve yaygın olmayan *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ve teşhisi doğal ürünlerin keşfinin çok önemli bir parçasıdır.²⁰⁵ 16S rRNA genlerinin sekans verileri *Streptomyces*'lerin sistematüğinde çok değerli bir öneme sahiptir ve yeni izole edilen *Streptomyces* türlerinin teşhisinde yoğun olarak kullanılmaktadır.²⁰⁶ *Streptomyces griseus* tarafından üretilen ve tüberküloza karşı etkili olan streptomisin, *Streptomyces antibioticus*'un ürettiği oleandomisin *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından sentezlenen antimikrobiyal bileşiklerden bazılarıdır. Ayrıca *Streptomyces peuceticus*'un ürettiği daunomisin (6), *Streptomyces verticillus*'un ürettiği bleomisin A₂ (7) ve *Streptomyces avermitilis* tarafından üretilen avermektin antitümör etkileri olduğu bilinen biyoaktif bileşiklerdir.

Topraktan izole edilen ve 16S rRNA genleri kullanılarak teşhis edilen *Streptomyces* sp. US24'ün Gram-pozitif ve -negatif bakterilere karşı güçlü inhibisyon etkisi gösteren iki bileşik ürettiği tespit edilmiştir. En yüksek antibakteriyel aktivite, eser minerallerin varlığında ve tek karbon kaynağı olarak % 1 nişasta içeren besiyerinde gözlemlenmiştir. Bu izolatanın, niddamisin ve selestisetin üreten *Streptomyces caelestis* ile % 98 homoloji göstermesine rağmen, ürettiği iki aktif molekülün bu antibiyotiklerden farklı olduğu bulunmuştur. Bileşikler ekstrakte edilip, kolon kromatografisi ile ayrıldıktan sonra, aktif fraksiyonlar HPLC ile fraksiyonlandırılmış, farklı pikler veren bileşikler ayrı olarak toplanarak antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Proton NMR spektrumlarından yola çıkarak bu bileşiklerin poliketid olabileceği düşünülmüştür.²⁰⁷

2005 yılında yapılan bir çalışmada, araştırmacılar topraktan izole ettikleri yeni bir aktinomiset türü olan *Streptomyces* sp. strain US80'in ürettiği antibakteriyel ve antifungal bileşiklerini incelemişlerdir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi, besiyerine magnezyum iyonları ekledikleri ve tek karbon kaynağı olarak % 1 konsantrasyonunda glukoz kullandıkları zaman elde etmişlerdir. US80 türüne ait 3 tane antimikrobiyal molekül saflaştırılıp; IR, ESI-MS, ¹H ve ¹³C/APT NMR teknikleri kullanılarak yapıları aydınlatılmıştır. Irumamisin, X-14952 B ve 17-hidroksi-venturisidin A olarak

isimlendirilen bu bileşiklerin test edilen iki filamentli mantar (*Verticillium dahliae* ve *Fusarium* sp.) ve *Candida tropicalis*'in üremelerini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunların yanısıra bileşiklerin, Gram-pozitif bakteriler olan *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon aktiviteleri olduğu bulunmuştur.²⁰⁸

Deniz organizmaları ile beraber yaşayan aktinomisetlerin antitümör ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada; izole edilen aktinomisetler içerisinde en fazla antimikrobiyal ve antitümör aktiviteyi *Streptomyces* cinsine ait türlerin gösterdiği bulunmuştur.²⁰⁹

Topraktan izole edilen *Streptomyces violaceusniger*'in fenotipik grubuna giren tüm üyelerinin, denenen tüm Gram-pozitif bakterilere, mayalara ve filamentli mantarlara karşı geniş spektrumda bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha da fazlası bu izolatların antitümör aktivitesinin kolon karsinom hücrelerine karşı da % 68 olduğu bulunmuştur. Hayakawa ve arkadaşları aynı çalışmada izole ettikleri 102 tane *Streptomyces violaceusniger* türünün *in vitro* antitümör aktivitelerini test etmişlerdir. Bunlardan % 67'sinin kolon karsinom hücreleri olan HCT-116'ya karşı inhibisyon aktivitelerinin olduğunu belirlemişlerdir.²¹⁰

Cao ve arkadaşları (2004) domatesin kökünden izole ettikleri *Streptomyces* türlerinin antimikrobiyal aktivitelerini test etmişler elde ettikleri türlerin % 21'inin antibakteriyel % 41'inin ise antifungal metabolitler ürettiğini tespit etmişlerdir. Özellikle *Streptomyces* sp. strain S30'un domates fidelerini *Rhizoctonia solani* patojenine karşı koruduğunu bulmuşlardır.²¹¹

Yeni bir antibiyotik olan "naftokinon", bir kızılgağaç türü olan *Alnus glutinosa*'nın nodüllerinden izole edilen bir *Streptomyces* türünden elde edilmiş olup, Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir.²¹²

Chu ve arkadaşları (2001), bir *Streptomyces* türünden, yalnızca prokaryotlarda bulunan ve görevi yeni sentezlenen proteinin N-terminalinden formil grubunu uzaklaştırmak olan "bakteriyel peptid deformilaz (PDF)" enzimini inhibe eden yeni iki metabolit elde etmişlerdir. *Streptomyces* fermantasyon kültürlerinden izole edilip yapıları aydınlatılarak biyolojik aktiviteleri tespit edilen bu yeni deformilaz inhibitörleri Sch382582 ve Sch382583 olarak isimlendirilmiştir.²¹³

2005 yılında yapılan başka bir çalışmada, izole edilen ve yeni bir tür olarak karakterize edilen *Streptomyces psammoticus*'un, SBR-22 olarak adlandırılan ve

metisiline dirençli *S. aureus*'lara karşı antibakteriyel etki gösteren bir poliketid antibiyotik ürettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada antibiyotik üretimi için kültür koşulları optimize edilerek, üreme ve antibiyotik üretimi için glukozun en iyi karbon, amonyum nitratın da en iyi azot kaynağı olduğu tespit edilmiştir.²¹⁴

Fas'tan farklı habitatlardan (endemik bitki kökleri, Atlas dağı, Sahara kumu, nehir, göl, deniz suyu, sediment, gübre ve atık su) izole edilen 320 aktinomiset türünden 32'sinin maya, mantar ve bakteriler üzerine güçlü antimikrobiyal etkileri olduğu gösterilmiştir. Aktif türlerin % 40'nın iki endemik bitkinin rizosferindeki topraklardan olduğu tespit edilmiştir. Özellikle polienik olmayan antifungal metabolitler üzerine gidilerek bunların sferoplast rejensyonu, ergosterol inhibisyonu ve UV-vis spektrum özellikleri araştırılmıştır. Bu strateji kullanılarak seçilen 10 izolatan *Streptomyces* cinsine dahil olduğu bulunmuş olup, aktivite spektrumlarına bakıldığında tüm izolatlar tarafından üretilen aktif bileşiklerin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.³¹

2005 yılında Mısır'da yapılan bir çalışmada; su, toprak ve ağaç kabuğundan izole edilen 25 aktinomiset türünün Gram-pozitif ve -negatif bakteriler, mayalar ve filamentli mantarlar üzerine antibakteriyel etkileri incelenmiştir. İzolatlardan 14'ünün test edilen bakterilerden en az biri üzerine antibakteriyel, ikisinin ise antifungal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA genleri kullanılarak yapılan teşhis çalışmalarında izolatların % 93'ünün *Streptomyces* cinsine % 7'sinin ise *Actinomadura* cinsine dahil olduğu bulunmuştur.²²

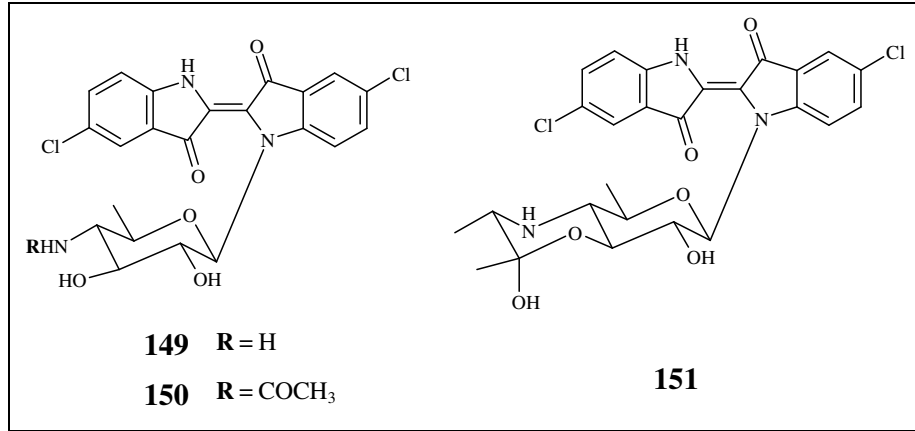
Bitki dokularından endofitik aktinomisetlerin izolasyonunun yapıldığı bir çalışmada, izolatların yaygın olarak *Streptomyces* cinsine dahil olduğu ve iki bitki patojeni fungus olan *Colletotrichum musae* ve *Fusarium oxysporum*'un üremelerini büyük ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir.²¹⁵

2004 yılında yapılan bir çalışmada topraktan izole edilen *Streptomyces hygrosopicus*' un kültür filtratlarının etil asetat ekstraktlarından 3 yeni amid [N-salicyloyl-2-aminopropan-1,3-diol, 1-acetyl-N-salicyloyl-2-aminopropan-3-ol ve N-salicyloyl-2-aminopropan-1-ol] izole edilmiştir. 1D ve 2D NMR ve MS spektrum verilerinin yorumlanmasıyla yapıları aydınlatılan bileşiklerin Gram-negatif ve -pozitif bakterilere karşı çok güçlü antibakteriyel etkisi olduğu gösterilmiştir.²¹⁶

Bir endemik bitki olan *Argania spinosa* L'nin rizosfer topraklarından izole edilen *Streptomyces* sp. strain Ap1'in iki bitki patojeni *Fusarium oxysporum* f. sp.

albedinis ve *Verticillium dahliae*'nin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Bu antifungal bileşik HPLC ile saflaştırılıp, NMR ve MS analizleriyle ile bir polien makrolid (isokainin) olduğu tespit edilmiştir.²¹⁷

İndigo ve 6,6'-dibiromoindigo bileşikleri, eski medeniyetler tarafından kullanılmış olan ve günümüzde de hala endüstriyel değere sahip en önemli boyar maddelerdir. Maskey ve arkadaşları *Streptomyces* sp. GW48/1497 suşundan 5,5'-dikloroindigo ile bu bileşiğe farklı tür şekerlerin bağlı olduğu akashin A (**149**), B (**150**) ve C (**151**) adını verdikleri türevlerini izole etmişlerdir. İndigonun herhangi bir biyolojik aktivitesinin olmamasına rağmen, izole etmiş oldukları akashin A–C (**149–151**) bileşiklerinin farklı tür insan tümör hücre serileri CNCL SF268, LCL H460, MACL ve kolon karsinom CCL HT29, melanom MEXF 514L, akciğer karsinom LXFA 526L, LXFL, 529L, göğüs kanser hücresi MCF-7 ile böbrek tümörleri olan PRCL PC3M ve RXF 631L'ye karşı IC₅₀ değerleri yaklaşık 2,8 µg/mL seviyelerinde aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir.²¹⁸

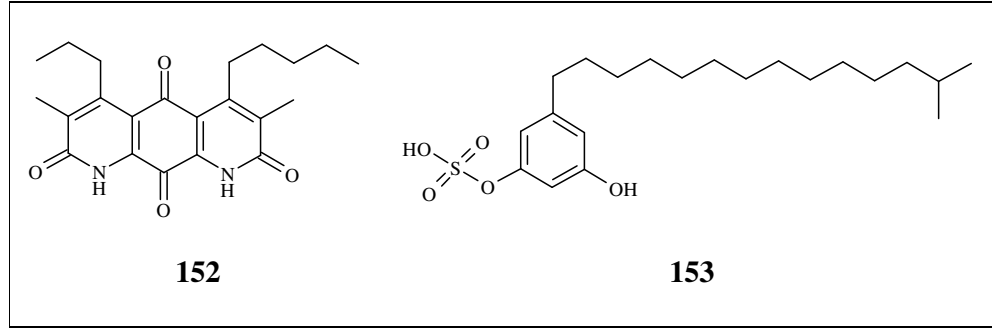


Topraktan izole edilmiş olan iki farklı tür *Streptomyces*'in etil asetat ekstraktlarından daha önceden bilinen mikrobiyal bir metabolit olan tetragulol metil eter ile üç yeni angusiklin türevi olan ve seitomisin olarak adlandırılan bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin orta derecede antimikrobiyal aktivite ve zayıf fototoksik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.²¹⁹

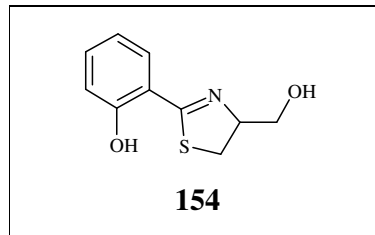
Topraktan izole edilen diğer bir *Streptomyces* sp. GW32/698 suşunun etil asetat ekstraktından ise biyolojik aktiviteye sahip yeni kinon antibiyotikleri olan bhimanon ile 5 tane bhimamisin A–E bileşikleri izole edilmiştir. Aynı zamanda bu bakteriden bilinen

mikrobiyal metabolitler olan chrysophanol, aloesaponarin II, 3,8-dihidroksil-1-metilntrakinon-2-karboksilik asit, adenosin, 2'-deoksiadenozin, fenilasetamid ve 2-(*p*-hidroksifenil)etanol bileşiklerinde izole edilip yapılarının aydınlatıldığı rapor edilmiştir.²²⁰

Yüksek sitotoksik aktiviteye sahip klorlanmış indigo glikozidleri ürettiği tespit edilmiş olan *Streptomyces* sp. GW48/1497 suşundan yeni bir antibiyotik olan diazakinomisin C (**152**) izole edilmiştir. Bu bileşiğin yanında diazakinomisin A ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bilinen panosialin wA (**153**) bileşiği de izole edilmiştir.²²¹



Daha önceden farklı tür mikroorganizmalardan saflaştırıldığı bilinen fakat ilk kez bir *Streptomyces* suşundan izole edildiği rapor edilen aerugin (**154**) olarak adlandırılan 4-hidroksimetil-2-(2-hidroksifenil)-2-tiazolin bileşiğinin *Streptomyces fradiae* SU-1 suşundan 2006 yılında izole edilmiştir. Bu bileşiğin *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Phytophthora parasitica*'ya karşı MIC değerlerinin 12,5 µL/mL olduğu belirlenmiştir.²²²



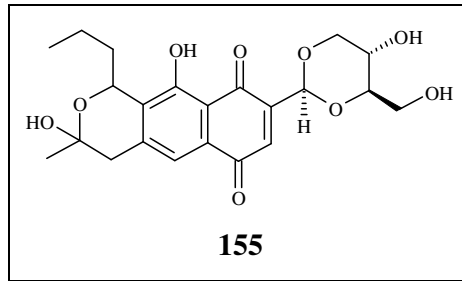
Azinotrisin benzeri 19 üyeli siklopepsipeptit halkasına sahip siklik heksadepsipeptitlerin 5 yeni üyesi olan kettapeptinler topraktan izole edilmiş olan

Streptomyces sp. GW99/1572 şusundan izole edilmişlerdir. MS ile 1 ve 2 boyutlu NMR teknikleri kullanılarak bu bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır. Özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.²²³

Triazolopirimidin antibiyotiklerinin ilk üyesi olan essramisin A, *Streptomyces* sp. Merv8102'den izole edilmiştir. Çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin MIC değerinin 2 ile 8 µg/mL arasında değiştiği ve antifungal aktiviteye sahip olmadığı rapor edilmiştir.²²⁴

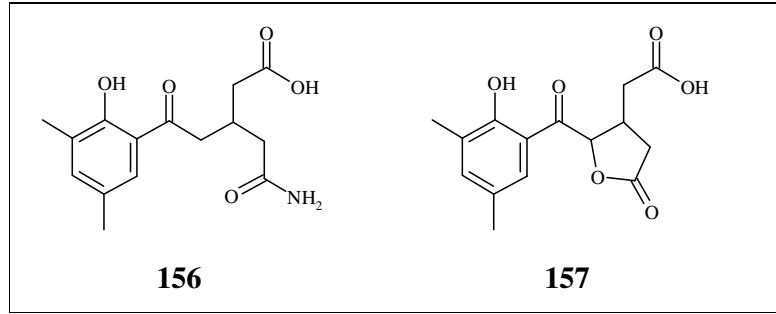
12 üyeli makrolid sınıfına ait yedi yeni pladienolid A–G bileşikleri *Streptomyces plantensis* Mer-11107'den izole edilmiştir. Pladienolid B bileşiğinin U251 kanser hücre serilerinin ekspresyon ve çoğalmasına karşı inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Ksenogref model çalışmalarında pladienolid B'nin tümör hücrelerinin büyümesini yaygın bir biçimde inhibe ettiği tespit edilmiştir ve böylece kanser tedavisinde pladienolid benzeri bileşiklerin kullanım potansiyellerinin olabileceği ifade edilmiştir.²²⁵

İnterleukin-1β dönüştürücü enzimin bir inhibitörü olan EI-2346 (**155**), *Streptomyces* sp E-2346'dan izole edilmiştir. Bu bileşiğin IL-1β dönüştürücü enzim inhibitörü olarak anti-inflamatuvar bir ajan olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.²²⁶

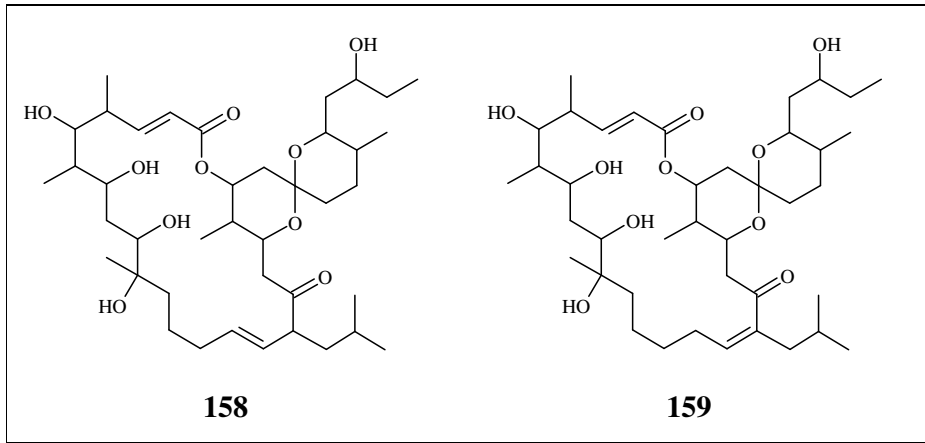


Rapamisin güçlü bir immunosüpresif ve anti-proliferatif bir ajandır. Bu bileşik ilk kez *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491'den doğal bir ürün olarak izole edilmiştir. Rapamisinin biyosentezinde son basamak sitokrom P-450 tarafından 15 ve 32 numaralı karbonların oksidasyonu ile 7, 32 ve 41 numaralı karbon atomlarının oksijen üzerinden metillenmesi ile gerçekleşmektedir. Bu sentez yolu olası pek çok biyosentetik ara ürünlerin izole edilmesine olanak sağlamaktadır. Graziani ve arkadaşları aktinomiset LL-D45042'den 15-deokso-7,32-O-didesmetilrapamisini izole edip, biyolojik aktivitesini incelemişler ve 12-kDa FK506-bağlayıcı proteine (FKBP12) ilgisinin IC₅₀ değerinin 400 nM olduğunu bulmuşlardır.²²⁷

Streptomyces sp. K03-0132'den iki yeni fenol türevi olan fenatik asit A (**156**) ve B (**157**) bileşiği ile bilinen bir bileşik olan aktiffenol izole edilmiştir. Fenatik asit A (**156**) ve B (**157**) bileşiklerinin *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitelerinin yanında fenatik asit B (**157**)'nin bazı Gram-pozitif bakterilere karşı orta derece aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.²²⁸



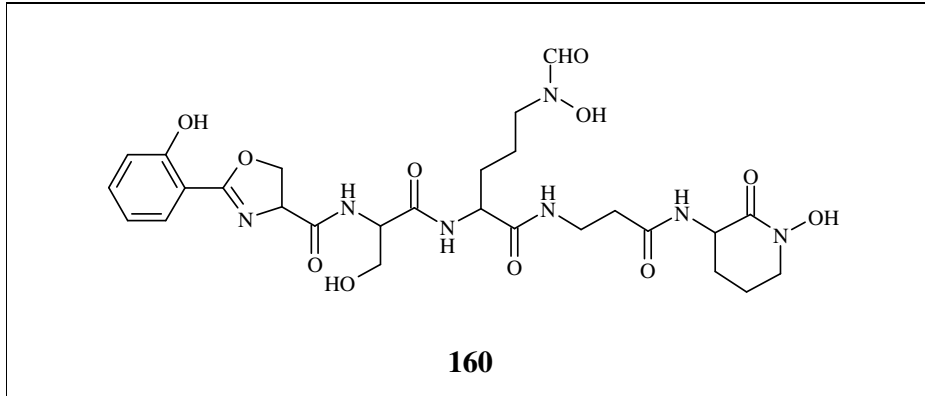
2005 yılında yapılan bir çalışmada yeni lipo-nükleosid antibiyotikler olan yedi farklı Caprazamisin A–G bileşikleri *Streptomyces* sp. MK730-62F2 suşundan Igarashi ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir.²²⁹ Aynı yıl Takahashi ve arkadaşları tarafından yeni immünosupresan ajanlar olan ushikulide A (**158**) ve B (**159**) *Streptomyces* sp. IUK-102'nin kültür ortamından izole edilmiştir. Her iki bileşiğinde $C_{40}H_{68}O_{10}$ kapalı formüle sahip, 22 üyeli makrolidlerden oldukları belirtilmiştir. Bu bileşiklerin *in vitro* çalışmalarında murin splenosit proliferasyonu için immünosüpresif aktivite gösterdiği belirlenmiştir.²³⁰



Direk biyoassay temelli fraksiyonlandırma yöntemi ile yeni bir makrolid olan antimisin A₁₇ *Streptomyces* sp. GAAS7310 suşundan izole edilmiştir. Bu bileşik 11 farklı mantar türüne karşı anlamlı antifungal aktivite sergilemiştir.²³¹

2006 yılında yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. Tü 6319'dan fogasin olarak adlandırılan yeni bir oktaketit ile SEK4b ve anhidroSEK4b adında iki yeni metabolit izole edilmiştir.²³²

2006 yılında yapılan diğer bir çalışmada, Sontag ve arkadaşları aktivite temelli fraksiyonlandırma yaklaşımı ile yeni antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip binlerce aktinomisetin sekonder metabolitlerini tararken yeni izole ettikleri *Streptomyces* sp. GW9/1258'den okzaselin (**160**) adında yeni bir bileşik izole etmişlerdir. Okzaselinin (**160**) çeşitli mantarlara ve Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü antibiyotik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca okzaselinin Fe⁺³ ile sağlam kompleksler (siderofor) oluşturduğunu bu sebepten dolayı demir hastalıkları tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.²³³

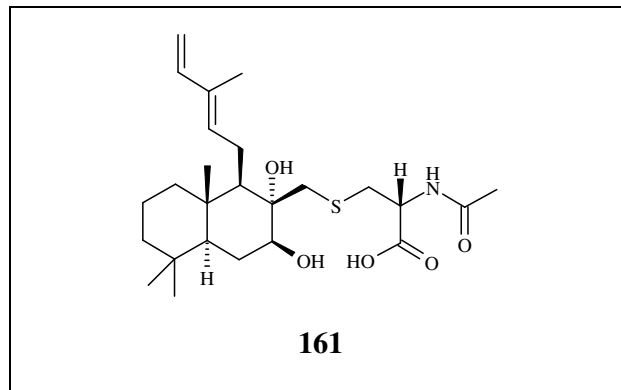


Lu ve Shen 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada, tıbbi olarak faydalanılan *Maytenus hookeri* bitkisinden izole ettikleri komensal bir tür olan *Streptomyces* sp. CS'den naftomisin A ve E olarak bilinen bileşiklerin yanında naftomisin K olarak adlandırdıkları yeni bir ansamisin bileşiği izole etmişlerdir. Bileşiklerin yapılarını NMR ve MS tekniklerini kullanarak aydınlatmışlardır. Naftomisin K'nın P388 ve A-549 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiğini fakat *S. aureus* ve *Mycobacterium tuberculosis* bakterilerine karşı herhangi bir aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir.²³⁴

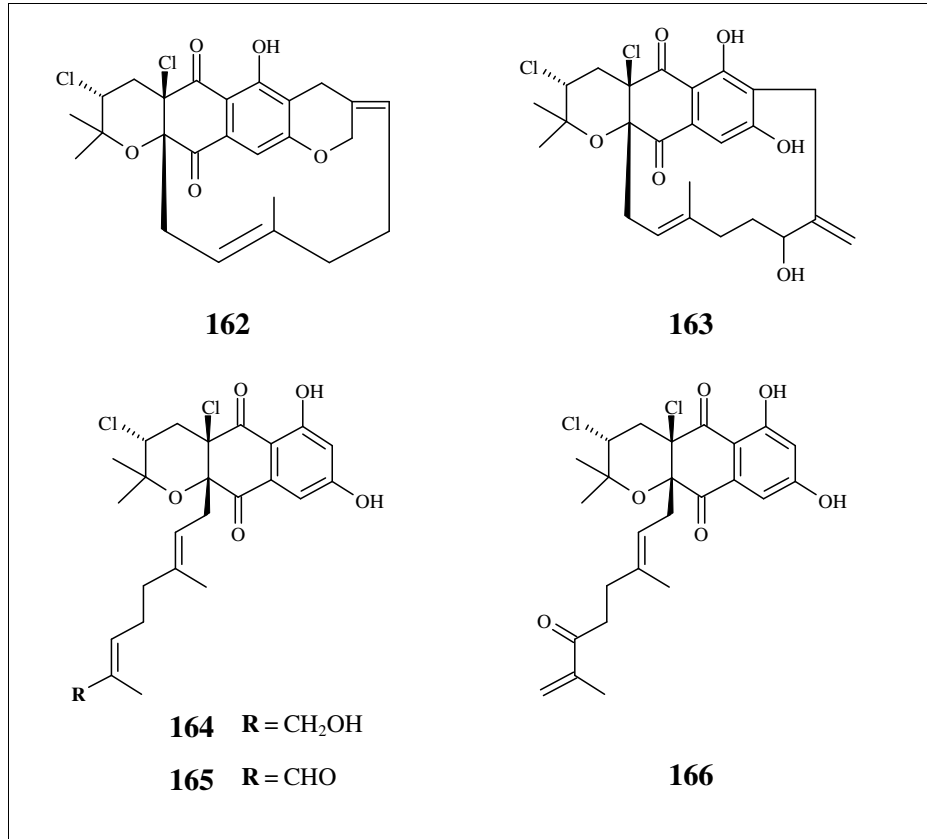
Streptomyces sp SS'den yeni bir nükleosidil-peptit antibiyotik olan sansanmisin izole edilmiştir. Bileşiğin yapısı bazik hidrolizasyon ve spektroskopik tekniklerle aydınlatılmıştır. Sansanmisin'in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı sırasıyla 10 ve 12,5 µg/mL olan MIC değerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.²³⁵

2007 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise *Streptomyces griseus* Acta 2871'in kültür filtratından antitümör aktiviteye sahip iki yeni aminofenoksazinon bileşiği olan elloksazinon A ve B izole edilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapıları NMR ve MS spektroskopisi tekniklerinin yanında X-ray analizleriyle aydınlatılmıştır. Elloksazinon A ve B bileşiklerinin *in vitro* çalışmalarda gastrik adenokarsinom insan hücrelerinin çoğalmalarına karşı orta derecede inhibisyon aktivitesi gösterdiği fakat hepatoselüler kanser hücrelerine karşı güçlü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, elloksazinon B'nin insan göğüs karsinom hücrelerinin üremelerine karşı oldukça güçlü inhibisyon aktivite sergilediği rapor edilmiştir.²³⁶

2008 yılında Fukumoto ve arkadaşları metilsiline karşı direnç geliştirmiş *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivite gösteren Cyslabdan (**161**) adında yeni bir bileşik izole etmişlerdir. Bu bileşiği, *Streptomyces* sp. K04-0144'ün kültür ortamından Diaion HP-20 ve ODS kolon kromatografisi ile preparatif HPLC tekniklerini kullanarak izole edip NMR spektroskopisi teknikleri ile de yapısını aydınlatmışlardır. Labdan-tipi diterpen iskelet yapısına sahip bileşiğin tiyoeter köprüsüyle bağlı bir *N*-asetilsistein içeriğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.²³⁷ MRSA'ya karşı imipenem antibiyotiğinin MIC değeri 16 µg/mL iken cyslabdan (**161**) ile kombine olarak imipenem verildiğinde MIC değerinin 0,015 µg/mL değerine düştüğünü göstermişlerdir.²³⁸

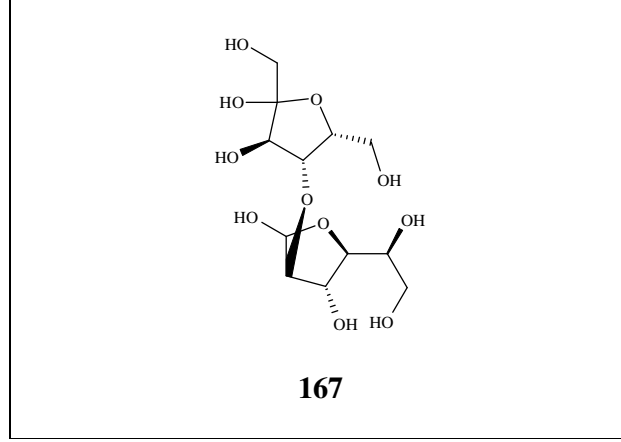


2008 yılında yapılan diğer bir çalışmada Motohasni ve arkadaşları tarafından *Streptomyces antimycoticus* NT17'nin kültür ortamından Napiradiomisin SR (**162**), 16-dekloro-16-hidroksinapiradiomisin C2 (**163**), 18-hidroksinapiradiomisin A1 (**164**), 18-oksonapiradiomisin A1 (**165**), 16-oksonapiradiomisin A2 (**166**), 7-demetil SF2415A3, 7-demetil A80915B, ve (*R*)-3-kloro-6-hidroksi-8-metoksi-R-lapachon bileşikleri izole edilmiştir. Bu yeni bileşiklerin bazılarının antibakteriyel aktivite sergilediğini belirtmişlerdir.²³⁹

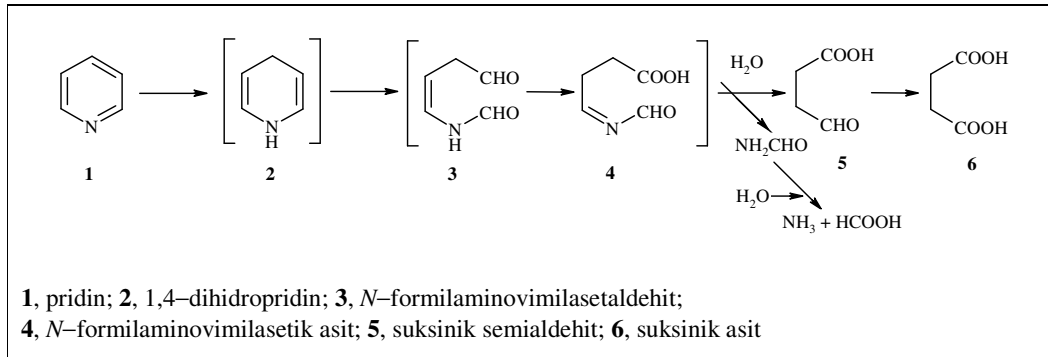


2009 yılında yapılan bir çalışmada, çeşitli habitatlardan izole edilen 316 aktinomisetten *Streptomyces* sp. JJ45 türünün bitki patojeni Gram-negatif *Xanthomonas campestris* pv. bakterisine karşı çok kuvvetli antibiyotik aktivitesi sergilediği saptanmıştır. Bu bakterinin 16S rRNA ile gen sekansları belirlenmiştir. Daha sonra *Streptomyces* sp. JJ45'in kültür ortamından polar karaktere sahip fraksiyonları poliakrilamid veya silika kolon kromatografisi, İTK ve YPİTK kromatografi teknikleri

kullanılarak aktif bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiğin α -L-sorbofranoz(3→2)- β -D-altrofranoz (**167**) olduğu NMR teknikleri ile belirlenmiştir.²⁴⁰

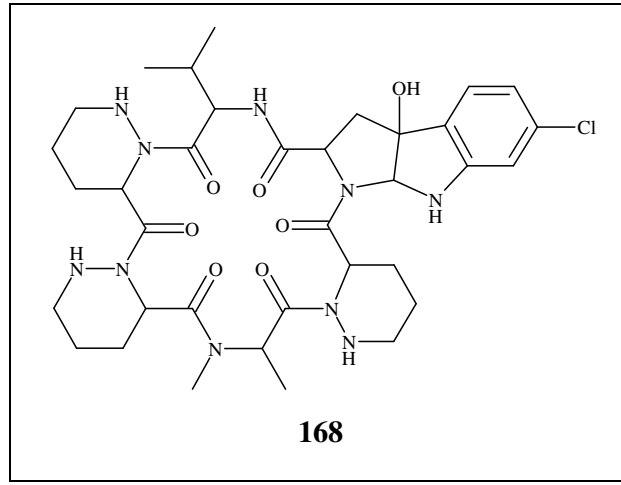


Li ve arkadaşları yeni izole etmiş oldukları *Streptomyces* sp. HJ02 türünün karbon kaynağı olarak sadece pridini kullanarak büyüebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu türün pridini güçlü bir biçimde biyodegradasyona uğrattığını belirlemişlerdir. *Streptomyces* sp. HJ02'nin farklı konsantrasyonlardaki pridin ve sukrozun biyolojik parçalanmasına pH ve sıcaklığın etkisini çalışmışlardır. 2000 mg/L konsantrasyondaki pridini *Streptomyces* sp. HJ02'nin yaklaşık 8 günde harcayabildiğini belirlemişlerdir. *Streptomyces* sp. HJ02'nin pridini metabolik olarak Şekil 2.7'de görüldüğü gibi parçalamış olduğunu önermişlerdir.²⁴¹



Şekil 2.7. *Streptomyces* sp. HJ02'nin pridini parçaladığı olası metabolik yol.

2009 yılında yapılan diğ er bir çalışmada ise *Streptomyces alboflavus* 313'ün fermantasyon kùltüründen silika jel kolon kromatografisi ve HPLC teknikleri kullanılarak NW-G01 (**168**) olarak adlandırılan yeni bir siklik heksadepsipeptit antibiyotik izole edilmiştir. NW-G01 (**168**) bileşiği; valin, *N*-metilalanin, klorlanmış pirolindolin türevi ile üç molekül piperazik asit molekülünü içermektedir. NW-G01 (**168**)'in, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve MRSA bakterilerine karşı MIC değerleri sırasıyla 3,90, 3,90, 7,81 ve 7,81 µg/mL olan güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.²⁴²



3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

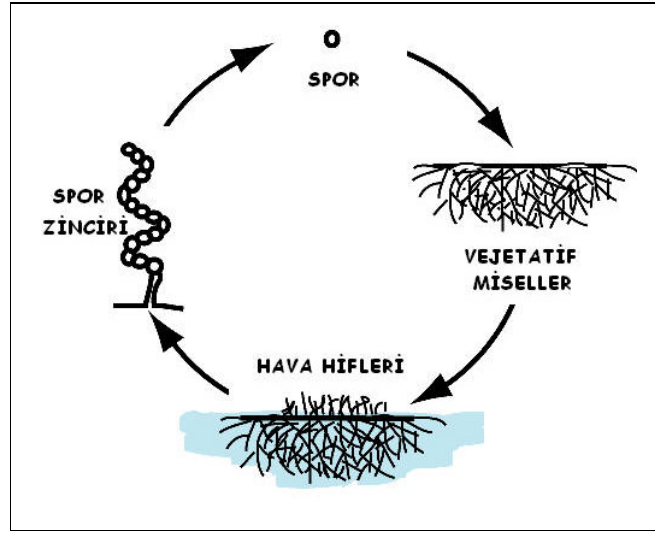
Türkiye'nin Orta Anadolu Bölgesi'nde yer alan Ayaş-Beypazarı (Ankara) çevresinde yetişen *Aethionema dumani*, *Salvia aytachii* ve *Achillea ketenoglui* endemik bitkilerinin kök çevresi rizosferik tabasından Prof. Dr. Mecit VURAL tarafından toplanan toprak numunelerinden, seçici besiyerleri kullanılarak aktinomiset izolasyonları Dr. Ebru İNCE YILMAZ tarafından yapılmıştır. Gerek morfolojik gerekse bazı biyokimyasal testler yapılarak *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlenen türler için 16S rRNA genleri kullanılarak moleküler teşhis yapıldı ve filogenetik çalışmalar sonucunda izole edilen türlerin yaklaşık % 95'inin *Streptomyces* cinsinin üyeleri olduğu tespit edildi.²⁴³ Bu çalışmada 67 *Streptomyces* türü ve bir tane de *Nocardioopsis* türü kullanıldı.

3.1.1. *Streptomyces* Türleri

Streptomyces cinsinin üyeleri; Gram-pozitif, filamentli ve spor oluşturan toprak bakterilerinin ait olduğu aktinomiset grubuna dahildir. Çok fazla sayıda tür ve alt tür tarafından temsil edilen *Streptomyces* cinsine dahil, 500'den fazla tür tanımlanmıştır.²⁴⁴ *Streptomyces* türleri; yüksek G/C oranına sahip Gram-pozitif bakterilerin üyeleri olarak, yaklaşık % 70-74 oranla en yüksek kromozomal G/C içeriğine sahiptirler. Streptomisetlerin diğer ayırt edici özellikleri oldukça büyük lineer kromozomları (~8 Mb) ve büyük lineer plazmidleridir (10-600 kb).²⁴⁵ Bu cinsin üyelerinin en karakteristik özellikleri ise; yüksek kapasitede sekonder metabolit üretme yetenekleridir. Bu sekonder metabolitler; oldukça kullanışlı antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler, antikanser ilaçları, herbisitler ve immünbaskılayıcı ajanlardır. Bilinen antibiyotik aktivite gösteren sekonder metabolitlerin % 55'i *Streptomyces* türleri tarafından ve buna ek olarak % 11'i de diğer aktinomisetler tarafından üretilmektedir.^{34,245}

Streptomyces'lerin diğer bir dikkat çeken özelliği (onları diğer bakterilerden ayıran), dikkate değer karmaşıklıkta olan yaşam döngüleridir.²⁴⁶ Kompleks yaşam

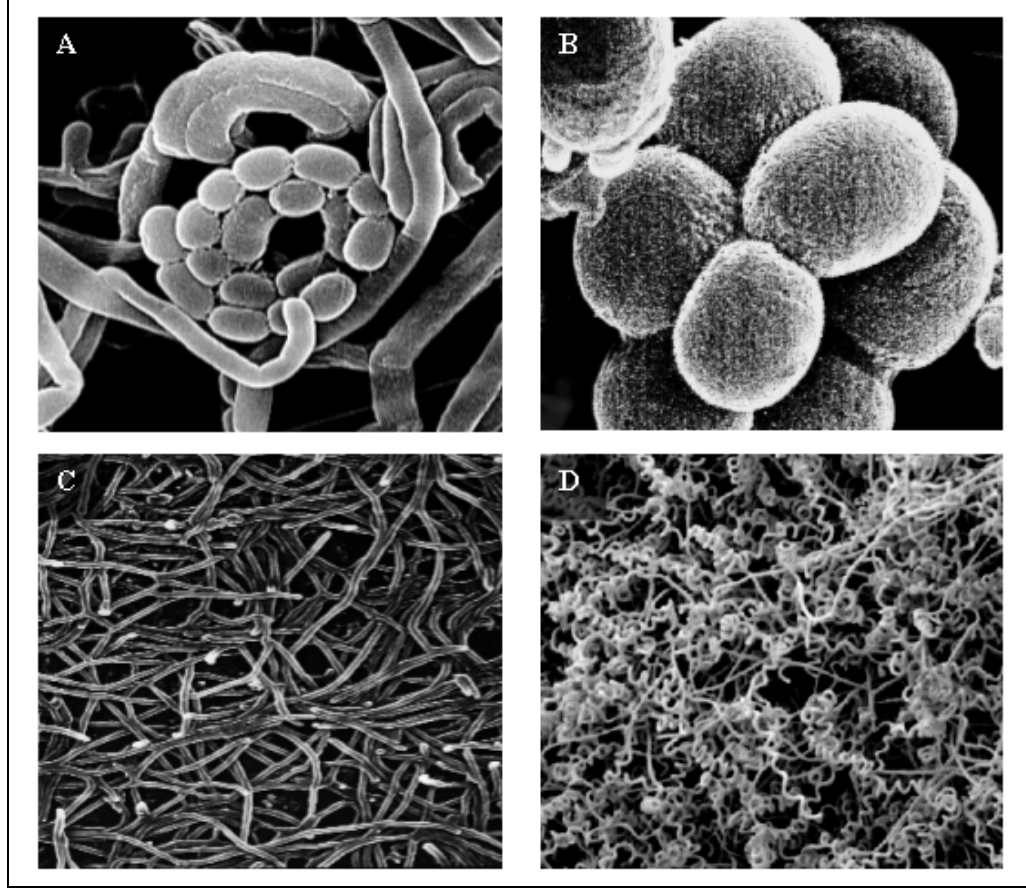
döngüleri açısından, streptomisetler, filamentli funguslara benzerler. Dallara ayrılmış hiflerin bir miselinden uçların uzamasıyla büyüme gösterirler.²⁴⁷ Tipik bir büyüme döngüsünde, sporlar besiyerinin yüzeyinde büyüyen filamentli hiflerden tomurcuklanırlar ve yoğunlaşarak vejetatif (substrat) miselleri oluştururlar (Şekil 3.1).²⁴⁸ Bu faz genel olarak vejetatif büyüme fazı olarak adlandırılır. Vejetatif fazı takiben, antibiyotik üretiminin de eş zamanlı olarak gerçekleştiği ve hava hiflerinin olduğu ikinci faz meydana gelir. Bu fazda, hava hifleri büyüyerek misellerden çıkar. Hifler; bazen helikal bir yapı da oluşturarak, vejetatif büyüme döngüsünü tekrar başlatmak üzere spor olarak dağılır.²⁴⁹



Şekil 3.1. *Streptomyces* türlerinin yaşam döngülerinin şematik gösterimi.

Streptomyces'lerde sekonder metabolit üretimi genellikle büyüme fazına bağlıdır. Hava hiflerinin gelişmesi sekonder metabolit üretimi ile eş zamanlı olarak devam etmektedir. Bu aşama, sıvı kültürlerde genel olarak stasyoner faza denk gelir.²⁵⁰ Streptomisetlerde sekonder metabolit üretimi düşük miktardaki spesifik üreme ile ilişkilidir. Çünkü spesifik üreme oranındaki düşüş, kimyasal ve morfolojik farklılaşma ile sonuçlanan düzenleyici mekanizmalar için sinyal oluşturmaktadır.²⁵¹ Resim 3.1'de farklı büyüme aşamalarındaki *Streptomyces* hücrelerinin görüntüleri verilmiştir.²⁵²

Sonuç olarak; klinik öneme sahip kullanışlı antibiyotiklerin üretilmesi, kompleks yaşam döngüsü ve ayırmedici genetik özellikleri, streptomisetleri ilgi çekici bir çalışma alanı haline getirmektedir.



Resim 3.1. Farklı büyüme aşamalarında *Streptomyces* hücrelerinin görünümü; (A) *Streptomyces coelicolor*'un sporlarının ve hava misellerinin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü, (B) *S. coelicolor* sporlarının taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü, (C) *S. coelicolor*'un sıvı besiyerindeki genç misellerinin ışık mikroskopundaki görüntüsü, (D) *S. coelicolor*'un kıvrılmış hava misellerinin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü.

Başka habitatlarda da *Streptomyces* türlerine rastlanmasına karşın, bu cinsin üyeleri genel olarak toprakta yayılış gösterirler. Gerçekte karakteristik toprak kokusuna, streptomisetlerin üretmiş olduğu *geosminler* olarak adlandırılan sekonder metabolitler neden olmaktadır. Bu bileşikler; karbon, oksijen ve hidrojenle meydana gelen doymamış halkalı bileşiklerdir.²⁴⁴

Streptomyces'ler asidik topraklardan ziyade bazik veya nötral topraklarda daha çok yayılış gösterir. İyi kurumuş topraklarda bol miktarda bulunurlar.²⁴⁴

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

IR spektroskopisi: KBr pelletleri hazırlanan numunelerin ATI-Unicam marka MATTSON Model 1000 Series FT-IR spektrofotometresi kullanılarak ölçümleri alındı.

UV-vis spektroskopisi: Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS spektrometre ve PG Instruments Ltd. T80+ model UV/VIS spektrometre (UVWin5 spektrofotometre yazılımı Ver 5.0.5) kullanılarak absorbans ölçümleri ve spektrumlar alındı.

Erime noktası tayini: Gallenkamp MPD 350 BM 2.5 marka cihaz kullanılarak erime noktası aralığı tayin edildi.

Optik çevirme açısı: Perkin-Elmer 341 model polarimetre kullanıldı.

¹H NMR spektroskopisi: Varian Unity 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz), Bruker DPX-400 yüksek performanslı dijital FT-NMR (400,1 MHz), Varian Inova 500 (499,8 MHz), Varian Inova 600 (599,7 MHz) kullanıldı. Kimyasal kayma değerleri kullanılan çözücüler internal referans olarak alınarak δ -değerleri (ppm) belirlendi. Eşleşme sabitleri (*J*) Hz cinsinden hesaplandı. Multiplisite Kısaltmaları: s = singlet, d = dublet, dd = dubletin dubleti, ddd = dubletin dubletinin dubleti, t = triplet, q = quartet, dq = quartetin dubleti, m = multipllet, br = geniş.

¹³C NMR spektroskopisi: Varian Unity 300 (75,5 MHz), Bruker AMX 300 (75,5 MHz), Bruker DPX-400 yüksek performanslı dijital FT-NMR (100,6 MHz), Varian Inova 500 (125,7 MHz), Varian Inova 600 (150,8 MHz) kullanıldı. Kimyasal kayma değerleri kullanılan çözücüler internal referans olarak alınarak δ -değerleri (ppm) belirlendi. Kısaltmalar: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kuartet.

2D NMR spektroskopisi: **H,H COSY** (¹H,¹H-Correlated Spectroscopy) **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) ve **HSQS** (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

Kütle Spektroskopisi (MS): **ESI MS;** Quattro Triple Quadrupole kütle spektrometre (Finnigan) ve LCQ Finnigan **HPLC ESI-MS;** Finnigan LCQ ile kombine HPLC-pump Rheos 4000 (Flux) ve UV dedektör (UVIS-205 (Linear)), **ESI HRMS;** Micromass LCT kütle spektrometresine bağlı HP 1100 HPLC-DAD ile hesaplandı (Reserpin (MW = 608) ve Leucin-Enkephalin (MW = 555) pozitif ve negatif iyonlaştırma modlarında standart olarak kullanıldı), **DCI;** Varian MAT 95 Finnigan (200 eV) ve NH₃ reaktif gaz olarak kullanıldı.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC): Cihaz I; Analitik; Jasco multiwavelength dedektör MD-910, iki pompalı ve karıştırma hücreli Jasco Intelligent Prep. Pump PU-987, 20 µL'lik enjeksiyon valfi (tip Rheodyne), Borwin-HPLC-yazılımlı, **Preparatif;** 500 µL'lik enjeksiyon loop, **Analitik kolon;** 1) Eurochrom 4.6 × 125 mm ön-kolonsuz, durağan faz: Hypersil, ODS 120 × 5 µm; 2) Vertex 4,6 × 250 mm, durağan faz: Nucleosil NP 100-C-18, partikül boyutu 5 µm, **Preparatif kolon;** 1) 16 × 30 mm ön-kolonlu Vertex 16 × 250 mm kolon, durağan faz: Eurospher C-18 RP 100 × 5 µm; 2) 16 × 30 mm ön-kolonlu Vertex 16 × 250 mm kolon, durağan faz: Nucleosil NP 100-C-18, partikül boyutu 5 µm, pore çapı 100 Å (Macherey–Nagel & Co.). **Cihaz II; Analitik;** BIO-RAD model 2800 pompa, 20 µL'lik enjeksiyon valfi (tip Rheodyne), BIO-RAD 1801 model UV dedektör, HP marka kiral dedektör ünitesi, Agilent marka G1379A model mikro degasser, LabAlliance kolon fırını, Dizge Analitik PicoChromo V 2.0 Kromatografi yazılım programı bulunan HPLC cihazı, **Kiral Kolon;** Daicel Chemical Industries marka, Crownpak CR 4 × 10 mm ön-kolonlu Crownpak CR (+) 4 × 150 mm ve Chiralcel OD 4,6 × 250 mm kiral kolonlar. **Cihaz III;** Spektral-dijital-fotometre A0293 model, 64 A0307 tip ikili pompa, HPLC-yazılımı V2.22, A0285 model karıştırma hücresi, 20 µL'lik 6/1 A0263 (Rheodyne) enjeksiyon valfi ünitelerini içeren Knauer HPLC cihazı. **HPLC-çözücüleri;** Asetonitril/su-azeotrop (% 83,7 asetonitril / % 16,3 su, kaynama noktası 78,5 °C). Azeotrop destile edildi, membran filtresinden (pore Ø: 0,45 µm, regenerated cellulose, Sartorius, Göttingen) geçirilerek filtre edilip ardından 15 dakika ultrasonikatör ile içindeki gaz kabarcıklarından arındırılarak kullanıldı.

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK): Camag marka YPİTK cihazı (Camag Linomat V sistem, 100 µL'lik enjektör, Camag Scanner III).

UV Lambası: 254 nm ve 366 nm dalga boylu Camag marka cihaz kullanıldı.

Filter press: Schenk Niro 212 B40.

Liyofilizatör: Liomatic 3, Lioma GmbH (Göttingen), Christ Alpha 1-4, Christ Loc-1 m, W. krannich GmbH CO. K.G. (Göttingen) ve Christ marka Alpha 2-4 LD Plus model cihazlarla dondurarak kurutma işlemleri yapıldı.

Sonikatör: BANDELIN Sonorex RK 510 model kullanıldı.

Jel Görüntüleme sistemi: Quantitiy One 4.5.2 yazılım versiyonun kullanıldığı Gel Doc XR, BioRad (USA) marka cihaz ile görüntüleme işlemleri yapıldı.

Elektroforez: Bio-Rad Sub-cell GT mini (İtalya) marka elektroforez tankı ve Wealtec marka güç kaynağı kullanıldı.

Laminar akış kabini: Kojar KR-125 ve HERA safe KS12 model laminar akış kabininde tüm mikrobiyolojik çalışmalar gerçekleştirildi.

Çalkalayıcı: Infos AG (CH 4103 Einbach) tip ITE, IKA shaker tip S50 (max. 6000 Upm) laboratuvar tipi çalkalayıcı ve Zhicheng ZHWY-200B (Çin) model orbital çalkalayıcı kullanılarak mikroorganizmalar üretildi.

Etüv: BINDER BD53 (Almanya) model etüv kullanıldı.

Otoklav: Albert Dargatz Autoclave, 119 L hacim, çalışma sıcaklığı 121 °C ve basınç 1,2 kg/cm² ile HIRAYAMA HV-50L (Japon) marka otoklavlar kullanılarak mikrobiyolojik materyallerin sterilizasyonu yapıldı.

Derin dondurucu: Sanyo marka derin dondurucu kullanılarak çalışılan bütün mikroorganizmalar saklandı.

3.1.3. Kullanılan Kromatografik Teknikler

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK): DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co.), YPİTK Alüminyum silika jel 60 F₂₅₄, 0,25 mm silika jel 60 F₂₅₄ ile kaplı alüminyum tabakalar (Merck KGaA).

Kimyasal Tarama için Kullanılan Cam Tabakalar: Merck silika jel 60 F₂₅₄ kaplı 10 × 20 cm'lik cam tabakalar.

Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (PİTK): 55 g silika jel P/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co.) üzerine 120 mL saf su ilave edilip 15 dakika karıştırılıp homojen hale getirildi. Elde edilen homojen süspansiyondan 60 mL 20 × 20 cm'lik cam tabakalar üzerine yayıldı. Hazırlanan tabakalar 24 saat boyunca açık havada kurutulduktan sonra aktive etmek için 130 °C'de 3 saat etüvde ısıtılarak hazırlandı.

Kolon Kromatografisi (CC): MN silika jel 60: 0,05-0,2 mm, 70-270 mesh (Macherey-Nagel & Co.), Silika jel 60 (partikül boyutu 0.04-0.063 mm) (Fluka) kullanıldı. Moleküler elek kromatografisi tekniği ile saflaştırma işlemlerinde Sephadex LH-20 (Pharmacia)'den faydalanıldı. Katı faz ekstraksiyon işlemlerinde Amberlite XAD-2, 300-1000 µm (Serva) ile XAD-16, 13-80 inch (Serva, Heidelberg) kullanıldı.

3.1.4. Renklendirici Reaktifler²⁵³

Anisaldehit/Sülfürik Asit: Şekerler, steroidler, ve terpenler ile mavi, kırmızı, gri, yeşil veya viyole renkler oluşturmaktadır.

Ehrlich's Reaktifi: Aminlerin ve indol türevlerinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Ninhidrin Reaktifi: Amino asitlerle, peptit ve polipeptitlerin serbest amino grupları ile mavi ve viyole arası renkler vermektedir. Ayrıca siklik ve N-asetillenmiş peptitlerle ise sarı renk oluşturmaktadır.

Potasyum Permanganat (KMnO₄) Reaktifi: Alkoller, safra asitleri ve lipitler olmak üzere organik bileşiklerin pek çoğunu görünür hale getirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. İTK tabakaları üzerinde kahverengi, gri ve koyu renkte spotların oluşmasını sağlar.

İyot (I₂) Buharı: Çift bağ bulunduran pek çok organik bileşikler için spesifik olmayan bir reaktiftir. Kahverengimsi ve nadiren sarı renkli spotların oluşmasına neden olur.

Palladyum (II) Klorür: Sülfür içeren bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. İTK tabakaları ısıtıldıktan sonra kahverengi/gri renkte spotlar oluşur.

Vanilin/Sülfürik Asit: Alkoller, fenoller ve stereoidlerle kırmızı-kahverengi, gri ve nadiren sarı renk oluşturur.

Orcin Reaktifi: Şekerlerin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Gri ve kahverengimsi bantların oluşumunu sağlar.

NaOH ve KOH çözeltileri *peri*-hidroksikinon bileşiklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu bileşikler bu çözeltilerle muamele edildiklerinde portakal renginden kırmızı veya viyole şeklinde renk değişimi gözlemlenmektedir.

Reaktiflerin hazırlanışı İlaveler I.'de verilmiştir.

3.1.5. Mikrobiyolojik Materyaller

3.1.5.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Disk agar difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal aktivite araştırmalarında kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ile *Bacillus subtilis* ATCC 11774 standart bakteri suşları ve *Candida albicans* ATCC 10231 mantarı MicroBioLogics® (Fransa) firmasından ticari olarak temin edildi.

Ayrıca antimikrobiyal aktivite taramalarında kullanılan *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces viridochromogene* (Tü 57), *Escherichia coli* bakterileri, *Candida albicans*, *Mucor miehei* (Tü 284), fungusları *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus subspicatus* mikroalgleri ile *Rhizoctonia solani* *Pythium ultimum* bitki patojenleri Georg-August Üniversitesi Göttingen/Almanya'da Prof. Dr. Hartmut LAATSCH'ın çalışma grubundan temin edildi.

3.1.5.2. *Artemia salina* (Brine Shrimp)

SERA Artemia brine shrimp yumurtaları (SERA Heinsberg) ve brine shrimp yemi (micro cell DOSHE Aquaristik KG Bonn) akvaryumculardan ticari olarak temin edildi.

3.1.5.3. Kullanılan Besiyerleri

Standart bakteri suşları, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853'ü, üretmek için Nutrient Broth (NB) ile Nutrient Agar (NA), *S. pyogenes* ATCC 19615 ile *B. subtilis* ATCC 11774 için ise Mueller Hinton Broth (MHB) ile Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri kullanıldı. *C. albicans* ATCC 10231 mantarı için, Sabouraud % 2 Dextrose Broth (%2SDB) ve Sabouraud % 4 Dextrose Agar (%4SDA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) besiyerleri kullanıldı.

Streptomyces türlerini üretmek için Tryptone Soya Broth (TSB) ve Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) kullanıldı. *Streptomyces* türlerini üretmek için ayrıca M₂ broth (M₂B) ve M₂ Agar (M₂A) besiyerlerinden faydalanıldı.

Ayrıca antimikrobiyal aktivite taramalarında kullanılan *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve *M. miehei* (Tü 284) M Test Agar (MTA) besiyerinde *C. albicans* ile *R. solani*,

P. ultimum bitki patojenleri Sabouraud Agar (SA) besiyerinde, *S. viridochromogene*, M_2^+ broth (M_2^+B) ve agar (M_2^+A) besiyerlerinde *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *S. subspicatus* mikroalgleri ise Bold's Basal Medium (BBM)'da üretilmeleri sağlandı.

Besiyerlerinin hazırlanması İlaveler II.'de, yapay deniz suyunun hazırlanması (YDS) İlaveler III.'te ve BBM için gerekli çözeltilerin hazırlanması İlaveler IV.'te verilmiştir.

3.1.5.4. Mikroorganizmaların Saklanma Koşulları

Çalışmada kullanılan bütün *Streptomyces* türleri ile antimikrobiyal aktivite taramalarında kullanılan standart bakteri, mantar ve mikro-algler üretilmiş oldukları sıvı besiyerlerinden 1 mL ve % 50 gliserol / % 50 su karışımından 1 mL alınarak 2 mL hacmindeki kriyotüplere bırakılıp -70 °C'de derin dondurucuda saklanmak suretiyle muhafaza edilmektedirler.

3.1.6. Kullanılan Kimyasallar

Kromatografik tekniklerde ve ekstraksiyon işlemlerinde faydalanılan tüm çözücüler destile edilip kullanıldı. Analitik saflıktaki çözücüler ise Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) ve Riedel-de Haën'den ticari olarak temin edildi.

Renklendirici reaktiflerin hazırlanmasında, bazı besiyerlerinin bileşimlerinde bulunan çözeltilerin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddeler ise Merck, Sigma-Aldrich ve Fluka Chemical Corp. (Buchs, Switzerland)'dan ticari olarak temin edilerek kullanıldı.

Besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan glikoz, bakto pepton, bakto agar, dextrose, soybean, yeast ekstrakt ve malt ekstrakt Merck, Darmstadt'dan ticari olarak temin edildi.

Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan, İmipenem (IPM, 10 µg), Ofloksasin (OFX, 5 µg), Netilmisin (NET, 30 µg), Amoksisilin (20 µg)/Klavulonik asit (10 µg) (AMC, 30 µg), Amfoterisin B (AFB, 30 µg) içeren standart antibiyotik diskleri ile 6 mm boş kağıt diskler Oxoid'den ve 9 mm çapındaki boş kağıt disler ise Schleicher & Schüll'den ticari olarak temin edildi.

3.2. METOD

3.2.1. Biyolojik Aktivite Temelli Ön–Tarama İşlemleri

3.2.1.1. *Streptomyces* Türlerinin TSB Kültür Ortamında Üretimi

16S rRNA genleri kullanılarak moleküler teşhisi yapılmış olan 67 *Streptomyces* ve bir *Nocardioopsis* türü, saklanma koşullarından çıkarılıp 28 °C’de 5 gün süreyle TSA’da üretildi. TSA’da üreyen mikroorganizmalar, 250 mL’lik erlenlerde 50’şer mL TSB içeren besiyerine alınıp orbital inkübatörde 28 °C’de, 230 rpm’de 2,5-5,5 gün süreyle inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı.

3.2.1.2. Test Edilen Standart Mikroorganizmaların Üretilmesi

TSB’de üretilen *Streptomyces* türlerinden elde edilen ham materyaller ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmek için kullanılan; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853’ 100 mL’lik erlenlerde 20’şer mL’lik NB besiyerinde *S. pyogenes* ATCC 19615 ise MHB besiyerinde 37 °C’de 3-6 saat arasında 625 nm’de absorbans 0,5 McFarland olacak şekilde üretildi. Daha sonra mikro pipet ile 100 µL alınıp steril pamuklu çubuklarla NA ve MHA besiyerine yayılıp 37 °C’de etüvde 24 saat süreyle üremeye bırakıldı.

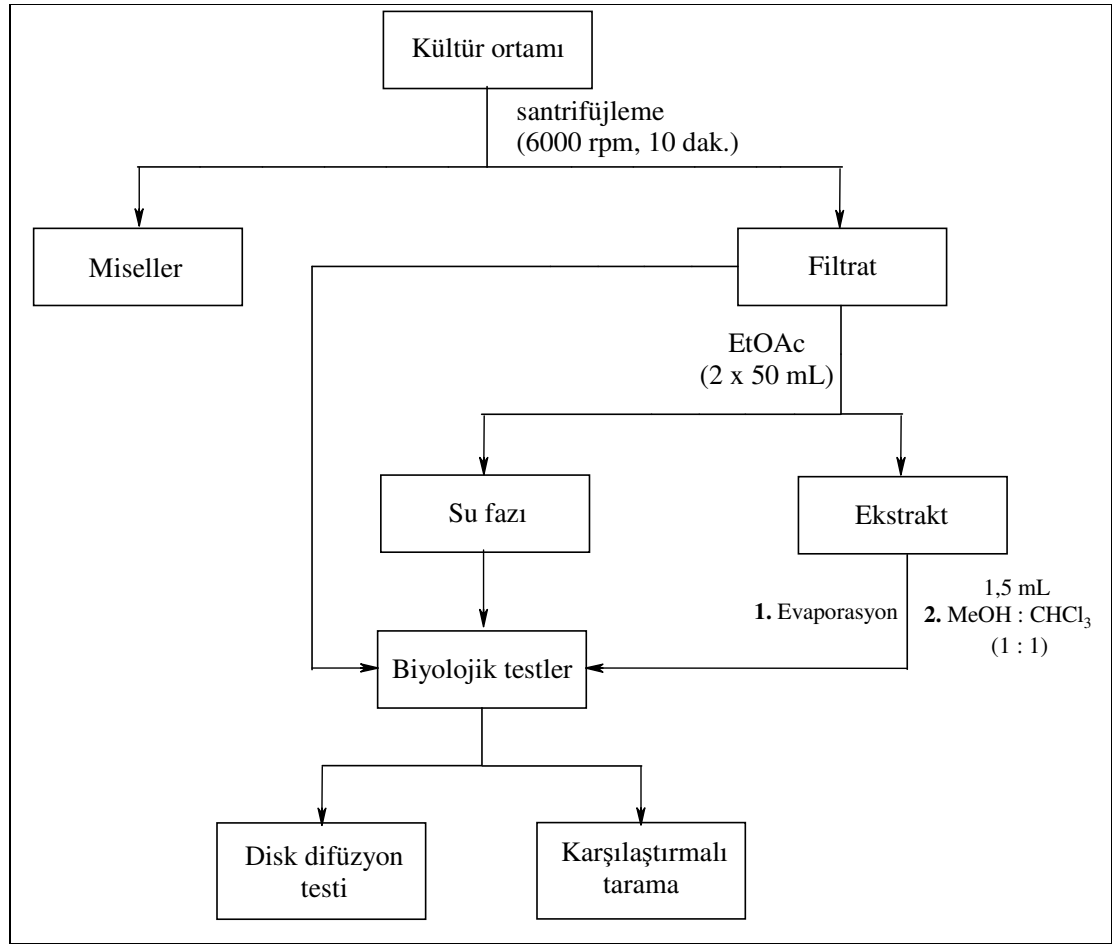
C. albicans ATCC 10231 ise %2SDB besiyerinde 8-10 saat üretildikten sonra 100 µL alınıp steril pamuklu çubuklarla %4SDA besiyerinde yayılıp 25 °C’de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmak suretiyle üretildi.

3.2.1.3. TSB Besiyerinde Üretilen *Streptomyces* Türlerinden Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu

Katı besiyerinde (TSA) iyi büyümüş koloniler seçilerek, 250 mL’lik erlenlerde 50’şer mL TSB içeren besiyerlerine aşılama yapılan izolatlar, orbital inkübatörde 28 °C’de, 230 rpm’de 2,5-5,5 gün süreyle inkübasyona bırakılarak üretildi. Üretilen izolatlar falkon tüplerine alınarak 6000 rpm’de 10 dakika santrifüflenerek süpernatant kısmı ayrıldı. Süpernatantın bir kısmı ayrılıp (filtrat) geriye kalan kısım ise 100 mL etil

asetat (EtOAc) ile buz içerisinde ekstrakte edildi. Ekstraksiyondan sonra organik faz ayrılıp kuruluğa kadar rotary evaporatör ile çözücüsü uçuruldu. Elde edilen ekstrakt 1500 µL kloroform:metanol (CHCl_3 :MeOH; 1:1) oranındaki çözücü sisteminde çözüldü (ekstrakt). Ayrıca ekstraksiyon sırasında geriye kalan su fazı, organik faza geçmeyen fakat su fazında kalan bileşenlerin (su fazı) olma ihtimallerini test etmek için saklanıp biyolojik aktivite yönünden denendi. Bu tarama prosedürünün akış diyagramı Şekil 3.2’de görülmektedir.

Bu işlemler sonucunda elde edilen filtrat, ekstrakt ve su fazı şeklindeki 3 fraksiyon antimikrobiyal aktivite yönünden disk difüzyon yöntemine göre standart mikroorganizmalara karşı test edildi ve elde edilen zon çapları Tablo 6.1 ve Resim 6.8-6.15’te görülmektedir.

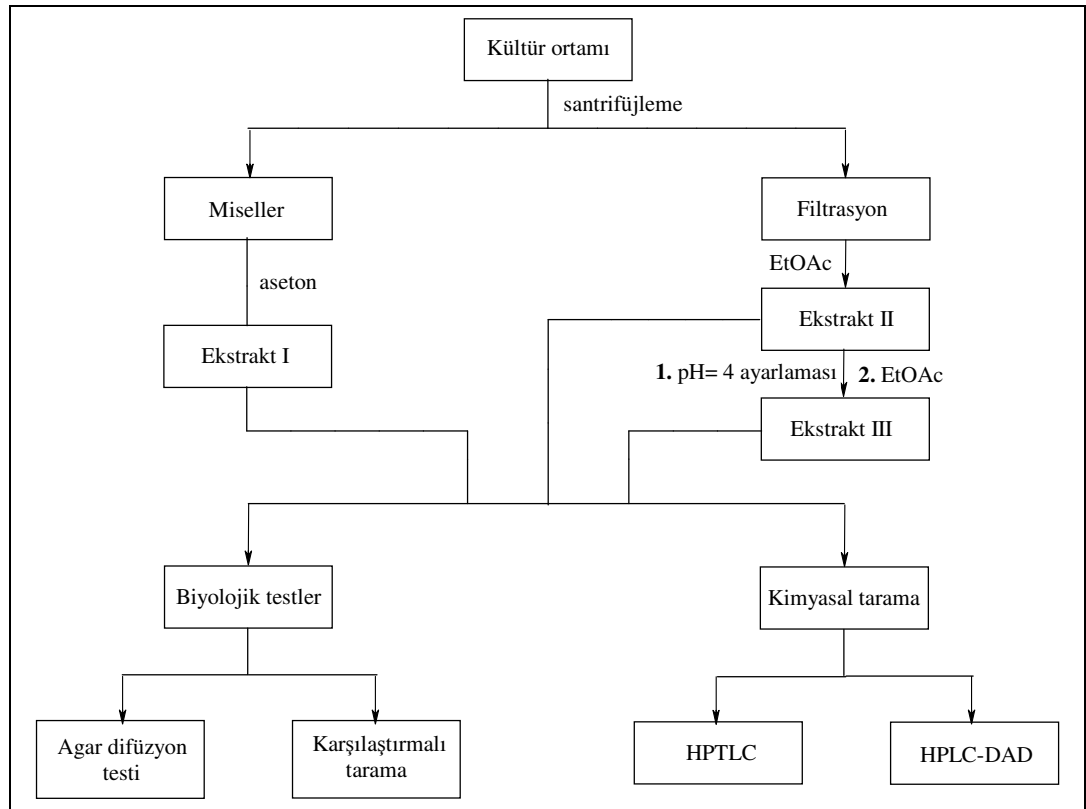


Şekil 3.2. 50 mL’lik TSB kültür ortamında üretilen *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri.

3.2.1.4. Kültür Ortamının İyileştirilmesi

Antibiyotikler çoğunlukla primer metabolizmaya bağlı ya da bundan etkilenen metabolik yollardan sentezlenirler. Primer metabolizmadan gelen ara metabolitler, antibiyotiklerin biyosentezi için öncül metabolitler olarak hizmet ederler. Bundan dolayı kültür ortamının içeriği üretici organizmanın metabolik kapasitesi ile sıkıca ilişkili olup, antibiyotik biyosentezini önemli ölçüde etkilemektedir.²⁵⁴ Bundan dolayı antimikrobiyal bileşik ürettiği tespit edilen türler, bu bileşiğin maksimum düzeyde üretimini sağlamak amacıyla besiyeri optimizasyon deneylerine (çeşitli karbon ve azot kaynakları, mineraller ve kültür sıcaklığı vs gibi) tabii tutulmaktadır.

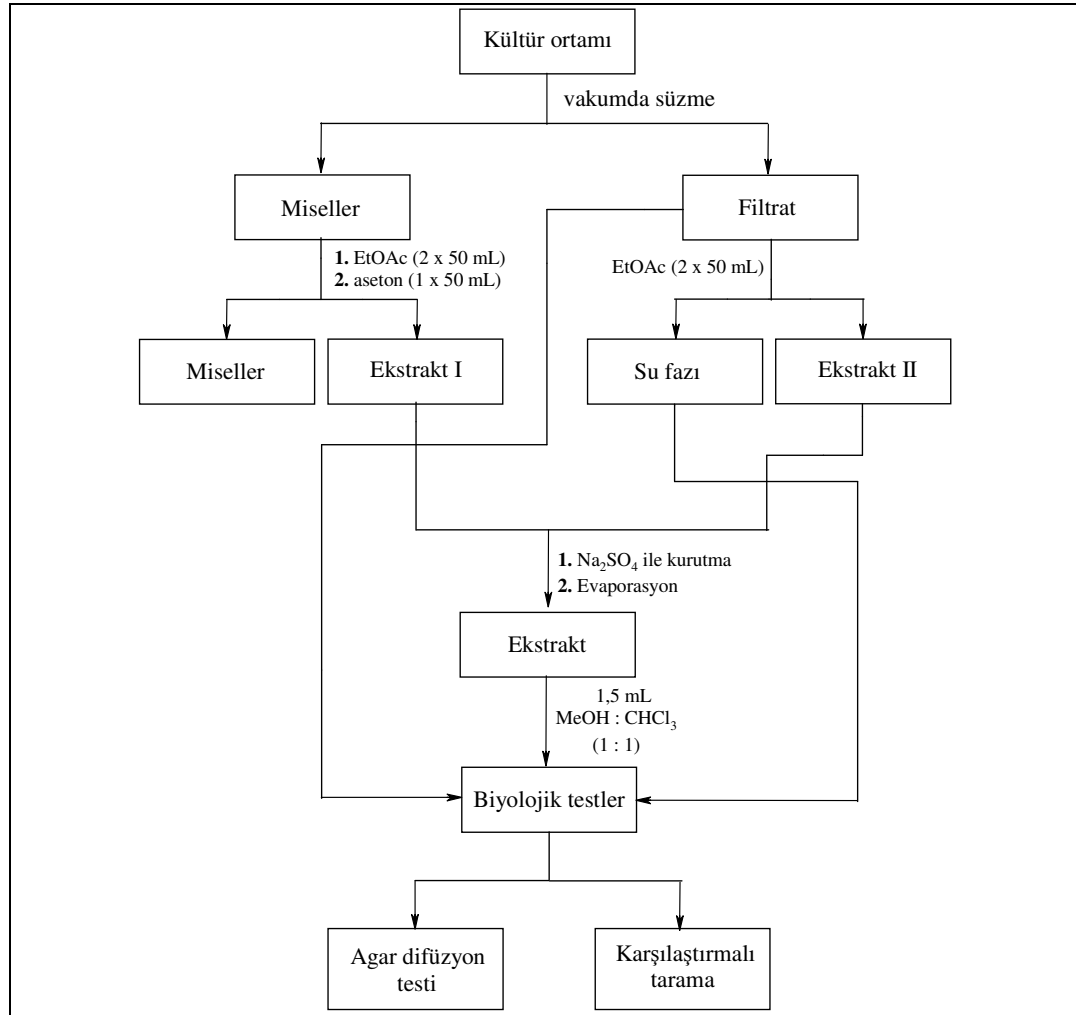
Literatürlere göre çoğu sekonder metabolit kültür ortamında zayıf asidik özelliğe sahiptir. Zayıf asidik özelliğe sahip metabolitler suda çözünen ve organik çözücülerde çözünmeyen tuzlar olarak kültür filtratında bulunur.⁴ Bu nedenle modifiye edilmiş bir işlemle tuz formunun asidik forma dönüştüğü ve böylece organik çözücülerle ekstraksiyonunun yapılabileceği pH değerinin 3-4 olduğu asidik koşullarda kültür filtratlarının ekstraksiyonundan yararlanılmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri.

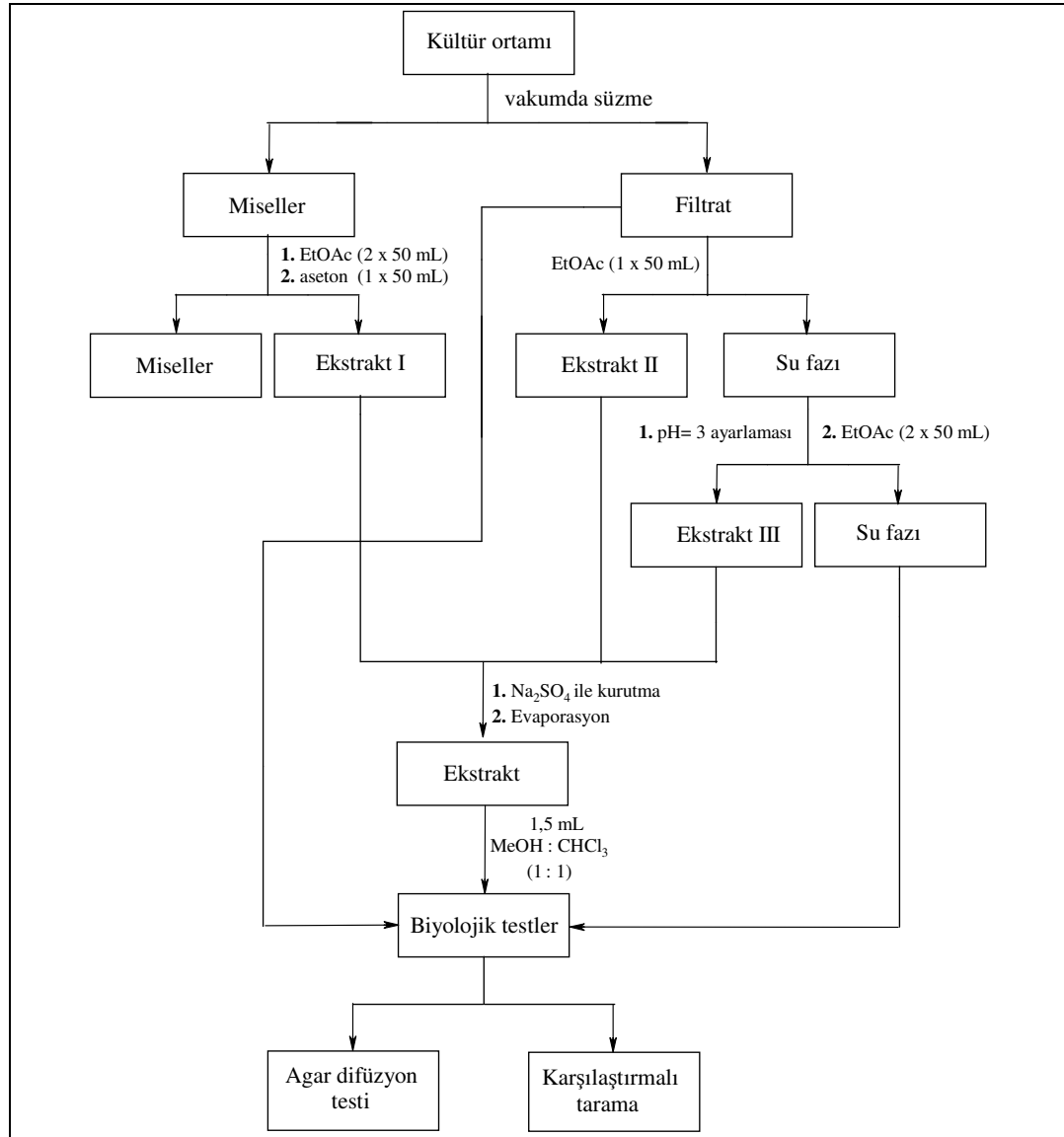
3.2.1.5. Besiyeri Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi

Literatür taramaları sonucu *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için 10 g malt ekstrakt, 4 g yeast ekstrakt ve 4 g glukozun 1 L çeşme suyunda çözülüp pH'nın 7,8'e ayarlanmasıyla hazırlanan M₂ besiyeri kullanılmasının daha faydalı olduğu tespit edildi.²²³ Çalışmalarımızın bu aşamasında daha önce TSB kullanılıp aktivite gösterdiği belirlenen 25 türden; AA50, AA58, AR12, AR17, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH50, CA3, CA12, CA14, CA17, CA21, CS41, CS44 ve CAH29 kodlu 19 türün bu kez M₂ besiyerinde (500 mL'lik erlenlerde 125 mL besiyeri) üretilerek Şekil 3.4'teki akış şemasına göre bunların ürettikleri sekonder metabolitlerin biyolojik aktivitelerine bakıldı.



Şekil 3.4. 125 mL'lik M₂ kültür ortamında üretilen *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri.

TSB kültür ortamında üretilerek Şekil 3.2'deki akış şemasına göre biyolojik aktiviteleri taranan AR6, AS41, AS42, BSH46, CA16 ve CS43 kodlu *Streptomyces* türlerinde su fazlarında da aktivite görüldü. Literatürlere göre çoğu sekonder metabolit kültür ortamında zayıf asidik özelliğe sahiptir. Bu türlerin de ürettiği oldukları biyoaktif sekonder metabolitlerin asidik özelliklerinden dolayı organik faza daha fazla bileşenin geçmesini sağlamak için Şekil 3.5'teki akış şemasına göre pH 3 ayarı yapıldıktan sonra etil asetat kullanılarak filtrat kısmında bulunan sekonder metabolitlerinin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. 125 mL'lik M₂ kültür ortamında üretilen AR6, AS41, AS42, BSH46, CA16 ve CS43 kodlu *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolit tarama işlemleri.

Biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenen AA50, AA58, AR6, AR12, AR17, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH46, BSH50, CA3, CA12, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS43, CS44 ve CAH29 kodlu türlerin M₂ besiyeri kullanılarak tekrar üretilmeleri ve ardından Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'teki yöntemlere göre etil asetat ve aseton ekstraksiyonları sonucunda elde edilen filtrat, ekstrakt ve su fazı şeklindeki 3 fraksiyon antimikrobiyal aktivite yönünden disk difüzyon yöntemine göre test edildi ve elde edilen zon çapları Tablo 6.2'de görülmektedir.

3.2.1.6. Disklerin Mikroorganizmalara Uygulanması

6 mm çapındaki steril boş kağıt disklere, Şekil 3.2, 3.4 ve 3.5'teki akış şemalarına göre *Streptomyces*'lerden elde edilen filtrat kısmı, etil asetat ekstraksiyonundan sonra elde edilen ham ekstraktın 1500 µL CHCl₃:MeOH (1:1)'de çözülmesiyle hazırlanan ekstrakt ve filtrat kısmının ekstraksiyonundan sora geriye kalan su fazından 20 µL emdirildi. Hazırlanan 6 mm çapındaki kağıt diskler 4 °C'de 5-10 dakika bekletildikten sonra mikroorganizmalar üzerinde test edildi. Negatif kontrol olarak ise saf su, etil asetat ve CHCl₃:MeOH (1:1)'den 20 µL emdirilmiş kağıt diskler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise ticari olarak temin edilmiş olan standart antibiyotik diskleri kullanıldı.

3.2.1.7. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılması

Antimikrobiyal aktivite N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standarts) kurallarına göre disk difüzyon deneyi ile belirlendi.²⁵⁵ Disk difüzyon testi NA ve MHA besiyerlerinde yapıldı. Mikroorganizmaların aşılması işlemi yapılmadan önce katı besiyerleri 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kullanılan bakteri suşları 20 mL NB ve MHB besiyerlerinde 4-6 saat (logaritmik faza kadar) üretildi. Taze besiyerine inokülasyon yapılarak 625 nm'de 0,08 ile 0,1 arasında absorbans ayarı yapıldı. Böylece absorbans 0,5 McFarland (1×10⁸ cfu/mL) standardına eşitlendi. *C. albicans* ATCC 10231 ise 20 mL %2SDB besiyerinde 8-10 saat arasında absorbans 0,5 McFarland standardına getirildi. McFarland standardına getirilen kültürlerden

100 µL alınıp katı besiyerine eklendi. Steril pamuklu çubuklar yardımıyla katı besiyerinin yüzeyine homojen bir biçimde yayıldı. Aşılama yapılmış NA ile MHA ve *C. albicans* ATCC 10231 için kullanılan %4SDA besiyerleri +4 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra 6 mm çapındaki disklere ham ekstrakt, etil asetat ekstraktının organik fazının kloroform:metanol (1:1) içerisindeki çözeltisi ve ekstraktın su fazından 20 µL emdirilmek suretiyle hazırlanmış kağıt diskler besiyerlerine yerleştirildi ve besiyerleri 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 11774 standart bakteri suşları 24 saat, *C. albicans* ATCC 10231 ise 25 °C’de 48 saat sonra oluşan inhibisyon zonları ölçülmektedir. Pozitif kontrol olarak İmipenem (10 µg), Ofloksasin (5 µg), Netilmisin (30 µg), Amoksisilin (20 µg)/Klavulonik asit (10 µg) ve Amfoterisin B (30 µg) antibiyotikleri kullanıldı. Pozitif kontrollerin denenmesi sonucunda elde edilen inhibisyon zon çapları Tablo 4.1’de görülmektedir. Negatif kontrol olarak ise saf su, etil asetat ve kloroform:metanol (1:1)’den 20 µL emdirilmiş kağıt disk kullanıldı.

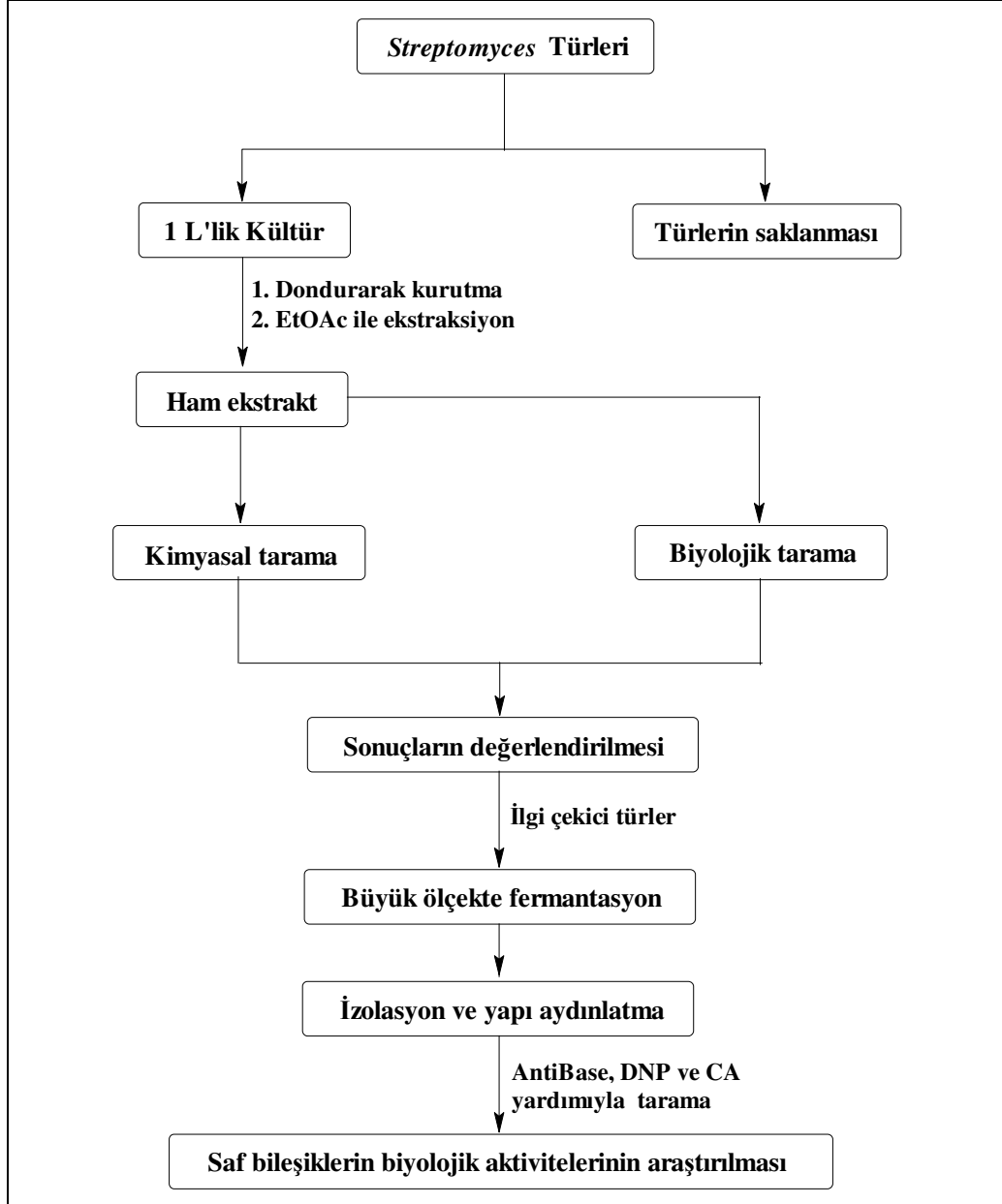
Bu yöntem klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda tercih edilen kalitatif bir yöntemdir. Belirli yoğunlukta bakteri besiyerine yayılır ve antibiyotik emdirilmiş diskler bunun üzerine yerleştirilir. Bir gecelik inkübasyondan sonra diskin çevresindeki inhibisyon zon çapı ölçülerek (Disk Agar Difüzyon) bakterinin o antibiyotiğe duyarlı olup olmadığı saptanır. Bu testte sonuçlar “duyarlı”, “dirençli” ve “orta dirençli” şeklinde verilmektedir.²⁵⁵

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 6.1, 6.2 ve 6.3’te ve Resim 6.1–6.15’te gösterilmiştir.

3.2.2. Biyolojik Aktivite ve Kimyasal Tarama Temelli Ön–Tarama İşlemleri

Çalışmalarımızın bu aşamasında daha önceden yapılan taramalarda aktivite gösterdiği belirlenen 25 türden; AA50, AA58, AR6, AR12, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH50, CA3, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS44 ve CAH29 kodlu iyi aktivite gösteren 21 tür belirlendi. *Streptomyces* cinslerine ait bu bakteriler, saklanma koşullarından çıkarılıp 28 °C’de 5 gün süreyle M₂ agar besiyerinde üretildi.²²³ M₂ agarda üreyen mikroorganizmalar, 1 L’lik erlenlerde 250 mL M₂ içeren 4

adet besiyerine aşılanıp orbital inkübatörde 28 °C’de, 155 rpm’de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. Birer litre üretilen bu *Streptomyces* türlerden elde edilen kültürlerle Şekil 3.6’daki akış şemasına göre tarama işlemleri uygulandı.



Şekil 3.6. 1 L’lik M₂ kültür ortamında üretilen *Streptomyces* türlerinin genel tarama işlemleri.

3.2.2.1. Biyolojik Tarama

19 *Streptomyces* türünün birer litrelik M₂ besiyerinde üretilmesiyle elde edilen kültürlerinin dondurarak kurutma işlemine tabi tutulduktan sonra elde edilen liyofilizatlarının EtOAc ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstraktlarının bir kısmı % 90 CHCl₃ / % 10 MeOH çözücü sisteminde 4 mg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 9 mm çapındaki kağıt disklere 20 µL emdirildi. Hazırlanan kağıt diskler steril laminar akış kabini içinde iyice kuruduktan sonra; *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. viridochromogene* (Tü 57), *E. coli* bakterileri, *C. albicans*, *M. miehei* (Tü 284), fungusları *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *S. subspicatus* mikroalgleri ile *R. solani* ve *P. ultimum* bitki patojenlerinin bulunduğu agar pleytlere yerleştirildi.

Bakteriler 12 saat boyunca 37 °C’de, funguslar 24 saat süreyle 27 °C’de, mikroalgler 96 saat gün ışığı altında 24–26 °C’de ve bitki patojenleri ise 48 saat süreyle 27 °C’de inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. Tablo 6.3’te görüldüğü gibi elde edilen zon çapları (mm) cetvel yardımıyla ölçüldü.

3.2.2.2. Kimyasal ve Farmakolojik Tarama

Ham ekstraktlar, silika jel kaplı cam tabakalar (10 × 20 cm) üzerinde spot edilip ardından % 95 CH₂Cl₂ / % 5MeOH ve % 90 CH₂Cl₂ / % 10 MeOH çözücü sistemleri kullanılarak ayrılmaları sağlandı. Tabakalar kurutulduktan sonra, öncelikli olarak gün ışığı altında kendiliğinden renkli bileşiklerin yerleri belirlendi. Daha sonra ise; UV ışığı altında 254 nm ve 366 nm’de kromatografik bantların yerleri işaretlendi ve ardından anisaldehit/sülfürik asit ve Ehrlich’s reaktifleri ile kromatografik bantlar renklendirilip ayrı ayrı değerlendirildi (Resim 6.17). Farmakolojik taramalar için 20 mg’lık ham ekstraktlar ilgili çalışma gruplarına gönderildi.

3.2.2.3. *Artemia salina* Sitotoksosite Testi

500 mL'lik ayırma hunisine 400 mL yapay deniz suyu bırakıldı ve ardından 1 g kuru *Artemia salina* L. yumurtası ilave edildi. Bu süspansiyondan 72 saat süreyle oda sıcaklığında hava geçirildi. Yumurtaların çatlayarak larvaların oluşması bu süre içerisinde hemen hemen tamamen gerçekleşmektedir. Ardından bir pipet yardımıyla derin kuyucuklu mikrotiter pleytlere (kuyucuk çapı 1,8 cm ve derinliği 2 cm) 20-40 larva içerecek şekilde 990 µL yapay deniz suyu bırakıldı ve mikroskop altında ölü larva sayıları belirlendi (N). Ardından 10 µg/µL DMSO (dimetil sülfoksit) şeklinde hazırlanan (saf bileşikler için 1 µg/µL DMSO şeklinde stok çözelti) ham ekstraktlardan 10 µL ilave edildi. Pozitif kontrol olarak aktinomisin D ve negatif kontrol olarak sadece DMSO ilave edildi. Ardından 24 saat buzdolabında bekletilip sonrasında mikroskop altında ölen larvalar sayıldı (A). Aşağıdaki eşitliğe göre % sitotoksosite hesaplandı;²⁵⁶

$$M = \left[\frac{A - B - N}{G - B - N} \right] \times 100$$

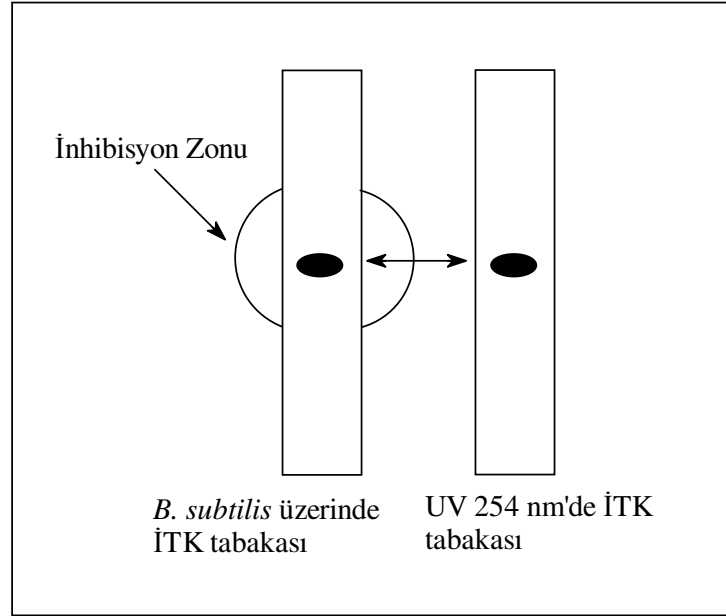
G: Toplam larva sayısı, **B:** Negatif kontrolde ölen ortalama larva sayısı, **A:** 24 saat sonra ölen larva sayısı, **N:** Başlangıçtaki ölü larva sayısı, **M:** % sitotoksosite (Aktinomisin D için % 100)

3.2.2.4. Biyootografi Tekniği

Antimikrobiyal etki gösteren sekonder metabolitlerin ayırımında ana stratejimiz fizikokimyasal metotlara dayalı olarak gerçekleştirildi. Bu metod ince tabaka kromatografisine (İTK) ve renklendirici reaktiflerin kullanılması temeline dayalı kimyasal tarama metodudur.¹¹³ İTK tabakalarına damlatılan örnekler farklı çözücü sistemleriyle birbirlerinden ayrılarak, fonksiyonel gruplarına göre, değişik kromojenik maddelerin püskürtülmesiyle görüntülenmektedir. Kimyasal tarama yöntemiyle birbirinden ayrılan bileşiklerin biyootografi testi ile antimikrobiyal aktiviteye sahip fraksiyonların yerleri belirlenebilmektedir.²⁵⁷ Bu test sisteminin prensibi ("bioautography agar overlay method"), bileşiklerin üzerinde yürütüldüğü ince tabaka

veya kağıt kromatogramlarından, bakteri veya funguslar ile inoküle edilmiş agara difüzyon ile geçişine dayanır (Şekil 3.7). Böylelikle çok küçük miktarlarda elde edilen maddelerin izolasyonu yapılarak biyolojik aktivitelerine bakılmaktadır. Biyootografinin temel yararı, bir karışımdan ayrılan bileşenlerin antimikrobiyal aktiviteleri hakkında bilgi sağlıyor olmasıdır.⁴

Bu çalışmada; büyük ölçekte üretilmelerine kimyasal taramalar sonucunda karar verilen BA2, AA50, BS40 ve AS42 kodlu *Streptomyces* türleri için biyootografi tekniği uygulandı. Resim 6.16'da *S. aureus* bakterisine *Streptomyces* sp. BA2'den elde edilen ham ekstraktın biyootografi tekniği uygulanması sonucu oluşan zon çapı görülmektedir.



Şekil 3.7. Biyootografi metodunun şematik gösterimi.

3.2.2.5. Seçilen Türlerin Büyük Ölçekte Üretimi ve Ekstraksiyonu

Bakteriyel suşların çoğu, besiyeri ortamlarında genelde 0,1-1 mg/L konsantrasyonda sekonder metabolit üretebilir. Bu sekonder metabolitlerden yeterli miktarda elde etmek için bakteriyel suşların en azından 25-50 litrelik ölçeklerde fermantasyonları gerekmektedir. Bu genellikle iki basamaklı bir işlemdir: Üretilecek mikroorganizmanın öncelikle agar kültürlerden 2-5 litrelik sıvı kültüre alınması ve ardından 25-50 litrelik fermantör ortamına aktarılması gerekmektedir. Fermantasyon işlemi, erlenlerin içerisinde aşılamanın yapıldığı bir çalkalayıcıda veya bir fermantörde yapılabilir. Kendiliğinden renkli bileşikleri (kinonlar gibi) ürettiği bilinen türlerin, bir jar fermantörden ziyade çalkalayıcıda üretilmeleri daha çok tercih edilmektedir.

Besiyeri ortamında mikroorganizmalar yeterince sürede üretildikten sonra elde edilen renkli kültür bir miktar selit ile karıştırılarak basınçlı filtrasyon işlemine tabi tutularak filtre edilmektedir. Filtrasyondan sonra su fazı (filtrat) ve misel kısmı ayrı ayrı olarak, etil asetat ile renkli ekstrakt elde edilmeyinceye kadar ekstraksiyon işlemine tabi tutulur. Çok az miktarda kalıntı elde edildiğinde ekstraksiyonun tamamlandığına karar verilebilir. Oda sıcaklığında etil asetat içinde ekstraktların saklanması bileşiklerin parçalanmasına veya daha küçük yapıları ürünler vermesine neden olabilmektedir. Çözeltiler mümkün olduğunca kısa sürede evapore edilmeli ve bileşiklerin parçalanma olasılığını minimuma indirmek için kalıntılar mümkün olan en düşük sıcaklıkta saklanmalıdır.

Ham ekstrakt elde etmek için bir diğer etkili ekstraksiyon metodu da XAD reçinesine adsorpsiyondur. Bu amaçla, filtrat kültürü XAD reçinesi (XAD-2 veya XAD-16) içeren cam bir kolondan uygun akış hızında geçirilir. Reçine tarafından tutulan bileşikler genellikle metanol veya metanol/su gradiyenti ile XAD üzerinden elüe edilir. Ucuz olmasından dolayı filtrat kısmının etil asetat ekstraksiyonu yerine XAD ile ekstraksiyon genelde tercih edilen yöntemdir. Eğer lipofilik etkileşimler varsa suda çözünen yüksek polariteli bileşikler iyi verimle elde edilebilir ve reçinenin yeniden kullanımı için geri kazanılması ve saflaştırması da daha kolay olmaktadır.

İzolasyon işlemi öncelikli olarak ilgilenilen bileşiğin polaritesine bağlıdır (bu ise değişik polaritede eluentler kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile belirlenir). Çoğu sekonder metabolit için uygun olan öncelikli iki ayırma sistemi vardır;

- Diklormetan/metanol (DCM/MeOH) veya etil asetat/sikloheksan gradient ile silika jel üzerinde ekstraktların flaş kromatografisi işlemine tabi tutularak fraksiyonlandırmak mümkündür. Bu sistem, fraksiyonları polaritelerine göre sınıflandırır. Silika jel kullanımının, metabolitleri yükseltgeme, daha küçük yapılara ayırma ve hatta parçalama gibi dezavantajları bulunmaktadır.
- Sephadex LH-20 kullanarak moleküler elek kromatografisinden faydalanmak mümkündür. Bu yöntemde ayırma işlemi molekül ağırlıklarına bağlıdır. Sephadex'in bilinen bir dezavantajı yoktur ve bileşiklerin geri kazanımları da oldukça yüksek verimle gerçekleşmektedir.

Elde edilen fraksiyonlardan bileşiklerin saflaştırılması aşamasında; PİTK, silika jel kolon kromatografisi, Sephadex LH-20 veya HPLC tekniklerinden hangisi veya hangisinin olacağına karar vermek için fraksiyonların İTK kromatogramlarına bakılmaktadır.

Bu stratejiler doğrultusunda; biyolojik ve özellikle de kimyasal taramalar sonucunda karar verilen *Streptomyces* sp. BA2 (25 L), *Streptomyces* sp. AA50 (17,5 L), *Streptomyces* sp. BS40 (25 L) lineer çalkalayıcıda ve *Streptomyces* sp. AS42 (5 L) ise orbital çalkalayıcıda büyük ölçekte üretildi. Elde edilen kültürler selit ile karıştırılıp basınçlı filtrasyona tabi tutularak filtrat ve misel kısımları ayrıldı. Misel kısımları etil asetat ve aseton ile filtrat kısmı ise XAD kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstraktlar silika jel kolon kromatografisine tabi tutularak fraksiyonlara ayrıldı. Elde edilen fraksiyonlardan bileşiklerin saflaştırılması, fraksiyon içerisinde bulunan bileşenlerin fizikokimyasal özelliklerine uygun kromatografik teknikler kullanılarak gerçekleştirildi. Bileşiklerin saflaştırılması Bulgular bölümünde Seçilen Türlerin Araştırılması başlıklı kısımda ayrıntılı olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *STREPTOMYCES* TÜRLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE YÖNÜNDEN TARANMASI

Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında 3 farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından seçici besiyerleri kullanılarak izolasyonları ve teşhisleri yapılan 67 *Streptomyces* ve bir *Nocardioopsis* türünün TSB besiyeri kullanılarak üremeleri sağlandı. Bu 68 türün TSB kültür ortamında üretmiş oldukları sekonder metabolitler, etil asetat kullanılarak Şekil 3.2'deki akış şemasına göre ekstrakte edildi. Elde edilen sekonder metabolit ekstraktlarının disk difüzyon yöntemine göre biyolojik aktivitelerinin taranması sonucunda, bunlar arasından 25 *Streptomyces* türünden elde edilen ham ekstraktların test edilen standart Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ile *C. albicans* ATCC 10231 mantarına karşı değişik oranlarda biyolojik aktivite gösterdikleri gözlemlendi (Tablo 6.1).

Biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenen AA50, AA58, AR6, AR12, AR17, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH46, BSH50, CA3, CA12, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS43, CS44 ve CAH29 kodlu türlerinin yeniden üretilerek biyolojik aktivite yönünden denenmesi için, yapılan literatür çalışmaları sonucunda M₂ besiyeri kullanılarak tekrar üretilmelerine karar verildi. M₂ besiyerinde üretilmeleri sağlanan 25 *Streptomyces* türünden AA50, AA58, AR12, AR17, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH50, CA3, CA12, CA14, CA17, CA21, CS41, CS44 ve CAH29 kodlu 19 türün filtrat ve misellerinin etil asetat ve asetonla ekstraksiyonları Şekil 3.4'teki akış şemasına göre yapıldı. Geriye kalan AR6, AS41, AS42, BSH46, CA16 ve CS43 kodlu türlerde ise daha önce yapılan çalışmalarda su fazında da biyolojik aktivite göstermeleri nedeniyle bunların filtrat kısımlarında Şekil 3.5'te gösterildiği şekliyle pH 3 ayarlaması yapıldı. Ardından filtrat ve miseller için etil asetat ve aseton kullanılarak sekonder metabolitlerinin ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. M₂ besiyeri kullanılarak üretilmeleri sağlanan seçili 25 *Streptomyces* türünden elde edilen ekstraktlar biyolojik aktivite yönünden disk difüzyon yöntemine göre tekrar test edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.2'de görülmektedir.

TSB ve M₂ kültür ortamında üretilen *Streptomyces* türlerinden elde edilen ham ekstraktların biyolojik aktivite yönünden disk difüzyon yöntemine göre araştırılması işlemlerinde; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853, standart bakteri suşları (37 °C’de 24 saat) ile *C. albicans* ATCC 10231 mantarı üzerinde 25 °C’de 48. saat sonunda oluşan inhibisyon zonları cetvelle ölçülerek belirlendi. Saflaştırılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirilmesinde, bu standart bakterilere ek olarak *B. subtilis* ATCC 11774’te kullanıldı. Standart mikroorganizma suşlarının tamamı üzerine, Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, pozitif kontrol olarak İmipenem (10 µg), Ofloksasin (5 µg), Netilmisin (30 µg) ve Amoksisilin (20 µg)/Klavulonik asit (10 µg) antibiyotikleri ile antifungal Amfoterisin B (30 µg)’nin oluşturdukları zon çapları belirlendi (Resim 6.1-6.6). Negatif kontrol olarak kullanılan saf su, etil asetat ve kloroform:metanol (1:1)’den 20 µL emdirilmiş 6 mm çapındaki kağıt disklerin kurutulduktan sonra standart mikroorganizmalara uygulanması sonucunda ise herhangi bir zon oluşturmadıkları tespit edildi (Resim 6.7).

Tablo 4.1. Test edilen mikroorganizmalara karşı standart antibiyotiklerin etkisi.

| Test edilen mikroorganizmalar | İnhibisyon Zon Çapları (mm) ^a | | | | |
|---------------------------------------------|------------------------------------------|------|------|------|------|
| | IPM | OFX | NET | AMC | AFB |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 26 | 28 | 24 | 20 | t.e. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | >>30 | 24 | 22 | >30 | t.e. |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 | >>30 | 26 | >30 | 28 | t.e. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 24 | 18 | 22 | R | t.e. |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774 | >>30 | 26 | >>30 | 28 | t.e. |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | 13 |

^a 6 mm çapında kağıt disk, **t.e.:** Test edilmedi, **R:** Dirençli, **IPM:** İmipenem (10 µg), **OFX:** Ofloksasin (5µg), **NET:** Netilmisin (30µg), **AMC:** Amoksisilin (20 µg)/Klavulonik asit (10 µg), **AFB:** Amfoterisin B (30 µg).

4.2. *STREPTOMYCES* TÜRLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE VE KİMYASAL TARAMA YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

TSB kültür ortamında üretimleri gerçekleştirildikten sonra etil asetat kullanılarak elde edilen ham ekstraktların disk difüzyon yöntemine göre yapılan taramalarda aktivite gösterdiği belirlenen 25 türden; AA50, AA58, AR6, AR12, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH50, CA3, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS44 ve CAH29 kodlu iyi aktivite gösteren 21 tür belirlendi. *Streptomyces* cinslerine ait bu bakteriler, saklanma koşullarından çıkarılıp 28 °C'de 5 gün süreyle M₂ agar besiyerinde üretildi.²²³ M₂ agarda üreyen mikroorganizmalar, 1 L'lik erlenlerde 250 mL M₂ içeren 4 adet besiyerine alınıp orbital inkübatörde 28 °C'de, 155 rpm'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. Birer litre üretilen bu *Streptomyces* türlerden elde edilen kültürler Şekil 3.6'daki akış şemasına göre, önce liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu ve ele geçen liyofilizat etil asetatla ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstraktlardan 9 mm çapındaki kağıt disklere 20 µL emdirildi. Hazırlanan kağıt diskler steril laminar akış kabini içinde iyice kuruduktan sonra; *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. viridochromogene* (Tü 57), *E. coli* bakterileri, *C. albicans*, *M. miehei* (Tü 284), fungusları *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *S. subspicatus* mikroalgleri ile *R. solani* ve *P. ultimum* bitki patojenlerinin bulunduğu agar pleytlere yerleştirilmek suretiyle oluşan zon çapları belirlendi. Ayrıca elde edilen ham ekstraktlar *Artemia salina* L. kullanılarak sitotoksik aktivite yönünden incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.3'te görülmektedir.

Kimyasal tarama açısından değerlendirmek için mevcut ham ekstraktlar silika jel kaplı cam tabakalar (10 × 20 cm) üzerinde spot edilip ardından CH₂Cl₂:MeOH (95:5) ve CH₂Cl₂:MeOH (90:10) çözücü sistemleri kullanılarak ayrılmaları sağlandı. Tabakalar kurutulduktan sonra, öncelikli olarak gün ışığı altında kendiliğinden renkli bileşiklerin yerleri belirlendi. Daha sonra ise; UV ışığı altında 254 nm ve 366 nm'de kromatografik bantların yerleri işaretlendi ve ardından anisaldehit/sülfürik asit ve Ehrlich's reaktifleri ile kromatografik bantlar renklendirilip ayrı ayrı değerlendirildi (Resim 6.17).

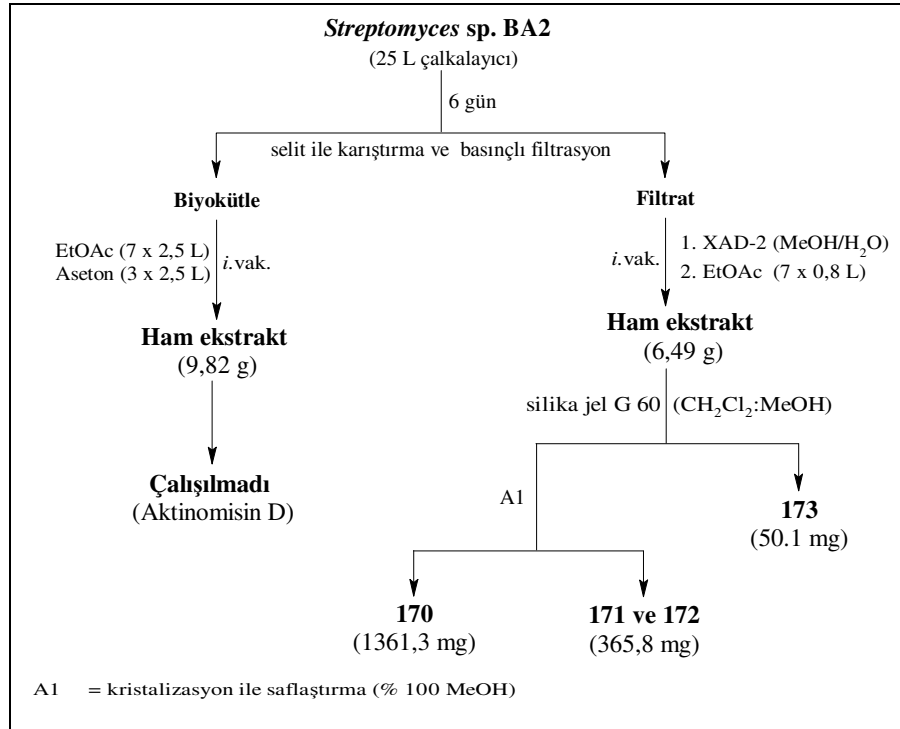
Kimyasal tarama sonucunda, ilgi çekici kromatogramlara sahip olan BA2, AA50, BS40 ve BS39 kodlu rizosferik *Streptomyces* türlerinin büyük ölçekte üretilmelerine karar verildi. Bu türlerden elde edilen ham ekstraktlara biyootografi tekniği uygulanarak biyolojik aktif fraksiyonların yerleri belirlendi (Resim 6.16).

4.3. SEÇİLEN TÜRLERİN ARAŞTIRILMASI

4.3.1. Rizosferik *Streptomyces* sp. BA2

4.3.1.1. Fermantasyon ve İzolasyon

Streptomyces sp. BA2'nin M₂ agar besiyerinde koyu kahverengi görünen iyi büyümüş pleytleri seçildi ve ardından 1 L'lik erlenmayerlerde her biri 250 mL M₂ besiyeri içeren 100 adet besiyerine aşılama yapıldı. Fermantasyon 28 °C ve 95 rpm'de lineer inkübatörde 6 gün süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen portakal renkli kültür, selitle karıştırılıp ardından basınçlı filtrasyon uygulanarak biyokütle ve filtrat kısmı birbirinden ayrıldı. Filtrat kısmı Amberlit XAD-2 kullanılarak adsorbe edildikten sonra MeOH/H₂O sistemi ile elüe edildi. Miseller etil asetat (7 × 2,5 L) ve asetonla ekstrakte (3 × 2,5 L) edildi. Amberlit XAD-2 kullanılarak su fazından ayrılması sağlanan ham filtrat ekstraktından (6,49 g) kromatografik teknikler kullanılarak Aktinomisin D (**170**), Monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımı ile *bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**) elde edildi. Misellerden elde edilen ham ekstraktın (9,82 g) ise İTK kromatogramında sadece Aktinomisin D (**170**) belirlenmiş olmasından dolayı saflaştırma yapılmadı (Şekil 4.1).



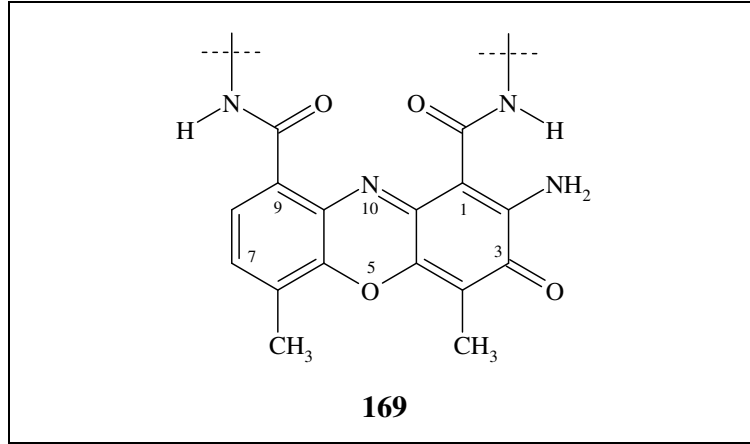
Şekil 4.1. Rizosferik *Streptomyces* sp. BA2'nin sekonder metabolitlerinin araştırılması.

4.3.1.2. Rizosferik *Streptomyces* sp. BA2'nin Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması

4.3.1.2.1. Aktinomisin D (170)

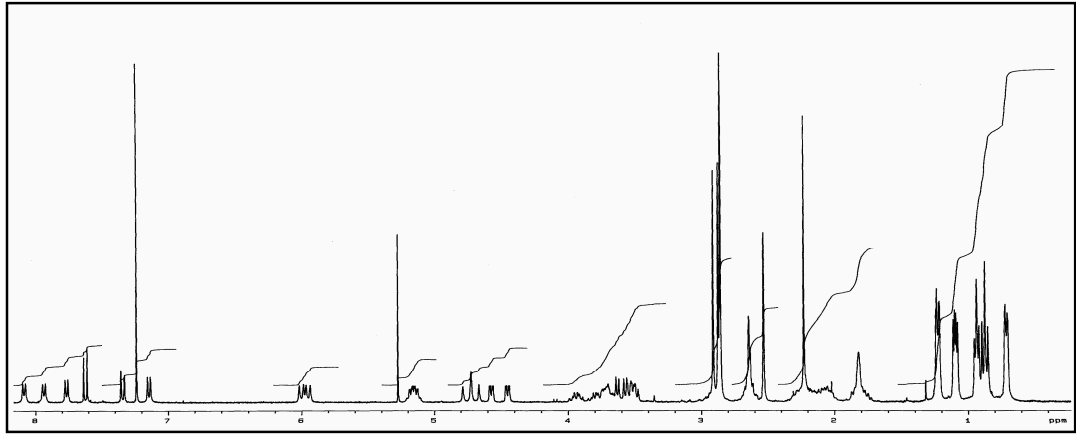
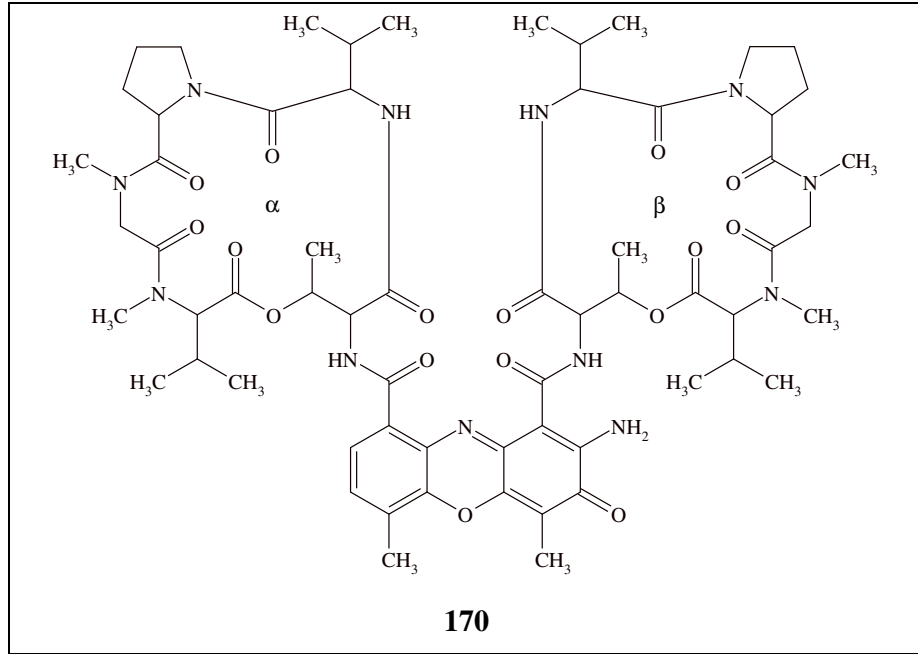
Aktinomisin D (170), NaOH ile renk değiştirmeyen fakat anisaldehyit/sülfürik asit reaktifi ile kırmızı renk veren fraksiyon II'deki kırmızımsı-portakal renginde düşük polariteye sahip, CH₂Cl₂:MeOH (95:5) çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,42 olan ana ürün olarak (1361,3 mg) elde edildi.

Aktinomisin D (170)'nin ¹H NMR spektrumunda, üç amit protonu δ 8,13, 7,97 ve 7,80'de geniş dubletler, 1,2,3,4-tetrasüstitüe aromatik halkanın iki *orto* eşleşmiş protonu δ 7,65 ve 7,37'de ve aromatik sistemin *peri*-pozisyonundaki metil gruplarının δ 2,57 ve 2,23'de üçer H'lık singletler görölmektedir. Bu sinyaller aktinomisinlerde bulunan fenoksazinon kromofor (169) grubu için oldukça karakteristik bir durumdur.



Ayrıca Şekil 4.2'deki ¹H NMR spektrumunda, bir kompleks peptidin varlığına işaret eden ve δ değerleri 7,20–0,75 arasında değişen üst üste çakışmış NMR sinyalleri görölmektedir. δ 7,20 (*J* = 6,4 Hz)'de 1 H'lık geniş bir dublet ile oksijenli veya α-amino asit protonlarına ait 8 proton sinyali δ 6,03 (d), 5,96 (d), 5,25–5,15 (m, 2 H), 4,78 (d), 4,73 (d), 4,61 (dd) ve 4,49 (dd) şeklinde olduğu belirlendi. Metilen ve metin gruplarından kaynaklı tam olarak ayrılmamış 8 H'lık yoğunluğa sahip sinyaller δ 4,03–3,31 arasında tespit edildi. Ayrıca *N*-metil gruplarından kaynaklı olabilecek, dört metil grubuna ait 12 H'lık yoğunluğa sahip dört singlet sinyal δ 2,93–2,88 arasında bulundu ve halkalardaki çeşitli metilen gruplarından kaynaklı 6 H'lık yoğunluğa sahip

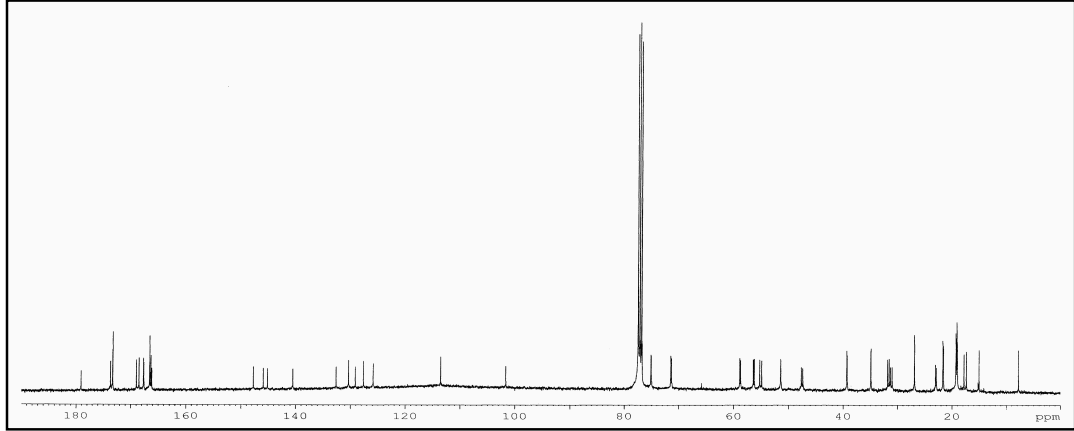
çoklu pikler δ 2,65–2,57 arasında, 8 H'lık çoklu pikler δ 2,38–1,76 arasında ve iki metil grubundan kaynaklı 6 H'lık pikler ise 1,28 (m) olarak belirlendi. δ 1,17–1,07 arasında iki metil grubundan kaynaklı çoklu pikler ve 4 metil grubundan kaynaklı 12 H'lık pikler δ 0,99–0,85 arasında belirlendi ve son olarak iki metil grubundan kaynaklı bir dubletin δ 0,75 ($J = 4,9$ Hz) olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2. Aktinomisin D (**170**)'nin ^1H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl_3).

Şekil 4.3'teki ^{13}C NMR spektrumunda fenoksazinon sistemindeki halka-karbon atomlarından kaynaklı olarak δ 100–150 arasında 11 sinyal ile δ 180'de ise 1 sinyal

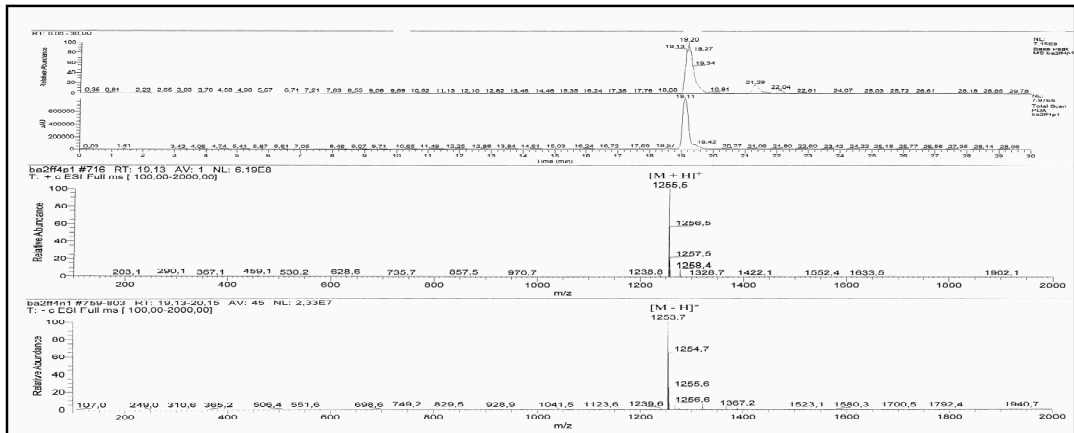
olmak üzere 12 sinyal olduğu belirlendi. Bir peptit sistemindeki lakton-karbonil grupları ve amid gruplarının karakteristik pikleri olan 12 tane sp^2 karbonil gruplarından kaynaklı pikler 170 ppm civarlarında olduğu belirlendi. δ 50–72 arasında amino asitlerin α -karbon atomlarından kaynaklı sinyaller tespit edildi. Ayrıca δ 74–75’de oksijenlenmiş metin karbonlarından kaynaklı iki sinyal bulundu.



Şekil 4.3. Aktinomisin D (170)'nin ^{13}C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl_3).

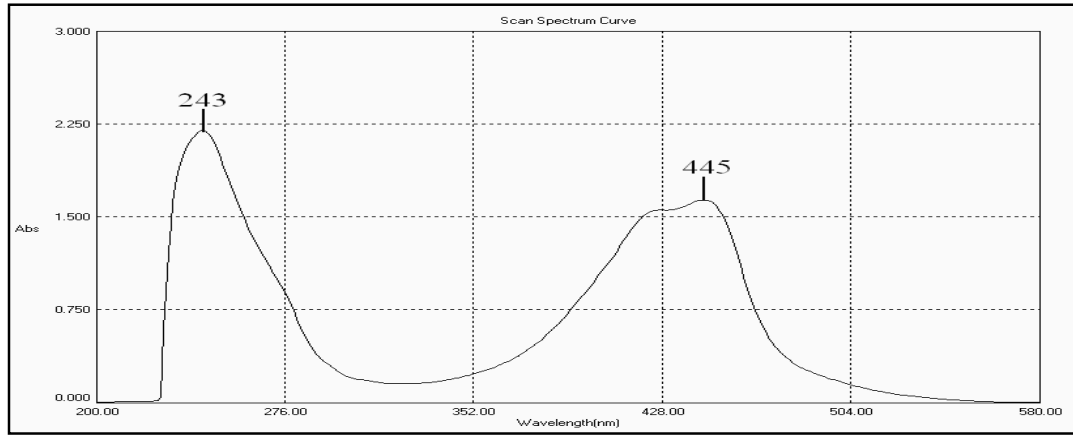
Şekil 4.4'teki HPLC-ESI-MS spektrumundan aktinomisin D (170)'in basit formülünün $\text{C}_{62}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ olduğu bulundu ve (+)-ESI-MS'de $[\text{M}+\text{H}]^+$ şeklindeki kütesinin (m/z) 1255,5 dalton olduğu belirlendi.

Bu sonuçlara göre aktinomisin D (170) AntiBase'de⁹³ tarandı ve elde edilen spektrumlar literatür sonuçları²⁵⁸ ile karşılaştırılarak yapı doğrulandı (Tablo 4.2).

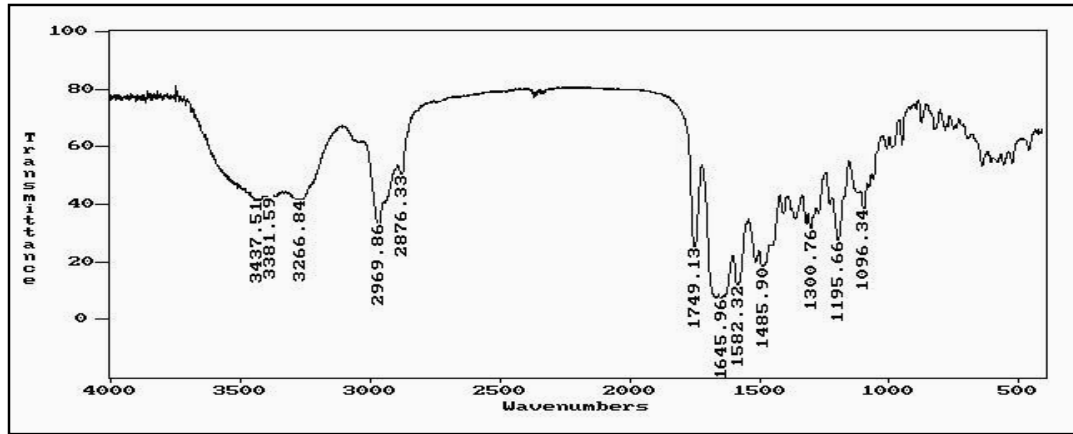


Şekil 4.4. Aktinomisin D (170)'nin HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu.

Aktinomisin D (**170**)'nin CH_2Cl_2 içerisinde hazırlanan $50 \mu\text{M}$ 'lık çözeltisinin UV-vis spektrumunda 243 ve 445 nm'de maksimum absorpsiyon yaptığı belirlendi (Şekil 4.5). FT-IR sonuçlarına göre ise $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3437, 2969, 1749, 1645 ve 1195 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. $50 \mu\text{M}$ 'lık Aktinomisin D (**170**)'nin UV spektrumu (CH_2Cl_2).



Şekil 4.6. Aktinomisin D (**170**)'nin FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Portakal-kırmızı renkte olan aktinomisinler bir çok *Streptomyces* türünden izole edilen kromopeptit antitümör antibiyotik ailesindedir ve 80'den fazla türevi ile pek çok sentetik varyasyonu bilinmektedir.²⁵⁹⁻²⁶¹ Waksman ve Woodruff tarafından 1940 yılında izole edilen ilk kristalin antibiyotiktir.²⁶² Aktinomisin kompleksleri A, B, C, D, I, X, Z ve diğer aktinomisin analogları şeklinde belirlenmişlerdir.²⁶³ Doğal aktinomisinlerin tamamı aynı fenoksazinon kromofor grubuna sahiptir ve sadece sahip oldukları iki

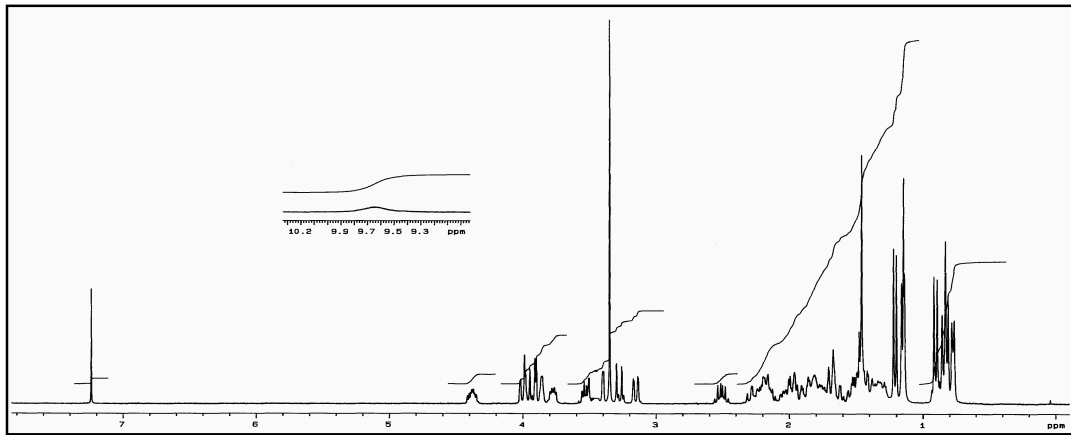
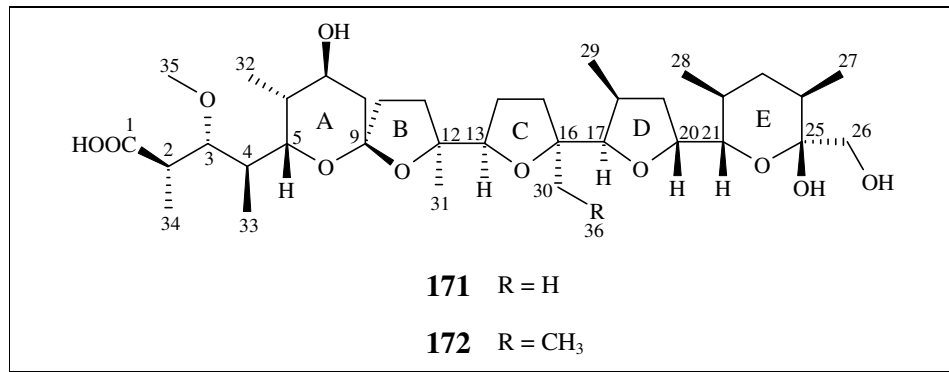
depsipentapeptit kısımlarındaki amino asit içeriklerinde farklılık gösterirler. Aktinomisin C₃ ve D özellikle Wilm's tümörlerinin²⁶⁴ ve çocuklarda yumuşak doku sarkomlarının²⁶⁵ tedavisinde antikanser ilaç olarak klinik uygulama alanı bulmuşlardır. Son yıllarda aktinomisin D (**170**), AIDS için terapötik bir ajan olarak önerilmektedir çünkü HIV-1 negatif-iplik transferinin güçlü bir inhibitörü olarak görev yapmaktadır.²⁶⁶ Aktinomisinlerde bulunan düzlemsel fenoksazinon kromofor grubu DNA ile etkileşebilmekte ve hızla çoğalan dokuların hücre büyümesinin inhibisyonunu yönlendiren RNA-polimerazın aktivitesini inhibe etmektedir.²⁶⁷

Tablo 4.2. Aktinomisin D (**170**)'nin fizikokimyasal özellikleri ve ¹H, ¹³C NMR verileri.

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Moleküler Formül: C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆ (1255,4)</p> <p>Görünüm: Portakal rekli toz halinde (1361,3 mg)</p> <p>Reaksiyonları: Anisaldehit/Sülfürik asit ile kırmızı renk, 2 N NaOH ile renk değişimi yok</p> <p>R_f: 0,42 (CHCl₃:MeOH (95:5))</p> <p>(+)-ESI MS: <i>m/z</i> (%) = 1277 ([M + Na]⁺, 100), 1255 ([M + H]⁺, 6)</p> <p>(-)-ESI MS: <i>m/z</i> (%) = 1254 ([M - H]⁻)</p> <p>¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ = 8,13 (d br, ³J = 6,4 Hz, 1 H, NH-Val_α), 7,97 (d br, ³J = 6,4 Hz, 1 H, NH-Val_β), 7,81 (d br, ³J = 6,4 Hz, 1 H, NH-Thr_β), 7,67 (d, ³J = 7,9 Hz, 1 H, 8-H), 7,39 (d, ³J = 7,9 Hz, 1 H, 7-H), 7,21 (d br, ³J = 6,4 Hz, 1 H, NH-Thr_α), 6,03 (d, ³J = 9,1 Hz, 1 H, 2-H Pro_α), 5,96 (d, ³J = 9,1 Hz, 1 H, 2-H Pro_β), 5,25-5,15 (m, 2 H, 3-H, Thr_{α,β}), 4,81 (d, ³J = 18,1 Hz, 1 H, 2-H_α, Sar_α), 4,73 (d, ³J = 18,8 Hz, 1 H, 2-H_β, Sar_β), 4,61 (dd, ³J = 6,4 Hz, ³J = 2,3 Hz, 1 H, 2-H Thr_α), 4,49 (dd, ³J = 6,4, ³J = 2,3 Hz, 1 H, 2-Thr_β), 4,03-3,40 (m, 8 H, 2-H_b Sar_{α,β}, 2-H, Val_{α,β}, 5-H₂, Pro_{α,β}), 2,93, 2,90, 2,88 (3 s, 3 H + 3 H + 6 H, NCH₃ Me-Val_{α,β}, NCH₃, Sar_{α,β}), 2,67, 2,57 (m + s, 6 + 3, 3-H_a Pro_{α,β}, 2,3-H, MeVal_{α,β}, 6-CH₃), 2,38-1,76 + 2,23 (m + s, 8 + 3 H, 3-H_b, 4-H₂ Pro_{α,β}, 3-H Val_{α,β}, 4-CH₃), 1,28 (m, 6 H, CH₃, Thr_{α,β}), 1,17-1,07 (m, 6 H, CH₃ Val_{α,β}), 0,99-0,82 (m, 12 H, CH₃ Val_{α,β}, CH₃ Me Val_{α,β}), 0,75 (d, ³J = 4,9 Hz, 6 H, CH₃ MeVal_{α,β}).</p> <p>¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : δ = 179,1 (s), 173,7 (s), 173,4 (s), 173,3 (s), 173,2 (s), 168,9 (s), 168,5 (s), 167,7 (s), 167,6 (s), 166,6 (s), 166,5 (s), 166,3 (s), 166,2 (s), 147,7 (s), 145,9 (s), 145,1 (s), 140,5 (s), 132,6 (s), 130,3 (d), 129,1 (s), 127,6 (s), 125,8 (d), 113,5 (s), 101,6 (s), 75,1 (d), 75,0 (d), 71,4 (d), 71,3 (d), 58,9 (d), 58,8 (d), 58,7 (t), 56,4 (d), 56,2 (d), 55,2 (d), 54,9 (d), 51,4 (t), 51,3 (d), 47,6 (t), 47,3 (t), 39,3 (d), 39,2 (d), 34,9 (d), 34,8 (q), 31,8 (q), 31,5 (q), 31,3 (t), 31,0 (t), 26,9 (q), 23,0 (q), 22,9 (t), 21,7 (t), 21,6 (q), 19,3 (q), 19,2 (q), 19,1 (q), 19,1 (q), 19,0 (q), 19,0 (q), 17,8 (q), 17,4 (q), 15,1 (q), 7,8 (q).</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

4.3.1.2.2. Monensin B (171) ve Monensin A (172)

Monensin B (171) ve A (172) karışımı, içerisinde Aktinomisin D (170)'nin de bulunduğu fraksiyon II'den MeOH içerisinde kristalizasyon yöntemi ile saflaştırıldı. Monensin B (171) ve A (172) renksiz, UV aktif olmayan fakat vanilin/sülfürik asit reaktifi ile açık kırmızı renk oluşturan bileşen olarak İTK üzerinde belirlendi. Monensin B (171) karışım içerisinde ana bileşen olarak yer almakta ve monensin A (172)'nin ise oldukça az bir miktara sahip olduğu analitik HPLC çalışmaları sonucunda tespit edildi. Karışımın CH₂Cl₂:MeOH (95:5) çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,52 olarak belirlendi.

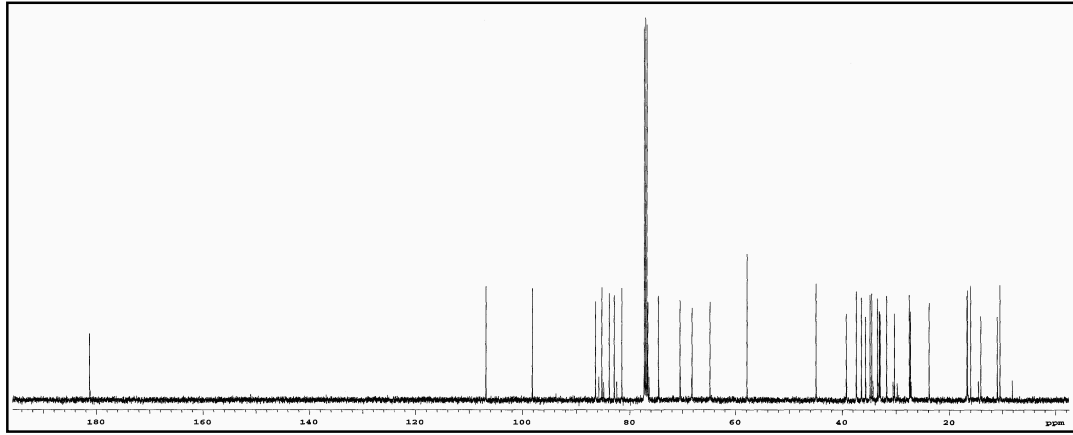


Şekil 4.7. Monensin B (171) ve A (172) karışımının ¹H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

Şekil 4.7'deki ¹H NMR spektrumunda karışım içerisinde baskın olan monensin B (171)'nin sinyalleri net olarak görülmektedir. Yapıdaki karboksilik asit grubundan dolayı δ 9,67'de geniş bir singlet görülmektedir. Metoksi grubundan kaynaklı δ 3,35'de 3 H'lık bir singlet ile δ 3,10–4,50 ppm aralığında 10 protona eşdeğer farklı sinyaller belirlendi. δ 0,75–0,92 aralığında 4 farklı metil grubundan kaynaklı 12 H'lık dubletler

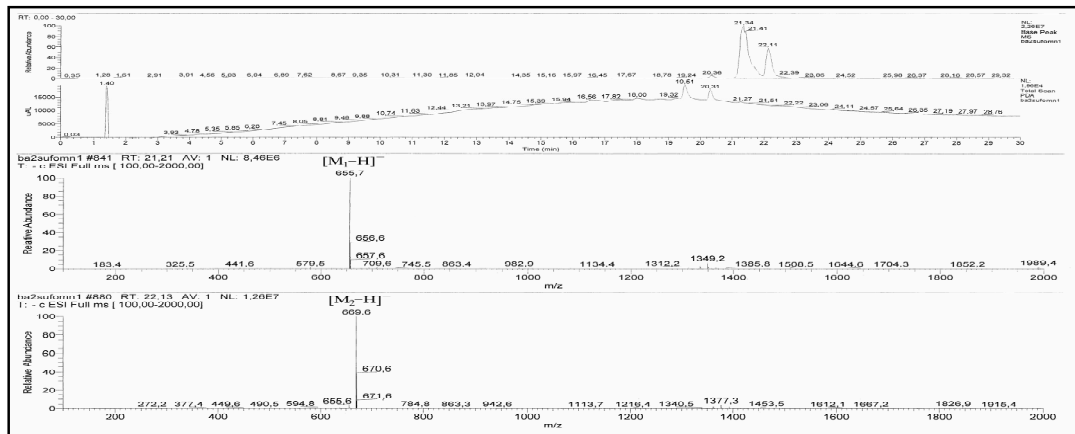
ve δ 1,1–1,23 ppm aralığında 9 protona eşdeğer 3 farklı metil grubuna ait sinyalin yanında δ 1,46'da 3H'lık bir singlet bulunmaktadır. Ayrıca yapıdaki çeşitli metil ve metilen gruplarından kaynaklı 22 H'lık multiplerin δ 1,25–2,55 aralığında olduğu belirlendi.

^{13}C NMR spektrumunda (Şekil 4.8) monensin B (**171**)'den kaynaklı 35 farklı yüksek yoğunluğa sahip sinyallerin yanında 36 farklı çok daha düşük yoğunluğa sahip monensin A (**172**)'dan kaynaklı sinyaller de tespit edildi. Monensin B (**171**) ve monensin A (**172**)'ya ait kimyasal kayma değerleri Tablo 4.3'te verilmektedir.



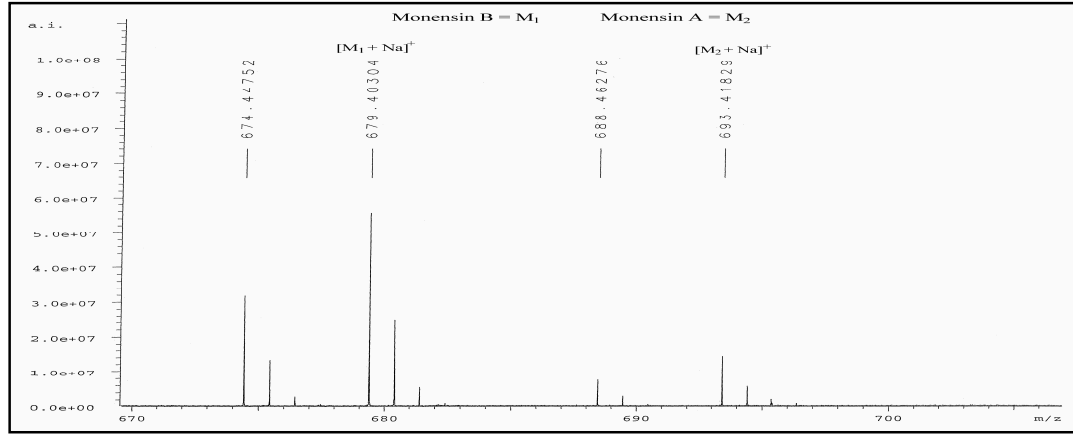
Şekil 4.8. Monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımının ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl_3).

Şekil 4.9'daki HPLC-ESI-MS kromatogramında 21,21. dakikada $[\text{M}_1-\text{H}]^-$ m/z değeri 655,7 olan monensin B (**171**) in geçtiği ve 22,13. dakikada ise $[\text{M}_2-\text{H}]^-$ m/z 669,6 olan monensin A (**172**)'nin olduğu belirlendi.



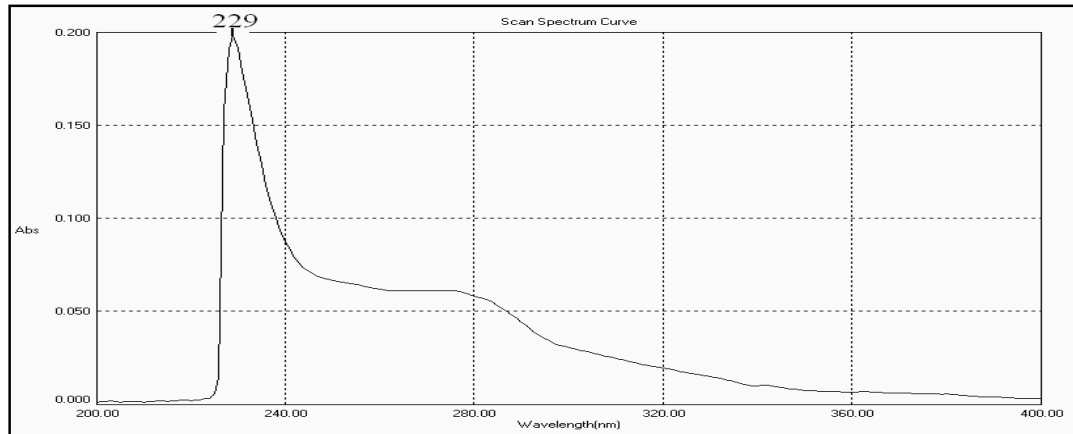
Şekil 4.9. Monensin B (**171**) ve A (**172**)'nin HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu.

HR-ESI-MS sonuçlarına göre (Şekil 4.10) Monensin B (**171**)'nin kapalı formülünün $C_{35}H_{60}O_{11}$ olduğu $[M_1+Na]^+$ m/z oranının 679,4030 ve Monensin A (**172**)'nin kapalı formülünün $C_{36}H_{62}O_{11}$ $[M_2+Na]^+$ formunda m/z oranının 693,4183 olduğu belirlendi. Bileşiklerin bu formlarının hesaplanan kütleleri ise sırasıyla 679,4028 ve 693,4184 olarak bulundu.



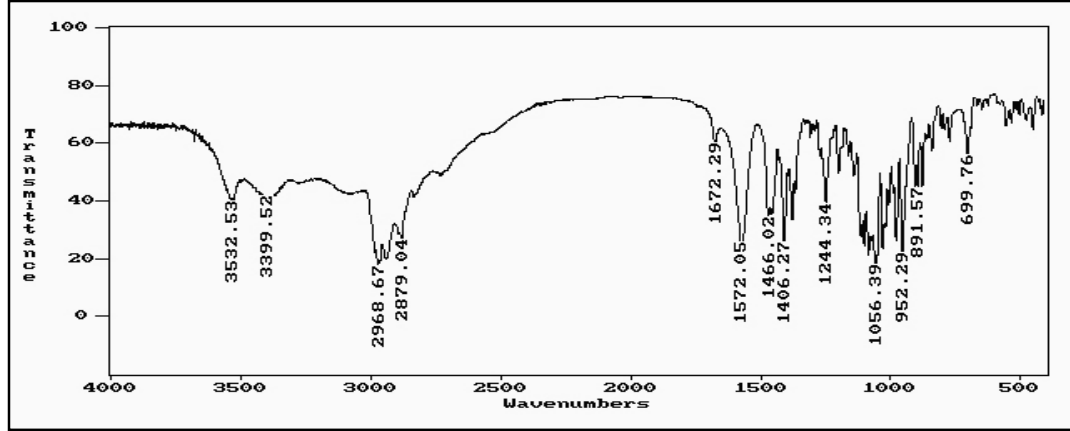
Şekil 4.10. Monensin B (**171**) ve A (**172**)'nin HR-ESI-MS spektrumu.

Monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımının CH_2Cl_2 'de hazırlanan 10 mg/mL'lik çözeltisinin UV spektrumunda 229 nm'de maksimum absorpsiyon yapıldığı belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 10 mg/mL'lik monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımının UV spektrumu (CH_2Cl_2).

Şekil 4.12’de, karışımın KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR sonuçlarına göre ise ν_{\max}^{KBr} 3532, 3399, 2968, 1572, 1406, 1244 ve 1056 cm^{-1} ’de pikler tespit edildi.



Şekil 4.12. Monensin B (171) ve A (172) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Elde edilen verilere göre AntiBase’de yapılan taramalar sonucunda karışım içerisindeki bileşenlerin monensin B (171) ve monensin A (172) olduğu belirlendi.⁹³ Spektrumların literatür sonuçları ile karşılaştırılmasıyla yapılar doğrulandı.²⁶⁸

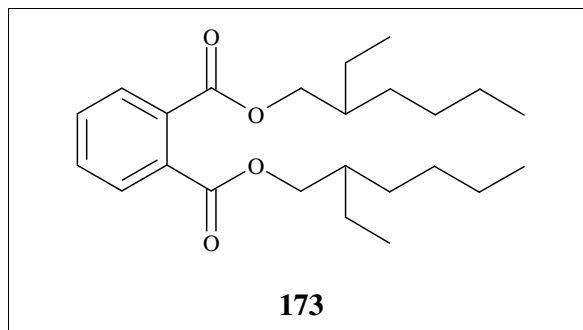
Monensinler *Streptomyces cinnamonensis*’ten izole edilmiş doğal poliyeter iyonofor antibiyotiklerdir.²⁶⁹ Karboksilik poliyeter antibiyotikler olan monensinler, veteriner hekimlikte 30 yılı aşkın bir süredir yaygın bir biçimde ticari öneme sahip bileşikler olarak kullanılmaktadır.²⁷⁰ Özellikle kümes hayvanlarında antikoksidial ajan olarak ve büyük baş hayvanların besin kalitesini artırmak için monensinlerden faydalanılmaktadır.²⁷¹ Monensin A (172) özellikle Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ ve Ag^+ gibi tek değerlikli kationlarla kompleks oluşturabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı hücrenin lipid membranından, Na^+/H^+ ’nın antiport taşınmasında olduğu gibi tek değerlikli kationların geçişine olanak sağlayabilmektedir.²⁷² Monensinlerin antibakteriyel özellikleri, hücre veya organel membranlardan metal kationlarının taşınmasına olanak sağlamasından kaynaklanmaktadır.²⁷³

Tablo 4.3. Monensin B (**171**) ve monensin A (**172**)'nin ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, 125 MHz, CDCl_3).

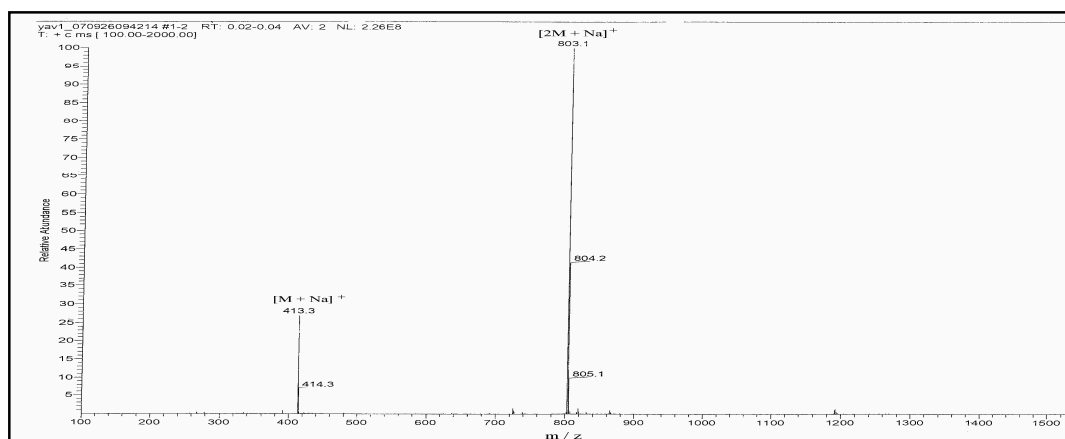
| Karbon No. | 171 | 171 ²⁶⁸ | 172 | 172 ²⁶⁸ |
|------------|------------|--------------------|------------|--------------------|
| 1 | 181,30 (s) | 181,33 (s) | 181,24 (s) | 181,40 (s) |
| 2 | 44,91 (d) | 45,03 (d) | 44,91 (d) | 45,12 (d) |
| 3 | 82,90 (d) | 83,03 (d) | 82,90 (d) | 83,16 (d) |
| 4 | 37,35 (d) | 37,47 (d) | 37,39 (d) | 37,58 (d) |
| 5 | 68,18 (d) | 68,31 (d) | 68,25 (d) | 68,46 (d) |
| 6 | 34,82 (d) | 34,91 (d) | 34,79 (d) | 34,92 (d) |
| 7 | 70,45 (d) | 70,55 (d) | 70,38 (d) | 70,61 (d) |
| 8 | 33,45 (t) | 33,58 (t) | 33,45 (t) | 33,61 (t) |
| 9 | 106,85 (s) | 106,96 (s) | 106,91 (s) | 107,15 (s) |
| 10 | 39,24 (t) | 39,34 (t) | 39,17 (t) | 39,34 (t) |
| 11 | 33,11 (t) | 33,22 (t) | 33,20 (t) | 33,35 (t) |
| 12 | 85,22 (s) | 85,32 (s) | 85,16 (s) | 85,37 (s) |
| 13 | 81,49 (d) | 81,59 (d) | 82,42 (d) | 82,64 (d) |
| 14 | 27,33 (t) | 27,42 (t) | 27,19 (t) | 27,31 (t) |
| 15 | 30,30 (t) | 30,40 (t) | 29,79 (t) | 29,97 (t) |
| 16 | 83,84 (s) | 83,91 (s) | 85,77 (s) | 86,02 (s) |
| 17 | 86,39 (d) | 86,47 (d) | 84,88 (d) | 85,04 (d) |
| 18 | 34,49 (d) | 34,60 (d) | 34,26 (d) | 34,46 (d) |
| 19 | 32,95 (t) | 33,05 (t) | 33,11 (t) | 33,35 (t) |
| 20 | 76,56 (d) | 76,68 (d) | 76,33 (d) | 76,53 (d) |
| 21 | 74,55 (d) | 74,61 (d) | 74,43 (d) | 74,58 (d) |
| 22 | 31,74 (d) | 31,85 (d) | 31,77 (d) | 31,92 (d) |
| 23 | 35,65 (t) | 35,76 (t) | 35,58 (t) | 35,76 (t) |
| 24 | 36,40 (d) | 36,51 (d) | 36,43 (d) | 36,61 (d) |
| 25 | 98,14 (s) | 98,27 (s) | 98,20 (s) | 98,44 (s) |
| 26 | 64,80 (t) | 64,91 (t) | 64,80 (t) | 65,02 (t) |
| 27 | 15,98 (q) | 16,05 (q) | 15,98 (q) | 16,12 (q) |
| 28 | 16,60 (q) | 16,76 (q) | 16,60 (q) | 16,77 (q) |
| 29 | 14,07 (q) | 14,14 (q) | 14,50 (q) | 14,63 (q) |
| 30 | 23,85 (q) | 23,92 (q) | 30,56 (t) | 30,69 (t) |
| 31 | 27,55 (q) | 27,65 (q) | 27,37 (q) | 27,50 (q) |
| 32 | 10,44 (q) | 10,51 (q) | 10,44 (q) | 10,53 (q) |
| 33 | 10,94 (q) | 11,01 (q) | 10,94 (q) | 11,05 (q) |
| 34 | 16,69 (q) | 16,68 (q) | 16,73 (q) | 16,77 (q) |
| 35 | 57,85 (q) | 57,91 (q) | 57,85 (q) | 58,00 (q) |
| 36 | – | – | 8,13 (q) | 8,26 (q) |

4.3.1.2.3. *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**)

Bis(2-etilhegzil)ftalat (**173**) *Streptomyces* BA2'nin filtrat kısmından elde edilen ham ekstraktın silika jel kolonundan CH₂Cl₂ ile elüe edilmesi sonucu sarımtırak renkte yağmsı bir madde olarak izole edildi. Bu bileşik aseton ve kloroformda iyi çözünmekte, metanolde az ve suda ise hiç çözünmemektedir. *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**), 254 nm'de UV ışığını absorblamakta ve anisaldehyt/sülfürik asit reaktifi ile kahverenkli bir renk vermektedir. Ayrıca sikloheksan:etil asetat (6:1) çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,58'dir.



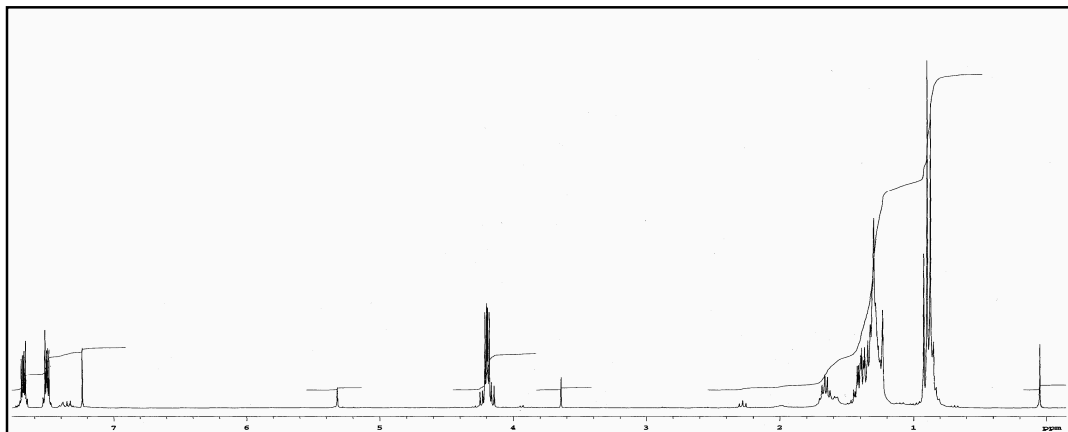
Moleküler formülü C₂₄H₃₈O₄ olan bileşiğin molekül kütlesi 390,56'dır. (+)-ESI-MS sonuçlarına göre [M+Na]⁺ m/z 413,3 ve [2M+Na]⁺ m/z 803,1 olarak doğrulandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**)'ın (+) ESI-MS spektrumu.

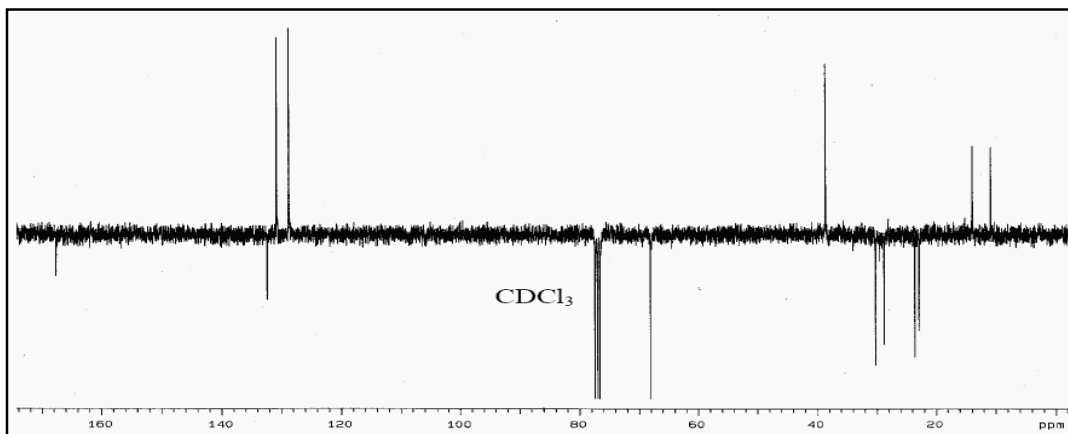
¹H NMR sonuçlarına göre δ 7,40 ve 7,80 ppm'de *orto*-eşleşmiş dubletin dubleti şeklinde iki farklı visinal aromatik protonun olduğu görülmektedir. Oksijene bağlı

metilen grubundan kaynaklı δ 4,20'de bir tane pik, δ 1,65'de metin protonundan kaynaklı multipler, dört metilen grubunun bulunduğu bir zincirden kaynaklı δ 1,2–1,5 ppm aralığında çoklu pik ve δ 0,90'da iki metil grubundan kaynaklı pikler belirlendi.



Şekil 4.14. Bis(2-etilhegzil)ftalat (173)'in ^1H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl_3).

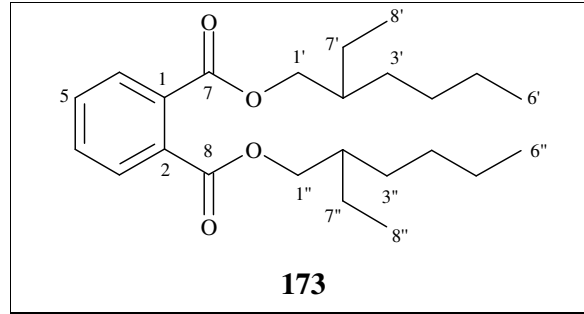
Bu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumunda, karbon atomlarına ait 12 sinyal belirlendi. Şekil 4.15'teki APT sonuçlarına göre; bir tane karbonil karbonundan kaynaklı δ 167,7 ppm'de pik, δ 132,4'de bir dördüncül aromatik karbon atomu, δ 128,8 ve 130,9'da aromatik protonların bağlı olduğu karbon atomlarının pikleri, beş farklı metilen karbonu ($\delta = 23,0, 23,7, 28,9, 30,4, 68,1$ ppm), δ 38,7'de bir metin karbonu ile δ 10,9 ve 14,0'da iki metil karbonundan kaynaklı pikler belirlendi.



Şekil 4.15. Bis(2-etilhegzil)ftalat (173)'in ^{13}C /APT NMR spektrumu (75 MHz, CDCl_3).

Bu verilere göre *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**) AntiBase'de⁹³ tarandı ve elde edilen spektrumlar literatür sonuçları ile karşılaştırılarak yapı doğrulandı.²⁷⁴

Bis(2-etilhegzil)ftalat (**173**)'ın *Streptomyces* sp. türlerinden²⁷⁵ ve *Penicillium olsonii*'den²⁷⁴ doğal ürün olarak izole edildiği rapor edilmiştir. Fakat bu bileşik plastik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**) bileşiğinin bir kontaminasyon değil *Streptomyces* sp. BA2'nin ürettiği bir sekonder metabolit olduğunu düşünmekteyiz (Tablo 4.4).



Tablo 4.4. *Bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**)'ın fizikokimyasal özellikleri ve ¹H, ¹³C NMR verileri.

Moleküler Formül: C₂₄H₃₈O₄ (390,56 g/mol)

Görünüm: Sarımtırak, yağimsı (50,1 mg)

Reaksiyonları: Anisaldehit/Sülfürik asit ile kahverengi

R_f: 0,58 (sikloheksan:EtOAc (60:10))

(+)-ESI MS: *m/z* (%) = 413,3 ([M + Na]⁺, 30), 803,1 ([2M + Na]⁺, 100)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,70 (2H, m, 3/6-H), 7,51 (2H, m, 4/5-H), 4,20 (4H, m, 1'/1''H₂), 1,66 (2H, m, 2'/2''-H); 1,30 (16H, m, 3'/3''/4'/4''/5'/5''/7'/7'' H₂), 0,90 (12H, m, 6'/6''/8'/8''-H₃)

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) : δ = 167,7 (s, C-7/C-8), 132,4 (s, C-1/C-2), 130,9 (d, C-3/C-6), 128,8 (d, C-4/C-5), 68,1 (t, C-1'/C-1''), 38,7 (d, C-2'/C-2''), 30,3 (t, C-7'/C-7''), 28,9 (t, C-3'/C-3''), 23,7 (t, C-4'/C-4''), 23,0 (t, C-5'/C-5''), 14,1 (q, C-8'/C-8'') 11,0 (q, C-6'/C-6'')

4.3.1.3. Rizosferik *Streptomyces* sp. BA2'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

4.3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması

Aktinomisin D (170) ve monensinin antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon yöntemine göre test etmek için; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615, *P. aeruginosa* ATCC 27853, ve *B. subtilis* ATCC 11774 standart bakteri suşları (37 °C'de 24 saat) ile *C. albicans* ATCC 10231 (25 °C'de 48 saat) mantarı kullanıldı. Aktinomisin D (170) ve Monensinin B (171) ve A (172) karışımının 2 mg/mL'lik stok çözeltilerinden Tablo 4.5'te görüldüğü gibi 6 mm çapındaki kağıt disklere 20, 30 ve 40 µg madde olacak şekilde emdirildikten sonra standart mikroorganizmalara uygulanması sonucunda oluşan zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü. Bu bileşiklerin özellikle Gram-pozitif bakterilerin büyümesi üzerine engelleyici etkiye sahip oldukları belirlendi. *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 ve *B. subtilis* ATCC 11774 standart bakteri suşları üzerinde 40 µg/kağıt disk'lik örneklerin oluşturduğu zon çapları Resim 6.18-6.20'de görülmektedir.

Tablo 4.5. Aktinomisin D (170) ile monensin B (171) ve A (172) karışımının standart mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.

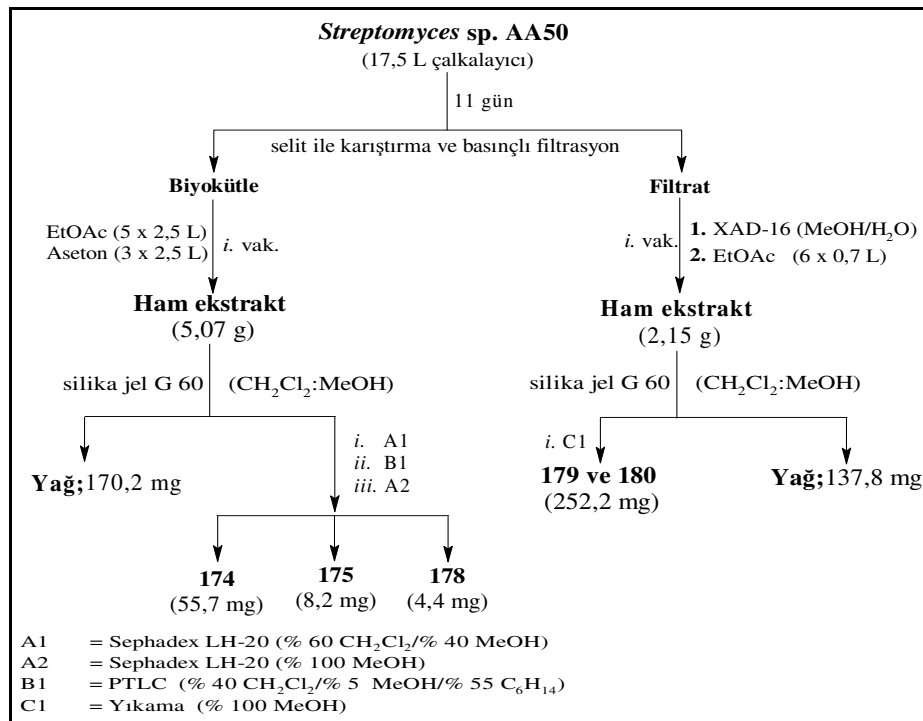
| Test edilen mikroorganizmalar | İnhibisyon Zon Çapları (mm) ^a | | | | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------|----|----|-------------------------------------|----|-----|
| | Aktinomisin D (µg/disk) | | | Monensin B ve A (karışım) (µg/disk) | | |
| | 20 | 30 | 40 | 20 | 30 | 40 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | – | 8 | 8 | – | – | – |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 20 | 22 | 26 | 18 | 20 | 22 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 | 26 | 28 | 30 | 28 | 30 | >30 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | – | – | – | – | – | – |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774 | 22 | 24 | 26 | – | 10 | 22 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | – | 7 | 8 | 9 | 12 | 12 |

^a 6 mm çapında kağıt diskler, –: aktif değil

4.3.2. Rizosferik *Streptomyces* sp. AA50

4.3.2.1. Fermantasyon ve İzolasyon

Streptomyces sp. AA50'nin, M₂ agar besiyerinde koyu lacivert renkte görünen iyi büyümüş pleytleri seçildi ve ardından 1 L'lik erlenmayerlerde her biri 250 mL M₂ sıvı besiyeri içeren 70 adet besiyerine aşılama yapıldı. Fermantasyon 28 °C ve 95 rpm'de lineer inkübatörde 11 gün süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen koyu kahverenkli kültür, selitle karıştırılıp ardından basınçlı filtrasyon uygulanarak biyokütle ve filtrat kısmı birbirinden ayrıldı. Filtrat kısmı Amberlit XAD-16 ile adsorbe edildikten sonra MeOH/H₂O çözücü sistemi ile kolonda tutulan bileşiklerin ayrılması sağlandı. Miseller etil asetat (5 × 2,5 L) ve ardından asetonla (3 × 2,5 L) ekstrakte edildi. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, misellerden elde edilen 5,07 g ekstraktan, 170,2 mg yağ ve PİTK tekniği kullanılarak chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**), chrysophanol (**175**) ile 2-acetylchrysophanol (**178**) elde edildi. Amberlit XAD-16 kullanılarak su fazından ayrılması sağlanan filtrat ekstraktı (2,15 g) kromatografik teknikler kullanılarak 137,8 mg yağ ve 252,2 mg siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımı elde edildi.

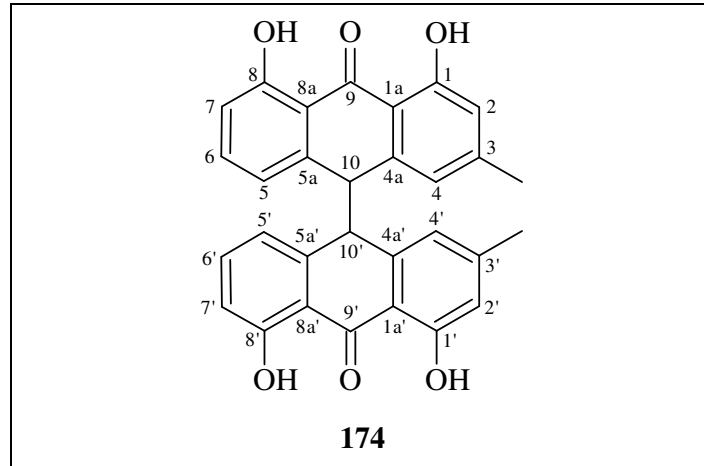


Şekil 4.16. Rizosferik *Streptomyces* sp. AA50'nin sekonder metabolitlerinin araştırılması.

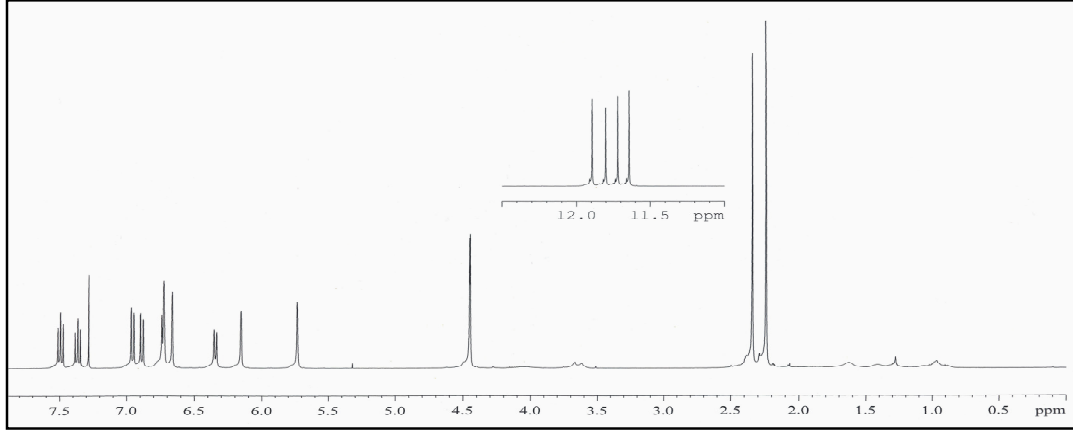
4.3.2.2. Rizosferik *Streptomyces* sp. AA50'nin Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması

4.3.2.2.1. Chrysophanol-10,10'-Bianthron (174)

Açık sarı görünüşlü toz halinde ana bileşen (55,7 mg) olarak izole edilen Chrysophanol-10,10'-bianthron, (174) *Streptomyces* sp. AA50'nin misellerinin etil asetat ve aseton ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ham ekstraktın, silika jel kolonundan CH₂Cl₂:MeOH (99:1) ile elüe edilmesi sonucu ele geçen fraksiyon II'ye, önce Sephadex LH-20 (% 60 CH₂Cl₂ / % 40 MeOH) ve ardından PİTK (% 40 CH₂Cl₂ / % 5 MeOH / % 55 Hekzan) teknikleri uygulanarak saflaştırıldı. Bu bileşik, kloroformda iyi çözünmekte, metanolde ise az çözünmektedir. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) seyreltik NaOH ile *peri*-hidroksi-antrakinonlar için karakteristik olan, sarı renkten viyole rengе değişim reaksiyonunu göstermektedir. Ayrıca, % 40 CH₂Cl₂ / % 5 MeOH / % 55 Hekzan çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,66 olarak belirlendi.

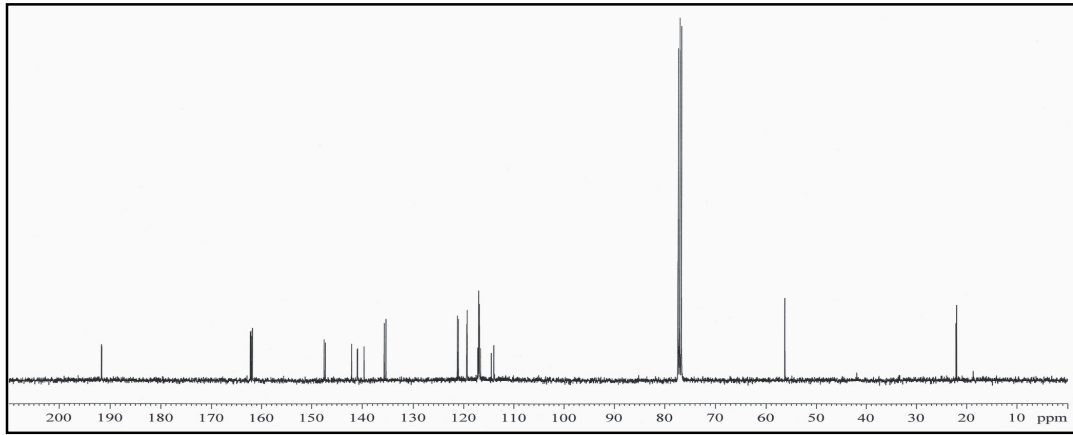


¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.17) δ 11,5-12,0 aralığında şelatlanmış hidroksil gruplarından kaynaklı 4 farklı singlet ile aromatik metil gruplarından kaynaklı δ 2,24 ve 2,34 ppm'de üçer H'lık singletler görülmektedir. δ 7,49 ve 7,36 ppm'de aromatik halkardaki, iki farklı protona komşu protonların dd vermesi beklenirken çok net bir triplet sergiledikleri belirlendi. Ayrıca δ 5,6–7,0 aralığında 8 farklı aromatik protondan kaynaklı sinyaller ve son olarak δ 4,5 civarlarında iki metin protonundan kaynaklı singletler belirlendi.



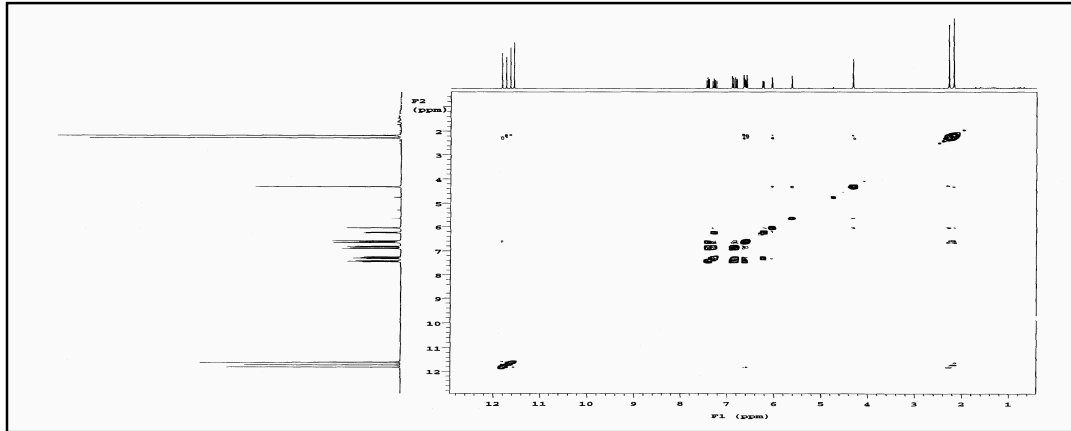
Şekil 4.17. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3).

Şekil 4.18'deki ^{13}C NMR spektrumunda δ 192 civarlarında 2 karbonil karbonuna ait sinyaller belirlendi. δ 161–163 ppm aralığında hidroksil gruplarının bağlı olduğu sp^2 hibriti yapmış 4 farklı karbon atomuna ait sinyaller ile δ 110–148 ppm aralığında aromatik halkaya ait sp^2 hibriti yapmış 10 tane, üzerinde proton bulunduran ve 10 tane de protonuz karbon atomlarından kaynaklı toplam 20 tane sinyal tespit edildi. Ayrıca metil gruplarına ait 21,97 ve 22,11 ppm'de sinyaller ve metin karbonlarına ait δ 56,3 civarında 2 karbon atomuna ait sinyaller bulunmaktadır.

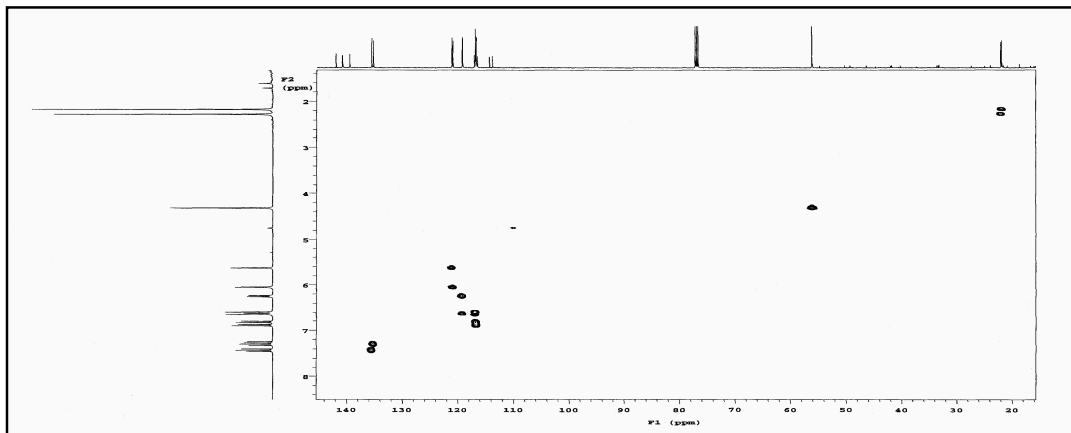


Şekil 4.18. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un ^{13}C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl_3).

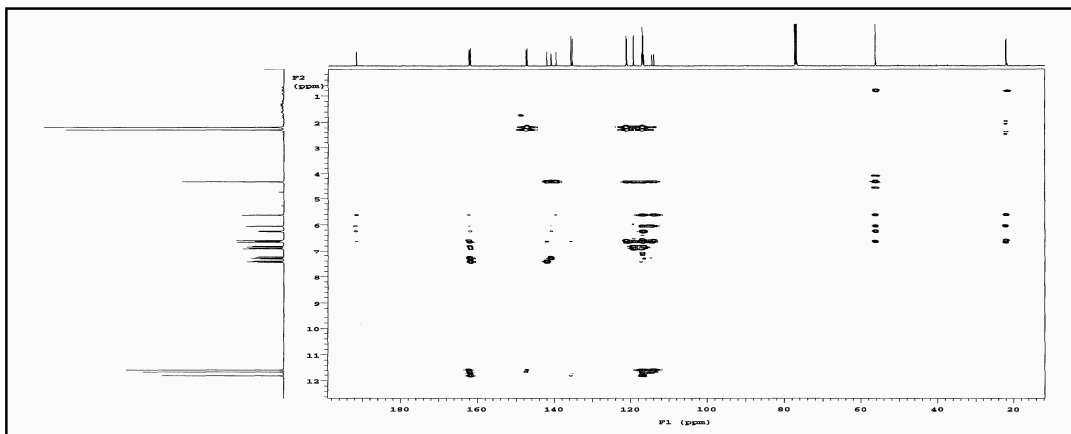
Ayrıca bileşiğin yapısının aydınlatılması için H,H COSY (Şekil 4.19), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.20) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları (Şekil 4.21) incelendi.



Şekil 4.19. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

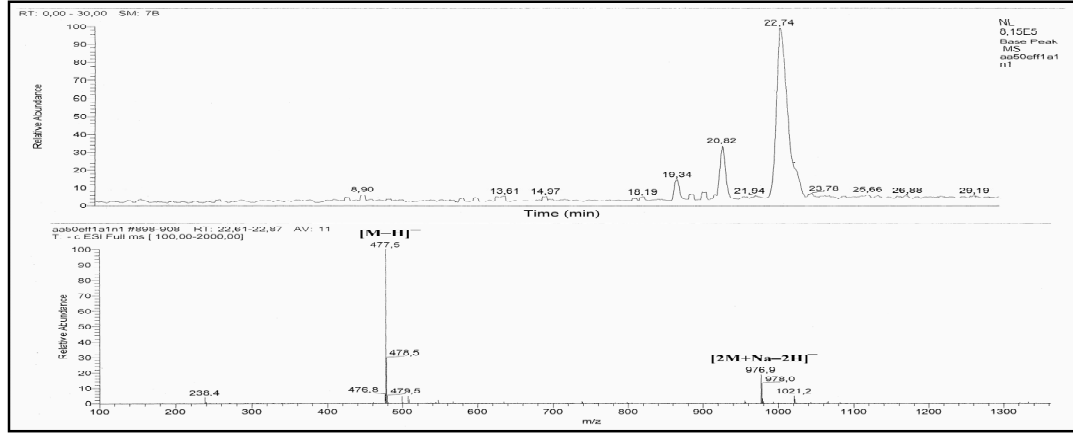


Şekil 4.20. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl₃).



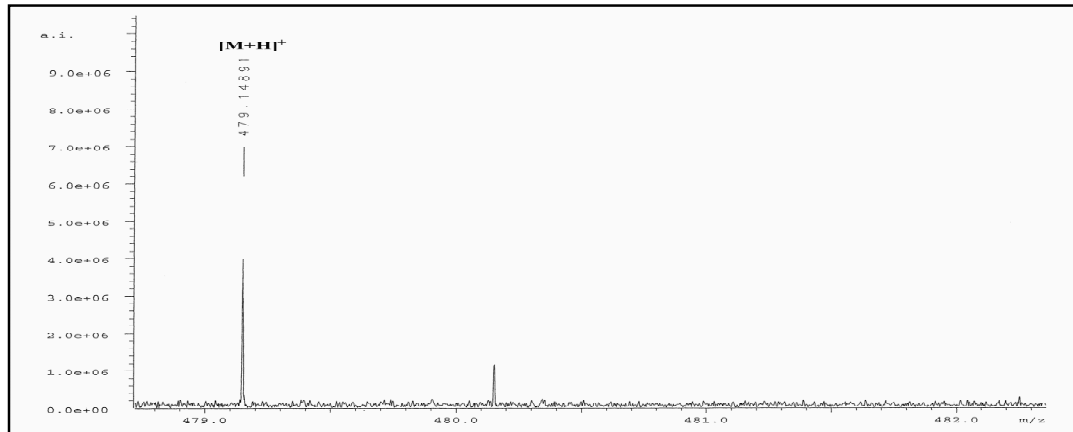
Şekil 4.21. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl₃).

Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un HPLC-ESI-MS kromatogramının ve spektrumunun görüldüğü Şekil 4.22'de, HPLC'den 22,74. dakikada geçtiği ve bileşiğin negatif modda ESI-MS m/z değerinin $[M-H]^-$ 477,5 ve $[2M+Na-2H]^-$ 976,9 olduğu belirlendi.



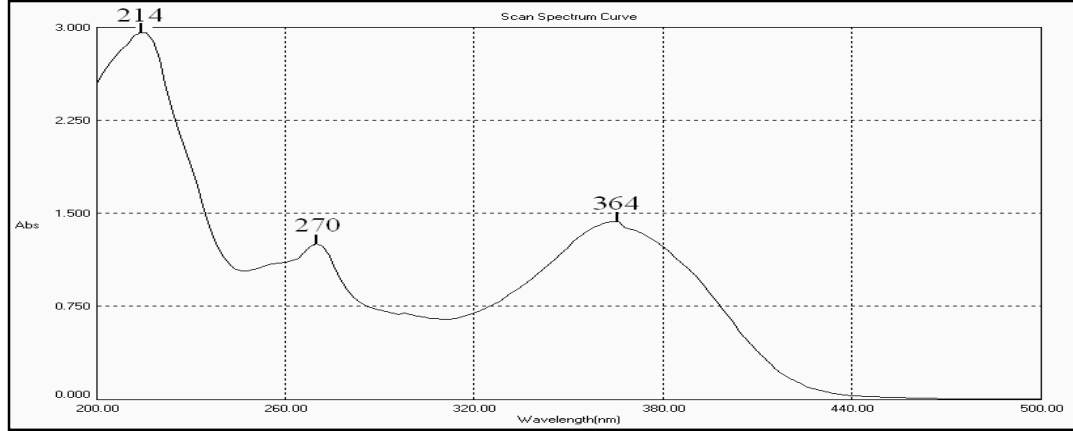
Şekil 4.22. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu.

Şekil 4.23'teki HR-ESI-MS sonuçlarına göre chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un kapalı formülünün $C_{30}H_{22}O_4$ olduğu, pozitif modda $[M_1+H]^+$ m/z oranının 479,1489 ve negatif modda ise $[M-H]^-$ formunda m/z oranının 477,1348 olduğu belirlendi. Bileşiğin bu formlarının hesaplanan kütleleri ise sırasıyla 479,1489 ve 477,1348 olarak belirlendi.



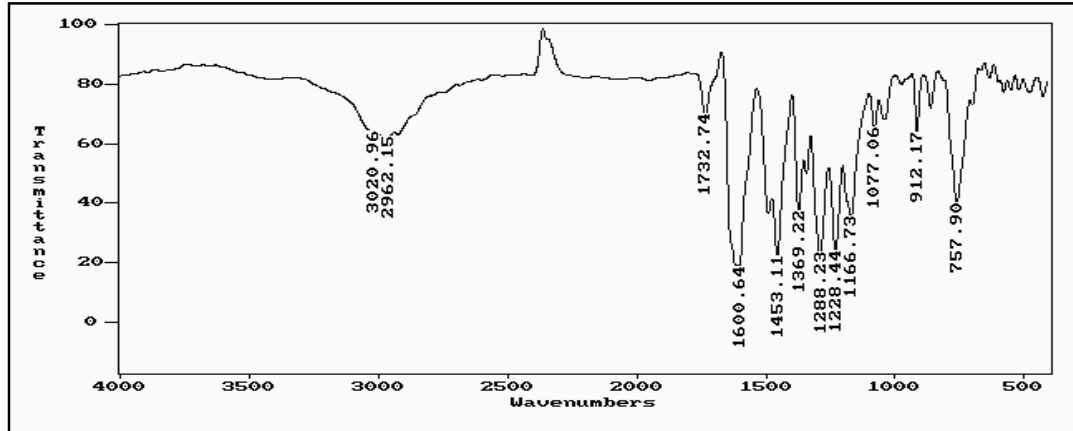
Şekil 4.23. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un HR-ESI-MS spektrumu.

Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un metanolde hazırlanan 100 μM 'lık çözeltisinin UV-vis spektrumunda 214 (29600), 270 (12550), 364 (14300) nm'de (ϵ) maksimum absorbans yaptığı belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. 100 μM 'lık chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un UV-vis spektrumu (MeOH).

Şekil 4.25'te bu bileşiğin KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR sonuçlarına göre ise, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3021, 2962, 1732, 1600, 1453, 1369, 1288, 1228, 1166, 912 ve 758 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi.



Şekil 4.25. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Elde edilen verilere göre, mikrobiyal sekonder metabolitlerin bir veri bankası olan AntiBase'de⁹³ yapılan taramalar sonucunda chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'a rastlanmadı. DNP⁹⁴ ve CA veri bankaları kullanılarak yapılan taramalarda ise bu bileşiğin bakterilerden izole edilmediği, bazı bitkilerden izole edildiği belirlendi. Literatür verileri ile karşılaştırılmak suretiyle^{276,277} 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapısı doğrulanan chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ilk kez bu çalışmada bir bakteriden (*Streptomyces* sp. AA50) izole edildi.²⁷⁸

Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) 1978 yılında Hata ve arkadaşları tarafından *Cassia garrettiana* Craib'den,²⁷⁹ Kitanaka ve Takido tarafından ise *Cassia obtusifolia* Linn²⁸⁰ bitkisinden izole edilmiştir. Ayrıca bu bileşik *Rhamnus nepalensis*,²⁷⁶ *Senna reticulata*²⁷⁷ ve *Senna longiracemosa*²⁸¹ bitkilerinden de izole edilmiştir.

Bu bileşiğin fizikokimyasal özellikleri Tablo 4.6'da görülmektedir. Ayrıca, Tablo 4.7'de ise ¹H ve ¹³C NMR verilerine ait kimyasal kayma değerleri verilmiştir.

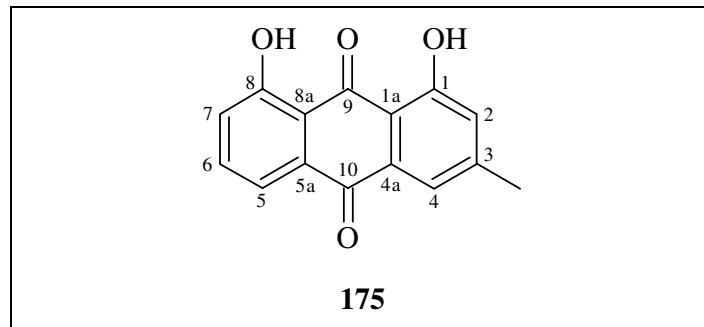
Tablo 4.6. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un fizikokimyasal özellikleri.

| | chrysophanol-10,10'-bianthron | chrysophanol |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Görünüm | Açık sarı, toz | Portakal rengi, kristal |
| Optik rotasyon $[\alpha]_D^{30}$ | - 5,0° (c: 0,1 CHCl ₃) | |
| Molekül formülü | C ₃₀ H ₂₂ O ₆ | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ |
| HRESI-MS (pozitif, m/z) | | |
| Bulunan | 479,1489 [M+H] ⁺ | 253,4 [M-H] ⁻ (ESI-MS) |
| Hesaplanan | 479,1489 | |
| Erime noktası (mp) | 209–210 °C (bozunma) | |
| UV-vis $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (ε) | 214 (29600); 270 (12550); 364 (14300) | 210 (54600); 256 (18500); 286 (9380); 428 (9680) |
| FT-IR ν_{\max}^{KBr} cm ⁻¹ | 3020,96; 2962,15; 1732,74; 1600,64; 1453,11; 1369,22; 1288,23; 1228,44; 1166,73; 1077,06; 912,17; 757,90 | |
| YPİTK R_f değeri* | 0,66 | 0,81 |

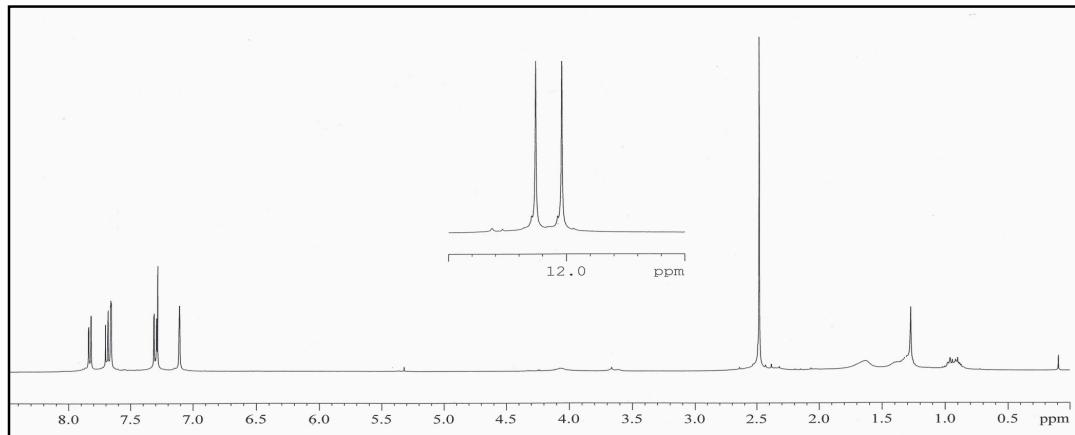
*YPİTK Alüminyum tabaka Silica Gel 60 F₂₅₄ (tabaka kalınlığı 0,2 mm) hareketli faz: % 5 MeOH / % 40 CH₂Cl₂ / % 55 Hekzan)

4.3.2.2.2. Chrysophanol (175)

Chrysophanol (**175**), chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'nun da bulunduğu fraksiyon II'den, PİTK tekniği kullanılarak portakal renkli, iğne kristal halde (8,2 mg) izole edildi. Bu bileşik, kloroformda iyi çözünmekte, metanolde ise az çözünmektedir. Antrakınon yapısında olan bu bileşik, seyreltik NaOH ile *peri*-hidroksi-antrakınonlar için karakteristik olan, sarı renkten viyole renge değişim reaksiyonu sergilemektedir. Ayrıca, % 40 CH₂Cl₂ / % 5 MeOH / % 55 Hekzan çözücü sisteminde R_f değeri 0,66 olarak belirlendi.

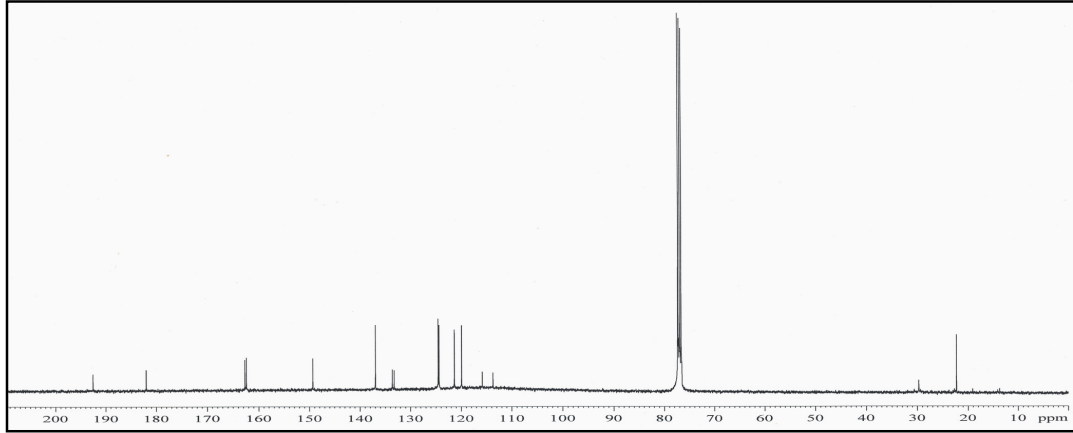


¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.26), iki şelatlanmış hidroksil gruplarından kaynaklı pikler δ 12,02 ve 12,13 ppm'de görülmektedir. Aromatik bölgede, 1,2,3-trisüstitüe ve 1,3,5,6-tetrasüstitüe aromatik halkalardan gelebilecek beş protona ait sinyaller belirlendi. Ayrıca, aromatik metil grubundan kaynaklı δ 2,48'de pik belirlendi.



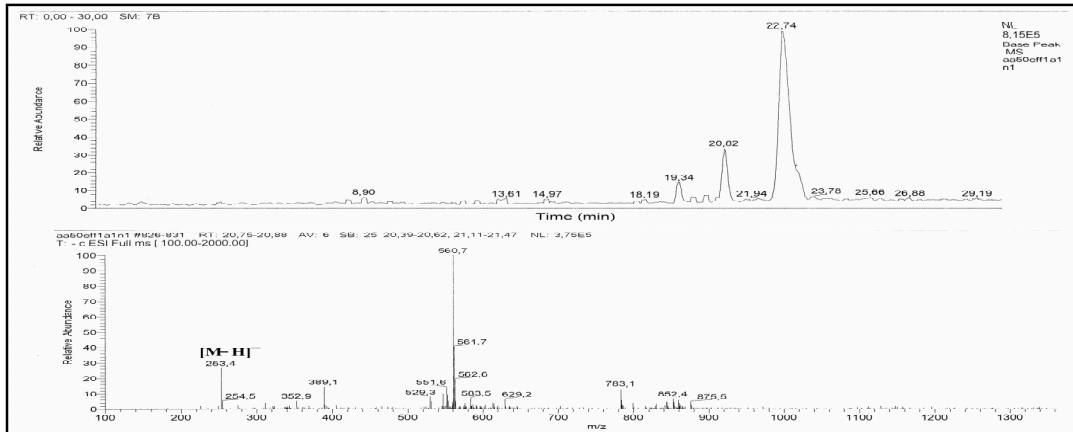
Şekil 4.26. Chrysophanol (**175**)'un ¹H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃).

Şekil 4.27'deki ^{13}C NMR spektrumunda δ 182 ve 192 ppm'de karbonil gruplarına ait sinyaller belirlendi. δ 163 ppm civarında hidroksil gruplarının bağlı olduğu sp^2 hibriti yapmış 2 farklı karbon atomuna ait sinyaller ile δ 110–150 ppm aralığında aromatik halkaya ait sp^2 hibriti yapmış 9 sinyal tespit edildi. Son olarak aromatik metil grubuna ait pikin δ 22,28 ppm'de olduğu belirlendi.



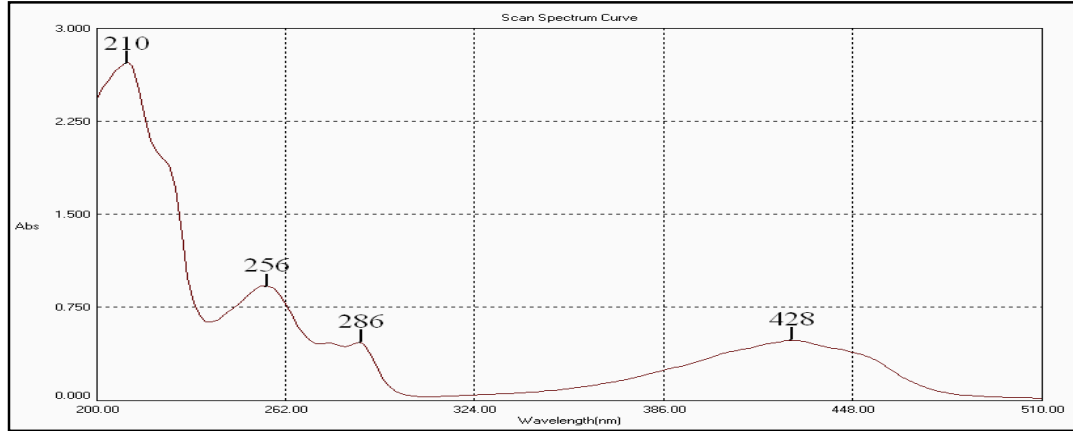
Şekil 4.27. Chrysophanol (**175**)'un ^{13}C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl_3).

Şekil 4.28'de, Chrysophanol (**175**)'un HPLC'den 20,82. dakikada geçtiği ve $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ kapalı formülüne uyan bileşiğin negatif moda ESI-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z değerinin 253,4 olduğu belirlendi.



Şekil 4.28. Chrysophanol (**175**)'un HPLC-ESI-MS kromatogramı ve spektrumu.

Chrysophanol (**175**)'un metanolde hazırlanan $50 \mu\text{M}$ 'lık çözeltisinin UV-vis spektrumunda 210 (54600), 256 (18500), 286 (9380), 428 (9680) nm'de (ϵ) maksimum absorbans yaptığı belirlendi (Şekil 4.29).

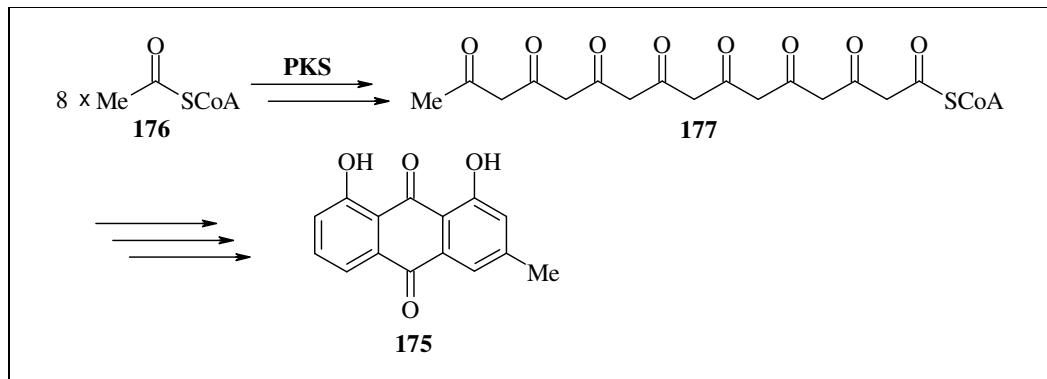


Şekil 4.29. 50 μM 'lık Chrysophanol (**175**)'un UV-vis spektrumu (MeOH).

Elde edilen spektroskopik verilerin, literatürlerle kıyaslanması sonucu chrysophanol (**175**)'un yapısı doğrulandı.^{277,282} Poliketidik antrakinon yapısında olan chrysophanol (**175**) *Drechslera catenaria*²⁸³ fungusu, bitkiler^{277,279-282} ile ayrıca böcekler²⁸⁴ ve likenler²⁸⁵ gibi çeşitli ökaryot canlılardan izole edilmiştir. Son yıllarda *Streptomyces* türlerinden de az miktarda izole edildiği rapor edilmiştir.²²⁰ Bu bileşiğin antifungal²⁸⁶ ve antiviral²⁸⁷ aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir.

İzole edilen bu bileşiğin fizikokimyasal özellikleri Tablo 4.6'da görülmektedir. ¹H ve ¹³C NMR verilerine ait kimyasal kayma değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Farklı canlılar tarafından üretilen doğal chrysophanol (**175**)'un biyosentezini (Şekil 4.30) aydınlatmak için Bringmann ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 8 tane asetil koenzim-A (**176**)'nın poliketit sentaz (PKS) enzimi ile bir oktaketit zincir prekürsör (**177**)'üne dönüşüp, ardından canlıya bağlı olarak bu prekürsörün dört farklı biyosentetik katlanma modeli ile bu bileşiğe dönüşebileceğini önermişlerdir.²⁸⁸



Şekil 4.30. Poliketit biyosentetik yoldan chrysophanol (**175**)'un biyosentezi.

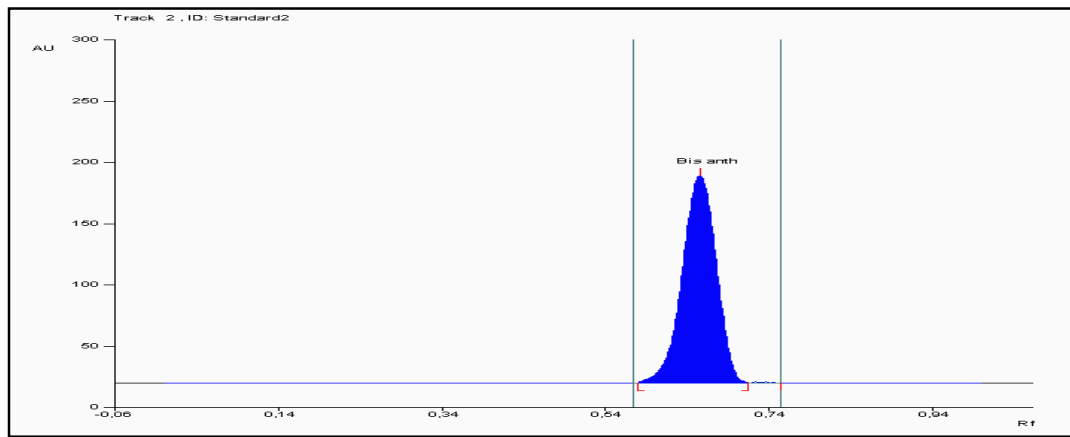
Tablo 4.7. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un ^{13}C ve ^1H NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, CDCl_3).

| pozisyon | chrysophanol-10,10'-bianthron (174) | | chrysophanol (175) | |
|-------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| | δ_{C}^a | δ_{H}^b ($J = \text{Hz}$) | δ_{C}^a | δ_{H}^b ($J = \text{Hz}$) |
| 1 | 162,10 | – | 162,72 | – |
| 2 | 117,01 | 6,74 (1H, d, 0,4) | 124,37 | 7,11 (1H, d, 0,7) |
| 3 | 147,56 | – | 149,36 | – |
| 4 | 121,05 | 6,16 (1H, s) | 121,37 | 7,66 (1H, d, 0,7) |
| 5 | 119,30 | 6,73 (1H, d, 7,4) | 119,94 | 7,83 (1H, dd, 1,1;7,5) |
| 6 | 135,71 | 7,49 (1H, t, 7,9) | 136,96 | 7,68 (1H, t, 7,8) |
| 7 | 116,85 | 6,96 (1H, dd, 0,9; 8,4) | 124,57 | 7,30 (1H, dd, 1,1; 8,4) |
| 8 | 161,82 | – | 162,42 | – |
| 9 | 191,63 | – | 192,53 | – |
| 10 | 56,27 | 4,44 (1H, s) | 181,99 | – |
| 1a | 114,49 | – | 113,73 | – |
| 4a | 140,89 | – | 133,27 | – |
| 5a | 142,07 | – | 133,64 | – |
| 8a | 117,17 | – | 115,87 | – |
| 3-CH₃ | 22,11 | 2,34 (3H, s) | 22,28 | 2,48 (3H, s) |
| 1-OH | – | 11,72 (1H, s) | – | 12,02 (1H, s) |
| 8-OH | – | 11,89 (1H s) | – | 12,13 (1H, s) |
| 1' | 162,26 | – | – | – |
| 2' | 117,00 | 6,66 (1H, d, 0,4) | – | – |
| 3' | 147,30 | – | – | – |
| 4' | 121,24 | 5,73 (1H, s) | – | – |
| 5' | 119,38 | 6,34 (1H, d, 7,4) | – | – |
| 6' | 135,37 | 7,36 (1H, t, 7,9) | – | – |
| 7' | 116,93 | 6,89 (1H, dd, 0,9; 8,4) | – | – |
| 8' | 161,92 | – | – | – |
| 9' | 191,70 | – | – | – |
| 10' | 56,28 | 4,45 (1H, s) | – | – |
| 1a' | 113,97 | – | – | – |
| 4a' | 139,65 | – | – | – |
| 5a' | 140,97 | – | – | – |
| 8a' | 116,62 | – | – | – |
| 3'-CH ₃ | 21,97 | 2,24 (3H, s) | – | – |
| 1'-OH | – | 11,64 (1H, s) | – | – |
| 8'-OH | – | 11,80 (1H, s) | – | – |

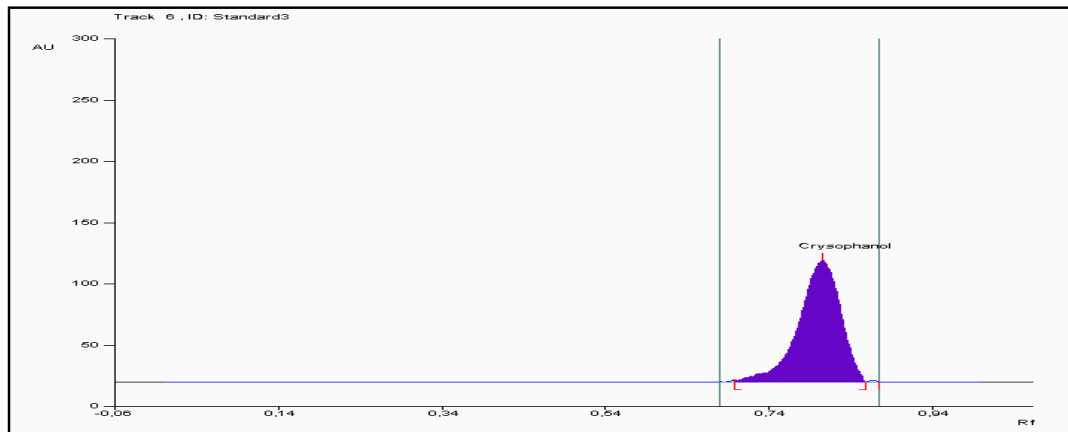
^a 100 MHz, ^b 400 MHz.

4.3.2.2.3. Chrysophanol-10,10'-Bianthron (174) ve Chrysophanol (175)'un YPİTK ile Ayrılmaları

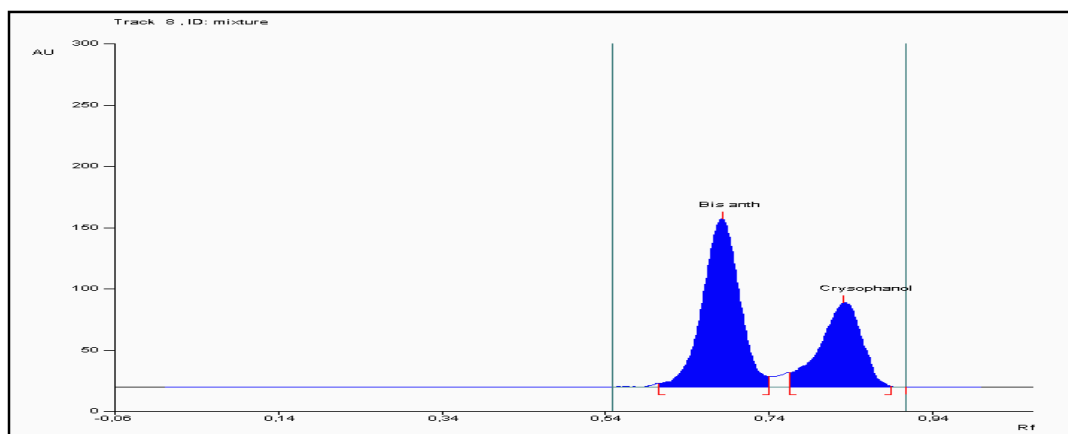
İnce tabaka kromatografisi ile ilgili çalışmalarda Camag marka YPİTK cihazı (Camag Linomat V-100 μ L, Camag Scanner III) kullanıldı. Çalışmalarda, YPİTK alüminyum silika jel 60 F₂₅₄ tabakalar kullanıldı. Standart olarak saf chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175) örnek çözeltileri ile, bunların karışımları 6 mm'lik bir bant genişliğinde, tabakanın soldan ve aşağıdan 15 mm'lik kısımlarından başlanarak inert gaz N₂ yardımıyla tabakaya spot edildi. Her bir spot arasındaki mesafe, kullanılan tabakanın boyutuna bağlı biçimde otomatik olarak ayarlandı. Yürütme işlemlerinde (9,5 cm), hareketli faz (% 5 MeOH / % 40 CH₂Cl₂ / % 55 Hekzan) ile önceden yaklaşık olarak 20 dakika süre ile doygun hale gelmiş olan tank (Camag Twin Trough Chamber, 10 × 10) kullanıldı. Yürütme işleminden sonra İTK tabakası üzerindeki çözücünün kuruması beklenildi ve tarama işlemleri, 6,00 × 0,45 mm slit aralığında, 1 mm s⁻¹ tarama hızında, 100 μ m s⁻¹ çözünürlükte gerçekleştirildi. Işın kaynağı olarak D2&W lambaları kullanılarak 254 nm'de tarama yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ise winCATS yazılımı yardımıyla yapıldı. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) için R_f değeri 0,66 ve chrysophanol (175) için ise 0,81 olarak hesaplandı. Şekil 4.31'de chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un, Şekil 4.32'de chrysophanol (175)'un, Şekil 4.33'te bu bileşiklerin karışımlarının YPİTK kromatogramları ve Şekil 4.34'te ise bu iki bileşiğin 3D YPİTK kromatogramı görülmektedir.



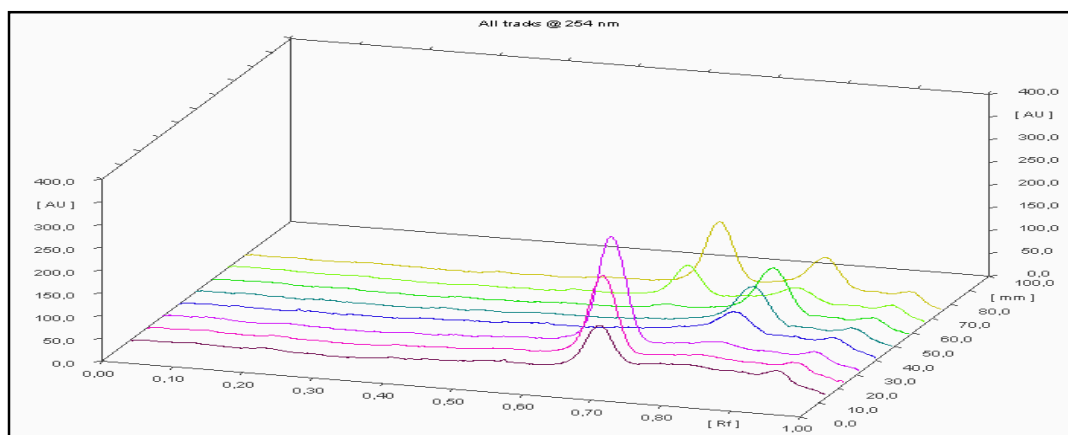
Şekil 4.31. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174)'un YPİTK kromatogramı.



Şekil 4.32. Chrysophanol (175)'un YPİTK kromatogramı.



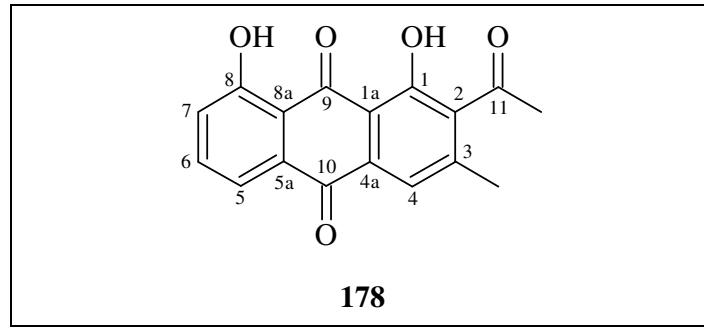
Şekil 4.33. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175) karışımının YPİTK kromatogramı.



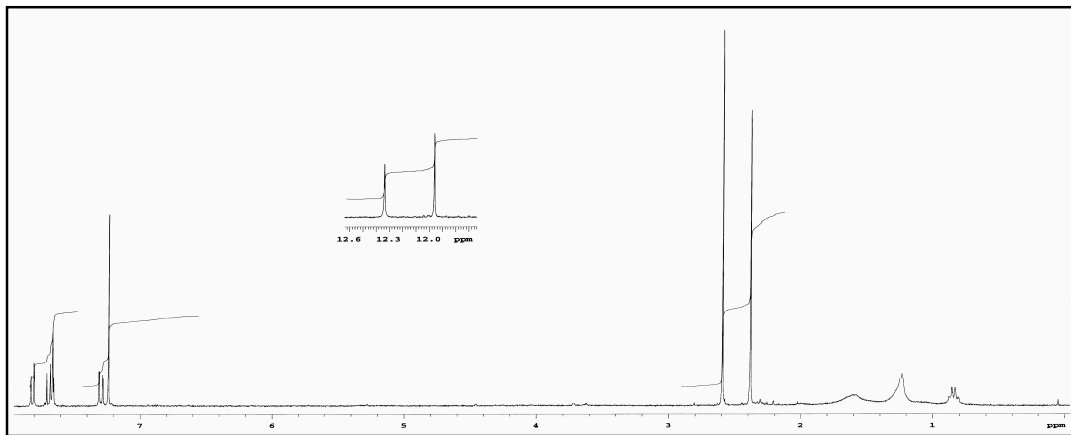
Şekil 4.34. Chrysophanol-10,10'-bianthron (174) ve chrysophanol (175)'un 3D YPİTK kromatogramı.

4.3.2.2.4. 2-Acetylchrysofanol (178)

Portakal-kırmızı renkli, iğne kristal görünümlü olan 2-acetylchrysofanol (**178**), fraksiyon III'ün Sephadex LH-20 (% 100 MeOH) ile moleküler elek kromatografisine tabi tutulmasının ardından MeOH içinde kristallendirme yöntemiyle saflaştırıldı. Bu bileşik, diklorometan ve kloroformda iyi, metanolde ise orta derece çözünmektedir. Antrakinon yapısında olan bu bileşik, *peri*-hidroksi-antrakinonlar için karakteristik bir renk değişim reaksiyonu olan, seyreltik NaOH ile sarı-portakal renkten viyole renge değişim reaksiyonu sergilemektedir. Ayrıca % 40 CH₂Cl₂ / % 5 MeOH / % 55 Hekzan çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,42 olarak belirlendi.

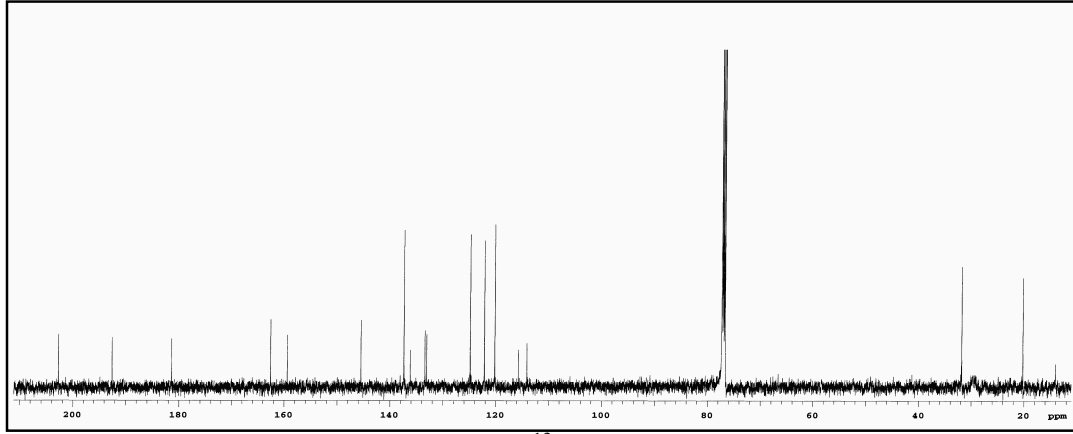


Şekil 4.35'teki ¹H NMR spektrumunda, şelatlanmış durumda olan iki farklı hidroksil grubundan kaynaklı pikler δ 11,96 ve 12,34 ppm'de görüldü. Aromatik protonlardan kaynaklı 4 H'lık protonlar δ 7,30–7,82 aralığında belirlendi. Ayrıca, metil gruplarına ait pikler δ 2,38 ve 2,59 ppm'de tespit edildi.



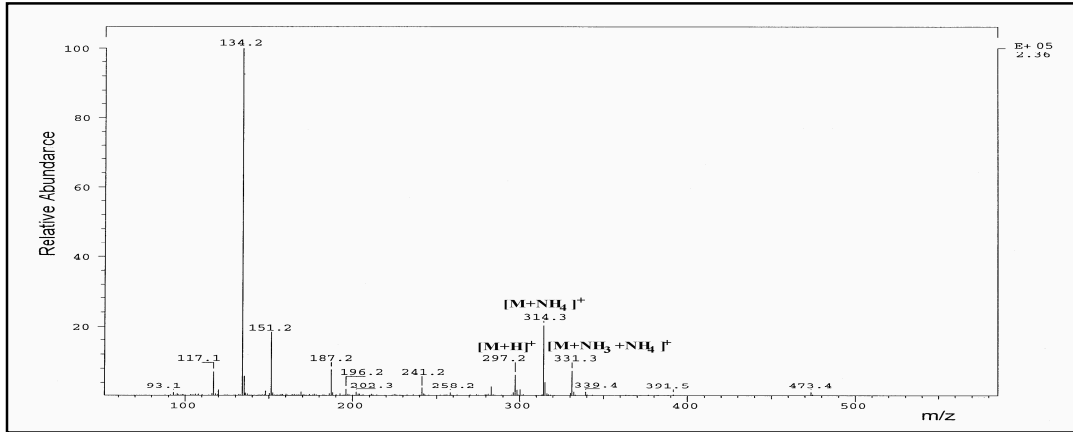
Şekil 4.35. 2-Acetylchrysofanol (**178**)'un ¹H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

^{13}C NMR spektrumunda (Şekil 4.36) δ 181,4, 192,6 ve 202,8 ppm'de karbonil gruplarına ait sinyaller belirlendi. δ 159,4 ve 162,6 ppm'de hidroksil gruplarının bağlı olduğu karbon atomlarına ait sinyaller ile δ 114–146 ppm aralığında aromatik halkaya ait sp^2 hibriti yapmış 10 sinyal tespit edildi. Son olarak iki metil grubuna ait pikler δ 20,2 ve 31,8 ppm olarak belirlendi.



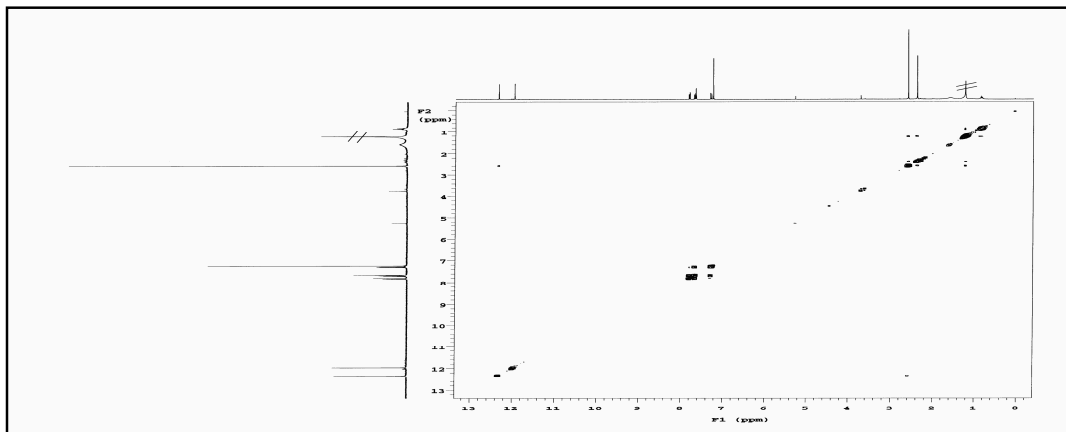
Şekil 4.36. 2-Acetylchrysophanol (178)'un ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl_3).

Kapalı formülü $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_5$ olan 2-acetylchrysophanol (178)'un, NH_3 'ün reaktan gaz olarak kullanıldığı DCI-MS spektrumunda (Şekil 4.37), m/z değeri $[\text{M}+\text{H}]^+$ 297,2, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 314,3 ve $[\text{M}+\text{NH}_3+\text{NH}_4]^+$ 331,3 olarak belirlendi.

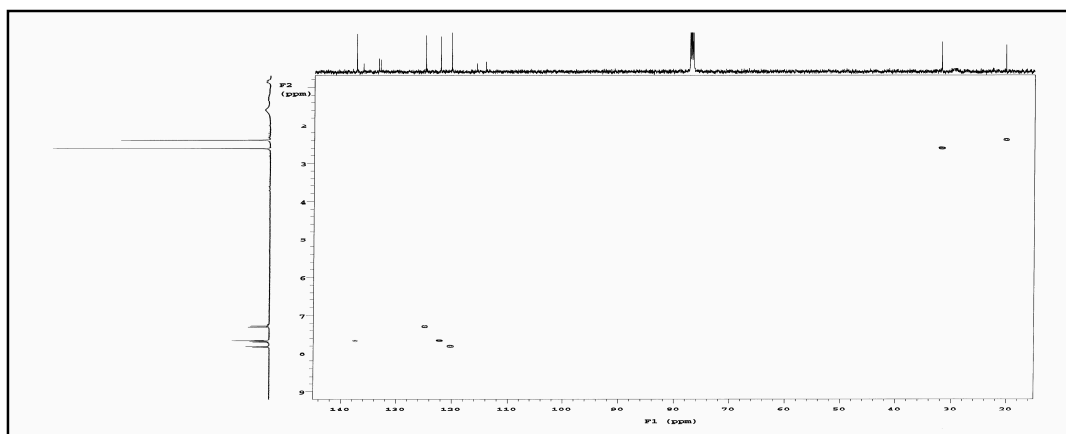


Şekil 4.37. 2-Acetylchrysophanol (178)'un DCI-MS spektrumu (NH_3).

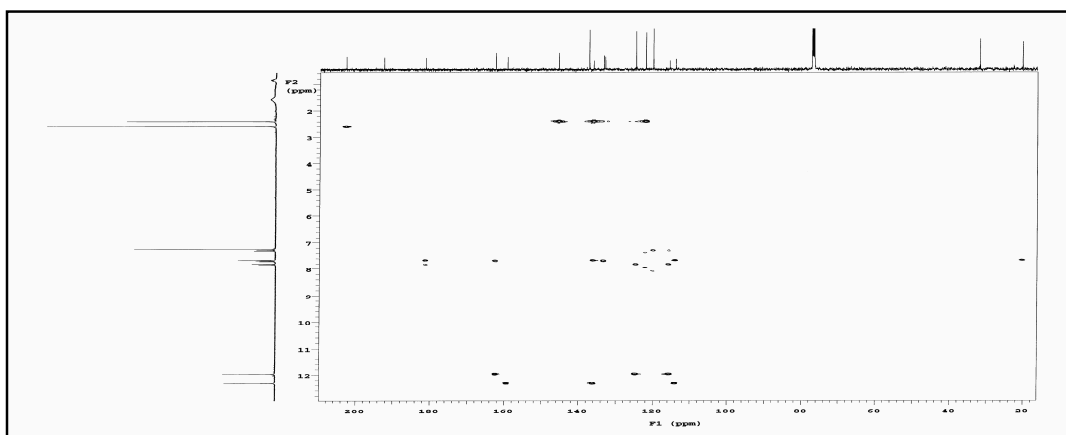
Ayrıca bileşiğin yapısının aydınlatılması için 1D NMR spektrumlarının yanında, H,H COSY (Şekil 4.38), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.39) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları da (Şekil 4.40) incelendi.



Şekil 4.38. 2-Acetylchrysophanol (**178**)'un H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl_3).

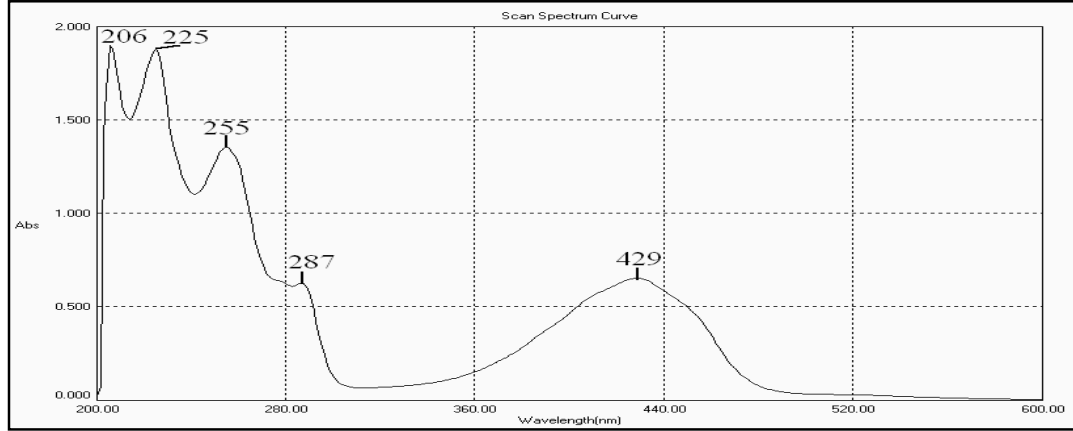


Şekil 4.39. 2-Acetylchrysophanol (**178**)'un HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl_3).



Şekil 4.40. 2-Acetylchrysophanol (**178**)'un HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl_3).

2-Acetylchrysofanol (**178**)'un metanolde hazırlanan 50 μM 'lık çözeltisinin UV-vis spektrumunda 206 (38000), 225 (37700), 255 (27100), 287 (12600) ve 429 (13100) nm'de (ϵ) maksimum absorbans yaptığı belirlendi (Şekil 4.41).

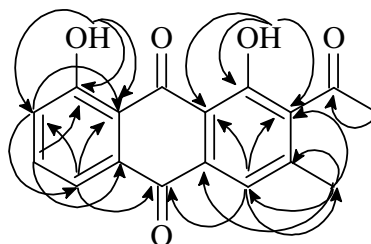


Şekil 4.41. 50 μM 'lık 2-Acetylchrysofanol (**178**)'un UV-vis spektrumu (MeOH).

2-Asetil-1,8-dihidroksi-3-metil-antrakinon olarakta adlandırılan 2-acetylchrysofanol (**178**)'un, elde edilen spektroskopik verilerine göre AntiBase'de yapılan taramalar sonucunda, bu bileşiğin daha önce Prof. Dr. Hartmut LAATSCH'ın grubunda marin *Streptomyces* sp. Mei 6-1,2'den izole edildiği ve yayımlanmamış bir çalışma olduğu tespit edildi.⁹³

Ayrıca 1968 yılında McCormick ve Jensen tarafından, *Streptomyces aureofaciens*'ten izole edilen biyolojik aktif protetron adlı bileşikten yola çıkarak kimyasal olarak uyguladıkları dekarboksilasyon yöntemi ile 2-acetylchrysofanol (**178**) sentezlenmiştir.²⁸⁹

1D ve 2 D NMR teknikleri kullanılarak yapısı doğrulanan bu bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR verilerine ait kimyasal kayma değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Şekil 4.40'taki HMBC spektrumunun analizi sonucu gözlemlenen uzak mesafe etkileşimleri Şekil 4.42'de görülmektedir.



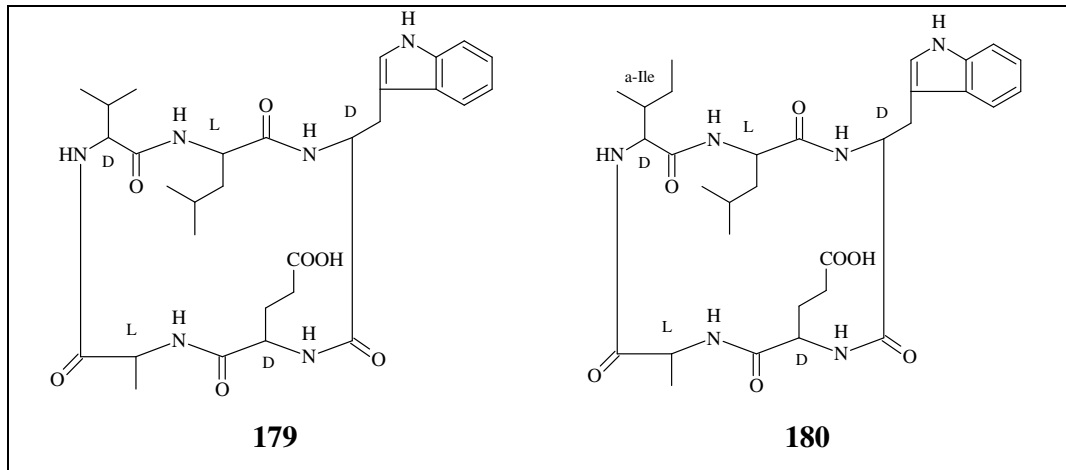
Şekil 4.42. 2-Acetylchrysophanol (178)'un HMBC korelasyonu.

Tablo 4.8. 2-Acetylchrysophanol (178)'un ^{13}C NMR (125 MHz) ve ^1H (300 MHz) kimyasal kayma değerleri (ppm, CDCl_3).

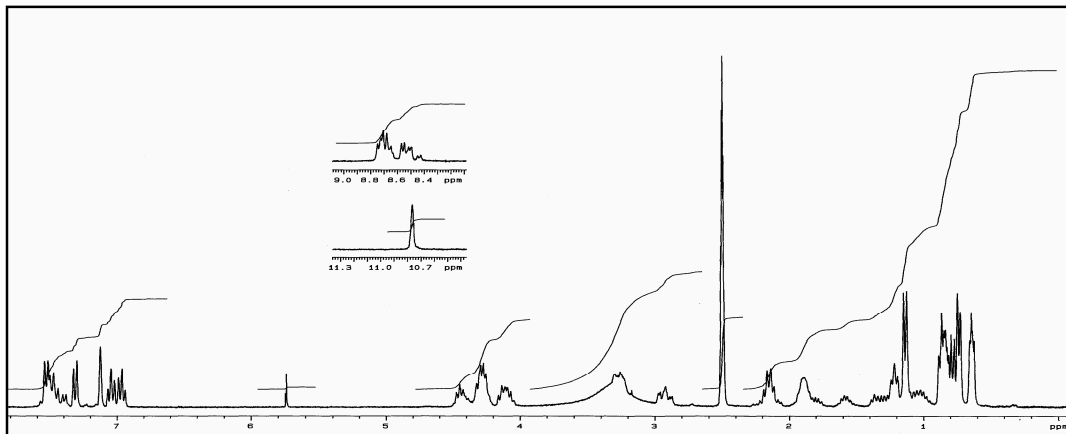
| pozisyon | 2-acetylchrysophanol (178) | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} ($J = \text{Hz}$) |
| 1 | 159,44 | – |
| 2 | 136,20 | – |
| 3 | 145,54 | – |
| 4 | 122,20 | 7,66 (1H, d, 0,5) |
| 5 | 120,22 | 7,82 (1H, dd, 1,2; 7,5) |
| 6 | 137,38 | 7,68 (1H, dd, 7,6; 8,3) |
| 7 | 124,88 | 7,30 (1H, dd, 1,2; 8,4) |
| 8 | 162,59 | – |
| 9 | 192,57 | – |
| 10 | 181,40 | |
| 11 | 202,79 | |
| 1a | 114,12 | – |
| 4a | 133,09 | – |
| 5a | 133,43 | – |
| 8a | 115,77 | – |
| 3-CH₃ | 20,24 | 2,38 (3H, d, 0,5) |
| 11-CH ₃ | 31,84 | 2,59 (3H, s) |
| 1-OH | – | 12,34 (1H, s) |
| 8-OH | – | 11,96 (1H s) |

4.3.2.2.5. Siklik Pentapeptit A (179) ve B (180) Karışımı

Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımı, *Streptomyces* AA 50'nin fitrat kısmının silika jel kolonundan CH₂Cl₂:MeOH ile elüe edilmesi sonucu toplanan fraksiyon IV'ün metanol ile yıkama işlemine tabi tutulmasıyla ana ürün (252,5 mg) olarak elde edildi. Bu karışımın, kloroformda hiç çözünmemesine karşın, metanoldeki çözünürlüğü oldukça düşük, fakat dimetil sülfoksitteki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Renksiz toz halinde olan karışım iyot (I₂) buharı ile pozitif sonuç vermektedir.

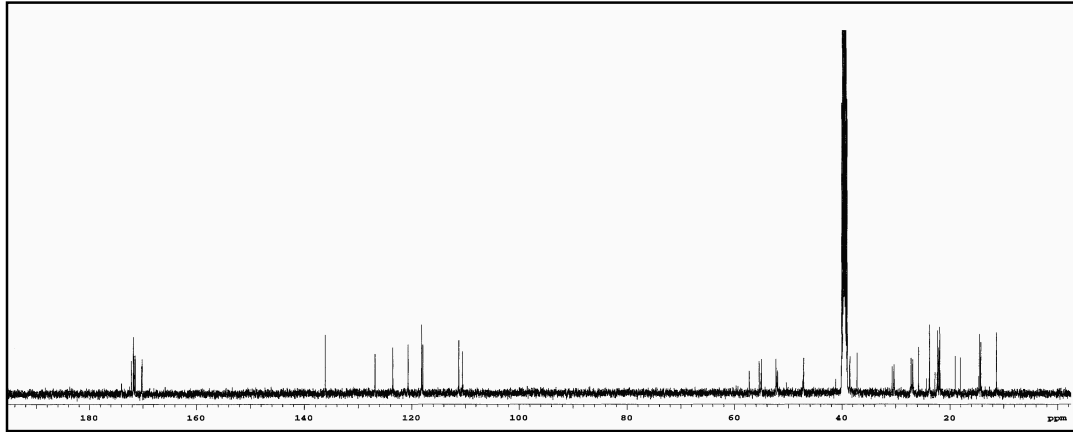


Karışıma ait ¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.43), Trp- amino asit kalıntısına ait imidazol halkasındaki N-H protonu δ 10,77'de belirlendi. Tipik bir peptidin, amit protonlarına ait sinyaller δ 8,4–8,7 aralığı ile yapıdaki aromatik amino asidin protonlarında yer aldığı δ 6,9–7,8 aralığında belirlendi. Son olarak, α-protonları δ 4,0–4,5 ppm aralığı ile diğer alifatik protonlar δ 0,6–3,0 ppm aralığında olduğu belirlendi.



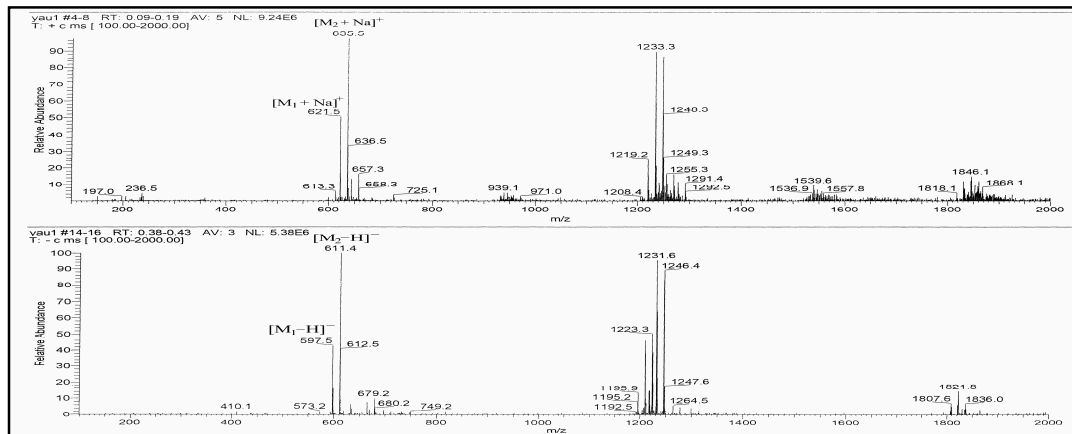
Şekil 4.43. Siklik pentapeptit karışımının (179, 180) ¹H NMR spektrumu (300 MHz, DMSO-d₆).

Şekil 4.44'teki siklik pentapeptit karışımına ait ^{13}C NMR spektrumunda δ 170–173 ppm aralığında karbonil gruplarına ait sinyaller tespit edildi. Siklik pentapeptit A (**178**) ve B (**179**) bileşiklerinin her ikisinde de yer alan aromatik amino asit kalıntısından (Trp-) kaynaklı 8 karbon atomuna ait pikler δ 110–136 ppm aralığında görülmektedir. α -karbon atomlarına ait sinyaller δ 47–58 ppm aralığında ve diğer alifatik karbon atomlarına ait pikler ise δ 11–39 ppm aralığında belirlendi.



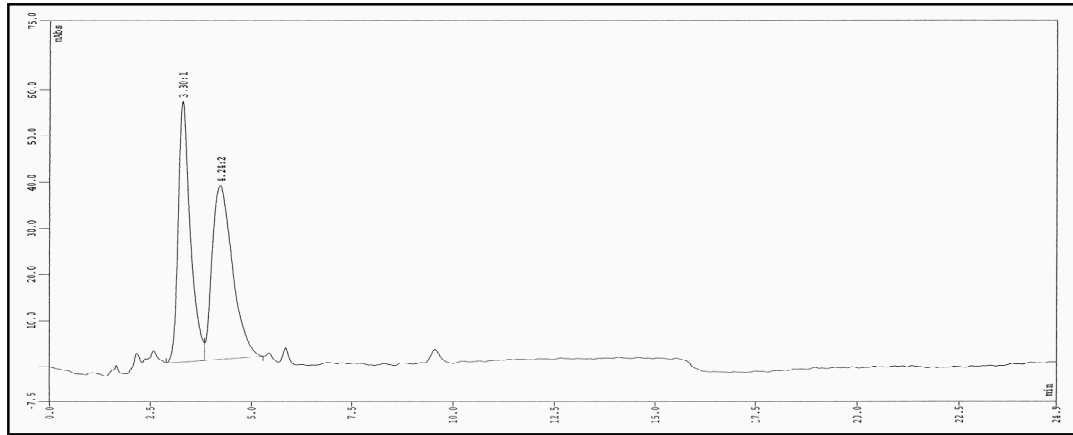
Şekil 4.44. Siklik pentapeptit karışımının (**179**, **180**) ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Karışımın ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.45), siklik pentapeptit A (**178**)'nın kapalı formülünün $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_7$ olduğu, m/z oranının $[\text{M}_1 + \text{Na}]^+$ 621,5 ve $[\text{M}_1 - \text{H}]^-$ 597,5 olduğu bulundu. Siklik pentapeptit B (**179**)'nin ise kapalı formülünün $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_7$ olduğu, m/z oranının $[\text{M}_2 + \text{Na}]^+$ 635,5 ve $[\text{M}_2 - \text{H}]^-$ 611,4 olduğu belirlendi.



Şekil 4.45. Siklik pentapeptit karışımının (**179**, **180**) ESI-MS spektrumu.

Siklik pentapeptit karışımının Şekil 4.46'daki HPLC kromatogramında, Nucleodur marka HPLC kolonundan (C₁₈, 100 Å, 5 µm) % 42 Asetonitril / H₂O çözücü sistemi ile ayrıldıkları belirlendi. HPLC'de siklik pentapeptit A (**179**)'nın 3,30. dakikada, bir CH₂ grubu fazla olan siklik pentapeptit B (**180**)'nin ise 4,42. dakikada kolondan ayrılmış olduğu DAD ile 220 nm dalga boyunda ölçülerek tespit edildi.



Şekil 4.46. Siklik pentapeptit karışımının (**179**, **180**) HPLC kromatogramı.

Elde edilen spektroskopik verilere göre AntiBase'de⁹³ yapılan taramalar sonucunda karışım içerisindeki bileşenlerden, siklik pentapeptit A (**179**)'nın siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-) yapısında olduğu ve siklik pentapeptit B (**180**)'nin ise siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-) yapısında peptitler oldukları literatür verileriyle de kıyaslanarak doğrulandı.²⁹⁰⁻²⁹⁴

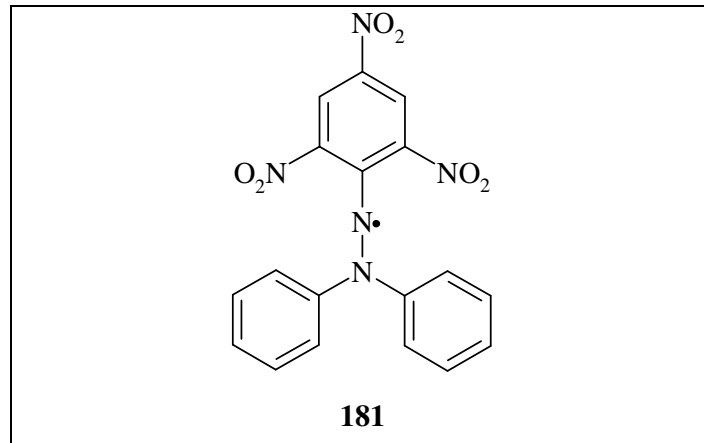
Siklik pentapeptit A (**179**) (siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-)) ve B (**180**) (siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-)) Kojiri ve arkadaşları tarafından *Streptomyces misakiensis*'ten izole edilip BE-18257A ve BE-18257B şeklinde tanımlanmıştır.^{290,291} Ayrıca aynı siklik pentapeptitler Miyata ve arkadaşları tarafından da *Streptomyces* sp. No. 7338'den izole edilip WS-7338 A ve WS-7338 B şeklinde adlandırılmıştır.²⁹²⁻²⁹⁴ Her iki çalışma grubu tarafından da bu peptitlerin endotelin reseptör antagonisti oldukları rapor edilmiştir.²⁹⁰⁻²⁹⁴

Ayrıca siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**179**) bileşikleri, bu çalışmada *Streptomyces* sp. AS42'den de izole edilmiştir.

4.3.2.3. Rizosferik *Streptomyces* sp. AA50'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

4.3.2.3.1. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidant aktiviteyi tayin etmek için kullanılan en eski metoddur. İlk olarak 1950'de doğal materyallerdeki H-donörlerini bulmak için önerilmiştir. Sonraları hem fenolik bileşiklerin hem de yiyeceklerin biyolojik açıdan önemli kısımlarının antioksidant potansiyelini tayin etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bu test, fenolik bileşiklerdeki H-donörlerinin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (**181**) (DPPH) serbest kararlı radikali ile tepkime kapasitesi temeline dayanmaktadır. DPPH görünür bölgede (517 nm) oldukça şiddetli absorpsiyon verir, böylece UV-vis spektroskopisi ile kolayca tayin edilebilir.²⁹⁵ Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon, DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına bu da 517 nm'deki absorbansın düşmesine neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H'tır. Bu olay, reaksiyon karışımının mor renkten sarı renge dönmesiyle gözlemlenir.



Bu amaç doğrultusunda, *Streptomyces* sp. AA50'den izole edilen bileşiklerden, Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un serbest radikal söndürme aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (**181**) (DPPH) ile modifiye Blois²⁹⁶ metodu kullanılarak test edildi.²⁹⁷ Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) pozitif kontrol olarak kullanıldı. 10-1000 µM aralığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BHT, BHA, chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un 3 mL'lik çözeltilerine metanolde hazırlanan 0,1 mM DPPH

çözeltilisinden (ışığa duyarlıdır) 1'er mL eklendi. Karışımlar vorteks yardımıyla iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Artan konsantrasyona bağlı olarak mordan sarıya dönüşen renk şiddeti izlendi. Spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Bu testte, düşük absorbans değeri yüksek aktivite anlamına gelmektedir.

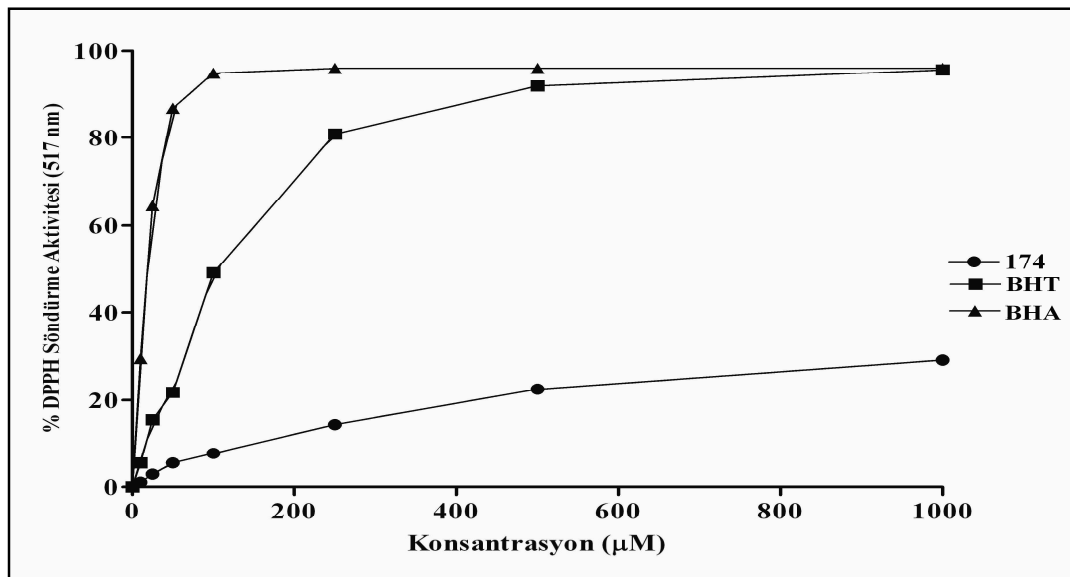
Elde edilen absorbans değerleri, aşağıdaki eşitlik kullanılarak % DPPH radikalini söndürme kapasitesi olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, artan madde derişimine karşı % DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi şeklinde grafiğe geçildi.

$$\% \text{ DPPH} \cdot \text{Söndürme Aktivitesi} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100$$

A_0 = Negatif kontrol numunesinin (DPPH) absorbansı,

A_1 = Örnek çözeltisinin absorbansı.

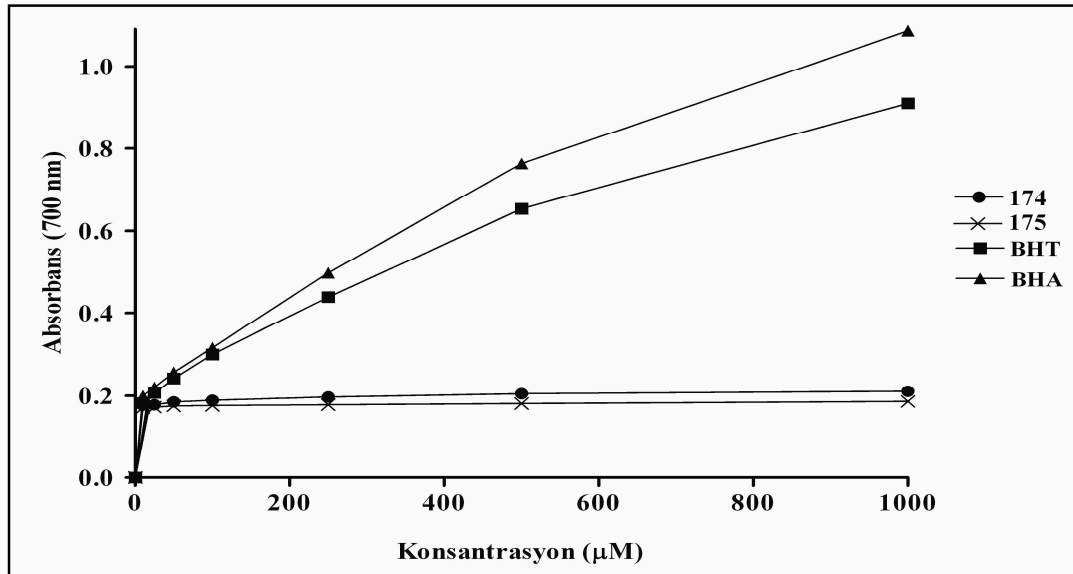
Yapılan ölçümler sonucunda chrysophanol (**175**)'un negatif yüzde sergilemiş olmasından dolayı çizilen grafikte gösterilmedi. Şekil 4.47'de görüldüğü gibi 1000 μM 'lık chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un, % 29,15 oranında DPPH radikalini söndürme aktivitesi gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.47. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve pozitif kontrollerin % DPPH radikalini söndürme aktivitesi.

4.3.2.3.2. İndirgeme Gücü

Fenton tipi reaksiyonlarda Fe^{2+} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksi radikalini oluştururken kendisi Fe^{3+} 'e yükseltgenir. OH radikalının oluşumu, lipid peroksidasyonuna, protein modifikasyonuna ve DNA hasarına yol açar. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**) varlığında Fe^{3+}/Fe^{2+} 'ye dönüşümü Oyaizu metodu²⁹⁸ ile incelendi.²⁹⁹ BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 μM) 1 mL'lik chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**), chrysophanol (**175**) ve pozitif kontrol çözeltilerinin üzerine sırayla, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH 6,6) ve 2,5 mL potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] (% 1, w/v) eklendikten sonra reaksiyon karışımı iyice karıştırıldı ve 50 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu karışıma daha sonra 2,5 mL trikloroasetik asit (TCA, % 10 w/v) ilave edildi, iyice çalkalandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadan 2,5 mL alınıp 2,5 mL distile su ve 0,5 mL $FeCl_3$ çözeltisi (% 0,1, w/v) ilave edilip iyice karıştırıldı. Daha sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi, artan konsantrasyonla birlikte sarıdan yeşile dönüşen renk şiddetinde artma gözlemlendi. 700 nm'de absorbans ölçüldü, artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Bu testte yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un oldukça düşük indirgeme gücüne sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.48).



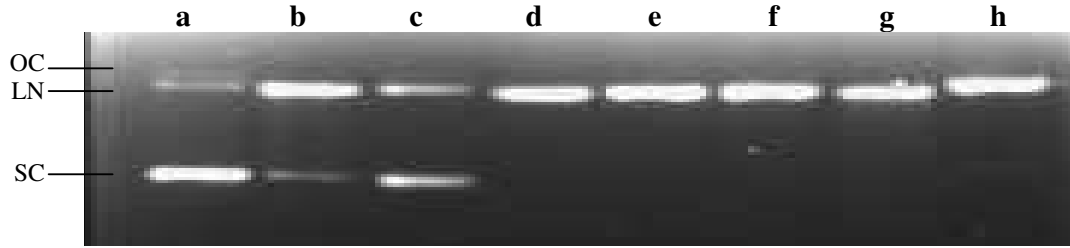
Şekil 4.48. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**), chrysophanol (**175**) ve pozitif kontrollerin Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme aktivitesi.

4.3.2.3.3. DNA'yı OH Radikaline Karşı Koruma Aktivitesi

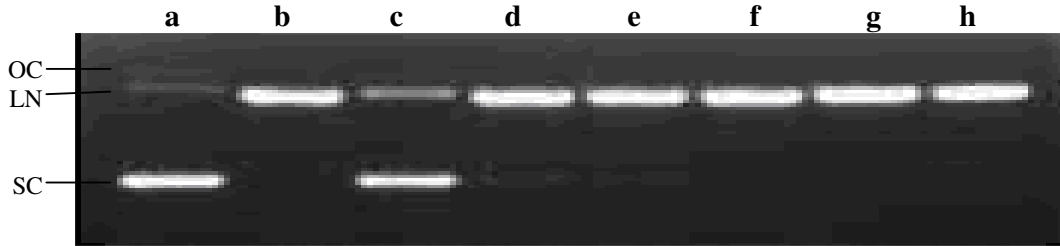
Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un Fenton tipi reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller tarafından DNA'da meydana gelebilecek zincir kırılmalarını engelleyici etkileri, pBluescript M13+ plasmid DNA kullanılarak, *in vitro* olarak araştırıldı. Fenton tipi reaksiyonlarda oluşan OH radikalının etkisiyle supercoiled (SC) formda olan plasmid DNA'da zincir kırıkları meydana gelerek open circular (OC) ve linear (LN) formlara dönüşür. DNA'da meydana gelen bu hasar agaroz jel elektroforezi yardımıyla SC formun diğer formlara yüzde dönüşümüyle gözlemlenir.^{300,301}

Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un DNA hasarını önleme etkisinin araştırıldığı testler, toplam hacim 14 µL olacak şekilde ependorf tüpleri içerisinde gerçekleştirildi. 4 µL pBluescript M13+ plasmid DNA (200 ng) üzerine 3 µL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,4), 3 µL 2 mM'lık FeSO₄ çözeltileri eklendi, ardından 25, 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda hazırlanan **174** ve **175** bileşiklerinden 2 µL ilave edildi. Daha sonra 4 µL % 15'lik H₂O₂ ilave edilip reaksiyon karışımı 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak 2 µL 50 mM KI kullanıldı. Ardından % 30 gliserol / % 0.01 bromofenol blue'den 3 µL ilave edilip 0,7 µg/mL etidyum bromür içerikli % 0,8'lik agaroz jele yükleme yapıldı. Elektroforez işlemi TAE tamponu (40mM Tris, 40 mM asetat, 1 mM EDTA, pH 8,2) içerisinde 40 V'da 180 dakika boyunca gerçekleştirildi. Elde edilen bantlar, jel görüntüleme sistemi kullanılarak belirlendi. Daha sonra bantlar Quantity One yazılımıyla (version 4.5.2. BioRad Co.) değerlendirildi.

Şekil 4.49 ve 4.50'de görüldüğü gibi, kuyucuk **a**'da bulunan saf DNA'ya ait üç formda görülmektedir. Kuyucuk **b**'de Fenton tipi reaksiyonla oluşan OH radikalının DNA'nın SC formunun hemen hemen tamamının LN formuna dönüştürdüğü görülmektedir. Kuyucuk **c**'de ise pozitif kontrol olarak kullanılan 50 mM'lık KI'nın DNA kesimini önlediği görülmektedir. Şekil 4.49'da kuyucuk **d-h** arasında değişik konsantrasyonlardaki chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'nun DNA kesimini engellemediği tespit edilmiştir. Şekil 4.50'de kuyucuk **d-h** arasında farklı konsantrasyonlardaki chrysophanol (**175**)'un da denen konsantrasyon aralığında DNA'yı OH radikallerine karşı koruyucu aktiviteye sahip olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.49. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un Fenton reaksiyonu ile oluşan OH radikallerinin pBluescript M13+ plasmid DNA'sına verdiği hasarı önleyici etkisinin araştırılması. **a:** plasmid DNA, **b:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + % 15 H₂O₂ (DNA hasarının kontrolü), **c:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 50 mM KI + % 15 H₂O₂ (pozitif kontrol), **d:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 25 µM **174** + % 15 H₂O₂, **e:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 50 µM **174** + % 15 H₂O₂, **f:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 100 µM **174** + % 15 H₂O₂, **g:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 250 µM **174** + % 15 H₂O₂, **h:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 500 µM **174** + % 15 H₂O₂.



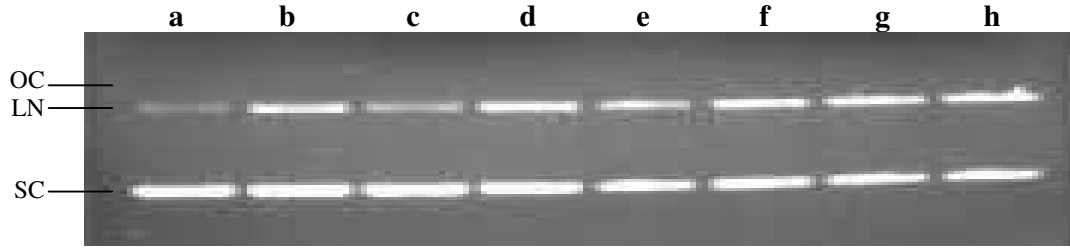
Şekil 4.50. Chrysophanol (**175**)'un Fenton reaksiyonu ile oluşan OH radikallerinin pBluescript M13+ plasmid DNA'sına verdiği hasarı önleyici etkisinin araştırılması. **a:** plasmid DNA, **b:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + % 15 H₂O₂ (DNA hasarının kontrolü), **c:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 50 mM KI + % 15 H₂O₂ (pozitif kontrol), **d:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 25 µM **175** + % 15 H₂O₂, **e:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 50 µM **175** + % 15 H₂O₂, **f:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 100 µM **175** + % 15 H₂O₂, **g:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 250 µM **175** + % 15 H₂O₂, **h:** plasmid DNA + 2 mM FeSO₄ + 500 µM **175** + % 15 H₂O₂.

4.3.2.3.4. DNA'yı Prooksidan Olarak Kesim Aktivitesi

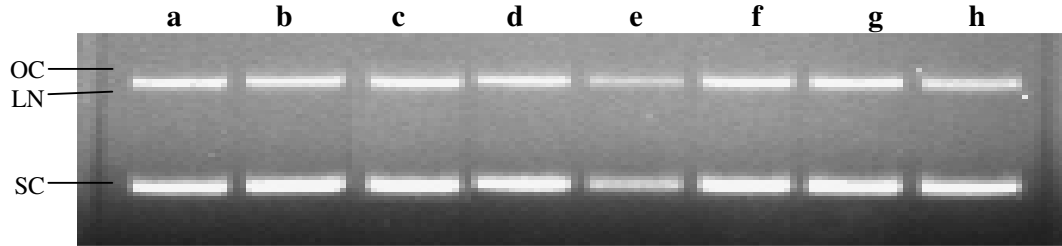
Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un Cu^{2+} varlığında prooksidan olarak davranış göstererek DNA'da zincir kırıkları meydana getirip-getirmedikleri, pBluescript M13+ plasmid DNA kullanılarak *in vitro* olarak araştırıldı. Bu tip çalışmalarda, Cu_2^+ varlığında DNA kesimi, ortamda prooksidan olarak davranış gösterebilecek maddelerin etkisiyle supercoiled (SC) formda olan plasmid DNA'da zincir kırıkları meydana gelerek open circular (OC) ve linear (LN) formlara dönüşümün olduğu DNA hasarları meydana gelir. DNA'da meydana gelen bu hasar agaroz jel elektroforezi yardımıyla SC formun diğer formlara yüzde dönüşümüyle gözlemlenir.^{302,303}

Bu amaç doğrultusunda *Streptomyces* sp. AA50'den izole edilen Chrysophanol-10,10'-Bianthron (**174**) ve Chrysophanol (**175**)'un prooksidan olarak DNA'da hasara neden olma etkisinin araştırıldığı reaksiyon karışımının toplam hacimi 12 μL olacak şekilde ependorf tüpleri içerisinde gerçekleştirildi. 4 μL pBluescript M13+ plasmid DNA (200 ng), 3 μL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile syreltildi ve üzerine 3 μL 300 μM 'lık CuCl_2 ilave edilip ardından 25, 50, 100, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarda Chrysophanol-10,10'-Bianthron (**174**) ve Chrysophanol (**175**) bileşiklerinden 2 μL ilave edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak 2 μL 50 mM KI kullanıldı. Ardından % 30 gliserin / % 0,01 bromofenol blue'den 3 μL ilave edilip 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etidyum bromür içerikli % 0,8'lik agaroz jele yükleme yapıldı. Elektroforez işlemi TAE tamponu (40 mM Tris, 40 mM asetat, 1 mM EDTA, pH 8,2) içerisinde 40 V'da 180 dakika boyunca gerçekleştirildi. Elde edilen bantlar, agaroz jel görüntüleme sistemi kullanılarak belirlendi. Bantlar Quantity One yazılımıyla (version 4.5.2. BioRad Co.) değerlendirildi.

Şekil 4.51 ve 4.52'de görüldüğü gibi, kuyucuk **a**'da bulunan saf DNA'ya ait üç formda görülmekte ve kuyucuk **b**'de ise Cu^{2+} 'nin DNA'ya tek başına hasar vermediği görülmektedir. Kuyucuk **c**'de Cu^{2+} ve pozitif kontrol olarak kullanılan 50 mM'lık KI'nın DNA üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 4.51'de kuyucuk **d-h** arasında değişik konsantrasyonlardaki chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve Şekil 4.52'deki kuyucuk **d-h** arasında ise farklı konsantrasyonlardaki chrysophanol (**175**)'nun Cu^{2+} varlığında denenen konsantrasyon aralığında prooksidan olarak davranmayıp DNA üzerinde kesim etkisine sahip olmadıkları gözlemlendi.



Şekil 4.51. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un Cu^{2+} varlığında pBluescript M13+ plasmid DNA'sını kesim etkisinin araştırılması. **a:** plasmid DNA, **b:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 , **c:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 50 mM KI (pozitif kontrol), **d:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 25 μM **174**, **e:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 50 μM **174**, **f:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 100 μM **174**, **g:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 250 μM **174**, **h:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 500 μM **174**.

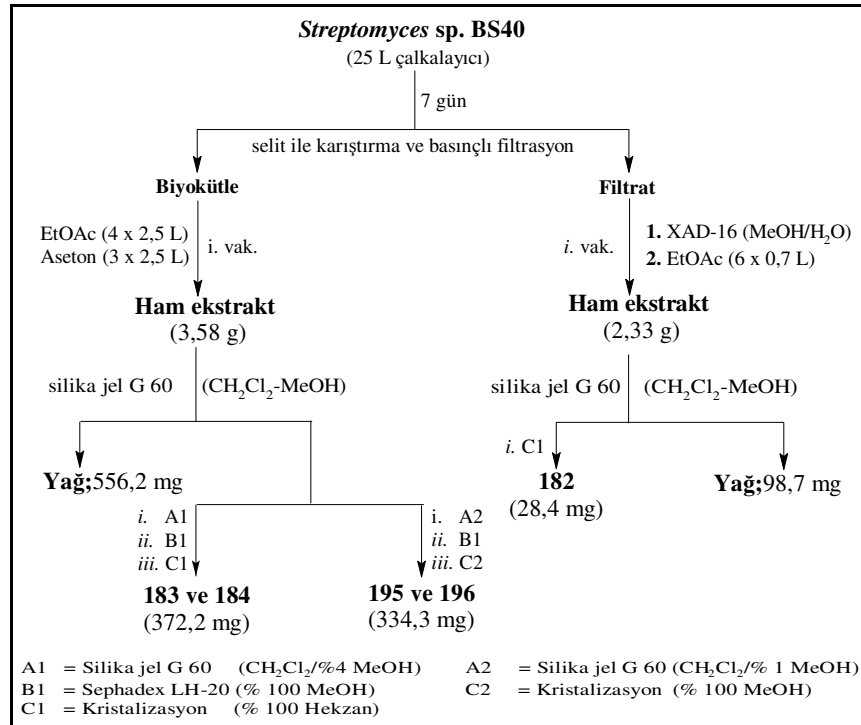


Şekil 4.52. Chrysophanol (**175**)'un Cu^{2+} varlığında pBluescript M13+ plasmid DNA'sını kesim etkisinin araştırılması. **a:** plasmid DNA, **b:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 , **c:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 50 mM KI (pozitif kontrol), **d:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 25 μM **175**, **e:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 50 μM **175**, **f:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 100 μM **175**, **g:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 250 μM **175**, **h:** plasmid DNA + 300 μM CuCl_2 + 500 μM **175**.

4.3.3. Rizosferik *Streptomyces* sp. BS40

4.3.3.1. Fermantasyon ve İzolasyon

Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında endemik bitkilerin rizosferik toprak tabakasından izole edilerek teşhisi yapılmış olan *Streptomyces* sp. BS40'ın M₂ agar besiyerinde gri renkli görünen iyi büyümüş pleytleri seçildi ve ardından 1 L'lik erlenmayerlerde her biri 250 mL M₂ besiyeri içeren 100 adet besiyerine aşılama yapıldı. Fermantasyon 28 °C ve 95 rpm'de lineer inkübatörde 7 gün süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen siyah renkteki kültür selitle karıştırılıp ardından basınçlı filtrasyon uygulanarak biyokütle ve filtrat kısmı birbirinden ayrıldı. Filtrat kısmı Amberlit XAD-16 kullanılarak adsorbe edilip ayrıldı ve misel kısmı ise önce etil asetat (4 × 2,5 L) ardından asetonla (3 × 2,5 L) ekstrakte edildi. Amberlit XAD-16 kullanılarak su fazından ayrılması sağlanan filtrat ekstraktından (2,33 g), kromatografik teknikler uygulanarak 98,7 mg yağ ve carbazomycin G (**182**) elde edildi. Misellerden elde edilen ekstraktan (3,58 g) ise 556,2 mg yağ ile teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımı ile 2 yeni teleocidin türevi 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomerinin (**196**) karışımları izole edildi (Şekil 4.53).

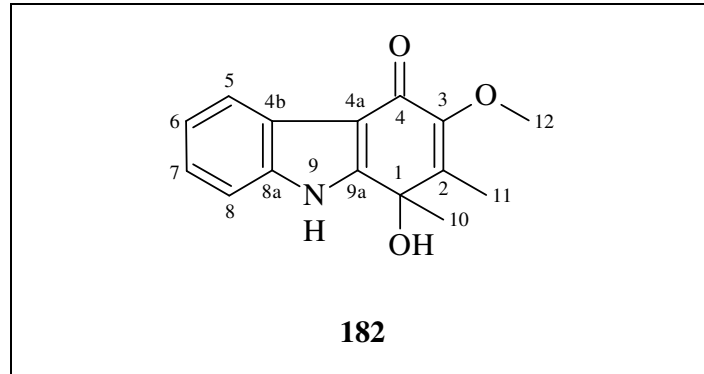


Şekil 4.53. Rizosferik *Streptomyces* sp. BS40'ın sekonder metabolitlerinin araştırılması.

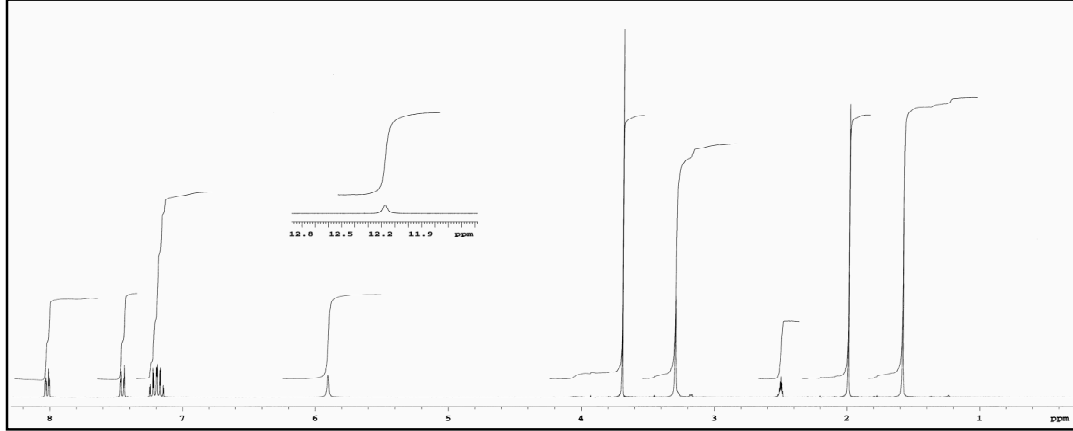
4.3.3.2. Rizosferik *Streptomyces* sp. BS40'ın Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması

4.3.3.2.1. Carbazomycin G (182)

Carbazomycin G (**182**), *Streptomyces* sp. BS40'ın filtrat kısmından elde edilen ekstraktın, silika jel kolonundan CH₂Cl₂:MeOH ile elüe edilmesi sonucu toplanan fraksiyon III'ün metanol içerisinde kristalizasyon işlemine tabi tutulması sonucu, açık sarı renkli kristal görünüşlü (28,4 mg) olarak elde edildi. Bu bileşik, diklorometan ve kloroformda hiç çözünmemesine karşın, metanolde orta derece ve dimetil sülfoksitte (DMSO) ise iyi çözünmektedir. Kinol yapısında olan bu bileşik, İTK tabakası üzerinde 365 nm'de UV ışığı altında kuvvetli mavi floresans vermektedir. Ayrıca % 50 EtOAc / % 50 Hekzan çözücü sisteminde R_f değeri 0,34 ve erime noktası ise 266–268 °C olarak belirlendi.

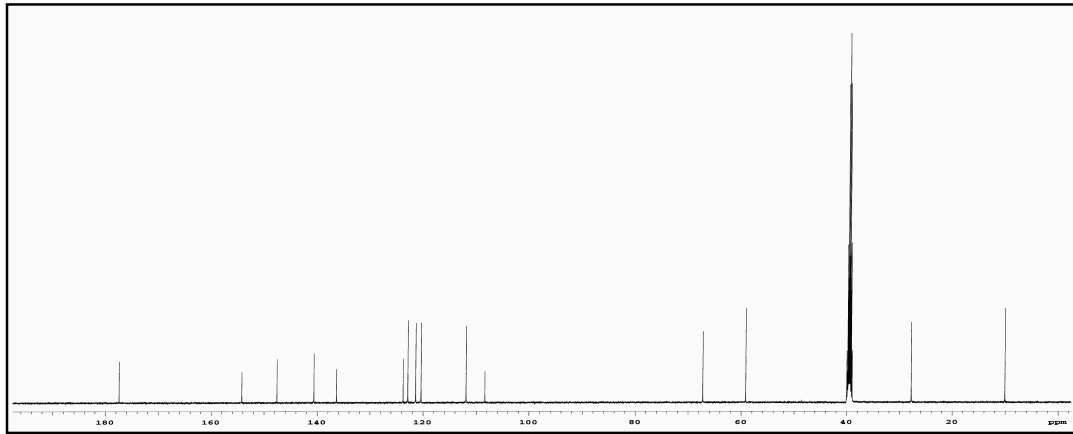


Şekil 4.54'de 300 MHz'de DMSO-*d*₆'da alınan ¹H NMR spektrumunda carbazomycin G (**182**)'deki N-H grubundan ve OH grubundan kaynaklı sinyaller sırasıyla δ 12,17 ppm ve δ 5,91 ppm'de birer singlet olarak belirlendi. Bileşikteki aromatik protonlardan kaynaklı sinyallerin ise δ 8,02 ve δ 7,46 ppm'de 1'er H'lık multipler ile 7,15–7,25 ppm aralığında 2 H'a eşdeğer multipler şeklinde olduğu tespit edildi. Bileşikteki metoksi grubundan kaynaklı 3 H'lık bir singletin δ 3,69 ppm'de olduğu görüldü. Son olarak yapıdaki iki metil grubundan kaynaklı 3'er H'lık singletler δ 1,99 ve δ 1,58 ppm olarak belirlendi.



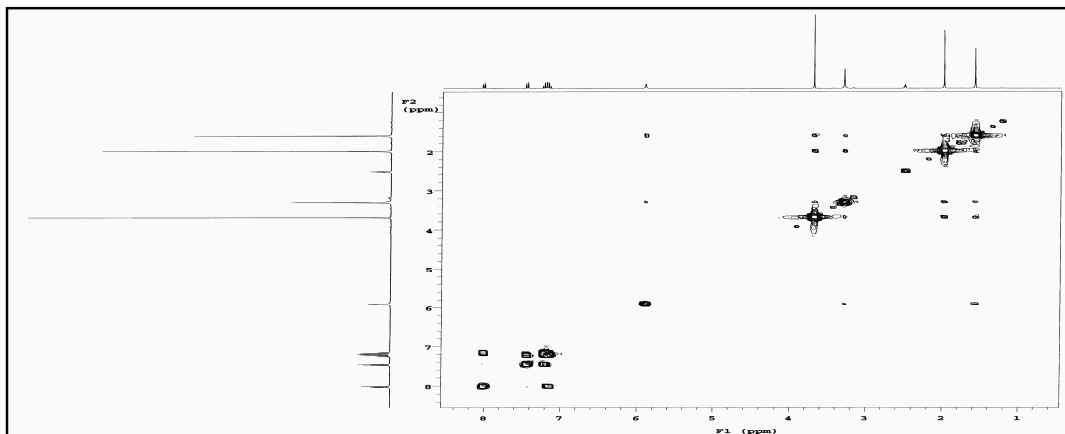
Şekil 4.54. Carbazomycin G (**182**)'nin ^1H NMR spektrumu (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

^{13}C NMR spektrumunda (Şekil 4.55), δ 177,4 ppm'de karbonil grubuna ait sinyal belirlendi. Aromatik halkadaki üzerinde H bulunduran karbonlardan kaynaklı 4 farklı pik δ 111–123 ppm aralığında görülmektedir. Kuarterner karbon atomlarından kaynaklı δ 108–155 ppm aralığında 6 sinyal ile δ 67,2 ppm'de bir sinyal olmak üzere toplam yedi sinyal belirlendi. Son olarak δ 59,2 ppm'de metoksi grubuna ait sinyal ile δ 27,8 ve 10,1 ppm'de metil gruplarına ait olan sinyaller belirlendi.

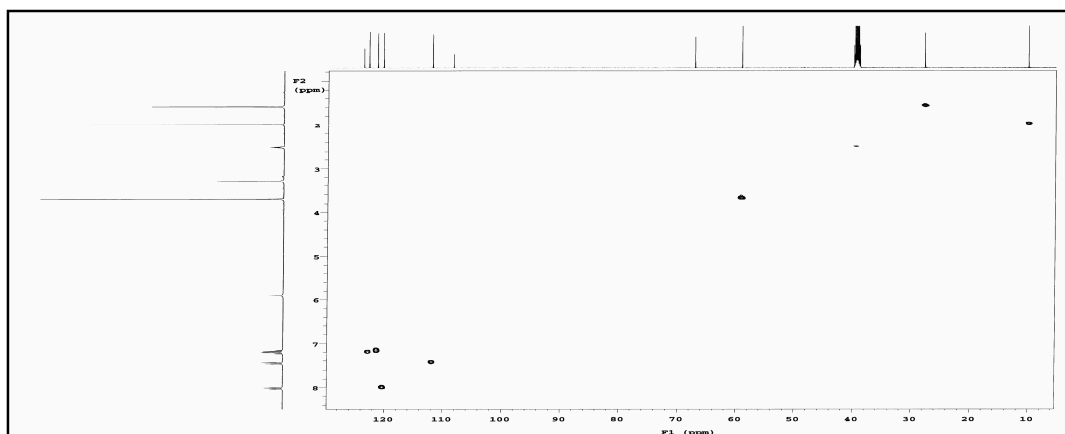


Şekil 4.55. Carbazomycin G (**182**)'nin ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

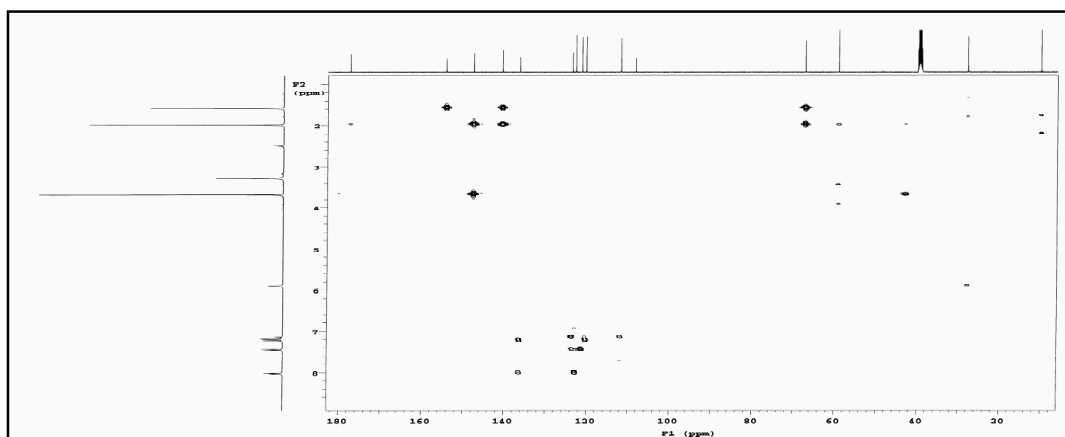
Ayrıca bileşiğin yapısının aydınlatılması için 1D NMR spektrumlarının yanında, H,H COSY (Şekil 4.56), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.57) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları da (Şekil 4.58) incelendi.



Şekil 4.56. Carbazomycin G (**182**)'nin H,H COSY spektrumu (300 MHz, DMSO- d_6).

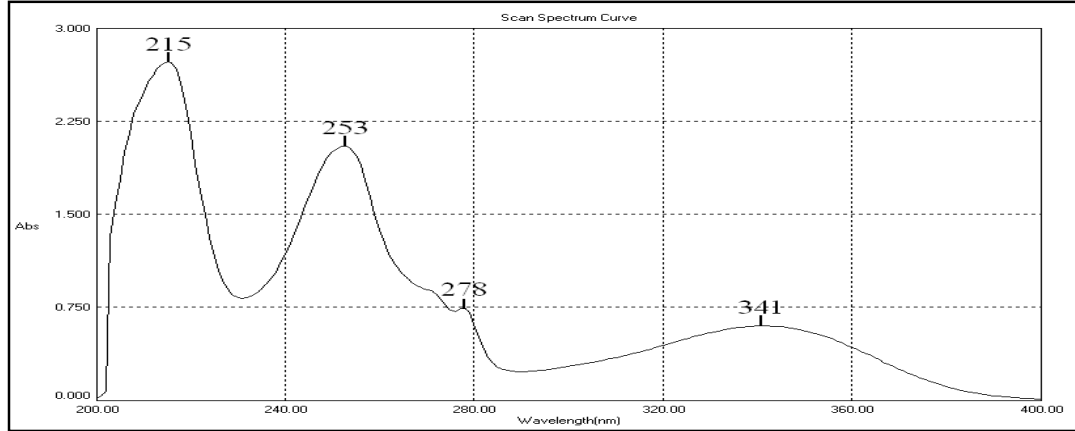


Şekil 4.57. Carbazomycin G (**182**)'nin HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, DMSO- d_6).

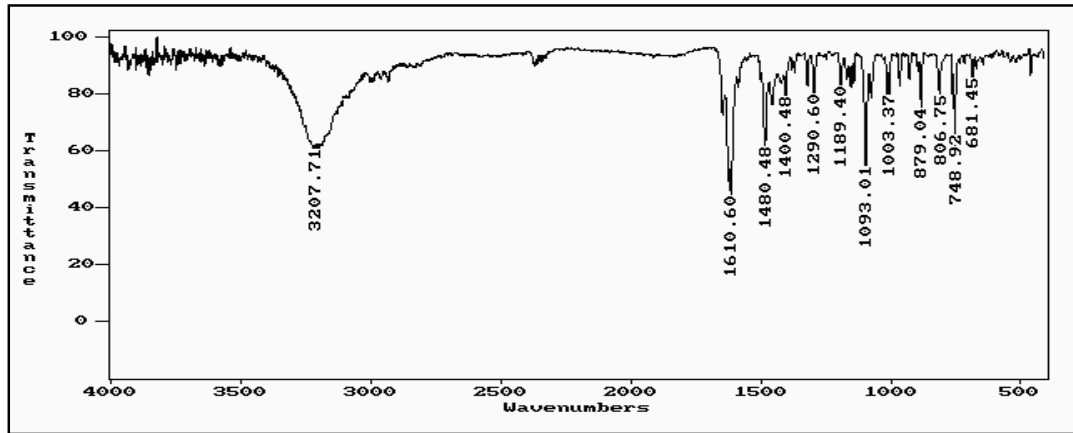


Şekil 4.58. Carbazomycin G (**182**)'nin HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, DMSO- d_6).

Carbazomycin G (**182**)'nin metanolde hazırlanan 100 μM 'lık çözeltisinin UV spektrumunda 215 (27300), 253 (20500), 278 (7500) ve 341 (6000) nm'de (ϵ) maksimum absorbans yaptığı belirlendi (Şekil 4.59). Ayrıca Şekil 4.60'ta bu bileşiğin KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR sonuçlarına göre ise, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3207, 1611, 1480, 1903 ve 749 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi.

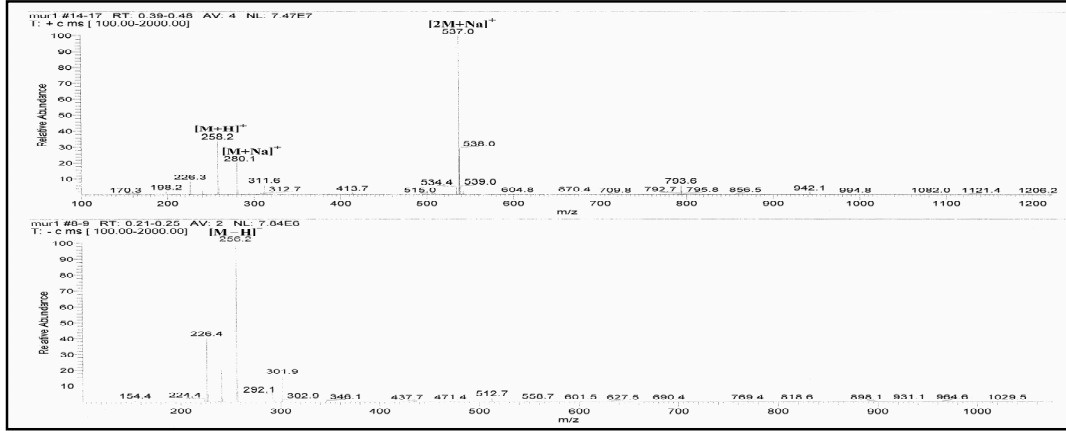


Şekil 4.59. 100 μM 'lık Carbazomycin G (**182**)'nin UV spektrumu (MeOH).

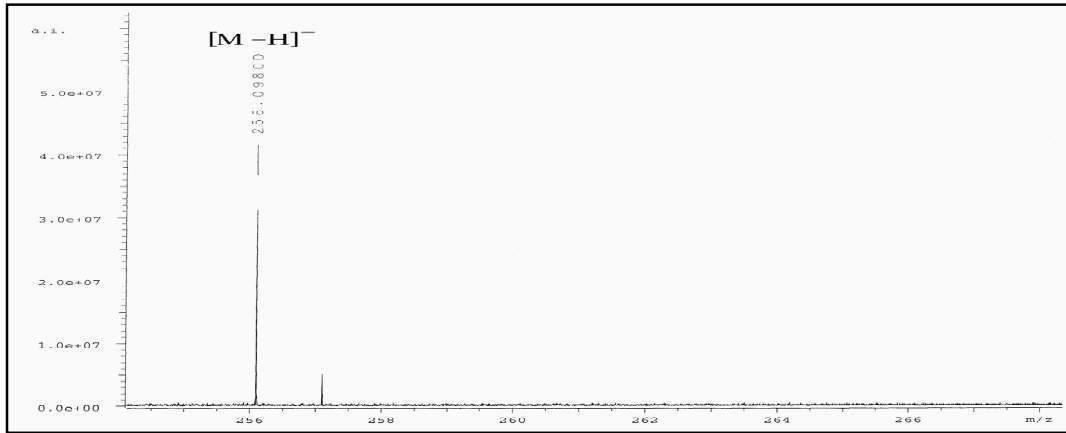


Şekil 4.60. Carbazomycin G (**182**)'nin FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Şekil 4.61'deki ESI-MS spektrumundan ve Şekil 4.62'deki HR-ESI-MS spektrumundan elde edilen sonuçlara göre carbazomycin G (**182**)'nin kapalı formülünün $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ olduğu, negatif modda $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z oranının 256,0980 ve hesaplanan kütle sinin ise 256,0979 olduğu belirlendi.



Şekil 4.61. Carbazomycin G (182)'nin ESI-MS spektrumu.



Şekil 4.62. Carbazomycin G (182)'nin HR-ESI-MS spektrumu.

Kütle spektrumundan elde edilen sonuçlara göre carbazomycin G (182), AntiBase'de⁹³ tarandı ve elde edilen NMR spektrumları literatür sonuçları³⁰⁴ ile karşılaştırılarak yapı doğrulandı.

Carbazomycin G (182) ve diğer türevleri Nakamura ve çalışma grubu tarafından *Streptovercillium ehimense*'den izole edilip yapısı doğrulanmıştır.³⁰⁴ Knölker ve Fröhner ise bu bileşiğin ilk total organik, sentezini geçiş metal kompleksleri³⁰⁵ ve ardından palladyum katalizörlüğünde³⁰⁶ gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir. Carbazomycin G (182)'nin *Trichophyton* türlerine karşı orta derecede antifungal aktivite gösterdiği bilinmektedir.³⁰⁴

İzole edilen bu bileşiğin fizikokimyasal özellikleri Tablo 4.9'da görülmektedir. ¹H ve ¹³C NMR verilerine ait kimyasal kayma değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Carbazomycin G (**182**)'nin fizikokimyasal özellikleri.

| carbazomycin G (182) | |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Görünüm | Açık sarı, kristal |
| Molekül formülü | C ₁₅ H ₁₅ N O ₃ |
| HRESI-MS (negatif, <i>m/z</i>) | |
| Bulunan | 256,0980 [M-H] ⁻ |
| Hesaplanan | 256,0979 |
| Erime noktası (mp) | 266–268 °C (241–243 °C) ^a |
| UV-vis λ _{max} ^{MeOH} nm (ε) | 215 (27300); 253 (20500); 278 (7500); 341 (6000) |
| FT-IR ν _{max} ^{KBr} cm ⁻¹ | 3207,71; 1610,60; 1480,48; 1400,48; 1290,60; 1189,40; 1093,01; 1003,37; 879,04; 806,75; 748,92; 681,45 |
| İTK R _f değeri [*] | 0,34 |

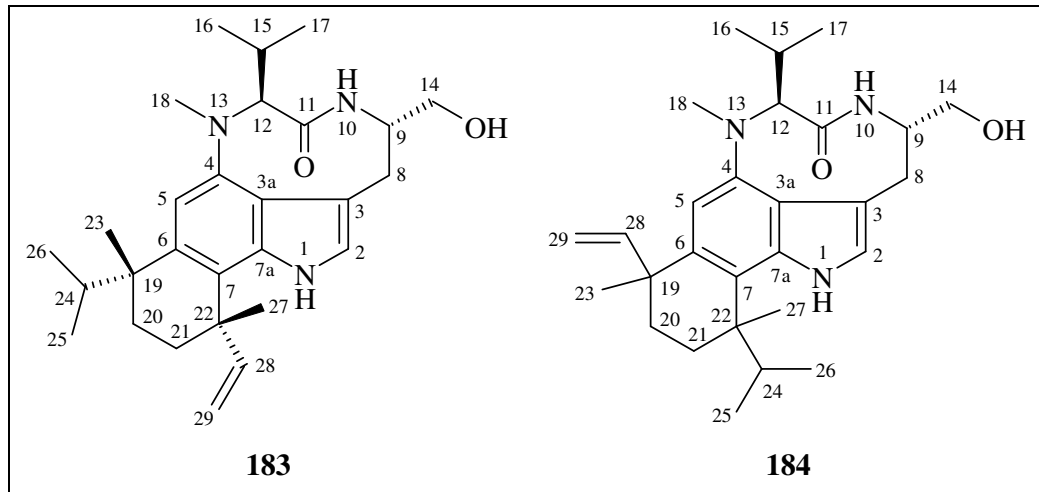
^{*}DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄; hareketli faz: % 50 EtOAc / % 50 Hekzan, ^alit.³⁰⁴

Tablo 4.10. Carbazomycin G (**182**)'nin ¹³C NMR (125 MHz) ve ¹H (300 MHz) kimyasal kayma değerleri (ppm, DMSO-*d*₆).

| pozisyon | carbazomycin G (182) | |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | δ _C | δ _H (<i>J</i> = Hz) |
| 1 | 67,24 | – |
| 2 | 154,21 | – |
| 3 | 147,57 | – |
| 4 | 177,42 | – |
| 5 | 120,39 | 8,02 (1H, m) |
| 6 | 121,39 | } 7,15–7,25 (2H, m) |
| 7 | 122,86 | |
| 8 | 111,95 | 7,46 (1H, m) |
| 4a | 108,38 | – |
| 4b | 123,73 | – |
| 8a | 136,40 | – |
| 9a | 140,65 | – |
| 1-CH₃ (10) | 27,82 | 1,58 (3H, s) |
| 2-CH ₃ (11) | 10,08 | 1,99 (3H, s) |
| 3-OCH₃ (12) | 59,16 | 3,69 (3H, s) |
| 1-OH | – | 5,91 (1H, s) |
| NH (9) | – | 12,17 (1H, br s) |

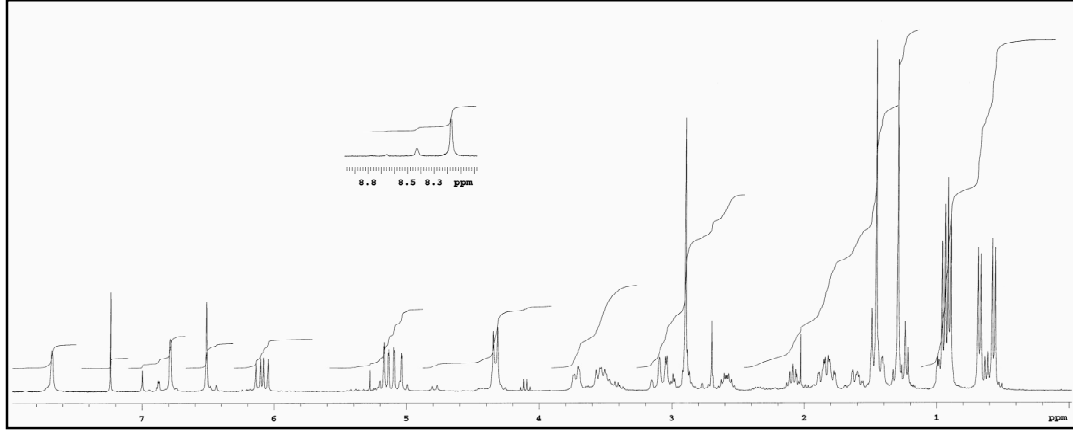
4.3.3.2.2. Teleocidin B2 (183) ve İzomer (184) Karışımı

Streptomyces sp. BS40'ın biyokütle kısmından elde edilen ekstraktın, silika jel kolonundan CH₂Cl₂:MeOH ile elüe edilmesi sonucu toplanan fraksiyon III'e, öncelikli olarak silika jel 60 CH₂Cl₂:MeOH (96:4) ardından Sephadex LH-20 (% 100 MeOH) kromatografik tekniklerinin uygulanmasından sonra ele geçen karışımın hekzan içerisinde kristallendirilmesi sonucunda renksiz, kristal görünümlü Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımı saflaştırılmıştır. Karışımın sikloheksan ve hekzandaki çözünürlüğü oldukça düşük olmasına karşın kloroform ve metanoldeki çözünürlüğü oldukça iyidir. İTK tabakası üzerinde, anisaldehit/sülfürik asit reaktifi ile kahverengi spot oluşturan karışım, UV ışığı altında 366 nm'de mavi floresan özellik göstermektedir. Karışımın, DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ üzerinde CH₂Cl₂:MeOH (95:5) çözücü sisteminde R_f değeri 0,33 olarak tespit edildi.



Şekil 4.63'teki ¹H NMR spektrumunda karışım içerisinde ana bileşen olan teleocidin B2 (**183**)'nin sinyalleri net olarak görülmektedir. Her iki bileşiğin ana iskelet yapısı aynı olduğundan, teleocidin B2 (**183**) ve izomeri (**184**)'nin indol çekirdeğindeki N-H grubundan kaynaklı sinyaller sırasıyla δ 8,18 ve 8,43 ppm'de geniş singletler olarak belirlendi. İndol halka sistemindeki ana bileşenden kaynaklı 2 numaralı proton δ 6,79'da izomerden kaynaklı olan ise 6,87'de dubletler şeklinde ve 5 numaralı proton ise sırasıyla δ 6,51 ve 7,00 ppm'de singlet olarak görüldü. Her iki bileşendeki amit protonu ise 7,69 ppm'de geniş bir singlet olarak belirlendi. Teleocidin B2 (**183**)'nin N-CH₃ δ 2,90 ppm'de 23 numaralı metil grubu 1,29 ppm ve 27 numaralı metil grubu ise

1,46 ppm olarak belirlenirken izomer (**184**)'e ait aynı sinyaller ise sırasıyla δ 2,70, 1,24 ve 1,49 ppm'de üçer protonluk singletler şeklinde belirlendi. Yapılarda bulunan vinil grubundaki CH protonu δ 6,1 ppm, CH₂'den kaynaklı protonlar ise 5,1 ppm civarında tespit edildi. Karışımdaki her iki bileşende bulunan izopropil gruplarından kaynaklı 4 metil protonlarına ait sinyaller δ 0,50–1,25 ppm aralığında üçer H'lık dubletler şeklinde oldukları belirlendi.

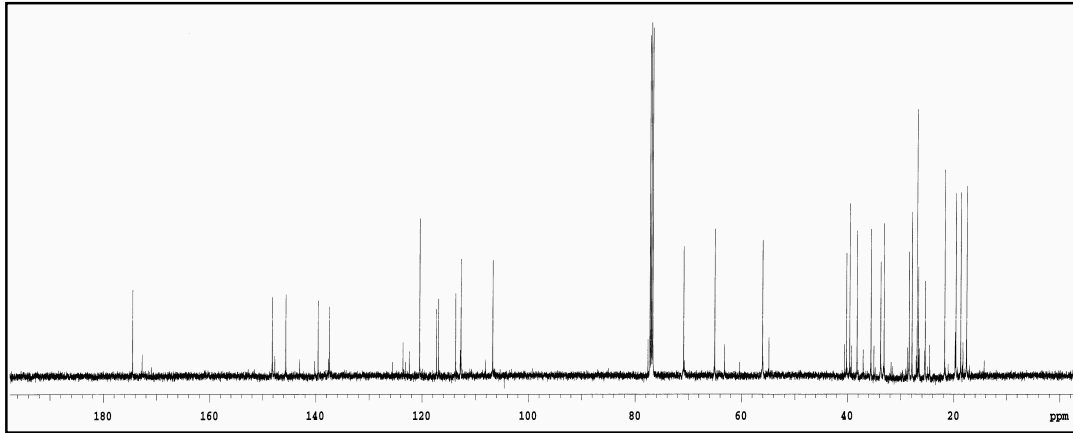


Şekil 4.63. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının ¹H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

¹³C NMR spektrumunda (Şekil 4.64), teleocidin B2 (**183**)'ye ait δ 174,5 ppm'de izomer (**184**)'e ait δ 172,7 ppm'de karbonil grubunun sinyali belirlendi. Karışımın ana bileşenine ait vinil grubunun sinyalleri δ 112,7 (t) ve 148,2 (d) ppm'de, izomerin ise 112,9 (t) ve 147,7 (d) ppm olarak belirlendi. Karışımın her iki bileşeninde benzer olarak bulunan imidazol halkasına ait ikişer tanesi metin, altışar tanesi de kuarterner olmak üzere toplamda sekizer adet karbon atomuna ait pikler ise δ 106–146 ppm aralığında görülmektedir. Bu imidazol halkasına ait karbon atomlarından, teleocidin B2 (**183**)'nin özellikle 2, 5, 7 ve 3a karbon atomlarına ait sinyaller δ 120,5, 106,8, 117,3 ve 116,9 ppm'de görülmesine rağmen karışımdaki az olan bileşen izomer (**184**)'in aynı karbon atomlarına ait sinyallerinin ise sırasıyla δ 123,6, 122,4, 123,1 ve 125,6 ppm değerlerine kaymış olduğu tespit edildi. Bu karbon atomlarına ait kimyasal kayma değerlerindeki fark, teleocidin B2'deki indol çekirdeğine 6- ve 7-pozisyonundan bağlı 6-üyeli karbosiklik iskeletin C-22 pozisyonundaki vinil grubu ile C-19 pozisyonundaki izopropil gruplarının izomerde yerlerinin değişmiş olabileceğini, diğer bir ifadeyle izomerde C-22 üzerinde izopropil grubunun ve C-19 üzerinde ise vinil grubunun

bulduğunu düşündürmektedir. Fakat izomerdeki C-19 ve C-22 kiral karbon atomlarının mutlak konfigürasyonları tam olarak tespit edilemedi. Ayrıca teleocidin B2 (**183**)'nin C-12 pozisyonundaki metin grubunun kimyasal kayma değeri δ 70,9 ppm iken izomerin aynı karbon atomunun kimyasal kayma değeri ise δ 77,6 ppm olarak belirlendi. İndol laktam halkasına bağlı hidroksimetil grubu teleocidin B2'de 65,0 ppm'de izomerinde ise 63,2 ppm'de görüldü. Bu grubun bağlı olduğu metin karbonunun kimyasal kayma değeri ise sırasıyla 56,1 ve 54,9 ppm olarak belirlendi. Son olarak ise δ 17–22 ppm aralığında yapılarıdaki izopropil gruplarındaki metillerden kaynaklı dörder adet sinyal ve δ 24–41 ppm aralığında geri kalan 10'ar adet alifatik karbonlardan kaynaklı sinyaller tespit edildi.

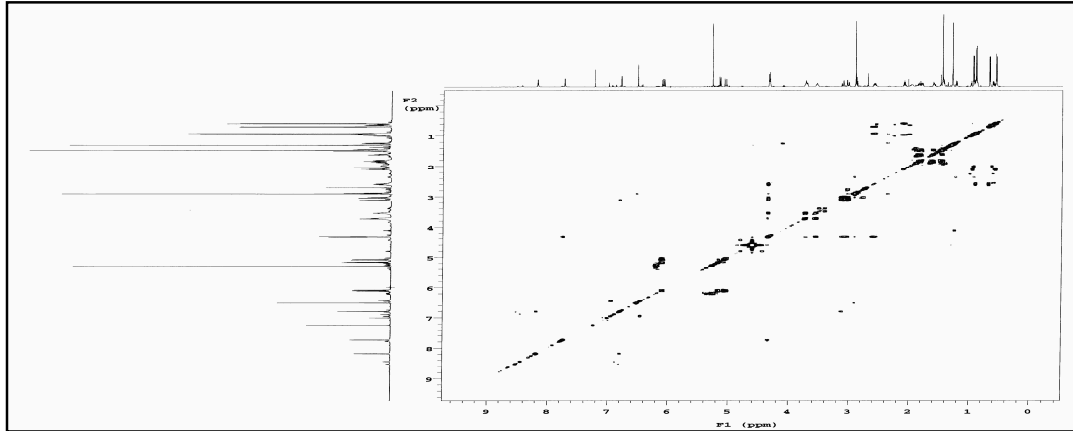
^{13}C NMR spektrumunda teleocidin B2 (**183**)'den kaynaklı 28 tane yüksek yoğunluğa sahip pikin yanında izomer (**184**)'den kaynaklı çok daha düşük yoğunluğa sahip 28 farklı pikin yerleri tespit edildi.



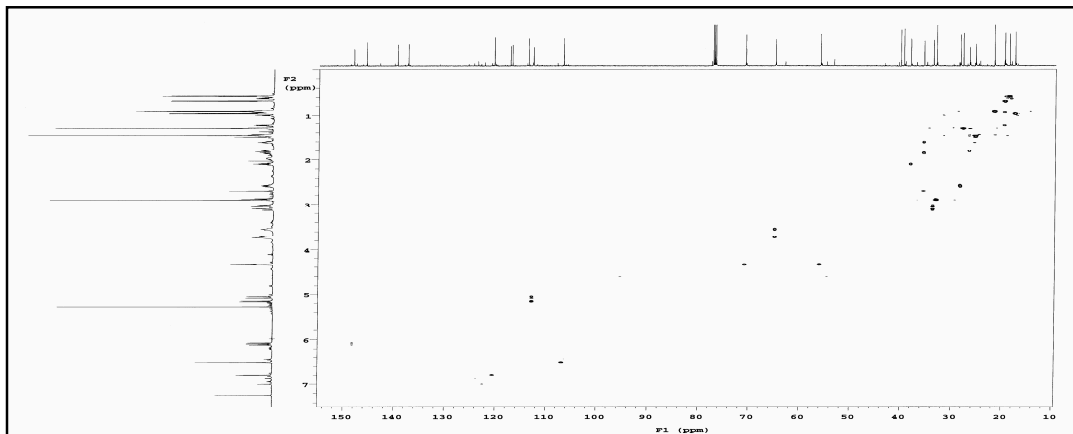
Şekil 4.64. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl_3).

Karışım içerisindeki bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının yanında, H,H COSY (Şekil 4.65), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.66) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları da (Şekil 4.67) incelenerek bileşiklerin iskelet yapıları tespit edildi. Karışım içerisindeki miktarda daha az olan bileşen teleocidin B2 izomeri (**184**)'nin karbon atomlarının yerlerinin belirlenmesinde 2D NMR spektrumlarından faydalanıldı.

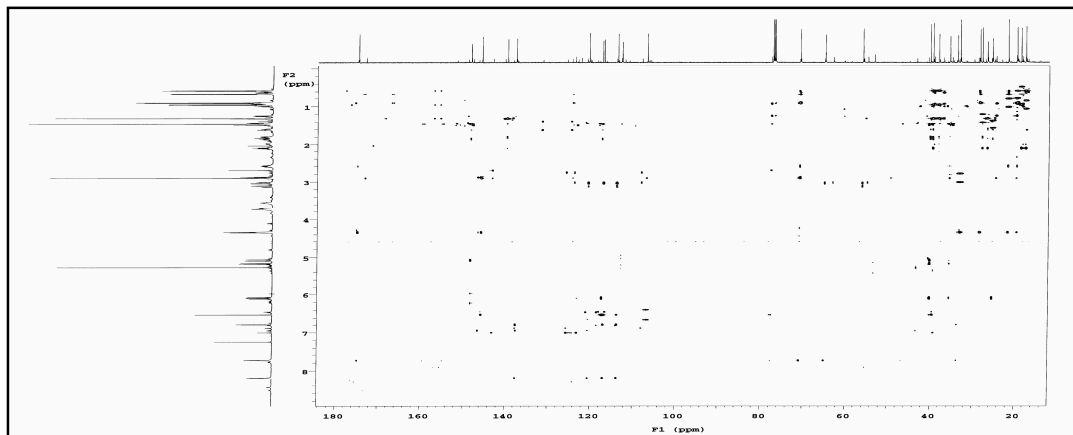
Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**)'ine ait 2D NMR spektrumlarından da faydalanılarak belirlenen ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.65. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının H,H COSY spektrumu (600 MHz, CDCl_3).

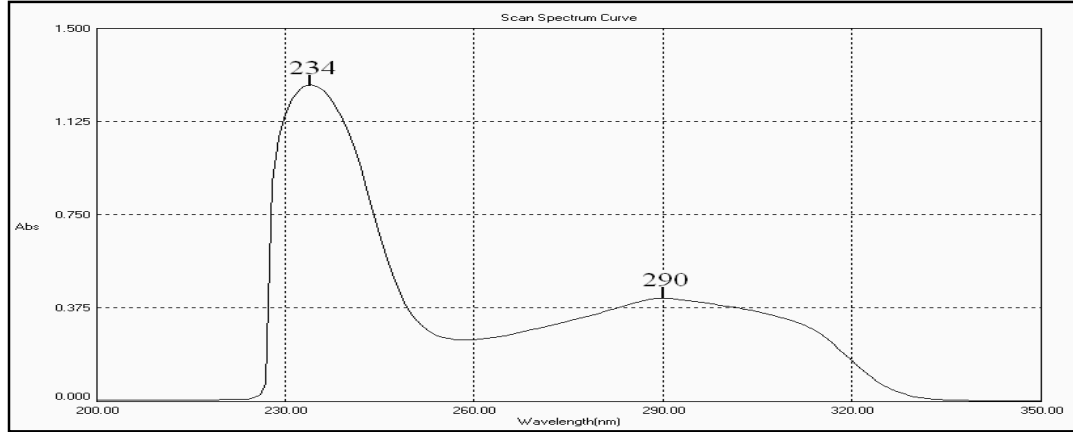


Şekil 4.66. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının HSQC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, CDCl_3).



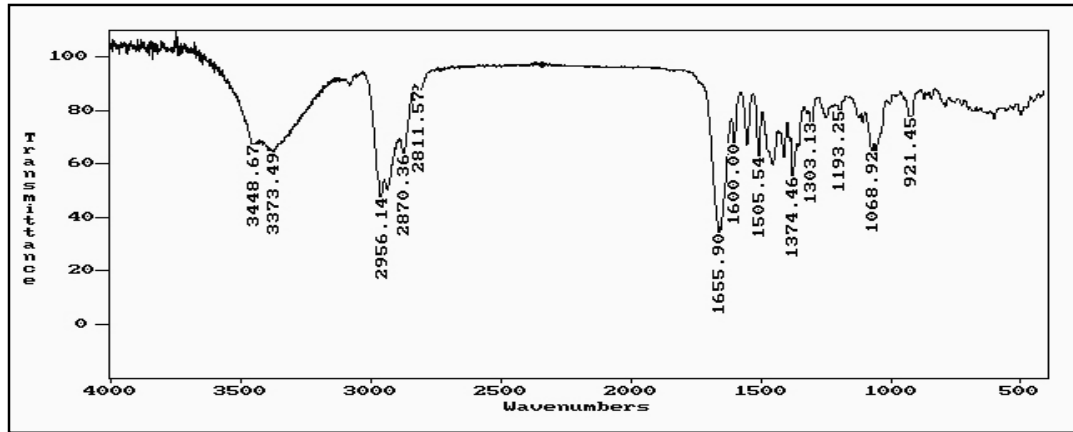
Şekil 4.67. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının HMBC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, CDCl_3).

Şekil 4.68'deki UV spektrumunda, Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının DCM'de hazırlanan 0,02 mg/mL'lik çözeltisinin 234 ve 290 nm'de maksimum absorptans yaptığı ve absorpsiyon şiddetlerinin sırasıyla 1,275 ve 0,414 olduğu belirlendi.



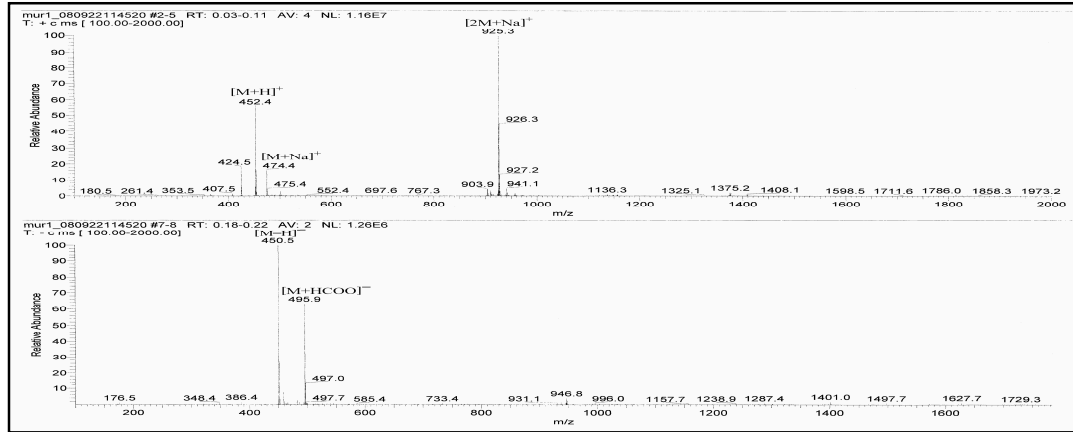
Şekil 4.68. 0,02 mg/mL'lik teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının UV spektrumu (CH_2Cl_2).

Ayrıca bu karışımın KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR spektrumunda ise (Şekil 4.69), $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3448, 3373, 2956, 2870, 1656, 1600, 1505, 1374, 1068 ve 921 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi.



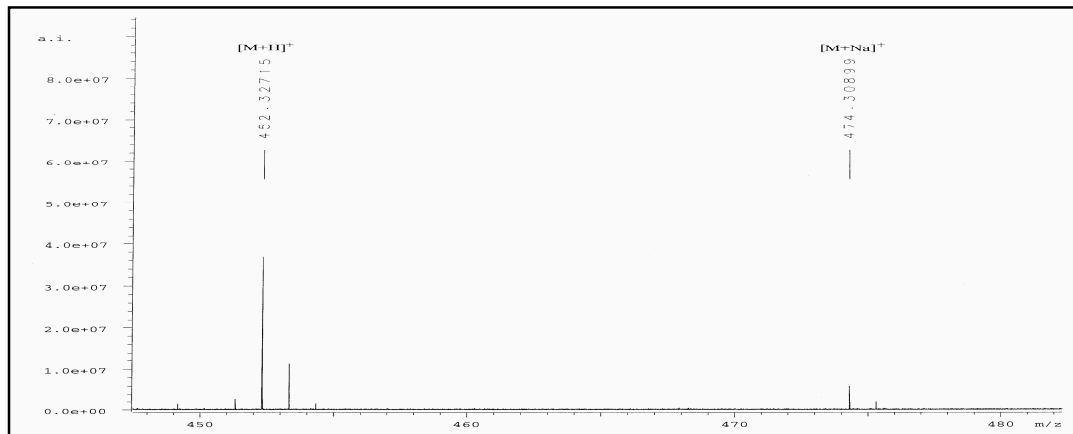
Şekil 4.69. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Karışıma ait olan Şekil 4.70'teki ESI-MS spektrumunda m/z oranı $[M+H]^+$ 452,4, $[M+Na]^+$ 474,4, $[2M+Na]^+$ 925,3 $[M-H]^-$ 450,5 ve $[M+HCOO]^-$ 495,9 olarak bulundu.



Şekil 4.70. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının ESI-MS spektrumu.

$C_{28}H_{41}N_3O_2$ şeklinde aynı kapalı formüle sahip olan teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının HR-ESI-MS spektrumundan (Şekil 4.71), m/z oranı $[M+H]^+$ 452,3272, $[M+Na]^+$ 474,3090 olduğu ve hesaplanan kütlelerinin ise sırasıyla 452,3272 ve 474,3091 olduğu belirlendi.



Şekil 4.71. Teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının HR-ESI-MS spektrumu.

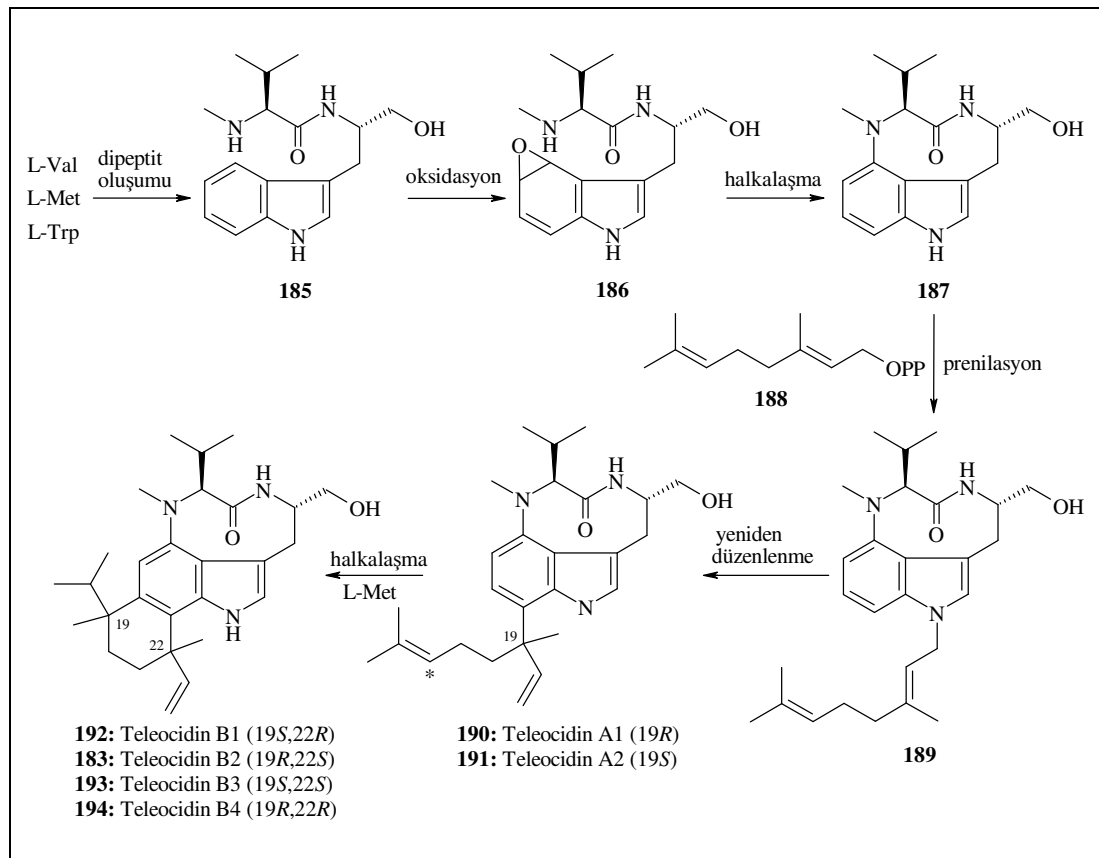
Karışımla ilgili elde edilen spektroskopik verilere göre AntiBase'de⁹³ yapılan taramalar sonucunda elde edilen literatür³⁰⁷ verileri ile Tablo 4.11'de verilen ¹³C NMR verilerinin karşılaştırılması sonucunda, karışımdaki ana bileşenin yapısının teleocidin B2 (**183**) olduğu doğrulandı. Karışımdaki az olan bileşenin ise kendisi ile aynı kapalı formüle sahip ve bilinen diğer teleocidin B türevleri olan teleocidin B1 (**192**), B3 (**193**) ve B4 (**194**) izomerlerinden farklı olan yeni bir teleocidin izomeri olduğu belirlendi fakat bu bileşiğin mutlak konfigürasyonu tam olarak tespit edilemedi.³⁰⁷

Güçlü cilt iritasyonuna neden olan ve aynı zamanda suda yaşayan hayvanlara karşı oldukça yüksek derecede toksik etkiye sahip "teleocidin", Takashima ve Sakai tarafından 1960 yılında bir toprak bakterisi olan *Streptomyces mediocidicus*'dan izole edilmiştir.³⁰⁷⁻³¹⁰ Fujuki ve çalışma grubu 1983 yılında, ters faz HPLC tekniğinden faydalanarak, "teleocidin" gerçekte teleocidin A1 (**190**) ve A2 (**191**) olan iki teleocidin A izomeri ile teleocidin B1 (**192**), B2 (**183**), B3 (**193**) ve B4 (**194**) olan dört teleocidin B izomerini içeren ve birbirleri ile yakın ilişkili bileşiklerin bir karışımı olduğunu ortaya çıkarmışlardır.³¹¹

Yoğun kimyasal ve spektroskopik çalışmalar ile X-ray kristalografik analiz tekniklerinden faydalanılarak bütün teleocidinlerin yapıları doğru bir biçimde aydınlatılıp,^{308-310,312} mutlak konfigürasyonları belirlenmiştir.^{307,313,314} Bütün bu çalışmalar teleocidinlerin indol halkasının 3- ve 4-pozisyonlarından köprülü yüksek derecede fonksiyonel 9-üyelı laktam içeren indol alkaloidler olduğunu göstermiştir. Ayrıca teleocidin ailesinin her bir üyesi, teleocidin A'da olduğu gibi indol çekirdeğine 7-pozisyonundan bağlı bir linalil (1,5-dimetil-1-vinil-4-hekzenil) yan zinciri ile karakterize iken teleocidin B'de ise indol çekirdeğine 6- ve 7-pozisyonundan bağlı 6-üyelı bir karbosiklik iskeleti içeren kendilerine has kompleks monoterpeneoid fonksiyonel gruba sahip özel bileşiklerdir. Teleocidinler, (-)-indolaktam V (**187**) (ILV)³¹⁵ çekirdeği içeren diğer bazı alkaloidlerle yapısal olarak ilişkilidirler ve bu nedenle sık sık indolaktam alkaloidler olarak adlandırılırlar.

Teleocidin alkaloidlerinin metabolik sentez yolu Şekil 4.72'de görüldüğü gibi ayrıntılı bir biçimde aydınlatılmıştır.³¹⁶⁻³¹⁹ Koshimidzu ve çalışma grubu tarafından *Streptomyces blastmyceticum* üzerinde yapılan biyosentetik çalışmalar sonucunda, L-triptofan (L-Trp), L-valin (L-Val) ve L-metiyonin (L-Met)'nin birleşmesi sonucunda teleocidinlerin biyosentetik öncülü olan ILV çekirdeğinin oluştuğunu göstermişlerdir.³¹⁶

ILV'in biyosentezinin ilk basamağında *N*-metil-L-valil-L-triptofanol (**185**) oluşmaktadır. Dipeptidin indol halkasının 4-pozisyonunun aktivasyonu, muhtemelen epoksit (**186**)'e oksidasyon yoluyla gerçekleşmekte ve ardından halkalaşma sonucu ILV (**187**) oluşmaktadır.³¹⁷ Irie ve çalışma grubunun *Streptomyces blastmyceticum* üzerinde yaptığı çalışmada, monoterpenoid yan zincirinin non-mevalonat metabolik yol vasıtasıyla D-glukozdan geldiğini tespit etmişlerdir.³¹⁸ ILV'in 7-pozisyonundan linalil kalıntısıyla birleşmesinin iki basamak üzerinden yürüdüğü gösterilmiştir. İlk basamakta indol azotunun geranil pirofosfat (**188**)³¹⁷ ile olivertin alkaloidlerinin biyosentezinde önemli bir ara ürün olan *N*-prenilli ILV (**189**)³¹⁹ oluşmakta ve ardından aza-Claisen-tipi yeniden düzenlenme ile teleocidin A türevleri oluşmaktadır. Son olarak, C-* pozisyonundan metilasyonu izleyen molekülicü halkalaşma ile teleocidin B türevleri biyokimyasal olarak sentezlenmektedir.³¹⁹



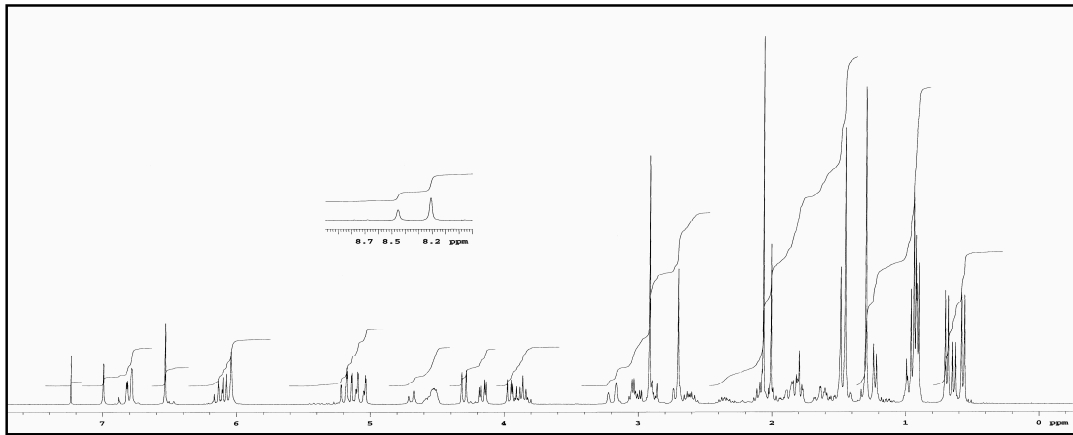
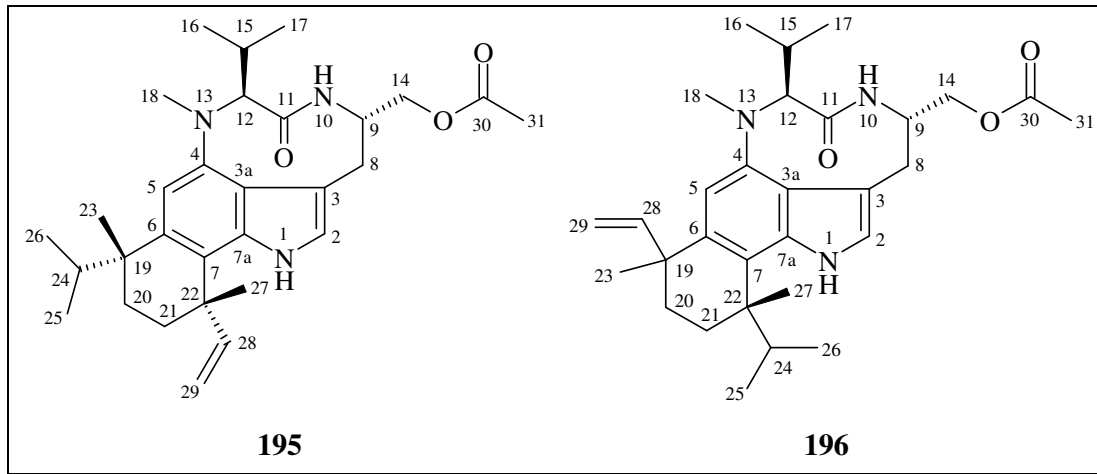
Şekil 4.72. Teleocidinlerin biyosentezinin şematik gösterimi.

Teleocidinlerin keşfinin ardından biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar, bu bileşiklerin, yüksek derecede inflamatuvar ve vezikatuvar ajan olmalarının yanında ayrıca önemli toksik etkiye de sahip olduklarını ortaya koymuştur.^{309,310,312} Moore ve grubu tarafından yapılan çalışmalarda, teleocidin A1 (**190**)'in farelere intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verildiğinde minimum letal dozun (LD₁₀₀) yaklaşık 0,3 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu alkaloidlerin deniz suyu içerisindeki konsantrasyonunun 0,15 mg/mL olması durumunda yarım saat içerisinde bazı küçük balık türlerinin (bait fish) tamamını öldürebildiği rapor edilmiştir.³¹² Takashima ve çalışma grubunun teleocidin B4 (**194**) üzerine yapmış oldukları çalışmalarda ise bu bileşiğin intravenöz enjeksiyon yoluyla farelere verildiğinde LD₅₀ değerinin 0,22 mg/kg olduğunu ve 0,01 mg/mL konsantrasyonda ise 1 saat içerisinde Japon balıklarının (Japanese killifish) ölmelerine neden olduğunu rapor etmişlerdir.³²⁰

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, teleocidinlerin güçlü tümör promoterleri olduğu ve biyolojik aktivitelerinde protein kinaz C (PKC) aktivasyonu yoluyla gerçekleştiği ortaya çıkartılmıştır.^{311,321-324} PKC en az on izoenzimden oluşan serin/treonin enzim sistemlerini fosforilleyen bir komplekstir. Çeşitli hücresel işlemlerin düzenlenmesinde farklı izoenzimler spesifik görevler almaktadır.³²⁵⁻³²⁸ Fizyolojik olarak PKC, (S)-1,2-diaçilgliseroller tarafından aktive edilirler.³²⁷ (S)-1,2-diaçilgliserollerin bu rolü, phorbol esterler, bryostatinler ve indollaktam alkaloidler gibi yapısal çeşitliliğe sahip doğal ürünler tarafından da taklit edilebilmektedir.³²⁸

4.3.3.2.3. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve İzomeri (**196**)

Streptomyces sp. BS40'ın misel kısmının EtOAc ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstraktın, silika jel kolonundan CH₂Cl₂:MeOH ile elüe edilmesi sonucu toplanan fraksiyon II'ye, öncelikli olarak silika jel 60 CH₂Cl₂:MeOH (99:1) ardından Sephadex LH-20 (% 100 MeOH) kromatografik tekniklerinin uygulanmasından sonra ele geçen karışımın MeOH içerisinde kristallendirilmesi sonucunda renksiz, kristal görünümlü 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımı (MYBS40E2-A) saflaştırılmıştır. Karışımın sikloheksan, heksan ve kloroformdaki çözünürlüğü oldukça yüksek fakat metanoldeki çözünürlüğü oldukça düşüktür. İTK tabakası üzerinde UV ışığı altında 366 nm'de mavi floresan özellik gösteren karışımın CH₂Cl₂:MeOH (95:5) çözücü sisteminde *R_f* değeri 0,60 olarak tespit edildi.



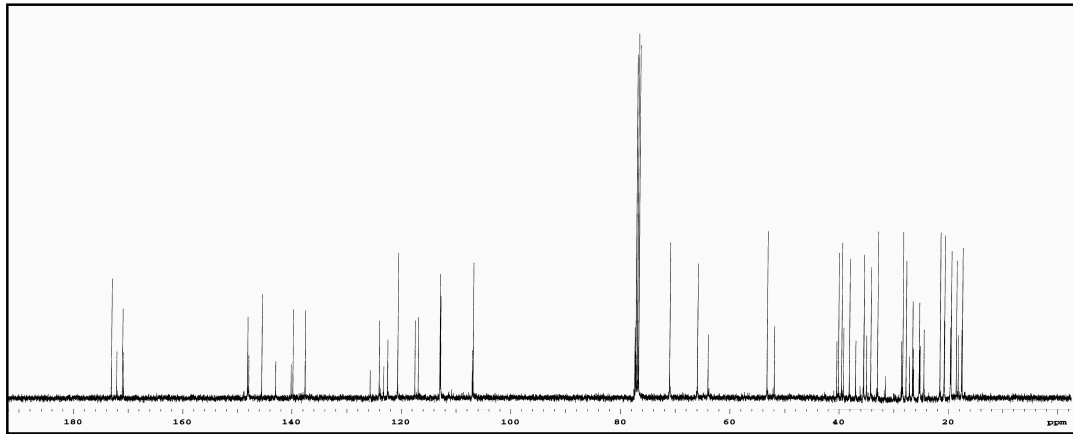
Şekil 4.73. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının ¹H NMR spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.73) karışım içerisinde ana bileşen olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'nin sinyalleri net olarak görülmektedir. Her iki bileşiğin ana iskelet yapısı aynı olduğundan, 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**)'in indol çekirdeğindeki *N*-H grubundan kaynaklı sinyaller sırasıyla δ 8,21 ve 8,45 ppm'de geniş singletler şeklindedir. İndol halka sistemindeki ana bileşenden kaynaklı 2 numaralı proton δ 6,79'da, izomerden kaynaklı olan ise 6,82'de dubletler şeklinde ve 5 numaralı proton ise sırasıyla δ 6,54 ve 7,00 ppm'de singlet olarak görüldü. Her iki bileşendeki amit protonu ise 6,04 ppm'de geniş bir singlet olarak belirlendi. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**)'ye ait *N*-CH₃ δ 2,92 ppm'de, 23 numaralı metil grubu 1,30 ppm'de, 27 numaralı metil grubu 1,45 ppm ve asetil grubu ise 2,07 ppm olarak belirlenirken izomer (**196**)'e ait aynı sinyaller ise sırasıyla δ 2,70, 1,30, 1,48 ve 2,01 ppm'de üçer H'lık singletler şeklinde belirlendi. Yapılarda bulunan vinil grubundaki CH protonu δ 6,1 ppm, CH₂'den kaynaklı protonlar ise 5,1 ppm civarında tespit edildi. Karışımdaki her iki bileşende de bulunan izopropil gruplarından kaynaklı 4 metil protonlarına ait sinyallerin δ 0,50–1,24 ppm aralığında üçer H'lık dubletler şeklinde oldukları belirlendi.

¹³C NMR spektrumunda (Şekil 4.74), amit karbonili ve asetil karbonili 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'de sırasıyla δ 173,1 ve 171,1 ppm'de, izomer (**196**) için ise δ 172,1 ve 170,9 ppm'de belirlendi. Karışımın ana bileşenine ait vinil grubunun sinyalleri δ 113,0 (t) ve 148,2 (d) ppm'de, izomerin ise 112,9 (t) ve 147,7 (d) ppm olarak belirlendi. Karışımın her iki bileşeninde de bulunan imidazol halkasına ait *sp*² hibriti yapmış sekizer adet karbon atomuna ait pikler ise δ 106–146 ppm aralığında görülmektedir. Bu imidazol halkasına ait karbon atomlarından, 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'nin özellikle 2, 5, 7 ve 3a karbon atomlarına ait sinyaller δ 120,7, 107,0, 117,5 ve 116,9 ppm'de görülmesine rağmen karışımdaki az olan bileşen izomer (**196**)'in aynı karbon atomlarına ait sinyallerinin ise sırasıyla δ 124,4, 122,5, 123,3 ve 125,8 ppm değerlerine kaymış olduğu tespit edildi. Bu karbon atomlarına ait kimyasal kayma değerlerindeki fark, tıpkı teleocidin B2 (**183**) ve izomerin (**184**)'de olduğu gibi 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'deki indol çekirdeğine 6- ve 7-pozisyonundan bağlı 6-üyelik karbosiklik iskeletin C-22 pozisyonundaki vinil grubu ile C-19 pozisyonundaki izopropil gruplarının bu bileşiğin izomerinde yerlerinin değişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Fakat izomerdeki C-19 ve C-22 kiral karbon atomlarının mutlak konfigürasyonları tam olarak tespit edilemedi. Ayrıca 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'nin C-12 pozisyonunda

bulunan metin grubunun kimyasal kayma değeri δ 71,1 ppm iken izomerin aynı karbon atomunun kimyasal kayma değeri ise δ 77,5 ppm olarak belirlendi. C-14 metilen grubu 14-*O*-acetylteleocidin B2'de 66,0 ppm'de izomerinde ise 64,0 ppm'de bu grubun bağlı olduğu C-9 metin karbonunun kimyasal kayma değeri ise sırasıyla 53,3 ve 52,0 ppm olarak belirlendi. Son olarakta δ 17–22 ppm aralığında yapılarıdaki izopropil grupları ve asetil grubundan kaynaklı beşer adet metil sinyali ve δ 24–41 ppm aralığında geri kalan 10'ar adet alifatik karbonlardan kaynaklı sinyaller tespit edildi.

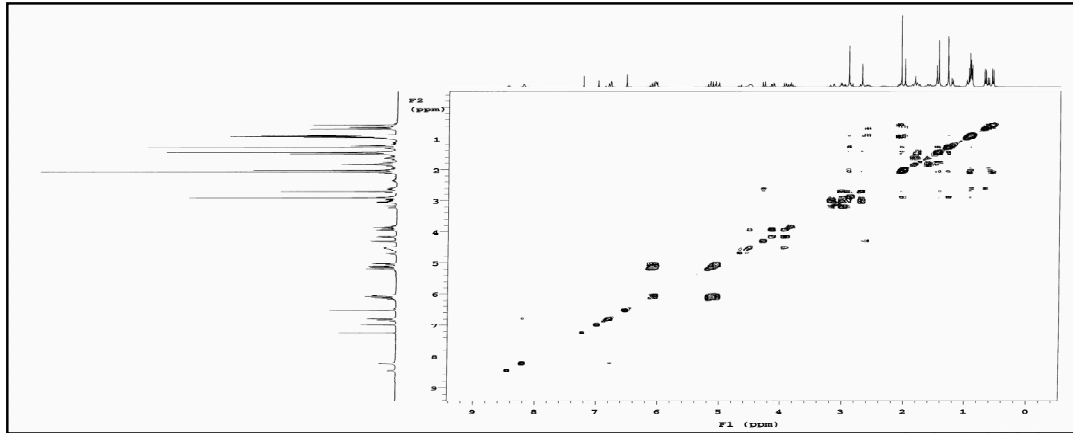
Bilinen bileşik olan teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımına ait ^{13}C NMR spektrumunda (Şekil 4.64) 28'er adet sinyal tespit edilmesine karşın, Şekil 4.74'teki ^{13}C NMR spektrumunda ise bir asetil grubundan kaynaklı olarak 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**)'ye ait 30 yüksek yoğunluğa sahip pikin yanında izomer (**184**)'e ait olan daha düşük yoğunluğa sahip 30 farklı pikin yerleri tespit edildi.



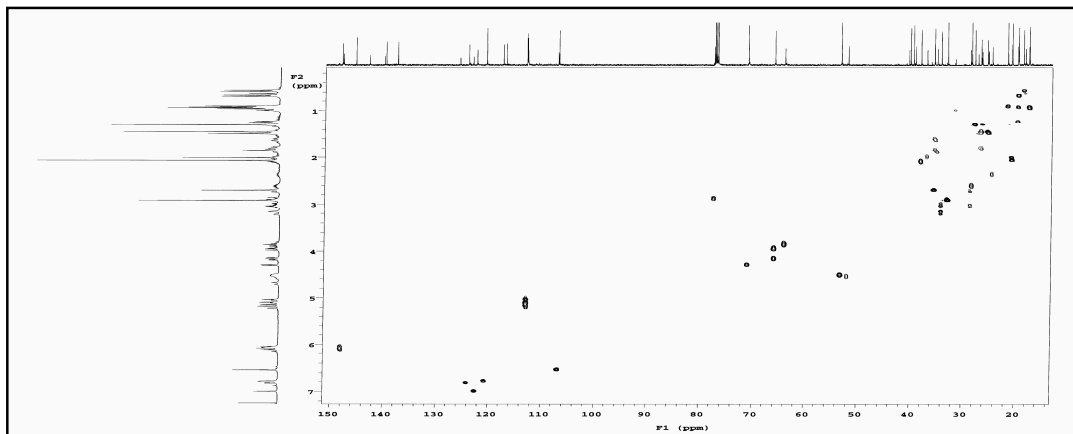
Şekil 4.74. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, CDCl_3).

Karışım içerisindeki bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının yanında, H,H COSY (Şekil 4.75), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.76) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları da (Şekil 4.77) incelenerek bileşiklerin iskelet yapıları tespit edildi. Özellikle karışım içerisindeki az olan bileşen 14-*O*-acetylteleocidin B2 izomeri (**196**)'nin karbon atomlarının yerlerinin belirlenmesinde faydalanıldı.

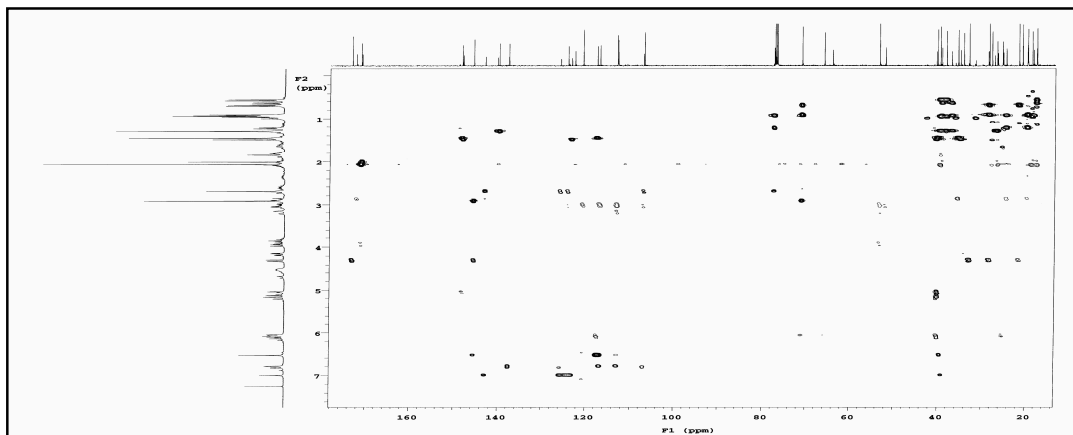
14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**)'ine ait 2D NMR spektrumlarından da faydalanılarak belirlenen ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri Tablo 4.11'de görülmektedir.



Şekil 4.75. 14-*O*-Acetylteleocidin (**195**) ve izomer (**196**) karışımının H,H COSY spektrumu (300 MHz, CDCl₃).

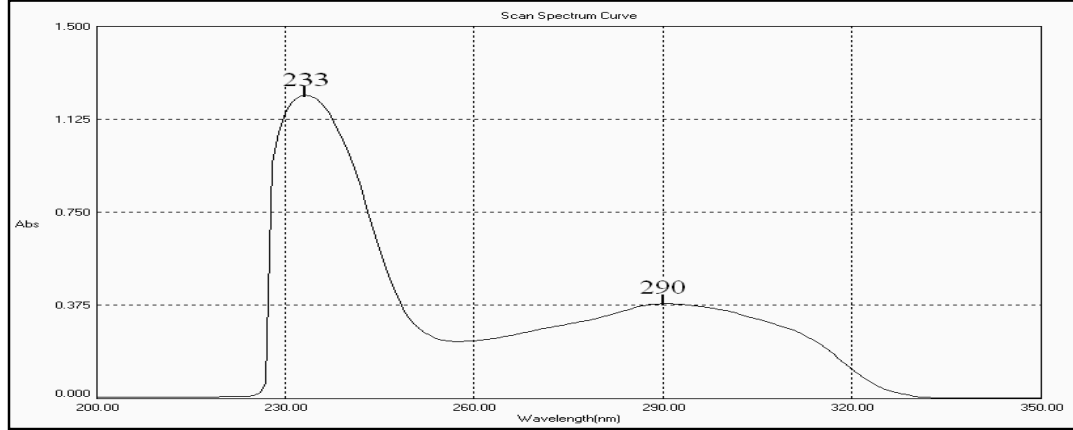


Şekil 4.76. 14-*O*-Acetylteleocidin (**195**) ve izomer (**196**) karışımının HSQC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl₃).



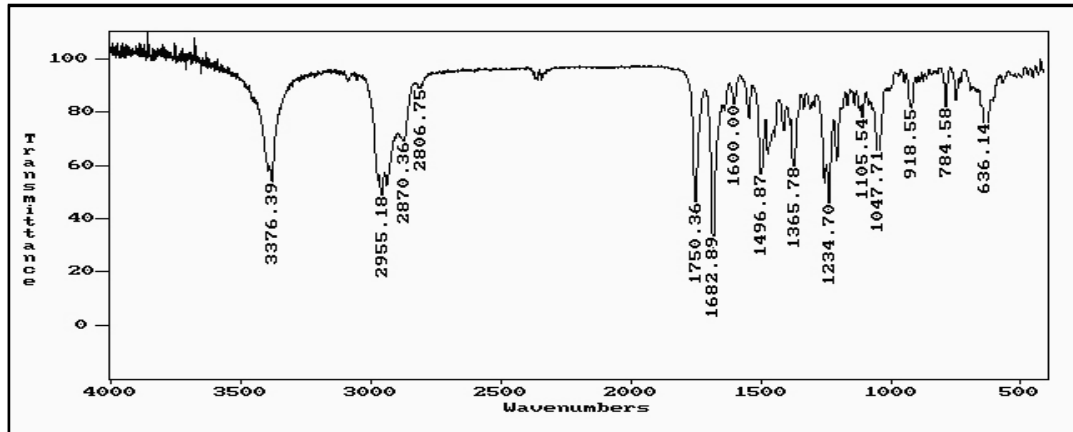
Şekil 4.77. 14-*O*-Acetylteleocidin (**195**) ve izomer (**196**) karışımının HMBC spektrumu (F1 75 MHz, F2 300 MHz, CDCl₃).

Şekil 4.78'deki UV spektrumunda, 14-*O*-acetylteleocidin (**195**) ve izomer (**196**) karışımının DCM'de hazırlanan 0,02 mg/mL'lik çözeltisinin 233 ve 290 nm'de maksimum absorptans yaptığı ve absorpsiyon şiddetlerinin sırasıyla 1,225 ve 0,382 olduğu belirlendi.



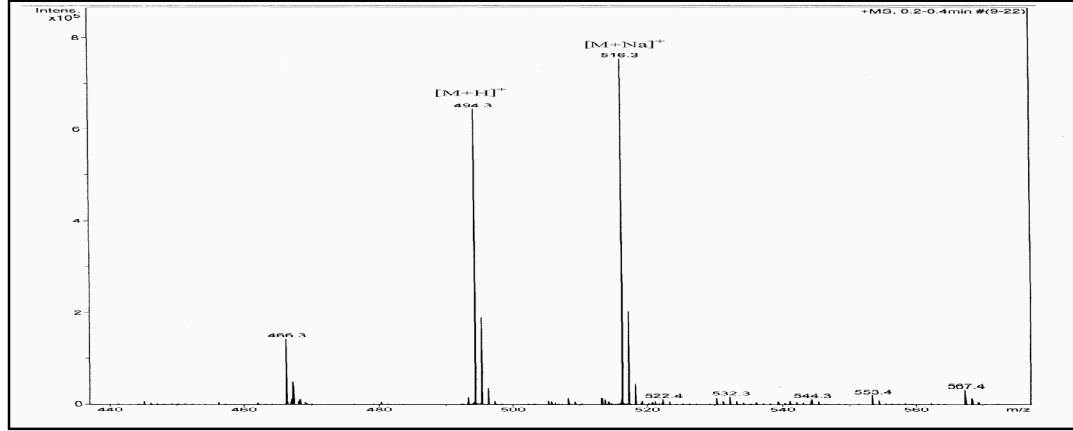
Şekil 4.78. 0,02 mg/mL'lik 14-*O*-acetylteleocidin (**195**) ve izomer (**196**) karışımının UV spektrumu (CH_2Cl_2).

Ayrıca bu karışımın KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR spektrumunda ise (Şekil 4.79), $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3376, 2955, 2870, 1750, 1682, 1600, 1496, 1365, 1274, 1105, 1047, 918, 784 ve 636 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi.



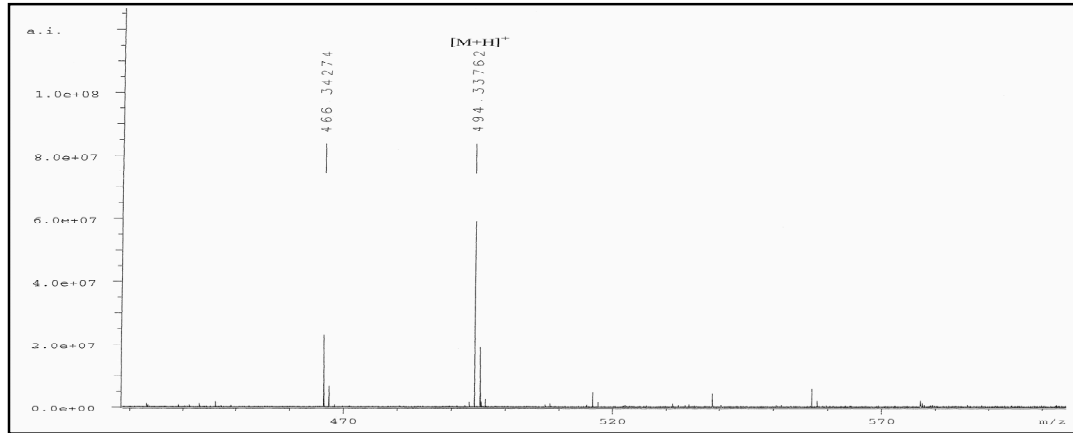
Şekil 4.79. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet).

14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımına ait olan Şekil 4.80'teki pozitif moda alınan (+) ESI-MS spektrumunda m/z oranı $[M+H]^+$ 494,3, $[M+Na]^+$ 516,3 ve , $[2M+Na]^+$ 1009,6 olarak bulundu.



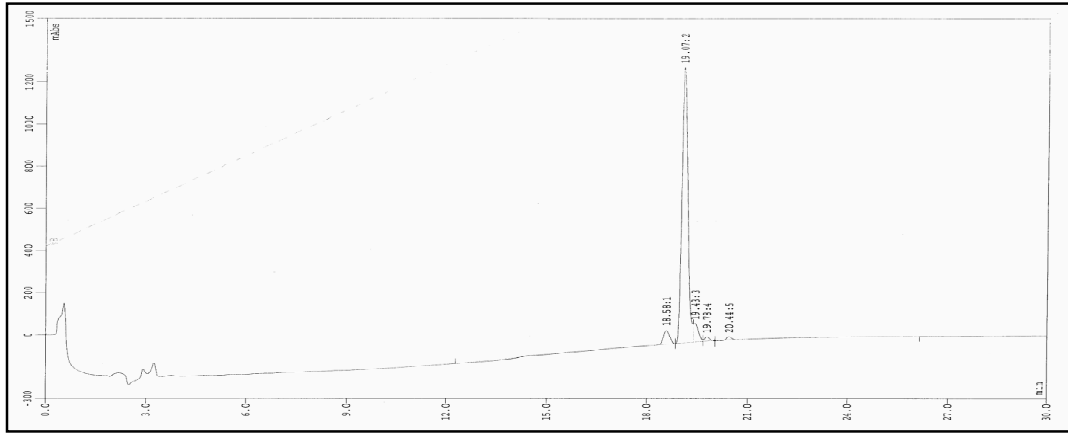
Şekil 4.80. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının (+) ESI-MS spektrumu.

$C_{30}H_{43}N_3O_3$ şeklinde aynı kapalı formüle sahip olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**184**) karışımının HR-ESI-MS sonuçlarına göre m/z oranının $[M+H]^+$ 494,3376 olduğu ve aynı formdaki hesaplanan kütlelerinin m/z oranının ise 494,3377 olduğu Şekil 4.71'deki spektrumdan belirlendi.



Şekil 4.81. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının HR-ESI-MS spektrumu.

14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının Şekil 4.82'deki HPLC kromatogramında, Nucleodur marka HPLC kolonundan (C₁₈, 100 Å, 5 µm, 3 × 250 mm) 0-15 dakika % 40 asetonitril / H₂O ve 15-30 dakika % 100 asetonitril çözücü sistemi ile 19,07. dakikada ayrılmadan geçtiği belirlendi. Ayrıca % 79,9 hekzan / % 20 2-propanol / % 0,1 trietil amin çözücü sistemlerinden faydalanılarak Crownpak CR (+) 4 × 150 mm ve Chiralcel OD 4,6 × 250 mm kiral kolonların ayrı ayrı kullanıldığı HPLC çalışmalarında da karışımın bu koşullarda ayrılmadığı tespit edildi.



Şekil 4.82. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının HPLC kromatogramı.

Karışımla ilgili elde edilen spektroskopik verilere göre, mikrobiyal sekonder metabolitlerin bir veri bankası olan AntiBase'de⁹³ yapılan taramalar sonucunda 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**)'e ait herhangi bir veriye rastlanmadı. DNP⁹⁴ ve CA veri bankaları kullanılarak yapılan taramalarda ise teleocidin B3 (**193**) ve teleocidin B4 (**194**)'ün kimyasal olarak sentezi için 14-*O*-acetylteleocidin B3 ve B4 türevlerinin sentezlenmiş olduğu belirlendi.³²⁹

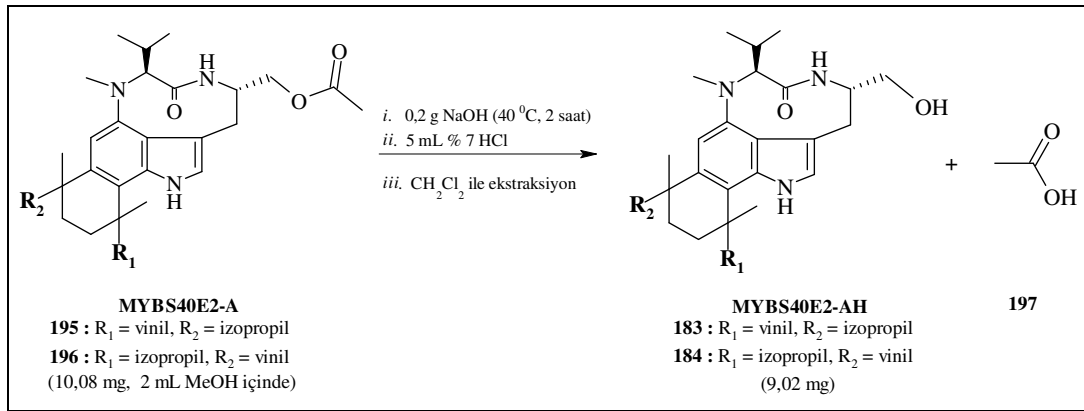
1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak ve daha önce doğal ürün olarak *Streptomyces medicidicus*'un misellerinden izole edilerek yapısı aydınlatılan teleocidin B2 (**183**)'nin³⁰⁷ spektroskopik verilerinden faydalanılarak yapısı doğrulanan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımı ilk kez bu çalışmada doğal ürün olarak *Streptomyces* sp. B40'tan izole edildi. Çalışmalar esnasında, dikkatsizlik sonucu özellikle yüz çevresinde meydana gelen kontaminasyon neticesinde oldukça şiddetli cilt iritasyonuna ve vezikül oluşumuna neden olduğu belirlendi.

Tablo 4.11. Teleocidin B2 (**183**), teleocidin izomeri (**184**), 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve 14-*O*-acetylteleocidin izomeri (**196**)'nin ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, 125 MHz, CDCl_3).

| Karbon No. | 183 | 184 | 195 | 196 |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 2 | 120,47 (d) | 123,61 (d) | 120,70 (d) | 124,10 (d) |
| 3 | 113,74 (s) | 108,12 (s) | 112,90 (s) | 107,11 (s) |
| 3a | 116,95 (s) | 125,62 (s) | 116,92 (s) | 125,77 (s) |
| 4 | 145,62 (s) | 143,04 (s) | 145,57 (s) | 143,01 (s) |
| 5 | 106,78 (d) | 122,41 (d) | 106,96 (d) | 122,55 (d) |
| 6 | 137,48 (s) | 137,61 (s) | 137,61 (s) | 137,66 (s) |
| 7 | 117,32 (s) | 123,10 (s) | 117,54 (s) | 123,27 (s) |
| 7a | 139,60 (s) | 140,22 (s) | 139,85 (s) | 140,18 (s) |
| 8 | 33,79 (t) | 28,81 (t) | 34,25 (t) | 28,66 (t) |
| 9 | 56,07 (d) | 54,87 (d) | 53,31 (d) | 51,98 (d) |
| 11 | 174,52 (s) | 172,74 (s) | 173,11 (s) | 172,14 (s) |
| 12 | 70,88 (d) | 77,62 (d) | 71,06 (d) | 77,47 (d) |
| 14 | 65,03 (t) | 63,18 (t) | 65,97 (t) | 64,04 (t) |
| 15 | 28,46 (d) | 24,61 (d) | 28,44 (d) | 24,56 (d) |
| 16 | 19,65 (q) | 19,75 (q) | 19,60 (q) | 19,65 (q) |
| 17 | 21,75 (q) | 19,80 (q) | 21,63 (q) | 19,72 (q) |
| 18 | 33,15 (q) | 35,62 (q) | 33,02 (q) | 35,56 (q) |
| 19 | 40,20 (s) | 40,58 (s) | 40,16 (s) | 40,48 (s) |
| 20 | 26,71 (t) | 27,14 (t) | 26,63 (t) | 27,20 (t) |
| 21 | 35,62 (t) | 35,05 (t) | 35,53 (t) | 35,02 (t) |
| 22 | 39,59 (s) | 39,29 (s) | 39,57 (s) | 39,22 (s) |
| 23 | 27,93 (q) | 26,55 (q) | 27,82 (q) | 26,45 (q) |
| 24 | 38,21 (d) | 37,08 (d) | 38,15 (d) | 37,01 (d) |
| 25 | 17,60 (q) | 17,67 (q) | 17,53 (q) | 17,63 (q) |
| 26 | 18,72 (q) | 18,30 (q) | 18,62 (q) | 18,25 (q) |
| 27 | 25,45 (q) | 25,55 (q) | 25,42 (q) | 25,27 (q) |
| 28 | 148,17 (d) | 147,68 (d) | 148,19 (d) | 147,96 (d) |
| 29 | 112,75 (t) | 112,90 (t) | 113,01 (t) | 112,85 (t) |
| 30 | – | – | 171,09 (s) | 170,89 (s) |
| 31 | – | – | 20,81 (q) | 20,88 (q) |

4.3.3.2.4. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve 14-*O*-acetylteleocidin İzomer (**196**) Karışımı (MYBS40E2-A) için Hidroliz Deneyi

Streptomyces sp. BS40'ın misellerinin EtOAc ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstrakta çeşitli kromatografik tekniklerin uygulanması sonucunda iki yeni teleocidin izomerleri olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomeri (**196**)'ni içeren ve MYBS40E2-A olarak kodlanan karışım izole edildi. MYBS40E2-A'dan 10,08 mg alınarak 2 mL metanol içerisinde çözüldü ve içerisine yaklaşık 0,2 g NaOH pelleti bırakılarak 40 °C'de 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından % 7'lik HCl'den 5 mL damla damla bırakılarak nötralleşmesi sağlandı. Daha sonra reaksiyon karışımı CH₂Cl₂ (2 × 20 mL) ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonucunda, asetik asit (**197**) ve MYBS40E2-AH olarak kodlanan karışım izole edildi (Şekil 4.83).



Şekil 4.83. 14-*O*-Acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımı için hidroliz işlemleri.

MYBS40E2-AH'ın ¹H, ¹³C NMR spektrumlarının yanında ESI-MS spektrumu alındı. Elde edilen spektrumlar aynı bakterinin misel kısmından elde edilen fraksiyon III'ten izole edilen teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımının spektrumları ile karşılaştırıldığında elde edilen spektrumların aynı olduğu tespit edildi. Böylece yeni teleocidinlerin, bilinen bileşik olan teleocidin B2 (**183**) ve izomeri (**184**)'nin laktam halkasına C-9 pozisyonundan bağlı hidroksi metil grubunun oksijeni üzerinden asetillenmiş türevleri olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve 14-*O*-acetylteleocidin izomeri (**196**) oldukları doğrulanmış oldu.

4.3.3.3. Rizosferik *Streptomyces* sp. BS40'tan İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

4.3.3.3.1. Antimikrobiyal ve Mortalite Yönünden Araştırılması

Rizosferik *Streptomyces* sp. BS40'tan izole edilen, *Trichophyton* türlerine karşı orta derecede antifungal aktivite gösterdiği bilinen³⁰⁴ carbazomycin G (**182**) ile teleocidin B2 (**183**) ve izomer (**184**) karışımı ile 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının 8 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden faydalanılarak 40, 80 ve 160 µg madde içerikli diskler hazırlandı. Disk difüzyon yöntemine göre 6 mm çapındaki kağıt diskler test mikroorganizmalarının aşılındığı agar pleytler üzerine yerleştirildi. Test mikroorganizması olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615, *P. aeruginosa* ATCC 27853, ve *B. subtilis* ATCC 11774 bakterileri ile *C. albicans* ATCC 10231 mantarının üremesi üzerine bu bileşiklerin denenen konsantrasyon aralığında herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği tespit edildi.

Çalışmalar esnasında, ciltte iritasyona ve vezikül oluşumuna neden olduğu belirlenen 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının *Artemia salina* L. larvaları üzerine % sitotoksik aktivitesi araştırıldı. 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının (MYBS40E2-A) 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında *Artemia salina* larvalarına karşı % 100 sitotoksik aktivite sergilediği tespit edildi. Teleocidin B2 (**183**)'nin güçlü cilt iritasyonuna neden olmasının yanında suda yaşayan hayvanlara karşı yüksek derecede toksik etkiye sahip olması ve güçlü tümör promotu olduğuna dair çeşitli literatür verileri³⁰⁷⁻³¹¹ bulunmasından dolayı bu çalışmada *Artemia salina* L. larvaları üzerine olan sitotoksik aktivitesi incelenmedi.

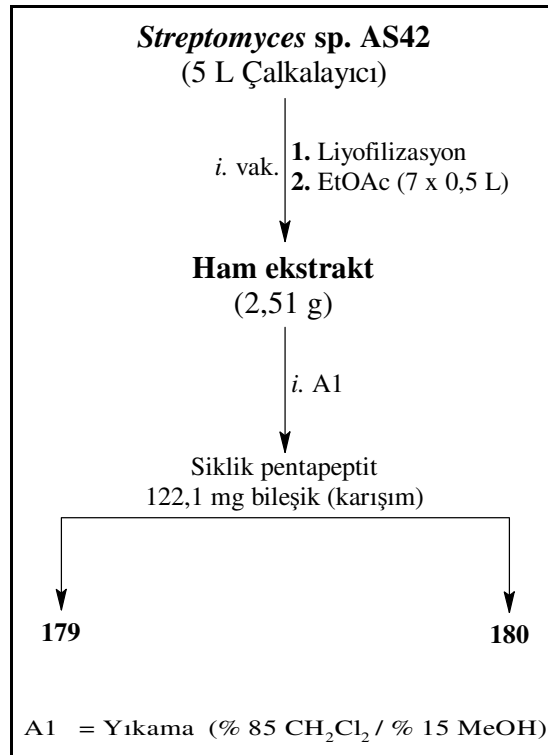
Tablo 4.12. Yeni teleocidin izomerler karışımı (MYBS40E2-A)'nın % mortalite aktivitesi.

| MYBS40E2-A (µg/mL) | <i>Artemia salina</i> (% mortalite) |
|-----------------------|----------------------------------------|
| 10,0 | 100 |
| 1,0 | 100 |
| 0,1 | 100 |

4.3.4. Rizosferik *Streptomyces* sp. AS42

4.3.4.1. Fermantasyon ve İzolasyon

Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında endemik bitkilerin rizosferik toprak tabakasından izole edilerek moleküler teşhisi yapılmış olan *Streptomyces* sp. AS42'nin M₂ agar besiyerinde kahverengi görünen iyi büyümüş pleytleri seçildi ve ardından 1 L'lik erlenmayerlerde her biri 250 mL M₂ besiyeri içeren 20 adet besiyerine aşılama yapıldı. Fermantasyon 28 °C ve 120 rpm'de orbital inkübatörde 10 gün süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen açık kahve renkteki kültür liyofilizasyon işlemine tabi tutularak kurutuldu. Elde edilen liyofilizat etil asetat (7 × 500 mL) ile ekstrakte edildi. Çözücünün uçurulması sonucu elde edilen 2,51 g ham ekstrakt % 15 MeOH / % 85 CH₂Cl₂ çözücü sistemi ile yıkanarak 122,1 mg siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımı elde edildi (Şekil 4.84).

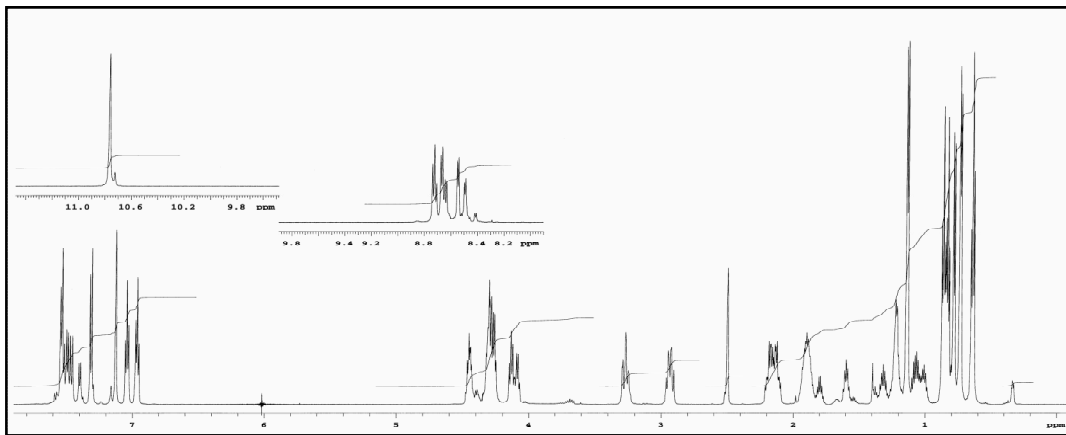
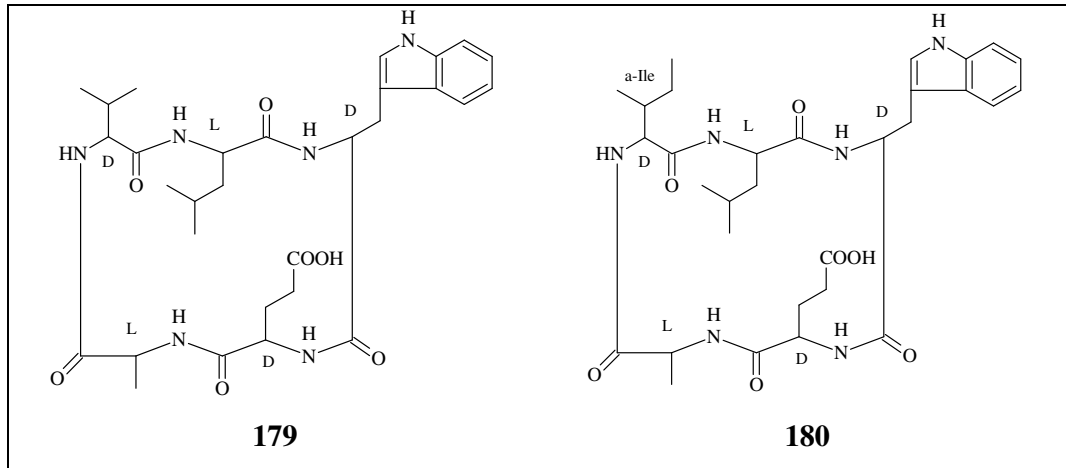


Şekil 4.84. Rizosferik *Streptomyces* sp. AS42'nin sekonder metabolitlerinin araştırılması.

4.3.4.2. Rizosferik *Streptomyces* sp. AS42'nin Ürettiği Sekonder Metabolitlerin Yapı Aydınlatması

4.3.4.2.1. Siklik Pentapeptit A (179) ve B (180) Karışımı

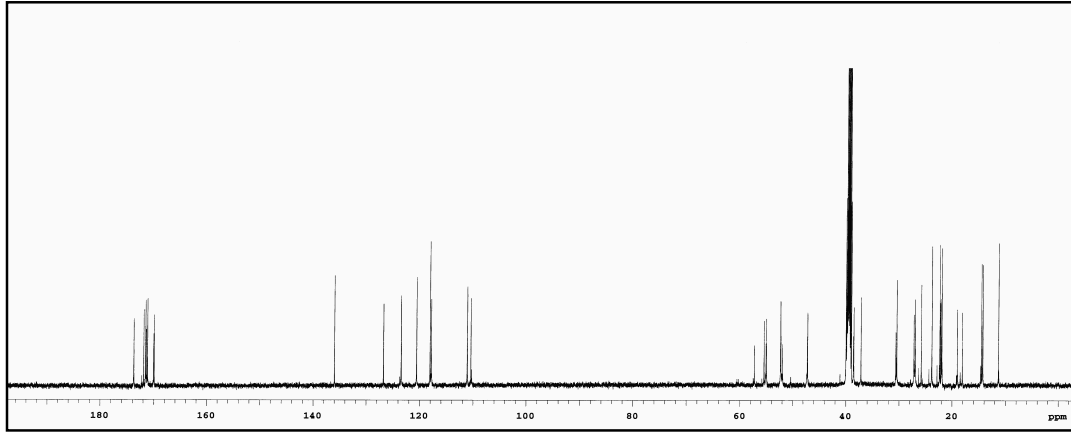
Streptomyces sp. AS42'nin orbital inkübatör kullanılarak M₂ besi ortamında üretilen (5 L) kültürünün, liyofilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra etil asetat ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstraktın % 15 MeOH / % 85 CH₂Cl₂ çözücü sistemi ile yıkanmasıyla siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımı (122,1 mg) elde edildi. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımı kloroformda hiç çözünmezken, metanoldeki çözünürlüğü oldukça düşük fakat dimetil sülfoksitteki çözünürlüğü ise oldukça yüksektir. Renksiz toz halinde olan karışım, iyot (I₂) buharı ile pozitif sonuç vermektedir. İTK tabakası üzerinde UV ışığı altında 366 nm'de şiddetli floresans özellik göstermektedir.



Şekil 4.85. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının ¹H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆).

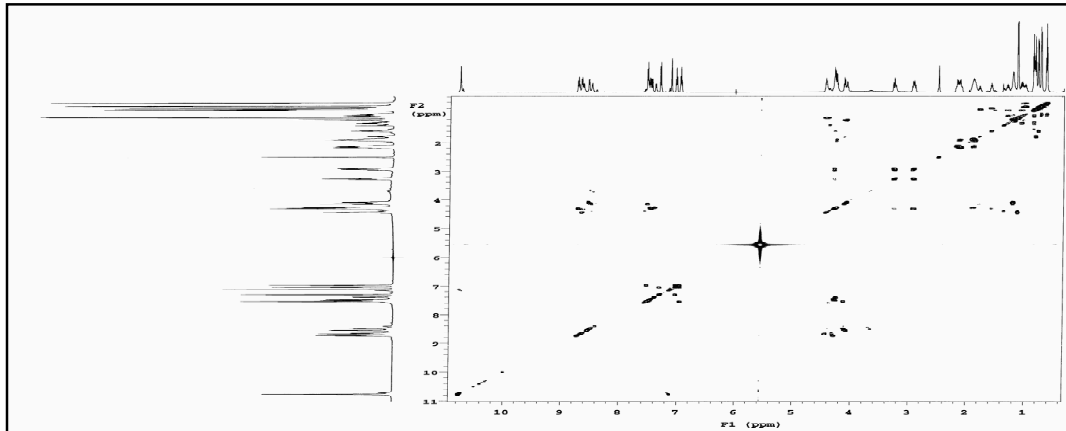
Karışımın 600 MHz'de alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.85), her iki peptitte de bulunan Trp- amino asit kalıntısındaki imidazol halkasına ait *N*-H protonu δ 10,76'da geniş bir singlet olarak belirlendi. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**)'nin her ikisinde de bulunan Trp-, Ala- ve Leu- amino asit kalıntılarında ait amit protonlarının sinyalleri δ 8,4-8,8 aralığında dubletler şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca siklik pentapeptitlerdeki Glu- kalıntısının amit protonu ve imidazol halkasına ait aromatik protonlar ile siklik pentapeptit A (**179**)'daki Val- ve siklik pentapeptit B (**180**)'deki allo-Ile- amino asit kalıntılarında ait amit protonlarının sinyalleri δ 6,9–7,8 ppm aralığında belirlendi. Son olarak, α -protonlarına ait sinyaller δ 4,0–4,5 ppm aralığında ve diğer alifatik protonlar ise δ 0,6–3,0 ppm aralığında olduğu belirlendi.

Şekil 4.86'teki siklik pentapeptit karışımının ^{13}C NMR spektrumunda karbonil gruplarına ait sinyallerin δ 170–173 ppm aralığında olduğu tespit edildi. Siklik pentapeptit A (**178**) ve B (**179**) bileşiklerinin her ikisinde de bulunan Trp- kalıntısındaki imidazol halkasında yer alan 8 karbon atomuna ait pikler δ 110–136 ppm aralığında görülmektedir. α -karbon atomlarına ait pikler δ 47–57 ppm aralığında ve diğer alifatik karbon atomlarına ait pikler ise δ 11–39 ppm aralığında belirlendi (Tablo 4.13).

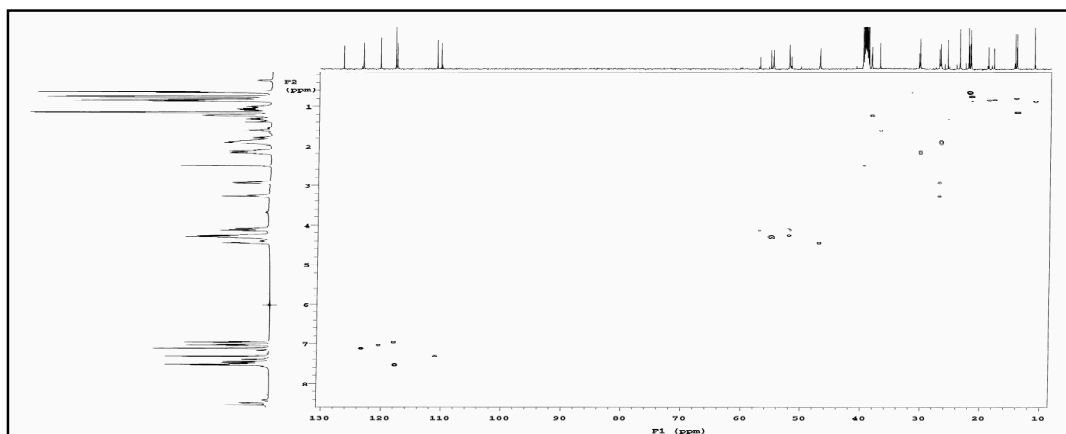


Şekil 4.86. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının ^{13}C NMR spektrumu (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

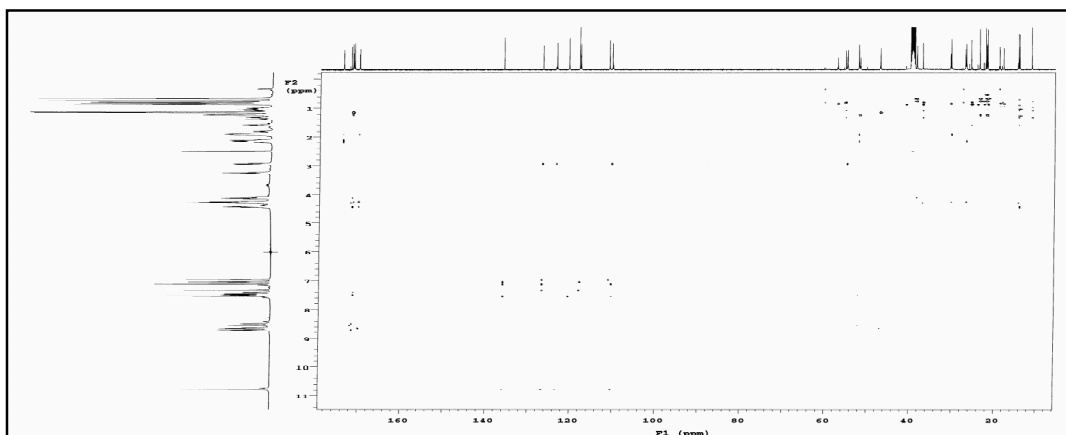
Ayrıca bileşiğin yapısının aydınlatılması için 1D NMR spektrumlarının yanında, H,H COSY (Şekil 4.87), proton-karbon eşleşmelerinin tespiti için HSQC (Şekil 4.88) ve proton-karbon uzak mesafe etkileşimlerinin belirlenmesi için HMBC spektrumları da (Şekil 4.89) incelendi.



Şekil 4.87. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının H,H COSY spektrumu (600 MHz, DMSO- d_6).



Şekil 4.88. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının HSQC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, DMSO- d_6).



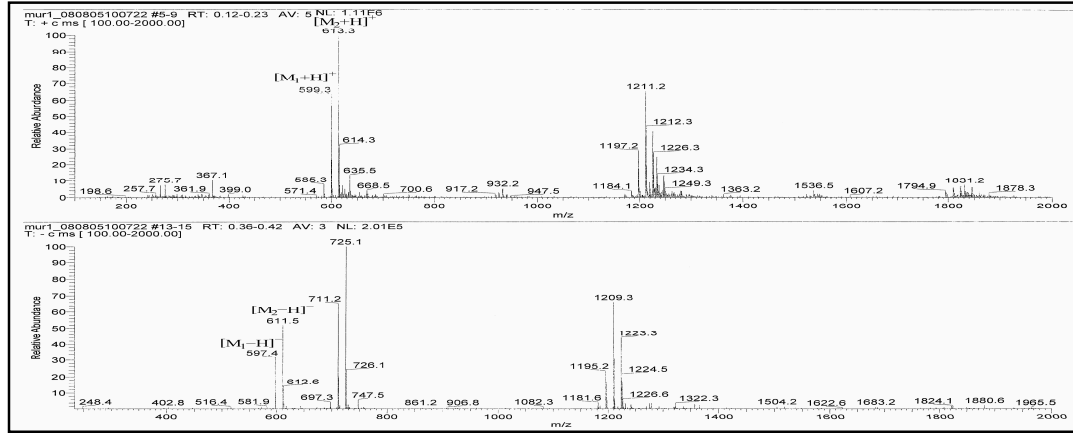
Şekil 4.89. Siklik pentapeptit A (179) ve B (180) karışımının HMBC spektrumu (F1 150 MHz, F2 600 MHz, DMSO- d_6).

Tablo 4.13. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**)'nin ^1H NMR²⁹¹ ve ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri (ppm, DMSO-*d*₆).

| Pozisyon | | siklik pentapeptit A (179) | | siklik pentapeptit B (180) | |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| | | δ_{H}^a (<i>J</i> = Hz) | δ_{C}^b | δ_{H}^a (<i>J</i> = Hz) | δ_{C}^b |
| D-Val [D-allo-Ile] | NH | 7,51 (1H, d, 9,2) | | 7,45 (1H, d, 9,4) | |
| | α CH | 4,14 (1H, m) | 57,27 (d) | 4,31* | 55,44 (d) |
| | β CH | 1,78 (1H, m) | 30,65 (d) | 1,58 (1H, m) | 37,18 (d) |
| | γ CH ₃ | 0,82 (3H, d, 6,6) | 18,11 (q) | 0,87 (3H, t, 7,4) | 14,55 (q) |
| | γ CH _{3[2]} [γ CH ₂] | 0,83 (3H, d, 6,6) | 19,05 (q) | 1,29 (1H, m) 1,07 (1H, m) | 25,79 (t) |
| | [δ CH ₃] | | | 0,78 (3H, d, 6,7) | 11,36 (q) |
| | CO | | 171,53 (s) | | 171,93 (s) |
| L-Leu | NH | 8,55 (1H, d, 6,5) | | 8,60 (1H, d, 6,6) | |
| | α CH | 4,10 (1H, m) | 51,98 (d) | 4,06 (1H, m) | 52,32 (d) |
| | β CH ₂ | 1,20 (2H, t, 7,6) | 38,62 (t) | 1,20 (2H, m) | 38,54 (t) |
| | γ CH | 1,01 (1H, m) | 23,79 (d) | 0,95 (1H, m) | 23,79 (d) |
| | δ CH ₃ | 0,74 (3H, d, 6,4) | 22,03 (q) | 0,73 (3H, d, 6,4) | 21,93 (q) |
| | δ CH ₃ | 0,64 (3H, d, 6,4) | 22,20 (q) | 0,63 (3H, d, 6,4) | 22,32 (q) |
| | CO | | 171,46 (s) | | 171,60 (s) |
| D-Trp | NH | 8,75 (1H, d, 8,4) | | 8,78 (1H, d, 7,0) | |
| | α CH | 4,28 (1H, m) | 55,08 (d) | 4,28* | 55,00 (d) |
| | β CH ₂ | 3,26 (1H, br d) | 27,20 (t) | 3,28 (1H, dd, 2,3;14,6) | 27,20 (t) |
| | β CH ₂ | 2,91 (1H, dd, 11,8;14,4) | | 2,90 (1H, dd, 11,8;14,6) | |
| | 1-NH | 10,79 (1H, br s) | | 10,78 (1H, br s) | |
| | 2-CH | 7,12 (1H, d, 1,2) | 123,44 (d) | 7,12 (1H, d, 1,8) | 123,46 (d) |
| | 3-C | | 110,42 (s) | | 110,44 (s) |
| | 3a-C | | 126,77 (s) | | 126,74 (s) |
| | 4-CH | 7,53 (1H, d, 7,6) | 117,83 (d) | 7,52 (1H, d, 7,6) | 117,83 (d) |
| | 5-CH | 6,96 (1H, t, 7,6) | 118,07 (d) | 6,96 (1H, t, 7,6) | 118,07 (d) |
| | 6-CH | 7,04 (1H, t, 7,6) | 120,58 (d) | 7,04 (1H, t, 7,6) | 120,58 (d) |
| | 7-CH | 7,31 (1H, d, 7,6) | 111,10 (d) | 7,31 (1H, d, 7,6) | 111,10 (d) |
| | 7a-C | | 136,01 (s) | | 136,01 (s) |
| CO | | 171,21 (s) | | 171,23 (s) | |
| D-Glu | NH | 7,39 (1H, d, 7,3) | | 7,49 (1H, d, 7,8) | |
| | α CH | 4,26 (1H, m) | 52,25 (d) | 4,25* | 52,30 (d) |
| | β CH ₂ | 1,88 (2H, m) | 26,95 (t) | 1,89 (2H, m) | 26,95 (t) |
| | γ CH ₂ | 2,16 (2H, m) | 30,47 (t) | 2,16 (2H, m) | 30,47 (t) |
| | COOH | 12,09 (1H, br s) | 173,76 (s) | 12,02 (1H, br s) | 173,76 (s) |
| | CO | | 170,09 (s) | | 169,97 (s) |
| L-Ala | NH | 8,72 (1H, d, 8,0) | | 8,75 (1H, d, 7,0) | |
| | α CH | 4,40 (1H, dq, 7,1) | 47,23 (d) | 4,45 (1H, dq, 7,1) | 47,17 (d) |
| | β CH ₃ | 1,14 (3H, d, 6,9) | 14,34 (q) | 1,13 (3H, d, 7,1) | 14,27 (q) |
| | CO | | 171,44 (s) | | 171,56 (s) |

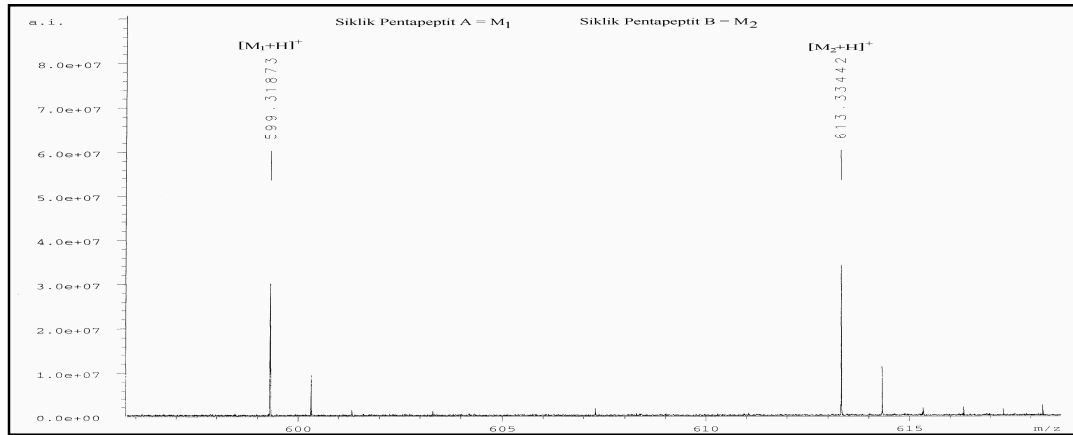
^a Literatür²⁹¹ (300 MHz), ^b 125 MHz, * Literatür²⁹⁴ (400 MHz).

Karışımın ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.90), kapalı formülü $C_{30}H_{42}N_6O_7$ olan siklik pentapeptit A (**178**)'nın, m/z oranının $[M_1+H]^+$ 599,3 ve $[M_1-H]^-$ 597,4 olduğu bulundu. Siklik pentapeptit B (**179**)'nin ise kapalı formülünün $C_{31}H_{44}N_6O_7$ olduğu, m/z oranının $[M_2+H]^+$ 613,3 ve $[M_2-H]^-$ 611,5 olduğu belirlendi.



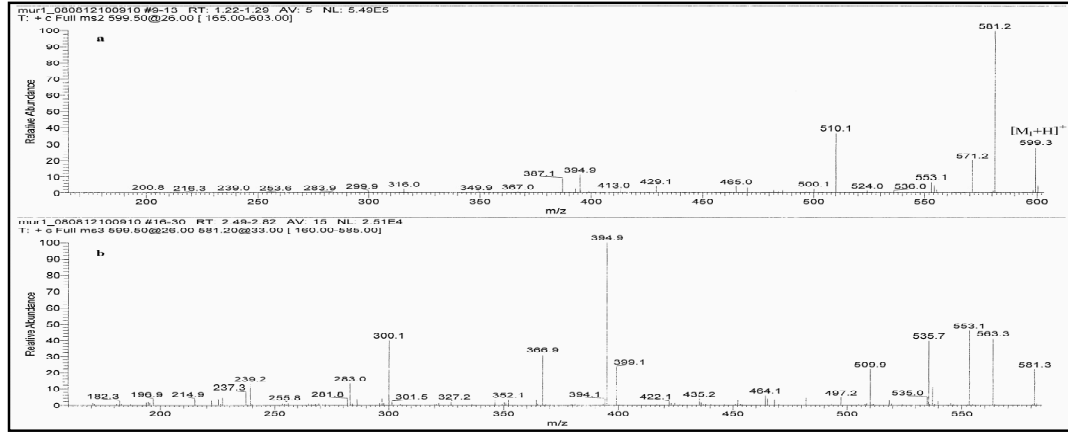
Şekil 4.90. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS sonuçlarına göre (Şekil 4.91) siklik pentapeptit A (**179**)'nın kapalı formülünün $C_{30}H_{42}N_6O_7$ olduğu $[M_1+H]^+$ m/z oranının 599,3187 ve siklik pentapeptit B (**180**)'nin kapalı formülünün $C_{31}H_{44}N_6O_7$ $[M_2+H]^+$ formunda m/z oranının 613,3344 olduğu belirlendi. Bileşiklerin bu formlarının hesaplanan kütleleri ise sırasıyla 599,3188 ve 613,3344 olarak bulundu.



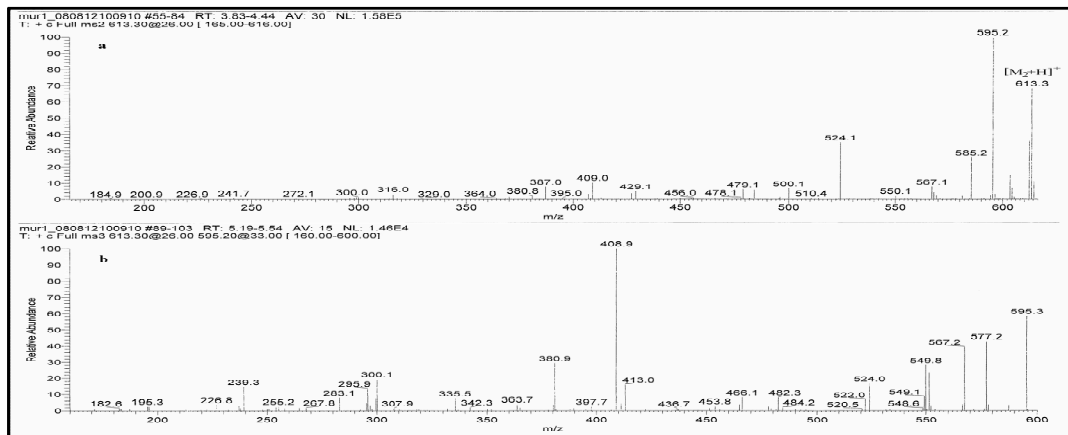
Şekil 4.91. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının HR-ESI-MS spektrumu.

HR-ESI-MS çalışmaları sonucunda kapalı formülünün $C_{30}H_{42}N_6O_7$ olduğu belirlenen siklik pentapeptit A (**179**)'nın yapısı ayrıntılı HPLC-MS çalışmaları sonucunda aydınlatıldı. HPLC alıkonma zamanı 1,22. dakikada, $[M+H]^+$ m/z oranı 599,30 olan bileşiğin MS^2 ve MS^3 'de oluşan fragmentlerinin (Şekil 4.92) değerlendirilmesi sonucunda amino asit sırasının Ala-Val-Leu-Trp-Glu şeklindeki bir siklik peptit yapısında olduğu belirlendi.



Şekil 4.92. Siklik pentapeptit A (**179**)'nin (a) ESI MS^2 ve (b) ESI MS^3 spektrumu.

Şekil 4.93 görüldüğü gibi, HPLC alıkonma zamanı 3,83'te $[M+H]^+$ m/z oranı 613,30 olan siklik pentapeptit B (**180**)'nin MS^2 ve MS^3 'de oluşan fragmentlerinin değerlendirilmesi sonucunda amino asit sırasının Ala-Ile-Leu-Trp-Glu şeklindeki bir siklik peptit yapısında olduğu tespit edildi. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**)'nin ESI MS^2 ve MS^3 fragmentlerinin ayrıntılı sonuçları Tablo 4.14'te görülmektedir.

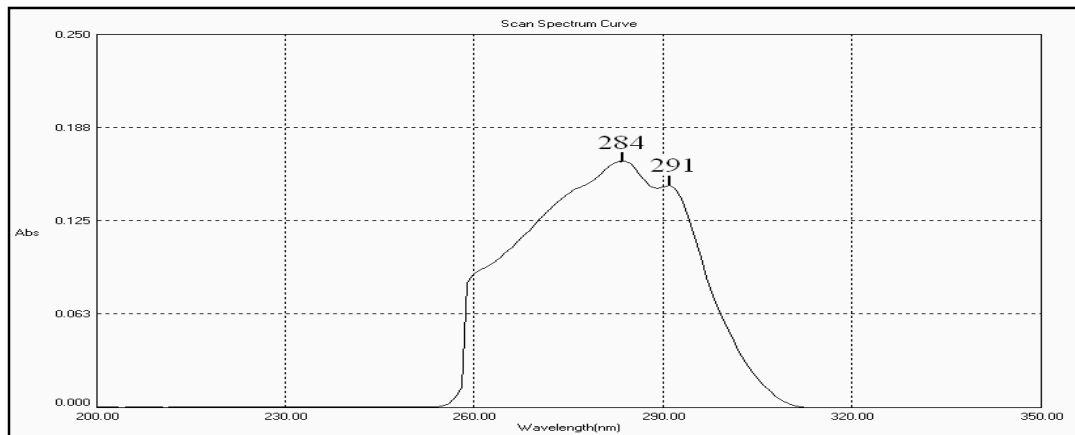


Şekil 4.93. Siklik pentapeptit B (**180**)'nin (a) ESI MS^2 ve (b) ESI MS^3 spektrumu.

Tablo 4.14. Siklik pentapeptit A (**179**) ve siklik pentapeptit B (**180**)'nin ESI MS² ve MS³ [M+H]⁺ fragment iyonlarının değerlendirilmesi.

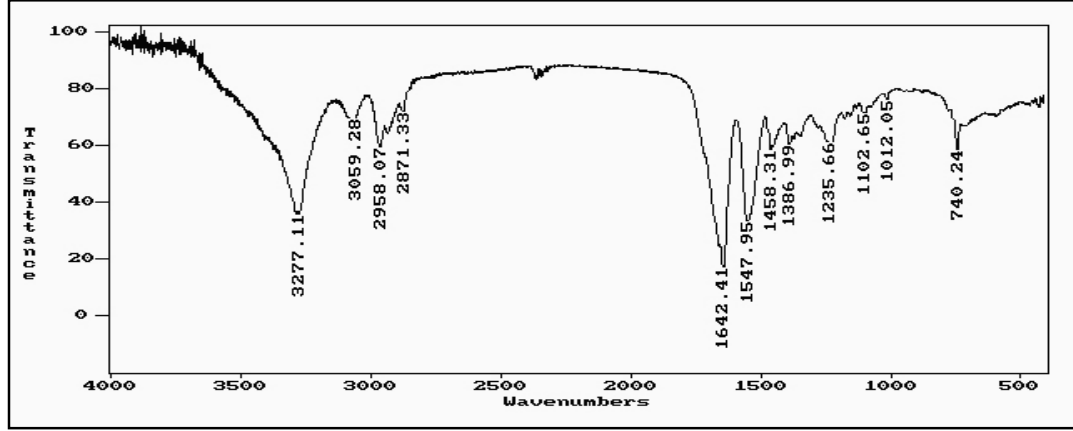
| MS ² ve MS ³ [M ₁ +H] ⁺ | siklik pentapeptit A (179)'nın amino asit sıra analizi | MS ² ve MS ³ [M ₂ +H] ⁺ | siklik pentapeptit B (180)'nin amino asit sıra analizi |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 182,3 | Glu-Ala -H ₂ O | 182,6 | Glu-Ala -H ₂ O |
| 200,8 | Glu-Ala | 200,9 | Glu-Ala |
| 237,3 | Ala-Val-Leu -H ₂ O-CO | 226,9 | Ile-Leu |
| 283,9 | Ala-Val-Leu | 272,1 | Trp-Glu -CO ₂ |
| 300,1 | Leu-Trp | 300,1 | Leu-Trp |
| 316,0 | Trp-Glu | 316,0 | Trp-Glu |
| 366,9 | Glu-Ala-Val-Leu -H ₂ O-CO | 380,9 | Glu-Ala-Ile-Leu -H ₂ O-CO |
| 387,1 | Trp-Glu-Ala | 387,0 | Trp-Glu-Ala |
| 394,9 | Glu-Ala-Val-Leu -H ₂ O | 408,9 | Glu-Ala-Ile-Leu -H ₂ O |
| 399,1 | Val-Leu-Trp | 413,0 | Ile-Leu-Trp |
| 413,0 | Glu-Ala-Val-Leu | 427,1 | Glu-Ala-Ile-Leu |
| 429,1 | Leu-Trp-Glu | 429,1 | Leu-Trp-Glu |
| 464,1 | Val-Leu-Trp-Glu -2H ₂ O-CO | 478,1 | Ile-Leu-Trp-Glu -2H ₂ O-CO |
| 500,1 | Leu-Trp-Glu-Ala | 500,1 | Leu-Trp-Glu-Ala |
| 509,9 | Val-Leu-Trp-Glu -H ₂ O | 524,0 | Ile-Leu-Trp-Glu -H ₂ O |
| 535,7 | [M ₁ +H -2H ₂ O-CO] ⁺ | 549,8 | [M ₂ +H -H ₂ O-CO] ⁺ |
| 553,1 | [M ₁ +H -H ₂ O-CO] ⁺ | 567,2 | [M ₂ +H -H ₂ O-CO] ⁺ |
| 563,3 | [M ₁ +H -2H ₂ O] ⁺ | 577,2 | [M ₂ +H -2H ₂ O] ⁺ |
| 571,2 | [M ₁ +H -CO] ⁺ | 585,2 | [M ₂ +H -CO] ⁺ |
| 581,3 | [M ₁ +H -H ₂ O] ⁺ | 595,3 | [M ₂ +H -H ₂ O] ⁺ |
| 599,3 | [siklo(-Leu-Trp-Glu-Ala-Val-)+H] ⁺ | 613,3 | [siklo(-Leu-Trp-Glu-Ala-Ile-)+H] ⁺ |

Şekil 4.94'teki UV spektrumunda, siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının DMSO'de hazırlanan 0,02 mg/mL'lik çözeltisinin 284 ve 291 nm'de maksimum absorptans yaptığı ve absorpsiyon şiddetlerinin sırasıyla 0,165 ve 0,149 olduğu belirlendi.



Şekil 4.94. 0,02 mg/mL'lik siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının UV spektrumu (DMSO).

Şekil 4.95'te, karışımın KBr ile hazırlanan pelletinin FT-IR sonuçlarına göre ise ν_{\max}^{KBr} 3277, 3059, 2958, 1642, 1547, 1458, 1235 ve 740 cm^{-1} 'de pikler tespit edildi.



Şekil 4.95. Siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının FT-IR spektrumu (KBr pellet).

Tablo 4.14'teki ESI MS² ve MS³ verilerinin değerlendirilmesi sonucu amino asit sırası belirlenen bileşiklerle ilgili, AntiBase'de⁹³ yapılan taramalar sonucunda elde edilen literatür verileri^{291,294} ile Tablo 4.13'teki NMR verilerinin karşılaştırılması sonucunda, siklik pentapeptit A (**179**)'nın siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-) yapısında ve siklik pentapeptit B (**180**)'nin ise siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-) yapısına sahip siklik peptitler oldukları tespit edildi.

Endotelin reseptör antagonisti²⁹⁰⁻²⁹⁴ oldukları rapor edilmiş olan siklik pentapeptit A (**179**) (siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-)) ve B (**180**) (siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-)), Miyata ve arkadaşları tarafından *Streptomyces* sp. No. 7338'den izole edilip sırasıyla WS-7338 A ve WS-7338 B şeklinde adlandırılmıştır.²⁹²⁻²⁹⁴ Ayrıca aynı siklik pentapeptitler Kojiri ve arkadaşları tarafından da *Streptomyces misakiensis*'ten izole edilip BE-18257 A ve BE-18257 B şeklinde tanımlanmıştır.^{290,291}

Ayrıca siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) bileşikleri, bu çalışmada *Streptomyces* sp. AA50'den de izole edilmiştir.

4.3.4.3. Rizosferik *Streptomyces* sp. AS42'den İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

4.3.4.3.1. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması

Rizosferik *Streptomyces* sp. AS42'den izole edilen ve endotelin reseptör antagonisti oldukları bilenen siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının DMSO'da hazırlanan 8 mg/mL'lik stok çözeltisinden faydalanılarak 40, 80 ve 160 µg madde içeren diskler hazırlandı. Disk difüzyon yöntemine göre 6 mm çapındaki kağıt diskler test mikroorganizmalarının aşılacağı agar pleytler üzerine yerleştirildi. Test mikroorganizması olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615, *P. aeruginosa* ATCC 27853, ve *B. subtilis* ATCC 11774 bakterileri ile *C. albicans* ATCC 10231 mantarının üremesi üzerine siklik pentapeptit A (**179**) ve B (**180**) karışımının, denenen konsantrasyon aralığında herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği tespit edildi.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlaç keşfinde en etkili ve en önemli kaynağı oluşturan doğal ürünler, bu alanda yapılan araştırmalar için geniş bir yapısal çeşitliliğe olanak sağlamaktadır. Bu da geniş bir aralıkta, hedeflenen hastalığa karşı aktivite gösteren düşük molekül ağırlıklı yeni öncü yapıların bulunması için büyük bir fırsat doğurmaktadır. Henüz dünya üzerindeki biyoçeşitliliğin % 10'undan daha az bir kısmı biyolojik aktivite yönünden test edilmiştir ve ticari öneme sahip kullanışlı olabilecek pek çok doğal öncü bileşik de keşfedilme aşamasındadır. Buna rağmen, doğal ürünlerden ilaç keşfinde uygulanan yöntemlerin zaman alıcı ve pahalı işlemler dizini gerektiriyor olması, günümüzde bu alana olan ilgiyi giderek azaltmaktadır.

Doğal ürünler üzerine yapılan çalışmalar yıllar boyunca bitkiler üzerinde odaklanmışken, gelinen noktada bu ilgi doğal ürünler için yeni bir kaynak olan bakteriler gibi mikroorganizmalara kaymış durumdadır. Bitki veya hayvanlar yerine bakteriler aracılığıyla biyoaktif metabolitlerin üretilmesi daha çok tercih edilmektedir. Bunun nedenleri;

- Bakterilerin istenilen miktarda ve herhangi bir koşul altında hızlı bir biçimde üretilmesinin mümkün olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bakteriler kutuplarda, deniz derinliklerinde ve jeotermal çıkış noktaları gibi oldukça ekstrem çevre şartlarında yaşamsal faaliyet gösterebilmektedir.
- Bakteriler, hayvan ve bitkilere göre simbiyotik olarak daha önemlidir.
- Doğal antibiyotiklerin çoğunun bakteri veya mantar kökenli olması, şeklinde sıralanabilir.

1. Daha önce Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında 3 farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından izole edilip 16S rRNA genleri kullanılarak moleküler teşhisleri yapılmış olan 67 *Streptomyces* ve bir *Nocardioopsis* türü bu çalışmada, öncelikli olarak biyolojik aktivite yönünden ön-tarama işlemine tabi tutuldu. Ön-tarama işlemlerinde TSB besiyeri kullanılarak üremeleri sağlanan bu bakterilerden etil asetat kullanılarak elde edilen ham ekstraktlar disk difüzyon yöntemine göre *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterilerinin ve *C. albicans* ATCC 10231 mayasının üremesi üzerine engelleyici etkisi test edildi. Tablo 6.1'de görüldüğü gibi bu 68 türün biyolojik aktivitelerinin taranması

sonucunda, 25 kadarının ham ekstraktlarının test mikroorganizmaları olan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerinin ve *C. albicans* ATCC 10231 mayasının üremesi üzerine değişik oranlarda biyolojik aktivite gösterdikleri tespit edildi. TSB kültür ortamında üretilen *Streptomyces*'lerden elde edilen ham ekstraktların, test mikroorganizmalarının üremesi üzerine engelleyici etkileri Resim 6.8–6.15'te görülmektedir.

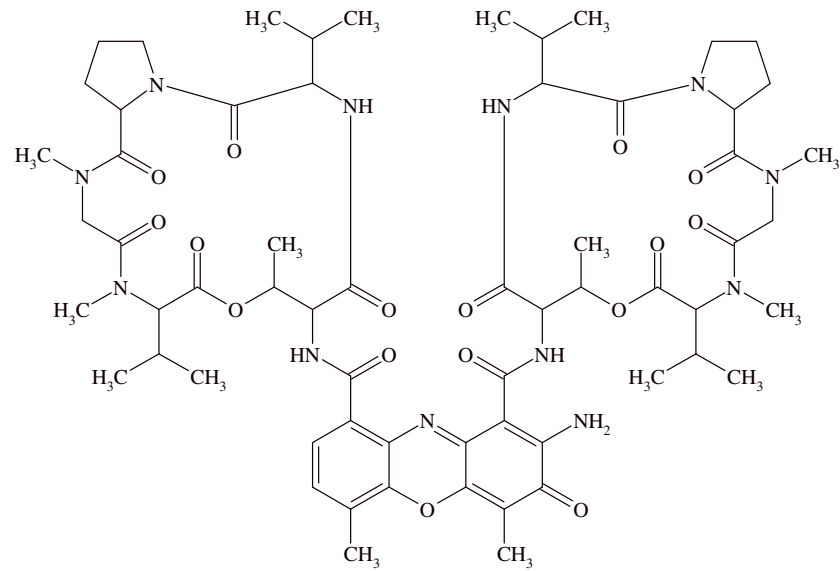
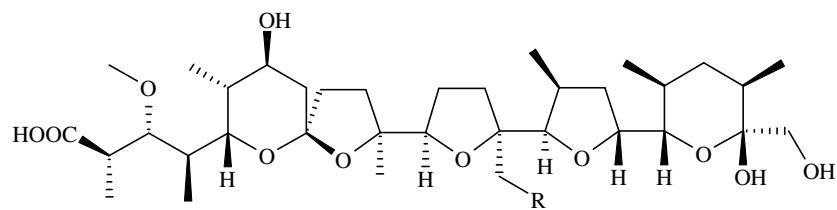
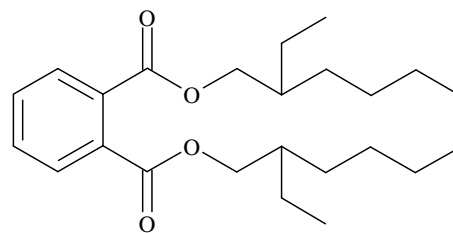
2. TSB kültür ortamında üretilip disk agar difüzyon yöntemine göre biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenen AA50, AA58, AR6, AR12, AR17, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH46, BSH50, CA3, CA12, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS43, CS44 ve CAH29 kodlu türler, çalışmaların bu aşamasında M₂ besiyerinde (500 mL'lik erlenlerde 125 mL besiyeri) üretildi. Elde edilen kültürlerden AR6, AS41, AS42, BSH46, CA16 ve CS43 kodlu *Streptomyces* türlerinde pH 3 ayarı yapıp geriye kalan 19 türe ait kültürün ise olduğu şekliyle EtOAc ve aseton kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Elde edilen ham ekstraktların test mikroorganizmalarının üremeleri üzerine olan engelleyici etkisi Tablo 6.2'de görüldüğü gibi genelde TSB besiyerinde üretilerek (Tablo 6.1) test edilen ham ekstraktlara nazaran daha yüksek aktivite sergilediği gözlemlendi.

3. Biyolojik aktivite temelli taramalar neticesinde aktif olduğu belirlenen bu 25 türden; AA50, AA58, AR6, AR12, AS41, AS42, ASH47, BA2, BA5, BS39, BS40, BAH26, BSH50, CA3, CA14, CA16, CA17, CA21, CS41, CS44 ve CAH29 kodlu iyi aktivite gösteren 21 tür seçildi. *Streptomyces* cinslerine ait bu bakteriler, 1 L'lik erlenlerde 250 mL M₂ içeren 4 adet besiyerine alınıp orbital inkübatörde 28 °C'de, 155 rpm'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılarak üretildi. Birer litre üretilen bu *Streptomyces* türlerinden elde edilen kültürler, Şekil 3.6'daki akış şemasına göre, önce liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu ve ardından ele geçen liyofilizat etil asetatla ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstraktlar bu kez Tablo 6.3'te görülen; *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. viridochromogene* (Tü 57), *E. coli* bakterileri, *C. albicans*, *M. miehei* (Tü 284), fungusları *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *S. subspicatus* mikroalgleri ile *R. solani* ve *P. ultimum* bitki patojenleri üzerine olan biyolojik aktiviteleri test edildi. Ayrıca elde edilen ham ekstraktlar *Artemia salina* L. kullanılarak sitotoksik aktivite yönünden incelendi. Mevcut ham ekstraktlar kimyasal tarama açısından değerlendirilmek üzere silika jel kaplı cam tabakalar (10 × 20 cm) üzerine spot edilip ardından CH₂Cl₂:MeOH (95:5) ve CH₂Cl₂:MeOH (90:10) çözücü sistemleri kullanılarak ayrılmaları sağlandı.

Tabakalar kurutulduktan sonra, öncelikli olarak gün ışığı altında kendiliğinden renkli bileşiklerin yerleri belirlendi. Daha sonra ise; UV ışığı altında 254 nm ve 366 nm'de kromatografik bantların yerleri işaretlendi. Son olarak, ayrı ayrı tabakalar üzerine anisaldehit/sülfürik asit reaktifi ve Ehrlich's reaktifi (Resim 6.17) püskürtülerek kromatografik bantlar renklendirilip gün ışığı ve UV ışığı altında incelenerek değerlendirildi. Ön-tarama işlemleri sonucu ilgi çekici *Streptomyces* türlerinin belirlenmesinde, kimyasal taramalar neticesinde tespit edilen dikkat çekici kromatograma sahip olan suşlara birincil, biyolojik aktivite temelli taramalardan elde edilen sonuçlara ise ikincil sırada yer verildi.

4. Biyolojik ve kimyasal taramalar sonucu yüksek aktivite sergileyen ve ilgi çekici kromatogramlara sahip olan *Streptomyces* sp. BA2, *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. BS40 ve *Streptomyces* sp. AS42 kodlu türlerden optimum üretim koşullarında yeteri miktarda sekonder metabolit elde etmek için büyük ölçekte üretilmelerine karar verildi. Kimyasal ve biyolojik ön-tarama işlemleri sonucunda BA2, AA50, BS40 ve BS39 kodlu rizosferik *Streptomyces* suşları bu çalışma kapsamında ele alınarak detaylı olarak araştırıldı. Standart şartlar kullanılarak üretilmeleri sağlanan seçilmiş bakterilerin kültürlerine çözücü ekstraksiyonu uygulandı. Elde edilen sekonder metabolit ekstraktları, kolon kromatografisi, İTK, PİTK, moleküler elek kromatografisi ve HPLC gibi çeşitli kromatografik teknikler uygulanarak saf bileşikler izole edildi. Bilinen metabolitlerin kimyasal yapıları, kütle, ^1H NMR ve ^{13}C NMR NMR spektrumları gibi yapısal veriler göz önüne alınarak AntiBase, Doğal Ürünler Sözlüğü ve Chemical Abstract'ta yapılan hızlı taramalarla aydınlatıldı. Yeni bileşikler ise ^1H NMR ve ^{13}C NMR teknikleri başta olmak üzere 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC gibi) ile UV, IR ve kütle spektrumları dikkatli bir şekilde değerlendirilerek yapısal olarak tanımlandı.

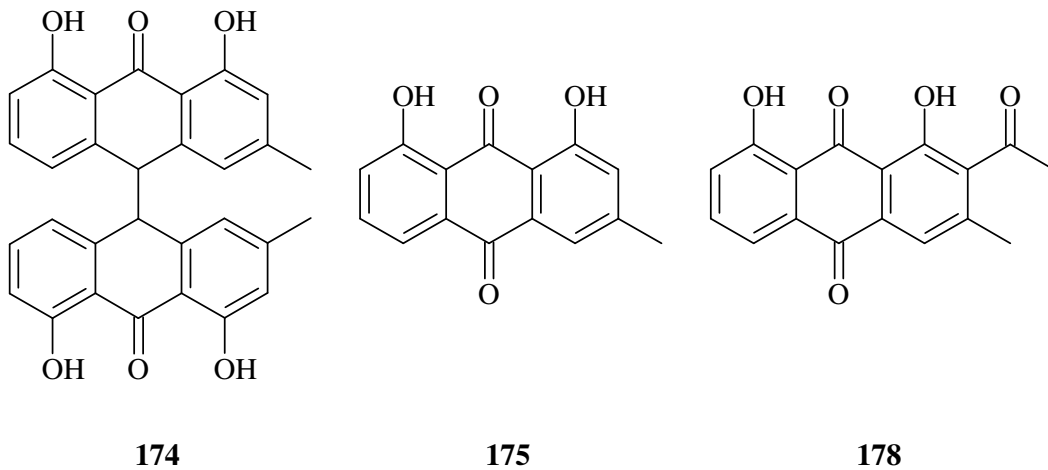
5. Biyolojik aktivite temelli ön-tarama işlemleri sırasında özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösterdiği belirlenen *Streptomyces* sp. BA2'den bilinen bileşikler olan, aktinomisin D (**170**), monensin B (**171**) ve monensin A (**172**) karışımı ile *bis*(2-etilhegzil)ftalat (**173**) saflaştırılıp yapıları aydınlatıldı. Resim 6.16'da ön-tarama işlemleri sırasında *S. aureus* bakterisi üzerine *Streptomyces* sp. BA2'den elde edilen ham ekstraktın biyootografi tekniği uygulanması sonucu oluşan zon çapı görülmektedir.

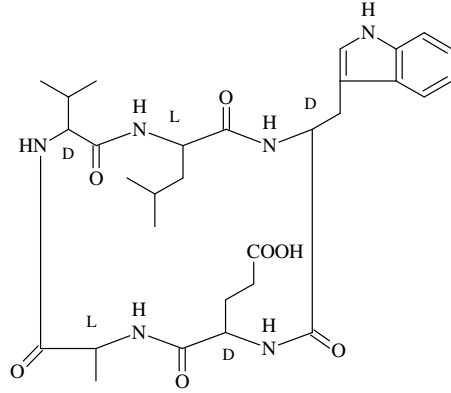
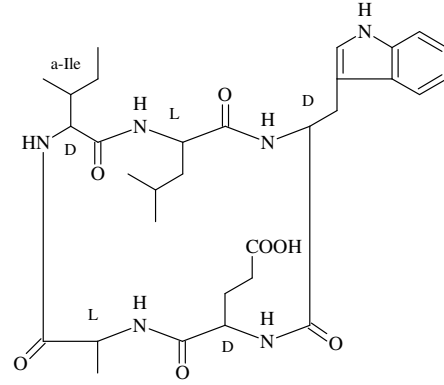
**170****171** R = H**172** R = CH₃**173**

6. Wilm's tümörlerinin²⁶⁴ ve çocuklarda yumuşak doku sarkomlarının²⁶⁵ tedavisinde antikanser ilaç olarak klinik uygulama alanı bulmuş olan aktinomisin D (**170**) ile doğal poliyeter iyonofor antibiyotikler olduğu bilinen²⁶⁹ ve 30 yılı aşkın bir

süredir yaygın bir biçimde ticari öneme sahip bileşikler olarak kullanılmakta²⁷⁰ olan monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımı test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi antimikrobiyal aktivite yönünden test edildi (Tablo 4.5). Test mikroorganizmaları üzerine pozitif kontrol olarak kullanılan IPM, OFX, NET ve AMC antibiyotikleri ile antifungal AFB'nin etkisi Tablo 4.1'de, oluşan zon çaplarının görüntüsü ise Resim 6.1–6.7'de görülmektedir. Aktinomisin D (**170**) ile monensin B (**171**) ve A (**172**) karışımı test mikroorganizmaları üzerinde 40 µg/kağıt disk konsantrasyonda uygulandığında özellikle *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 ve *B. subtilis* ATCC 11774 Gram-pozitif bakteri suşlarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği (Resim 6.18–6.20) ve elde edilen zon çaplarının, aynı mikroorganizmalara uygulanan standart antibiyotiklerle hemen hemen eşit olduğu tespit edildi.

7. Kimyasal taramalar sırasında kendiliğinden renkli bileşikler içerdiği tespit edilen *Streptomyces* sp. AA50'den daha önce bazı *Streptomyces* türlerinden izole edildiği rapor edilmiş olan chrysophanol (**175**)²²⁰ ile AntiBase'de yapılan taramalar sonucunda *Streptomyces* sp. Mei 6-1,2'den izole edilmiş fakat yayımlanmamış bir bileşik olan 2-acetylchrysophanol (**178**)⁹³ ve daha önce *R. nepalensis*,²⁷⁶ *S. reticulata*²⁷⁷ *C. garrettiana*,²⁷⁹ *C. obtusifolia*,²⁸⁰ ve *S. longiracemosa*²⁸¹ bitkilerinden de izole edildiği bildirilmiş olan fakat ilk kez bu çalışmada bir mikroorganizmadan izole edilen chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) bileşikler saflaştırıldı. Ayrıca endotelin reseptör antagonisti²⁹⁰⁻²⁹⁴ oldukları bilinen siklik pentapeptit A (**179**) ve siklik pentapeptit B (**180**) bileşikler karışım halinde izole edildi.

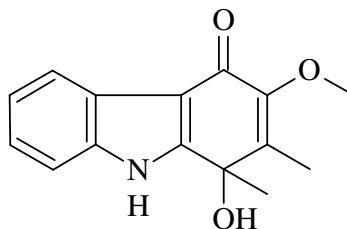
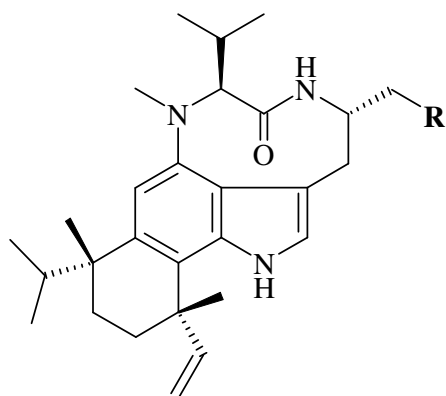
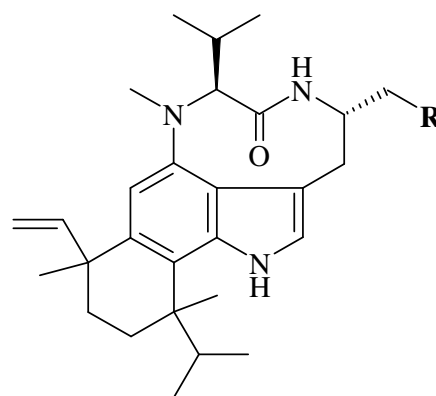


**179****180**

8. *Streptomyces* sp. AA50'den izole edilip saflaştırılan bileşiklerin tamamının Tablo 4.1'de görülen standart antibiyotiklerin denendiği test mikroorganizmaları üzerine disk agar difüzyon yöntemine göre 40–160 µg/disk konsantrasyon aralığında antimikrobiyal açıdan test edildiğinde herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadıkları gözlemlendi. Ayrıca izole edilen bu bileşiklerden chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**)'un DPPH radikal söndürme aktivitesi, indirgeme gücü gibi antioksidan özellikleri de test edildi. BHT ve BHA'nın pozitif kontrol olarak kullanıldığı testlerde, chrysophanol (**175**)'un negatif yüzde gösterdiği ve chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**)'un ise 1000 µM konsantrasyonda % 29 oranında DPPH radikal söndürme aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.47). Bu bileşiklerin Oyaizu metoduna^{298,299} göre Şekil 4.48'de görüldüğü üzere Fe³⁺'ü Fe²⁺'ye indirgeme gücünün araştırıldığı çalışmalar sonucunda pozitif kontrollerle kıyaslandığında oldukça düşük indirgeme gücüne sahip oldukları belirlendi. Chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ve chrysophanol (**175**) bileşiklerinin, agaroz jel elektroforezinden faydalanılarak pBluescript M13+ plasmid DNA'sını OH radikale karşı koruma aktivitesi (Şekil 4.49–4.50) ile pBluescript M13+ plasmid DNA'sını prooksidan olarak kesim aktivitesi (Şekil 4.51–4.52) araştırıldı. Bu bileşiklerin denenen konsantrasyon aralığında (25–500 µM) DNA'yı OH radikale karşı koruma ve DNA'sını prooksidan olarak kesim aktivitesine sahip olmadığı gözlemlendi.

9. Biyolojik aktivite temelli ön-tarama işlemlerinde özellikle *C. albicans* ATCC 10231 ve *M. miehei* (Tü 284) funguslarına karşı yüksek aktivite sergileyen ve kimyasal taramalar sonucunda ilgi çekici UV aktif kromatogramlara sahip olduğu belirlenen

Streptomyces sp. BS40'tan ise, ilk olarak *Streptoverticillium ehimense*'den izole edilip³⁰⁴ ardından total organik sentezinin^{305,306} yapılmış olduğu rapor edilen carbazomycin G (**182**) saflaştırıldı. Bunun yanında ilk kez 1960 yılında bir toprak bakterisi olan *Streptomyces mediocidicus*'dan izole edilmiş³⁰⁷⁻³¹⁰ olan teleocidin B2 (**183**) ile teleocidin B2 izomeri (**184**)'nin bulunduğu bir karışım izole edildi. Karışım içerisinde az olan bileşen olarak yer alan ve teleocidin B2 izomeri (**184**) olarak ifade edilen bileşiğin, bilinen diğer teleocidin B türevleri olan teleocidin B1 (**192**), B3 (**193**) ve B4 (**194**) izomerlerinden farklı yeni bir teleocidin izomeri olduğu belirlendi. Ayrıca bu bakteriden iki yeni teleocidin türevi olan 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve 14-*O*-acetylteleocidin B2 izomer (**196**) karışımı izole edilip yapıları 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak aydınlatıldı. Fakat teleocidin B2 izomeri (**184**) ile 14-*O*-acetylteleocidin B2 izomeri (**196**)'nin mutlak konfigürasyonları belirlenemedi.

**182****183** R = OH**195** R = OAc**184** R = OH**196** R = OAc

10. Standart test mikroorganizmaları üzerine disk agar difüzyon yöntemine göre *Streptomyces* sp. BS40'tan izole edilen bileşikler 40–160 µg/disk konsantrasyon aralığında antimikrobiyal açıdan test edildiğinde, bazı *Trichophyton* türlerine karşı orta derecede antifungal aktivite gösterdiği bildirilen³⁰⁴ Carbazomycin G (**182**) de dahil hiç birinin aktivite göstermediği belirlendi. Çalışmalar esnasında, dikkatsizlik sonucu özellikle yüz çevresinde meydana gelen kontaminasyon neticesinde oldukça şiddetli cilt iritasyonuna ve vezikül oluşumuna neden olduğu belirlenen 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve izomer (**196**) karışımının *Artemia salina* L. larvaları üzerinde 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında % 100 sitotoksik aktivite sergilediği tespit edildi (Tablo 4.12) Teleocidin B2 (**183**)'nin güçlü cilt iritasyonuna neden olmasının yanında suda yaşayan hayvanlara karşı yüksek derecede toksik etkiye sahip olması ve güçlü tümör promotu olduğuna dair çeşitli literatür verileri³⁰⁷⁻³¹¹ bulunmasından dolayı bu çalışmada *Artemia salina* L. larvaları üzerine olan sitotoksik aktivitesi incelenmedi.

11. Ön-tarama işlemleri sırasında elde edilen ham ekstrakt içerisinde metanolde çözünürlüğü düşük olan bileşenleri ihtiva ettiği tespit edilen *Streptomyces* sp. AS42'den ise, endotelin reseptör antagonisti²⁹⁰⁻²⁹⁴ oldukları bilinen ve bu çalışmada ayrıca *Streptomyces* sp. AA50 suşundan da izole edilmiş olan siklik pentapeptit A (**179**) ve siklik pentapeptit B (**180**) karışımı izole edildi. HPLC-ESI-MS²/MS³ verileri ile 1D ve 2D NMR spektrumlarının değerlendirilmesi sonucunda siklik pentapeptit A (**179**)'nın siklo(-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp-) yapısında ve siklik pentapeptit B (**180**)'nin ise siklo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-) yapısına sahip siklik peptitler oldukları tespit edildi.

12. Zengin bir vejetasyona sahip ülkemizdeki lokal endemik bitkilerin rizosferik toprak tabakasından izole edilerek teşhisleri yapılmış olan ve bu çalışma kapsamında ayrıntılı bir biçimde çalışılan *Streptomyces* sp. BA2, *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. BS40 ve *Streptomyces* sp. AS42'den aktinomisin D (**170**), monensin B (**171**) ve monensin A (**172**) karışımı, bis(2-etilhegzil)ftalat (**173**), chrysophanol (**175**), 2-acetylchrysophanol (**178**), siklik pentapeptit A (**179**), siklik pentapeptit B (**180**), carbazomycin G (**182**) ve teleocidin B2 (**183**) bilinen bileşiklerinin yanında ilk kez bu çalışmada bir bakteriden izole edilen chrysophanol-10,10'-bianthron (**174**) ile biyolojik olarak aktif olan teleocidinlerin yeni üyeleri olan ve teleocidin B2 izomeri (**184**) ile 14-*O*-acetylteleocidin B2 (**195**) ve 14-*O*-acetylteleocidin B2 izomeri (**196**) olarak

adlandırılan bileşikler, bakteriyel sekonder metabolit olarak izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır. Ayrıntılı olarak çalışılmış olan bu dört bakteriden *Streptomyces* sp. AA50 ve *Streptomyces* sp. BS40 kodlu olanlardan yeni bileşiklerin izole edilmesi ülkemizde bu yönüyle çok az çalışılan *Streptomyces* türlerinin yeni üyelerinin olduğunu ve böylesi yetenekli mikroorganizmalardan biyolojik aktif yeni doğal ürünlerin keşfedilebileceğini göstermektedir.

6. TABLOLAR VE RESİMLER

Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları.

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| NEG | Su | - | - | - | - | - | - | |
| | EtOAc | - | - | - | - | - | - | |
| | CHCl ₃ :MeOH | - | - | - | - | - | - | |
| AA50 | Filtrat | - | 10 | 12 | - | - | - | |
| | Ekstrakt | 10 | 14 | 16 | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AA53 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AA58 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | 12 | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AA59 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 5,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR2 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR3 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR4 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 3,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR6 | Filtrat | - | 10 | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | 9 | - | - | - | - | |
| AR9 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR12 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | 8 | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR17 ^b | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | 8 | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR22 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AR24 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 6,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |
| AS25 | Filtrat | - | - | - | - | - | - | |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | 5,5 | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | - | |

Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları (devamı).

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| AS28 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 17,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS29 | Filtrat | - | - | - | - | - | 4,5 | 13,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS31 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 14,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS34 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 15,60 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS36 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 32,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS37 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 23,60 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS40 | Filtrat | - | - | - | - | - | 4,5 | 16,40 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS41 | Filtrat | 14 | 13 | 16 | 13 | - | 2,5 | 13,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | 12 | 12 | 14 | 12 | - | | |
| AS42 | Filtrat | 10 | 10 | 9 | - | - | 2,5 | 20,30 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | 10 | 10 | 9 | - | - | | |
| AAH61 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 16,40 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AAH63 | Filtrat | - | - | - | - | - | 4,5 | 36,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AAH66 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 21,40 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AAH67 | Filtrat | - | - | - | - | - | 5,5 | 12,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AAH68 | Filtrat | - | - | - | - | - | 3,5 | 15,60 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| ASH47 | Filtrat | - | 12 | 12 | - | - | 3,5 | 17,10 |
| | Ekstrakt | - | 14 | 14 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |

Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları (devamı).

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| BA1 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 15,30 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA2 | Filtrat | - | 14 | 14 | - | - | 2,5 | 24,20 |
| | Ekstrakt | - | 22 | 18 | 14 | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA3 | Filtrat | - | - | - | - | - | 7,5 | 12,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA5 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 21,20 |
| | Ekstrakt | - | 10 | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA11 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 14,20 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA12 | Filtrat | - | - | - | - | - | 6,5 | 24,40 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA14 | Filtrat | - | - | - | - | - | 3,5 | 20,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BR57 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 13,20 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS29 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 13,80 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS32 | Filtrat | - | - | - | - | - | 5,5 | 17,60 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS33 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 15,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS39 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 11,40 |
| | Ekstrakt | - | - | 7 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS40 | Filtrat | - | - | - | - | - | 5,5 | 17,90 |
| | Ekstrakt | - | 7 | 7 | - | 16 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS44 | Filtrat | - | - | - | - | - | 3,5 | 32,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BAH20 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 17,40 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |

Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları (devamı).

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| BAH26 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 20,80 |
| | Ekstrakt | 12 | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BAH28 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 12,00 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BSH46 | Filtrat | - | 14 | 18 | - | - | 2,5 | 9,70 |
| | Ekstrakt | - | 24 | 28 | - | 8 | | |
| | Su fazı | - | 10 | 10 | - | - | | |
| BSH50 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 30,00 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | 18 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA3 | Filtrat | - | - | - | - | - | 7,5 | 17,10 |
| | Ekstrakt | - | 10 | 14 | 7 | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA11 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 17,50 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA12 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 17,50 |
| | Ekstrakt | - | 8 | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA13 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 10,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA14 | Filtrat | - | 10 | 14 | - | - | 6,5 | 12,30 |
| | Ekstrakt | - | 16 | 22 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA16 | Filtrat | - | - | - | - | 12 | 1,5 | 13,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | 9 | | |
| CA17 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 12,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | 8 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA18 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 10,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA19 | Filtrat | - | - | - | - | - | 4,5 | 15,90 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA21 | Filtrat | - | 8 | - | - | - | 4,5 | 19,40 |
| | Ekstrakt | - | 18 | 22 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CA24 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 8,60 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |

Tablo 6.1. TSB besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları (devamı).

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| CA28 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 15,20 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CS38 | Filtrat | - | - | - | - | - | 1,5 | 19,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CS41 | Filtrat | - | 10 | - | - | - | 1,5 | 11,50 |
| | Ekstrakt | - | 16 | 12 | 7 | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CS42 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 13,10 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CS43 | Filtrat | - | - | - | - | 18 | 2,5 | 12,00 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | 12 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | 16 | | |
| CS44 | Filtrat | - | - | 12 | - | - | 5,5 | 14,20 |
| | Ekstrakt | - | 14 | 24 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CAH29 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 21,50 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | 7 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CAH33 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 12,80 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| CAH35 | Filtrat | - | - | - | - | - | 1,5 | 12,70 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |

Standart bakteriler 625 nm'de O.D. 0,8-1,0 (0,5 McFarland) olacak şekilde 4-6 saat sıvı besiyerlerinde üretildi ve ardından 100 µL alınıp katı besiyerlerine eküvyonlu tüplerle ekimleri yapıldı. *Streptomyces*'lerin üretildiği TSB besiyeri santrifüjlendikten sonra geriye kalan sıvı kısım (Filtrat) Şekil 3.2.'deki akış şemasına göre 100 mL etil asetat ile soğukta ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt kısmı 1500 µL Kloroform:Metanol (1:1) ile çözüldü (Ekstrakt) ve filtrat kısmının etil asetatla ekstraksiyonundan sonra geriye kalan kısım (Su fazı) antimikrobiyal açıdan test edildi. Disklere 20 µL madde emdirildi.

^a: 6 mm çapında kağıt disk, ^b: *Nocardioopsis* sp. AR17, -: Aktif değil,

NEG: Negatif kontroller (20 µL; Su: steril su, EtOAc: Etil asetat, CHCl₃:MeOH: Kloroform:Metanol (1:1)).

Tablo 6.2. M₂ besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları.

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| NEG | Su | - | - | - | - | - | | |
| | EtOAc | - | - | - | - | - | | |
| | CHCl ₃ :MeOH | - | - | - | - | - | | |
| AA50 | Filtrat | - | 10 | 10 | - | - | 2,5 | 24,30 |
| | Ekstrakt | 14 | 16 | 18 | 12 | 12 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AA58 | Filtrat | - | - | - | - | - | 6,5 | 26,90 |
| | Ekstrakt | - | 7 | 10 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AR6 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 40,50 |
| | Ekstrakt | 8 | 8 | 8 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AR12 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 30,70 |
| | Ekstrakt | - | 12 | 12 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AR17 ^b | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 23,10 |
| | Ekstrakt | - | - | 3 | - | 8 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| AS41 | Filtrat | - | - | 10 | - | - | 2,5 | 56,20 |
| | Ekstrakt | - | - | 9 | 7 | - | | |
| | Su fazı | - | - | 10 | - | - | | |
| AS42 | Filtrat | - | 10 | 12 | - | - | 2,5 | 51,60 |
| | Ekstrakt | 8 | 14 | 22 | 10 | 20 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| ASH47 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 48,70 |
| | Ekstrakt | 7 | 10 | 12 | 10 | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA2 | Filtrat | - | 14 | 16 | - | - | 2,5 | 34,90 |
| | Ekstrakt | - | 22 | 26 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BA5 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 26,30 |
| | Ekstrakt | - | - | 20 | - | 10 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS39 | Filtrat | - | - | - | - | - | 3,5 | 36,30 |
| | Ekstrakt | - | 14 | 14 | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BS40 | Filtrat | - | - | - | - | 14 | 5,5 | 29,60 |
| | Ekstrakt | - | 14 | 16 | - | 24 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BAH26 | Filtrat | - | - | - | - | - | 2,5 | 23,30 |
| | Ekstrakt | - | - | - | - | - | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |
| BSH46 | Filtrat | - | 12 | 18 | - | - | 3,5 | 49,30 |
| | Ekstrakt | - | 20 | 24 | - | 10 | | |
| | Su fazı | - | - | - | - | - | | |

Tablo 6.2. M₂ besiyerinde üretilen *Streptomyces*'lerin biyolojik taramalarının sonuçları (devamı).

| Grup | Denenen madde | Zon Çapları (mm) ^a | | | | | İnkübasyon Süresi (Gün) | Ekstrakte Edilen Miktar (mg) |
|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Kullanılan Mikroorganizmalar | | | | | | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | |
| BSH50 | Filtrat | – | – | – | – | – | 2,5 | 25,80 |
| | Ekstrakt | – | 8 | 7 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | – | | |
| CA3 | Filtrat | – | 12 | 18 | – | – | 3,5 | 33,20 |
| | Ekstrakt | – | 20 | 28 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | 10 | – | – | | |
| CA12 | Filtrat | – | 8 | – | – | – | 3,5 | 34,20 |
| | Ekstrakt | – | – | 12 | – | – | | |
| | Su fazı | – | 8 | – | – | – | | |
| CA14 | Filtrat | – | 12 | 14 | – | – | 3,5 | 25,40 |
| | Ekstrakt | – | 22 | 28 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | 10 | – | – | | |
| CA16 | Filtrat | – | 7 | – | – | 14 | 2,5 | 50,90 |
| | Ekstrakt | 7 | 12 | 12 | – | 8 | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | 8 | | |
| CA17 | Filtrat | – | – | – | – | – | 3,5 | 42,10 |
| | Ekstrakt | – | 8 | 8 | – | 10 | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | – | | |
| CA21 | Filtrat | – | – | – | – | – | 3,5 | 36,60 |
| | Ekstrakt | – | 12 | 22 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | – | | |
| CS41 | Filtrat | – | 12 | 14 | – | – | 3,5 | 35,90 |
| | Ekstrakt | 14 | 16 | 22 | 7 | – | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | – | | |
| CS43 | Filtrat | – | – | – | – | 14 | 2,5 | 34,20 |
| | Ekstrakt | – | 8 | 10 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | 10 | | |
| CS44 | Filtrat | – | 10 | – | – | – | 2,5 | 33,10 |
| | Ekstrakt | – | 8 | 12 | – | – | | |
| | Su fazı | – | – | – | – | – | | |
| CAH29 | Filtrat | 14 | 10 | 10 | – | 14 | 3,5 | 29,60 |
| | Ekstrakt | – | 20 | 18 | – | 24 | | |
| | Su fazı | 14 | 7 | – | – | – | | |

Standart bakteriler 625 nm'de O.D. 0,8-1,0 (0,5 McFarland) olacak şekilde 4-6 saat sıvı besiyerlerinde üretildi ve ardından 100 µL alınp katı besiyerlerine eküvyonlu tüplerle ekimleri yapıldı. *Streptomyces*'lerin üretildiği M₂ besiyeri vakumla süzülükten sonra geriye kalan sıvı kısım (Filtrat) Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'teki akış şemasına göre etil asetat ve aseton kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt kısmı 1500 µL CHCl₃:MeOH (1:1) ile çözüldü (Ekstrakt) ve filtrat kısmının etil asetat ve asetonla ekstraksiyonundan sonra geriye kalan kısım (Su fazı) antimikrobiyal açıdan test edildi. Disklere 20 µL madde emdirildi.

^a: 6 mm çapında kağıt disk, ^b: *Nocardioopsis* sp. AR17, –: Aktif değil,

NEG: Negatif kontroller (20 µL; Su: steril su, EtOAc: Etil asetat, CHCl₃:MeOH: Kloroform:Metanol (1:1)).

Tablo 6.3. M₂ besiyerinde üretilen rizosferik *Streptomyces* izolatlarının ham ekstraktlarının agar difüzyon mortalite testi ile biyolojik taraması.

| Kod Numarası | İnhibisyan Zon Çapları (mm) ^a | | | | | | | | | | | İnkübasyon Süresi (gün) | Miktar (mg) | <i>Artemia salina</i> , (Mortalite %) |
|--------------|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------------------|
| | Test Edilen Mikroorganizmalar | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57) | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Mucor miehei</i> (Tü 284) | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Pythium ultimum</i> | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Chlorella sorokiniana</i> | <i>Scenedesmus subspicatus</i> | | | |
| AA50 | 12 | 18 | 20 | 0 | 0 | 0 | t.e. | t.e. | 11 | 0 | 0 | 5 | 125,20 | 56,0 |
| AA58 | 11 | 12 | 0 | 11 | 0 | 0 | - | - | 11 | 11 | 11 | 5 | 55,03 | 37,6 |
| AR6 | 12 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | - | + | 0 | 0 | 0 | 5 | 805,77 | 76,2 |
| AR12 | 15 | 16 | 11 | 12 | 0 | 0 | - | - | 13 | 14 | 13 | 5 | 461,38 | 62,7 |
| AS41 | 10 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | t.e. | t.e. | 11 | 0 | 0 | 5 | 28,10 | 53,0 |
| AS42 | 20 | 20 | 0 | 11 | 0 | 0 | - | - | 0 | 0 | 0 | 5 | 140,10 | 38,8 |
| ASH47 | 15 | 16 | 15 | 12 | 0 | 12 | - | ++ | 19 | 19 | 19 | 5 | 160,96 | 30,1 |
| BA2 | 21 | 25 | 21 | 0 | 11 | 15 | t.e. | t.e. | 15 | 15 | 0 | 5 | 82,80 | 95,0 |
| BA5 | 17 | 18 | 0 | 15 | 0 | 0 | - | + | 11 | 11 | 12 | 5 | 630,29 | 38,9 |

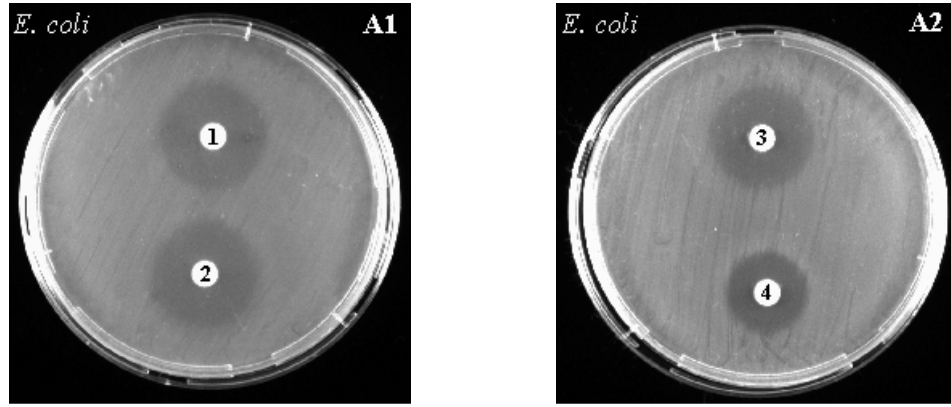
Tablo 6.3. M₂ besiyerinde üretilen rizosferik *Streptomyces* izolatlarının ham ekstraktlarının agar difüzyon mortalite testi ile biyolojik taraması (devamı).

| Kod Numarası | İnhibisyan Zon Çapları (mm) ^a | | | | | | | | | | | İnkübasyon Süresi (gün) | Miktar (mg) | <i>Artemia salina</i> , (Mortalite %) |
|--------------|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------------------|
| | Test Edilen Mikroorganizmalar | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57) | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Mucor miehei</i> (Tü 284) | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Pythium ultimum</i> | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Chlorella sorokiniana</i> | <i>Scenedesmus subspicatus</i> | | | |
| BS39 | 12 | 32 | 18 | 11 | 0 | 40 | – | – | 0 | 0 | 12 | 5 | 186,71 | 42,8 |
| BS40 | 15 | 24 | 15 | 14 | 24 | 28 | t.e. | t.e. | 24 | 25 | 20 | 5 | 59,20 | 100 |
| BAH26 | 20 | 0 | 12 | 12 | 0 | 0 | – | – | 0 | 10 | 12 | 5 | 262,63 | 64,4 |
| BSH50 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | 5 | 80,34 | 12,4 |
| CA3 | 23 | 28 | 19 | 15 | 12 | 0 | – | – | 17 | 16 | 15 | 5 | 198,60 | 44,4 |
| CA14 | 11 | 22 | 18 | 12 | 0 | 0 | – | – | 13 | 14 | 13 | 5 | 253,46 | 4,9 |
| CA16 | 12 | 0 | 13 | 0 | 11 | 25 | t.e. | t.e. | 0 | 0 | 0 | 5 | 59,20 | 100 |
| CA17 | 10 | 20 | 16 | 10 | 13 | 20 | ++ | ++ | 11 | 12 | 10 | 5 | 247,97 | 100 |
| CA21 | 10 | 12 | 17 | 23 | 0 | 0 | – | – | 0 | 0 | 13 | 5 | 253,26 | 0 |

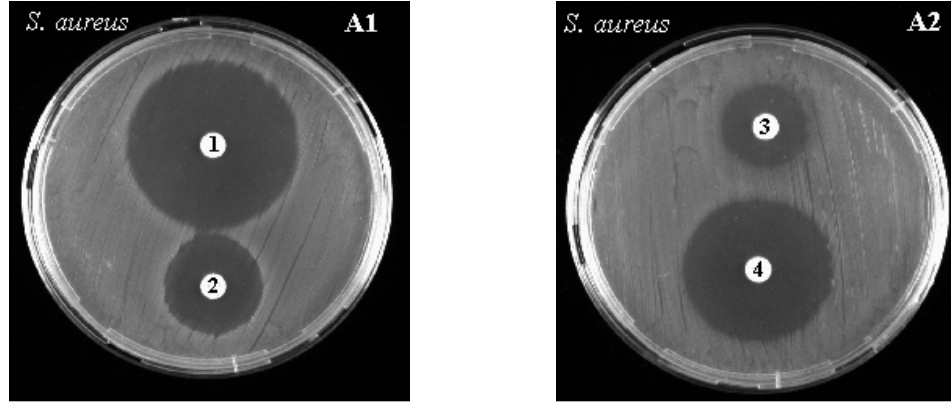
Tablo 6.3. M₂ besiyerinde üretilen rizosferik *Streptomyces* izolatlarının ham ekstraktlarının agar difüzyon mortalite testi ile biyolojik taranması (devamı).

| Kod Numarası | İnhibisyon Zon Çapları (mm) ^a | | | | | | | | | | | İnkübasyon Süresi (gün) | Miktar (mg) | <i>Artemia salina</i> , (Mortalite %) |
|--------------|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------------------|
| | Test Edilen Mikroorganizmalar | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57) | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Mucor miehei</i> (Tü 284) | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Pythium ultimum</i> | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Chlorella sorokiniana</i> | <i>Scenedesmus subspicatus</i> | | | |
| CS41 | 17 | 11 | 23 | 18 | 0 | 0 | – | – | 0 | 0 | 10 | 5 | 105,84 | 2,0 |
| CS44 | 11 | 22 | 19 | 11 | 0 | 0 | – | – | 13 | 13 | 15 | 5 | 153,05 | 2,8 |
| CAH29 | 12 | 21 | 20 | 0 | 15 | 21 | t.e. | t.e. | 19 | 20 | 15 | 5 | 46,0 | 89,0 |

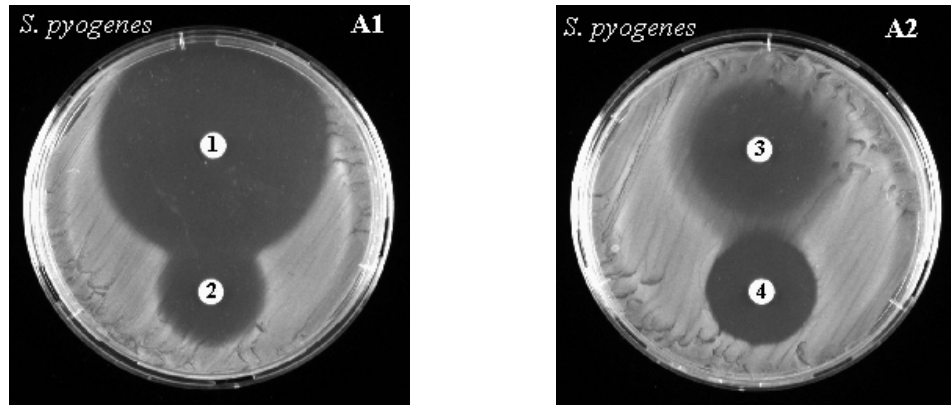
^a: 9 mm çapında kağıt disk, Kağıt disk başına 4 mg ham ekstrakt, *Artemia* test: 100 µg/mL
t.e. : test edilmedi, – : aktif değil, + : zayıf aktivite, ++ : aktif



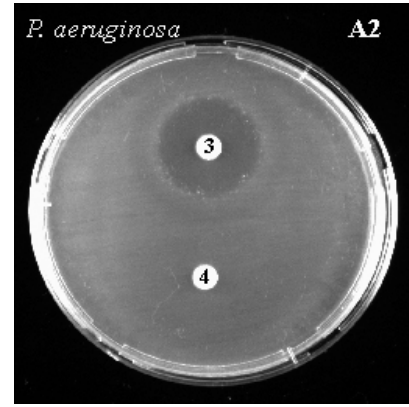
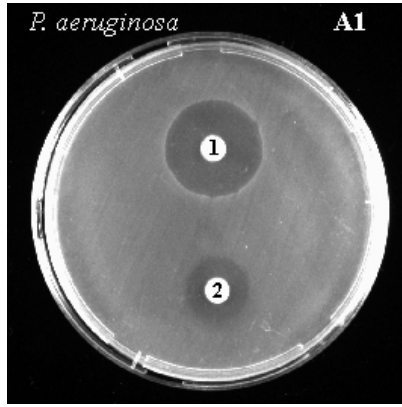
Resim 6.1. *E. coli* ATCC 25922'nin üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi; **A1)** antibiyotikler 1- IPM, 2- OFX **A2)** antibiyotikler 3- NET, 4- AMC.



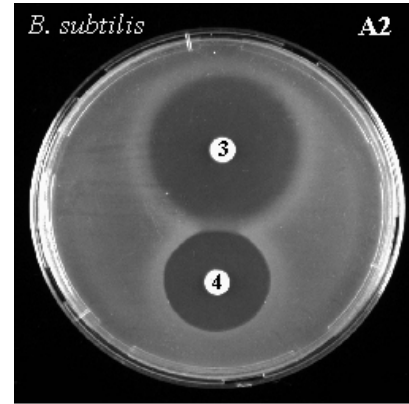
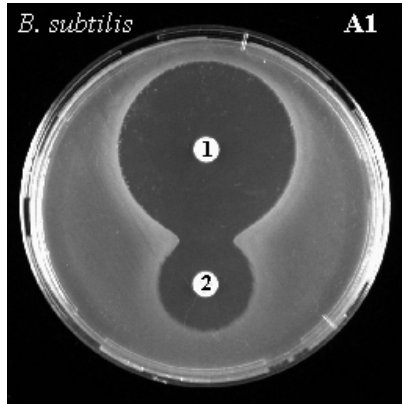
Resim 6.2. *S. aureus* ATCC 25923'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi; **A1)** antibiyotikler 1- IPM, 2- OFX **A2)** antibiyotikler 3- NET, 4- AMC.



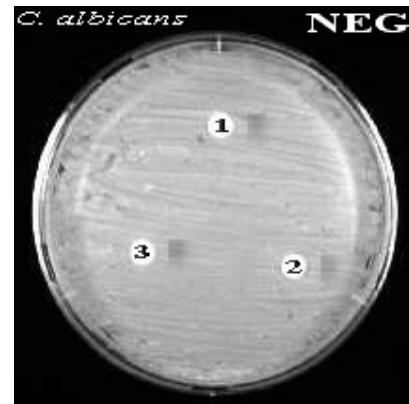
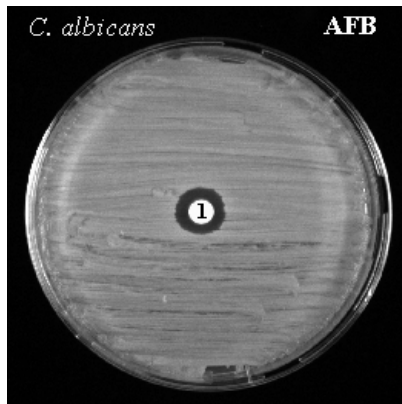
Resim 6.3. *S. pyogenes* ATCC 19615'in üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi; **A1)** antibiyotikler 1- IPM, 2- OFX **A2)** antibiyotikler 3- NET, 4- AMC.



Resim 6.4. *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi; A1) antibiyotikler 1- IPM, 2- OFX A2) antibiyotikler 3- NET, 4- AMC.

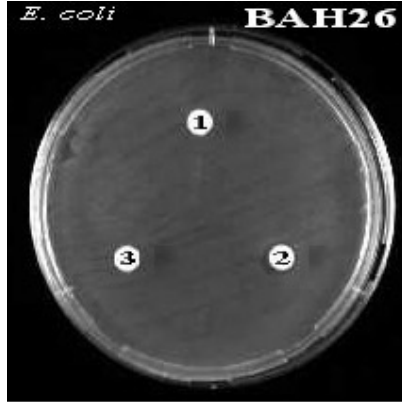


Resim 6.5. *B. subtilis* ATCC 11774'ün üremesi üzerine antibiyotiklerin etkisi; A1) antibiyotikler 1- IPM, 2- OFX A2) antibiyotikler 3- NET, 4- AMC.

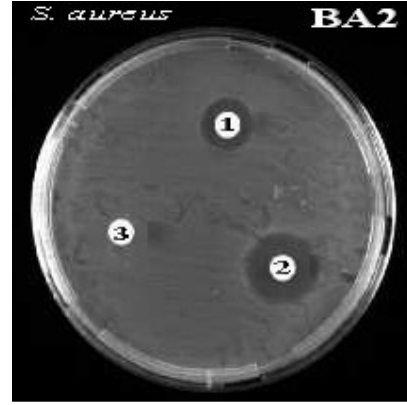


Resim 6.6. *C. albicans* ATCC 10231'in üremesi üzerine antifungal amfoterisin B (AFB)'nin etkisi; 1- 30 µg/kağıt disk.

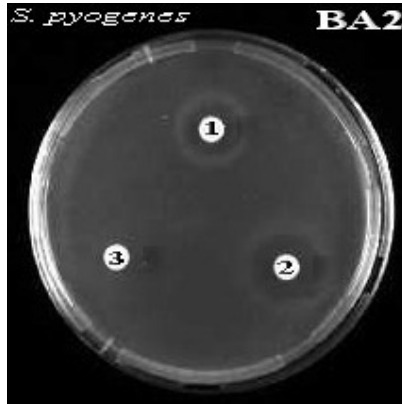
Resim 6.7. *C. albicans* ATCC 10231'in üremesi üzerine negatif kontrollerin (NEG) etkisi; 1-Saf su, 2-Etil asetat, 3-Kloroform:Metanol (1:1).



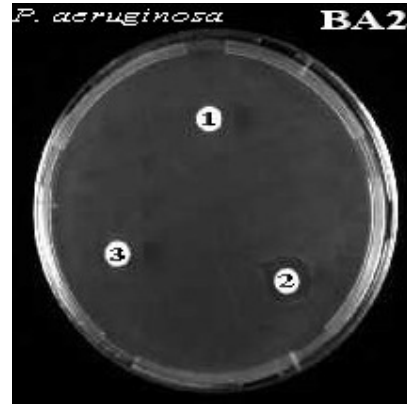
Resim 6.8. *E. coli* ATCC 25922'nin üremesi üzerine **BAH26** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



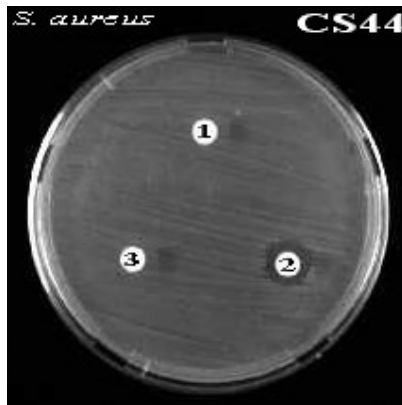
Resim 6.9. *S. aureus* ATCC 25923'ün üremesi üzerine **BA2** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



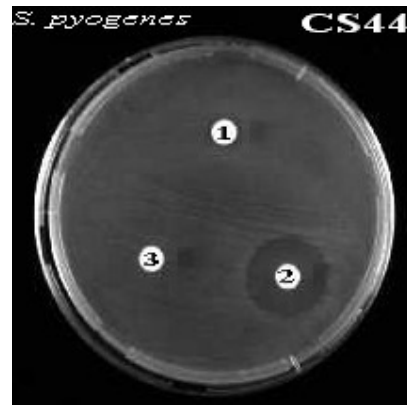
Resim 6.10. *S. pyogenes* ATCC 19615'in üremesi üzerine **BA2** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



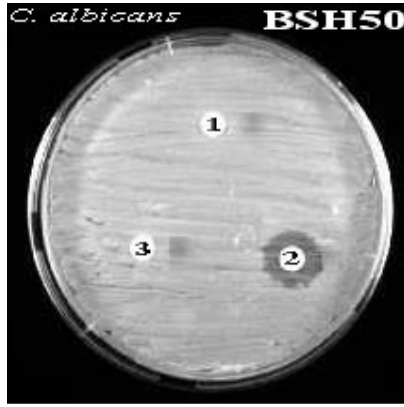
Resim 6.11. *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün üremesi üzerine **BA2** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



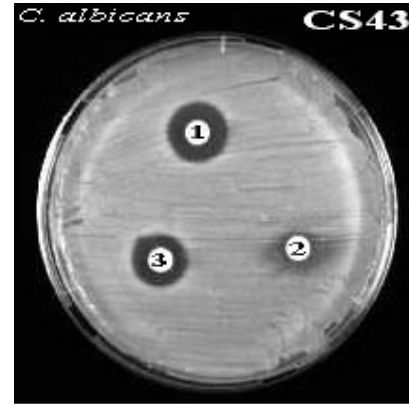
Resim 6.12. *S. aureus* ATCC 25923'ün üremesi üzerine **CS44** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



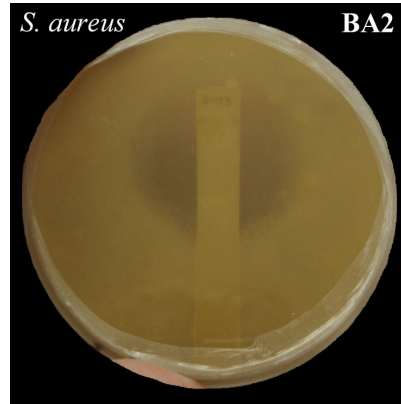
Resim 6.13. *S. pyogenes* ATCC 19615'in üremesi üzerine **CS44** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



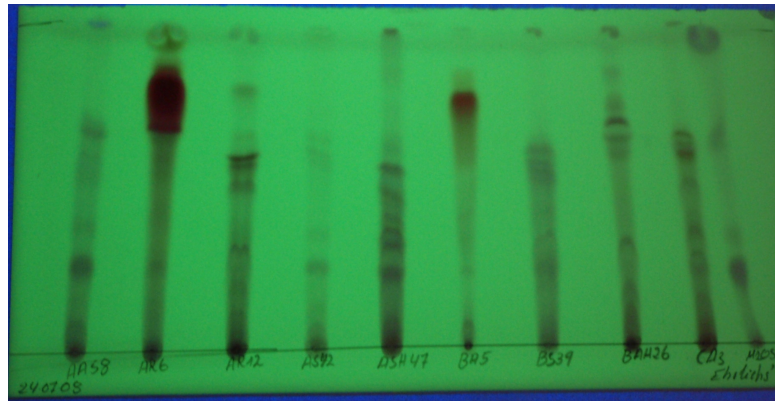
Resim 6.14. *C. albicans* ATCC 10231'in üremesi üzerine **BSH50** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



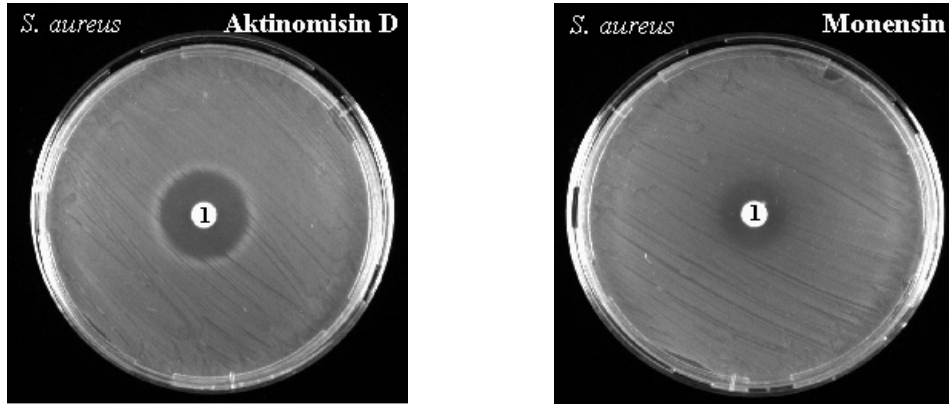
Resim 6.15. *C. albicans* ATCC 10231'in üremesi üzerine **CS43** ekstraktının etkisi; 1-Üst sıvı, 2-Etil asetat fazı, 3-Su fazı.



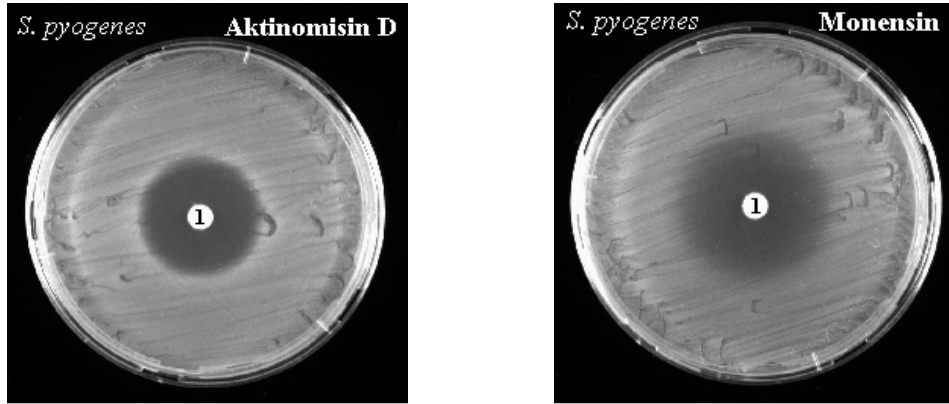
Resim 6.16. *Streptomyces* sp. BA2'den elde edilen ham ekstraktın biyootografi metodu ile *S. aureus* üzerine olan etkisi.



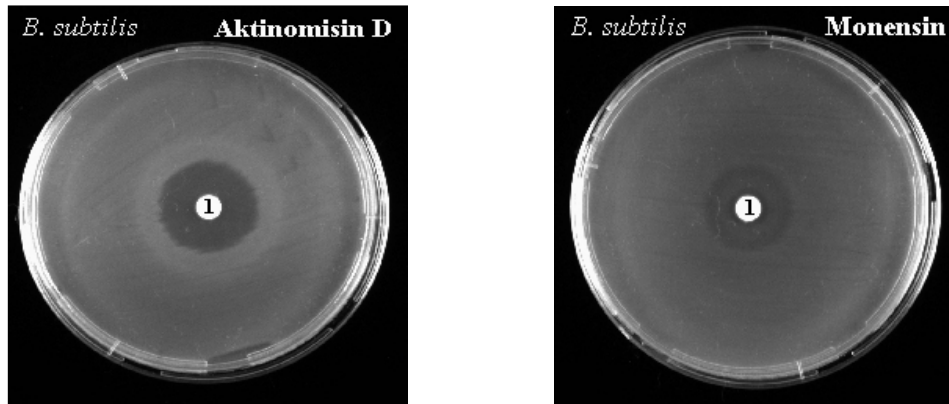
Resim 6.17. *Streptomyces* türlerinden elde edilen ham ekstraktların kimyasal tarama metodu ile araştırılması (Ehrlich's reaktifi püskürtüldükten sonra 254 nm altında kromatogramların görüntüsü).



Resim 6.18. *S. aureus* ATCC 25923'ün üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi; 1- 40 µg/kağıt disk.



Resim 6.19. *S. pyogenes* ATCC 19615'in üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi; 1- 40 µg/kağıt disk.



Resim 6.20. *B. subtilis* ATCC 11774'ün üremesi üzerine Aktinomisin D (170) ve monensinin etkisi; 1- 40 µg/kağıt disk.

7. İLAVELER

İlaveler I. Renklendirici Reaktiflerin Bileşimi

I.1. Anisaldehit/Sülfürik Asit Reaktifi

| | | |
|----------------------|-------|-------|
| Anisaldehit | | 1 mL |
| Metanol | | 85 mL |
| Asetik asit | | 14 mL |
| Sülfürik asit (% 98) | | 1 mL |

I.2. Ehrlich's Reaktifi

| | | |
|---------------------------|-------|-------|
| 4-dimetilaminobenzaldehit | | 1 g |
| HCl (% 37) | | 25 mL |
| Metanol | | 75 mL |

I.3. Ninhidrin Reaktifi

| | | |
|--------------------------------|-------|-------|
| Ninhidrin | | |
| (2,2-dihydroxyindan-1,3 dion) | | 0,3 g |
| <i>iso</i> -propanol | | 95 mL |
| Collidin (2,4,6-trimetilpidin) | | 5 mL |
| Asetik asit (% 96) | | 5 mL |

I.4. Potasyum Permanganat (KMnO₄) Reaktifi

| | | |
|--------------------------------|-------|--------|
| KMnO ₄ | | 3 g |
| K ₂ CO ₃ | | 20 g |
| NaOH (% 5) | | 5 mL |
| Saf su | | 300 mL |

I.5. İyot (I₂) Buharı

| | | |
|----------------|-------|-------|
| I ₂ | | 2 g |
| Silika jel | | 100 g |

I.6. Palladyum (II) Klorür Reaktifi

| | | |
|-------------------|-------|---------|
| PdCl ₂ | | 0,5 g |
| Saf su | | 100 mL |
| HCl (% 25) | | 5 damla |

I.7. Vanilin/Sülfürik Asit Reaktifi

| | | |
|------------------------------------------|-------|-------|
| Vanilin | | 0,5 g |
| H ₂ SO ₄ (Derişik) | | 80 mL |
| Etanol | | 20 mL |

I.8. Orcin Reaktifi

| | | |
|-------------------------|-------|---------|
| Orcinol | | 0,1 g |
| HCl (Derişik) | | 40,7 mL |
| FeCl ₃ (% 1) | | 1 mL |
| Saf su | | 100 mL |

İlaveler II. Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimi.**II.1. Nutrient Broth (NB)**

| | | |
|----------|-------|---------|
| Pepton | | 5 g |
| Et özütü | | 3 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.2. Nutrient Agar (NA)

| | | |
|----------|-------|---------|
| Pepton | | 5 g |
| Et özütü | | 3 g |
| Agar | | 15 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.3. Mueller Hinton Broth (MHB)

| | | |
|----------------|-------|---------|
| Mueller Hinton | | 23 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.4. Mueller Hinton Agar (MHA)

| | | |
|----------------|-------|---------|
| Mueller Hinton | | 23 g |
| Agar | | 17,5 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.5. Sabouraud %2 Dextrose Broth (%2SDB)

| | | |
|------------------------------|-------|---------|
| Sabouraud % 2 Dextrose Broth | | 30 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.6. Sabouraud % 4 Dextrose Agar (%4SDA)

| | | |
|-----------------------------|-------|---------|
| Sabouraud % 4 Dextrose Agar | | 65 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.7. Tryptone Soya Broth (TSB)

| | | |
|---------------------|-------|---------|
| Tryptone Soya Broth | | 30 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.8. Tryptone Soya Broth (TSA)

| | | |
|---------------------|-------|---------|
| Tryptone Soya Broth | | 30 g |
| Agar | | 17,5 g |
| Saf su | | 1000 mL |

II.9. M₂ Broth (M₂B)

| | | |
|----------------|-------|--------------------|
| Malt Ekstrakt | | 10 g |
| Yeast Ekstrakt | | 4 g |
| Glikoz | | 4 g |
| Musluk Suyu | | 1000 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |

İlaveler II. Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimi (Devamı).**II.10. M₂ Agar (M₂A)**

| | | |
|----------------|-------|--------------------|
| Malt Ekstrakt | | 10 g |
| Yeast Ekstrakt | | 4 g |
| Glikoz | | 4 g |
| Musluk Suyu | | 1000 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |
| Agar | | 18 g |

II.11. M Test Agar (MTA)

| | | |
|----------------|-------|--------------------|
| Malt Ekstrakt | | 10 g |
| Yeast Ekstrakt | | 4 g |
| Glikoz | | 4 g |
| Saf Su | | 1000 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |
| Agar | | 20 g |

II.12. Sabouraud Agar (SA)

| | | |
|--------|-------|--------------------|
| Glikoz | | 40 g |
| Pepton | | 10 g |
| Saf Su | | 1000 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |
| Agar | | 15 g |

II.13. M₂⁺ Broth (M₂⁺B)

| | | |
|------------------------|-------|--------------------|
| Malt Ekstrakt | | 10 g |
| Yeast Ekstrakt | | 4 g |
| Glikoz | | 4 g |
| Yapay Deniz Suyu (YDS) | | 500 mL |
| Musluk Suyu | | 500 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |

II.14. M₂⁺ Agar (M₂⁺A)

| | | |
|------------------------|-------|--------------------|
| Malt Ekstrakt | | 10 g |
| Yeast Ekstrakt | | 4 g |
| Glikoz | | 4 g |
| Yapay Deniz Suyu (YDS) | | 500 mL |
| Musluk Suyu | | 500 mL |
| pH | | 7,8 (2 N NaOH ile) |
| Agar | | 18 g |

İlaveler II. Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimi (Devamı).**II.15. Bold's Basal Medium (BBM)**

| | | |
|--------------------------------------|-------|---------|
| NaNO ₃ | | 0,250 g |
| KH ₂ PO ₄ | | 0,175 g |
| K ₂ HPO ₄ | | 0,075 g |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | | 0,075 g |
| NaCl | | 0,025 g |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | | 0,025 g |
| Fe-EDTA Stok Çözeltisi | | 1,0 mL |
| Eser Element Çözeltisi II | | 1,0 mL |
| Saf Su | | 1000 mL |

II.16. Bold's Basal Medium Agar (BBMA)

| | | |
|--------------------------------------|-------|---------|
| NaNO ₃ | | 0,250 g |
| KH ₂ PO ₄ | | 0,175 g |
| K ₂ HPO ₄ | | 0,075 g |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | | 0,075 g |
| NaCl | | 0,025 g |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | | 0,025 g |
| Fe-EDTA Stok Çözeltisi | | 1,0 mL |
| Eser Element Çözeltisi II | | 1,0 mL |
| Saf Su | | 1000 mL |
| Agar | | 18 g |

Hazırlanan bütün besiyerleri; 1,2 bar ve 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı.

İlaveler III. Yapay Deniz Suyunun (YDS) Bileşimi (10 L Musluk Suyunda)

III.1. Yapay Deniz Suyu (YDS)

| | | |
|--------------------------------------|-------|---------|
| Demir sitrat | | 1 g |
| NaCl | | 194,5 g |
| MgCl ₂ •6H ₂ O | | 88 g |
| Na ₂ SO ₄ | | 32,4 g |
| CaCl ₂ | | 18 g |
| Na ₂ HPO ₄ | | 0,08 g |
| SiO ₂ | | 0,15 g |
| Eser Element Çözeltisi I | | 10 mL |
| Stok Çözelti | | 100 mL |

III.2. YDS için Eser Element Çözeltisi I (1 L Saf Suda)

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|
| H ₃ BO ₃ | | 0,611 g |
| MnCl ₂ | | 0,389 g |
| CuSO ₄ | | 0,056 g |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O | | 0,056 g |
| Al ₂ (SO ₄) ₃ •18H ₂ O | | 0,056 g |
| NiSO ₄ •6H ₂ O | | 0,056 g |
| Co(NO ₃) ₃ •6H ₂ O | | 0,056 g |
| TiO ₂ | | 0,056 g |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O | | 0,056 g |
| LiCl | | 0,028 g |
| SnCl ₂ | | 0,028 g |
| KI | | 0,028 g |

III.3. YDS için Stok Çözelti (2 L Saf Suda)

| | | |
|--------------------------------------|-------|--------|
| KCl | | 110 g |
| NaHCO ₃ | | 32 g |
| KBr | | 16 g |
| SrCl ₂ •6H ₂ O | | 6,8 g |
| H ₃ BO ₃ | | 4,4 g |
| NaF | | 0,48 g |
| NH ₄ NO ₃ | | 0,32 g |

İlaveler IV. BBM için Gerekli Çözeltilerin Bileşimi.

IV.1. Eser Element Çözeltisi II

| | | |
|-----------|-------|-------|
| Çözelti A | | 10 mL |
| Çözelti B | | 10 mL |
| Saf su | | 80 mL |

IV.2. Çözelti A

| | | |
|------------------------------------------------------|-------|---------|
| MnSO ₄ •H ₂ O | | 16,9 mg |
| Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O | | 13,0 mg |
| Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O | | 10,0 mg |
| Saf su | | 10 mL |

IV.3. Çözelti B

| | | |
|--------------------------------------|-------|---------|
| CuSO ₄ •5H ₂ O | | 5,0 mg |
| H ₃ BO ₃ | | 10,0 mg |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O | | 10,0 mg |
| Saf su | | 10 mL |

IV.4. Fe-EDTA Stok Çözeltisi

| | | |
|--------------------------------------|-------|--------|
| FeSO ₄ •7H ₂ O | | 0,7 g |
| EDTA | | 0,93 g |
| Saf su (60 °C) | | 80 mL |
| Saf su | | 20 mL |

8. KAYNAKLAR

1. Baker, D., Mocek, U., Garr, C. Natural Products vs. Combinatorials: A Case Study, S.K. Wrigley, M.A. Hayes, R. Thomas, E.J.T. Chrystal, N. Nicholson, Eds.; Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical, Industries, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, **2000**, pp: 66–72.
2. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. Medicinal Plants in Therapy, *Bulletin of the World Health Organization*, **1985**, 63(6), 965–981.
3. Nakanishi K. An Historical Perspective of Natural Products Chemisrty, S.D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Aminoacids, Peptides, Porphyrins and Alkaloids, Vol. 4, *Elsevier Science Ltd.*, UK, **1999**. pp: XXIII-XXVIII.
4. Liang, L. Investigation of Secondary Metabolites of North Sea Bacteria: Fermentation, Isolation, Structure Elucidation and Bioactivity, *zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen*, **2003**, pp: 1–21.
5. Blair, C.E. Latin: a Living Language in the Service of the Study of Life, *A Journal of The California Native Plant Society*, *Fremontia*, **2003**, 31(1), 11–17.
6. Wink, M. A Short History of Alkaloids, M.F. Roberts, M. Wink, Eds.; Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, *Plenum Press*, New York, **1998**, pp: 11–44.
7. Meriçli, A.H. Fitoterapi ve Eczacılar için Önemi, *Aktüel Eczacı*, **1985**, 19, 18.
8. İlçim, A., Dığrak, M., Bağcı, E. Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, *Turkish Journal of Biology*, **1998**, 22, 119–125.
9. Demirezer, L.Ö. Fitoterapi, Besin-İlaç Etkileşimim, *Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetik Bölümü Beslenme Bilimleri Anabilim Dalı Yayını*, Ankara, **1999**, 1, pp: 72–84.
10. Grabley, S., Thiericke, R. Bioactive Agents from Fatural Sources: Trends in Discovery and Application, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **1999**, 64, 101–154.
11. Guo, D., Su Y., Dai, J., Guo H. Lecture on the 23rd *IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, Florence, **2002**.
12. Liu, J., Zhou, Y., Yu, C., Han, Y., Wu, F., Qi, B. The Structures of Huperzine A and B, Two New Alkaloids Exhibiting Marked Anticholinesterase Activity, *Canadian Journal of Chemistry*, **1986**, 64, 837–839.
13. Tang, X.C., He, X.C., Bai, D.L. Huperzine A: A Novel Acetylcholinesterase Inhibitor, *Drugs Future*, **1999**, 24, 647–663

14. Zeng, F., Jiang, H., Yang, Y., Chen, K., Ji, R. Progress in Synthesis and Structural Modification of Huperzine A, *Progress in Chemistry*, **2000**,12(1), 63–76.
15. Wall, M.E., Wani M.C. *153rd National Meeting of the American Chemical Society*, Miami Beach, Florida., **1967**, Paper No. M-006.
16. Bartsch, V. “Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom” in Das Taxol-Buch, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, New York, **2000**, 76–88.
17. Davies, J. In Praise of Antibiotics, *ASM News*, **1999**, 65, 304–310.
18. Fenical, W. Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource, *Chemical Reviews*, **1993**, 93(5), 1673–1683.
19. Terlau, H., Bach, G., Zeeck, A., Das medizinische Potential von Naturstoffen, *Urologe [B]*, Springer Verlag, Berlin, **2000**, 40, 266–270.
20. Sieradzki, K., Tomasz, A. A Highly Vancomycin-Resistant Laboratory Mutant of *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters*, **1996**, 142, 161–166.
21. Sutcliffe, J.A. Antibacterial Agents: Solutions for the Evolving Problems of Resistance, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, 13, 4159–4161.
22. Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioia, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. Isolation of Actinomycetes Producing Bioactive Substances from Water, Soil and Tree Bark Samples of the North-East of Algeria, *Journal of Medical Mycology*, 2005, 15, 45–51.
23. Pfaller, M.A, Wenzel, R. Impact of the Changing Epidemiology of Fungal Enfections in the 1990s., *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, **1992**, 11, 287–291.
24. Vandamme, E.J. Ed.; *Biotechnology of Industrial Antibiotics, Drug and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 22, *Marcel Dekker*, New York, **1984**.
25. Goodfellow, M., Williams, S.T., Mordarski, Eds.; *Actinomycetes in Biotechnology*, *Academic Press*, London, **1988**.
26. Omura, S. *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*, *Brock/Springer*, New York, **1992**.
27. Buckingham, J. *Dictionary of Natural Products*, England: Chapman and Hall/CRC, **1997**.
28. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002, *Journal of Natural Products*, **2003**, 66, 1022–1037.
29. Iwai, Y., Omura, S. Cultural Conditions for Screening of New Antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 34, 123–141.

30. Okami, Y., Hotta, A.K. Search and Discovery of New Antibiotics, M. Goodfellow, S.T. Williams, M. Mordarski Eds.; Actinomycetes in Biotechnology, *Academic Press*, London, **1988**, pp: 1–32.
31. Ouhdouch, Y., Barakata, M., Finance, C. Actinomycetes of Moroccan Habitats: Isolation and Screening for Antifungal Activities, *European Journal of Soil Biology*, **2001**, 37, 69–74.
32. Barakata, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K.H., Beaulieu, C. Characterization of Rhizospheric Soil ,Streptomycetes from Morroccan Habitats and Their Antimicrobial Activities, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 18, 49–54.
33. Demain, A.L. Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of Microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 52, 455–463.
34. Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W. Exploiting the Genetic Potential of Polyketide Producing Streptomycetes, *Journal of Biotechnology*, **2003**, 106, 221–232.
35. Tohyama, S., Eguchi, T., Dhakal, R.P., Akashi, T., Otsuka, M., Kakinuma, K. Genome-Inspired Search for New Antibiotics. Isolation and Structure Determination of New 28-Membered Polyketide Macrolactones, Hastoctacosanolides A and B, from *Streptomyces halstedii* HC34, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 3999–4005.
36. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. How Many Antibiotics are Produced by the Genus *Streptomyces*?, *Archives of Microbiology*, **2001**, 176, 386–390.
37. Bull, A, Ward A.C, Goodfellow, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: The Paradigm Shift, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2000**, 64, 573–606.
38. Waksman, S.A., Lechevalier, H.A. Neomycin, a New Antibiotic Active Against Streptomycin-Resistant Bacteria, Including Tuberculosis Organisms, *Science*, **1949**, 109, 305–307.
39. Gräfe, U. Biochemie der Antibiotika: Struktur–Biosynthese–Wirkmechanismus, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, New York, **1992**, 42.
40. Beppu, T. Secondary Metabolites as Chemical Signals for Cellular Differentiation, *Gene*, **1992**, 115, 159–165.
41. Trossell, K.B.G. Natural Product Chemistry “A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach”, Second Edition, *Swedish Pharmaceutical Press*, Stockholm, Sweden, **1997**, pp: 16–17.
42. Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their use in the Isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology*, **1929**, 10, 226–236.

43. Adremont, A., Cropet, D., Courvalin, P. Antibiotikaresistenz, *Spektrum der Wissenschaft*, **1997**, 7, 50–57.
44. Abraham, E.P. History of β -lactam Antibiotics, In A.L. Deamin, N.A. Solomen, (Hrsg.), Antibiotics Containing β -Lactam Structure, *Springer Verlag*, New York/Heidelberg/Berlin/Tokyo, **1983**, Bd. 1, pp: 1–14.
45. Rachakonda, S., Cartee, L. Challenges in Antimicrobial Drug Discovery and the Potential of Nucleoside Antibiotics, *Current Medicinal Chemistry*, **2004**, 11, 775–793.
46. von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Häbich, D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival?, *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**, 45(31), 5072–5129.
47. Barbachyn, M.R., Ford, C.W. Oxazolidinone Structure-Activity Relationships Leading to Linezolid, *Angewandte Chemie International Edition*, **2003**, 42(18), 2010–2023.
48. Raja, A., LaBonte, J., Lebbos, J., Kirkpatrick, P. Daptomycin, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2003**, 2, 943–944.
49. Nathan, C. Antibiotics at the Crossroads, *Nature*, **2004**, 431, 899–902.
50. Pinner, R.W., Teutsch, S.M., Simonsen, L., Klug, L.A., Graber, J.M., Clarke, M.J., Berkelman, R.L. Trends in Infectious Diseases Mortality in the United States, *The Journal of The American Medical Association*, **1996**, 275, 189–193.
51. Wenzel, R.P., Edmond, M.B. Managing Antibiotic Resistance, *The New England Journal of Medicine*, **2000**, 343(26), 1961–1963.
52. Leeb, M. Antibiotics: A Shot in the Arm, *Nature*, **2004**, 431, 892–893.
53. Clark, N.M., Hershberger, E., Zervosc, M.J., Lynch, J.P. Antimicrobial Resistance Among Gram-positive Organisms in the Intensive Care Unit, *Current Opinion in Critical Care*, 2003, 9(5), 403–412.
54. Butler, M.S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, *Journal of Natural Products*, **2004**, 67, 2141–2153.
55. Butler, M.S., Natural Products to Drugs: Natural Product Derived Compounds in Clinical Trials, *Natural Product Reports*, **2005**, 22, 162–195
56. Berdy, J. *Bioactive Metabolites from Microorganisms*, M.E. Bushell, U. Gräfe, Eds.; Progress in Microbiology, *Elsevier*, Amsterdam, **1989**, 27, pp: 3–25.
57. Betina, V. *The Chemistry and Biology of Antibiotics*, *Elsevier*, Amsterdam, **1983**.
58. Gustafson, K. Roman M., Fenical, W. The Macrolactins, a Novel Class of Antiviral and Cytotoxic Macrolides from a Deep-Sea Marine Bacterium, *Journal of the American Chemical Society*, **1989**, 111, 7519–7524.

59. Walsh, C. Molecular Mechanisms that Confer Antibacterial Drug Resistance, *Nature* **2000**, 406, 775–781.
60. Wright, G.D. Aminoglycoside-Modifying Enzymes, *Current Opinion in Microbiology*, **1999**, 2(5), 499–503.
61. Hakenbeck, R., Grebe, T., Zahner, D., Stock, J.B. β -Lactam Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Penicillin-Binding Proteins and non-Penicillin-Binding Proteins, *Molecular Microbiology*, **1999**, 33(4), 673–678.
62. Lambert, P.A. Cellular Impermeability and Uptake of Biocides and Antibiotics in Gram-positive Bacteria and Mycobacteria, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **2002**, 92, 46S–54S.
63. Wright, G.D. Mechanisms of Resistance to Antibiotics, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2003**, 7, 563–569.
64. Eady, E.A., Cove, J.H. Staphylococcal Resistance Revisited: Community-Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*—an Emerging Problem for the Management of Skin and Soft Tissue Infections, *Current Opinion in Infectious Diseases*, **2003**, 16, 103–124.
65. Salgado, C.D., Farr, B.M., Calfee, D.P. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors, *Clinical Infectious Diseases*, **2003**, 36(2), 131–139.
66. Deshpande, L.M., Moet, G.J., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, USA, **2004**, abstract C2-1360 (SENTRY antimicrobial surveillance program).
67. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J., Harrison, L.H., Lexau, C., Reingold, A., Lefkowitz, L., Cieslak, P.R., Cetron, M., Zell, E.R., Jorgensen, J.H., Schuchat, A., Increasing Prevalence of Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, *The New England Journal of Medicine*, **2000**, 343, 1917–1924.
68. Gordon, K.A., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., Comparison of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* Susceptibilities from Community-Acquired Respiratory Tract Infections and Hospitalized Patients with Pneumonia: Five-Year Results for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2003**, 46(4), 285–289.
69. Bouchillon, S.K., Hoban, D.J., Johnson, J.L., Johnson, B.M., Butler, D.L., Saunders, K.A., Miller, L.A., Poupard, J.A. In vitro Activity of Gemifloxacin and Contemporary Oral Antimicrobial Agents Against 27,247 Gram-positive and Gram-negative Aerobic Isolates: a Global Surveillance Study, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2004**, 23(2) 181–196.
70. AJIC special article, National Nosocomial Infections Surveillance(NNIS) System, Report, Data Summary from January 1992 Through June 2004, *NNIS Report AJIC*, **2004**, 32(8), 470–485, http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/nnis_pubs.html (15.05.2009).

71. Wiedemann, B. Die Epidemiologie Antibiotikaresistenter Bakterien und die Notwendigkeit, Validierte und Qualitätskontrollierte Testergebnisse zu Verwenden, *GIT LaborMedizin*, **1996**, 5, 217–226.
72. Davies, J. Inactivation of Antibiotics and The Dissemination of Resistance Genes, *Science*, **1994**, 264, 375–382.
73. Walsh, F.M., Amyes, S.G.B. Microbiology and Drug Resistance Mechanisms of Fully Resistant Pathogens, *Current Opinion in Microbiology*, **2004**, 7(5), 439–444.
74. Wood Mackenzie_s Productview: <http://www.woodmac.com/pharmabiotech>.
75. Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabut, K., Oguri, T., Tenover, F.C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain with Reduced Vancomycin Susceptibility, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1997**, 40, 135–146.
76. Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*, *Science*, **2003**, 302, 1569–1571.
77. Grabley, S., Thiericke R. Drug Discovery from Nature, *Springer Verlag*, Berlin, **1999**.
78. Clemett, D., Markham, A. Linezolid, *Drugs*, **2000**, 59(4), 815–827.
79. Borel, J.F., Feuer, C., Magnee C., Stähelin, H. Effects of the New Antilymphocytic Peptide Cyclosporin A in Animals, *Immunology*, **1977**, 32(6), 1017–1025.
80. Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., Hashimoto M., Taga, T. Structure of FK506, a Novel Immunosuppressant Isolated from *Streptomyces*, *Journal of the American Chemical Society*, **1987**, 109(16), 5031–5033.
81. McGuire, J.M., Bunch, R.L., Andersen, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., Smith, J.W. “Ilotycin,” a New Antibiotic, *Antibiotics & Chemotherapy*, **1952**, 2, 281–283.
82. Martin, S.F., Hida, T., Kym, P.R., Loft, M., Holgson, A. The Asymmetric Synthesis of Erythromycin B, *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 3193–3194.
83. Bryskier, A., Agourides, C., Chantot, J.F. In; Expanding Indications for the New Macrolides, Azalides and Streptogramins, S.H. Zinner, L.S. Young, J.F. Acar, H.C. Neu Eds.; *Marcel Dekker*, **1997**.
84. Malathum, K., Coque, T.M., Singh, K.V., Murray, B.E., In Vitro Activities of Two Ketolides, HMR 3647 and HMR 3004, Against Gram-Positive Bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1999**, 43(4), 930–936.

85. Ednie, L.M., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. Comparative Antianaerobic Activities of The Ketolides HMR 3647 (RU 66647) and HMR 3004 (RU 64004), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**, 41(9), 2019–2022.
86. Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.W.C., Rolinson, G.N. Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations, *Nature*, **1959**, 183, 257–258.
87. Spellberg, B., Powers, J.H., Brass, E.P., Miller, L.G., Edwards, J.E. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future, *Clinical Infectious Diseases*, **2004**, 38(9), 1279–1286.
88. Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development, *Journal of Natural Products*, **1997**, 60(1), 52–60.
89. Stafford, A. Lecture in the Symposium “Profiting from Nature by Leveraging Natural Product Drug Discovery”, London, **1999**.
90. Faulkner, D.J. Marine Natural Products, *Natural Product Reports*, **1996**, 13(2), 75–125.
91. Bernan, V.S., Greenstein, M., Maiese, W.M. Marine Microorganisms as a Source of New Natural Products, *Advances in Applied Microbiology*, **1997**, 43, 57–90.
92. Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., Hashimoto M., Taga, T. Structure of FK506, a Novel Immunosuppressant Isolated from *Streptomyces*, *Journal of the American Chemical Society*, **1987**, 109, 5031–5033.
93. Laatsch, H. *AntiBase 2008*, A Data Base for Rapid Structural Determination of Microbial Natural Products, **2008** and annual updates, Chemical Concepts, Weinheim, Germany; see <http://wwwuser.gwdg.de/~ucoc/laatsch/antibase.htm>.
94. Dictionary of Natural Products on CD-ROM, *Chapman & Hall Chemical Database*, **2004**.
95. Faulkner, D.J., Highlights of Marine Natural Products Chemistry (1972–1999), *Natural Product Reports*, **2000**, 17(1), 1–6.
96. Okami, Y., Potential Use of Marine Microorganisms for Antibiotics and Enzyme Production, *Pure and Applied Chemistry*, **1982**, 54(10), 1951–1962.
97. Bull, A.T., Goodfellow M., Slater, J.H. Biodiversity as a Source of Innovation in Biotechnology, *Annual Review of Microbiology*, **1992**, 46, 219–252.
98. Delong, E.F., Wu, K.Y., Prezelin B.B., Jovine, R.V.M. High Abundance of Archaea in Antarctic Marine Picoplankton, *Nature*, **1994**, 371, 695–697.
99. Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus *Salinospora*, *Angewandte Chemie International Edition*, **2003**, 42(3), 355–357.

100. Höfs, R., Walker, M., Zeeck, A. Hexacyclinic acid, a Polyketide from *Streptomyces* with a Novel Carbon Skeleton, *Angewandte Chemie International Edition*, **2000**, 39(18), 3258–3261.
101. Grond, S., Papastavrou, I., Zeeck, A. Novel α -L-Rhamnopyranosides from a Single Strain of *Streptomyces* by Supplement-Induced Biosynthetic Steps, *European Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 2002(19), 3237–3242.
102. Zähler H., Fiedler, H.P. The Need for New Antibiotics: Possible Ways Forward, P.A. Hunter, G.K. Darby, N.J. Russell, Eds.; Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends, 53rd Symposium of the Society for General Microbiology, *Cambridge University Press*, Cambridge, England, **1995**, pp: 67–84.
103. Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *Journal of Natural Products*, **2007**, 70, 461–477.
104. Peláez, F., The Historical Delivery of Antibiotics from Microbial Natural Products-Can History Repeat?, *Biochemical Pharmacology*, **2006**, 71, 981–990
105. Telefoncu, A. Biyoteknoloji, *Ege Üniversitesi Basımevi*, No: 152, Bornova-İzmir, **1995**, pp: 162–164.
106. Demain, A.L., Fang, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **2000**, 69, 1–39.
107. Grabley, S., Thiericke, R. Recent Developments in Drug Discovery Technologies, S. Grabley, R. Thiericke Eds.; Drug Discovery from Nature, *Springer*, Berlin, **1999**, pp: 38–48.
108. Zähler, H., Drautz, H., Weber, W. Novel Approaches to Metabolite Screening, J.D. Bu'Lock, L.J. Nisbet, D.J. Winstanley Eds, Bioactive Microbial Products: Search and Discovery, *Academic Press*, New York, **1982**, pp: 51–70.
109. Grabley, S., Thiericke, R., Zeeck, A. The Chemical Screening Approach, S. Grabley, R. Thiericke Eds.; Drug Discovery from Nature, *Springer-Verlag*, Heidelberg. **1999**, pp: 124–148.
110. Fiedler, H.P., Zähler, H. Screening for New Secondary Metabolites From Microorganisms, V. Braun, F. Götz, Eds.; Microbial Fundamentals of Biotechnology, *WILEY-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, **2001**, pp: 16–51.
111. Bérdy, J. Are Actinomycetes Exhausted as a Source of Secondary Metabolites?, *Biotekhnologiya*, **1995**, 8, 13–34.
112. Hill, D.C., Wrigley, S.K., Nisbet, L.J. Novel Screen Methodologies for Identification of New Microbial Metabolites with Pharmaceutical Activity, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **1998**, 59, 73–121.

113. Umezawa, S., Tsuchiya, T., Tatsuta, K., Horiuchi, Y., Usui, T., Umezawa, H., Hamada, M., Yagi, A. A New Antibiotic, Dienomycin. I. Screening Method, Isolation and Chemical Studies, *The Journal of Antibiotics*, **1970**, 23, 20–27.
114. Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., Masuma, R. A New Alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin, Taxonomy, Fermentation, Isolation and Preliminary Characterization, *The Journal of Antibiotics*, **1977**, 30, 275–282.
115. Drautz, H., Zähler, H. A New Method of Screening for Secondary Metabolites in Streptomycetes. K.P. Schaal, G., Pulverer, Eds.; Actinomycetes, Zbl. Bakt. Suppl., Vol. 11, *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, **1981**, pp: 515–519.
116. Zähler, H., Drautz, H. Methods in the Search for New Secondary Metabolites from Microorganisms—a Comparison, R. Dahlbohm, and J.L.G., Nilsson, Eds.; VIII International Symposium on Medicinal Chemistry, Proceedings Vol 2, *Swedish Pharmaceutical Press*, Stockholm, **1985**, pp: 49–68.
117. Fiedler, H.-P. Biosynthetic Capacities of Actinomycetes. 1 Screening for Secondary Metabolites by HPLC and UV-Visible Absorbance Spectral Libraries, *Natural Product Letters*, **1993**, 2, 119–128.
118. Grote, R., Chen, Y., Zeeck, A., Chen, Z., Zähler, H. Pyridazomycin, a New Antifungal Antibiotic Produced by *Streptomyces violaceoniger*, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 595–601.
119. Rapp, C., Jung, G., Katzer, W., Loeffler, W. Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an Antifungal Dipeptide with an Unusual Chlorine-containing Amino Acid, *Angewandte Chemie International Edition*, **1988**, 27(12), 1733–1734.
120. Potterat, O., Stephan, H., Metzger, J. W., Gnau, V., Zähler, H., Jung, G. Aborycin—A Tricyclic 21-Peptide Antibiotic Isolated from *Streptomyces griseoflavus*, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1994**, 1994, 741–743.
121. Fiedler, H.-P., Schüz, T., Decker, H. An Overview of Nikkomycins: History, Biochemistry, and Applications, J.W. Rippon, and R.A. Fromtling, Eds.; Cutaneous Antifungal Agents: Compounds in Clinical Practice and Development, *Marcel Dekker*, New York, **1993**, pp: 325–352.
122. Fauth, U., Zähler, H., Mühlenfeld, A., Achenbach, H. Galbonolides A and B – Two non-Glycosidic Antifungal Macrolides. *The Journal of Antibiotics*, **1986**, 39, 1760–1764.
123. Achenbach, H., Mühlenfeld, A., Fauth, U., Zähler, H. The Galbonolids. Novel, Powerful Antifungal Macrolides from *Streptomyces galbus* ssp. *Eurothermus*, *Annals of The New York Academy of Sciences*, **1988**, 544, 128–140.
124. Keller-Schierlein, W., Hagman, L., Zähler, H., Huhn, W. Maduraferrin, a Novel Siderophore from *Actinomadura madurae*, *Helvetica Chimica Acta*, **1988**, 71, 1528–1540.

125. Meiwes, J., Fiedler, H.-P., Haag, H., Zähler, H., Konetschny-Rapp, S., Jung, G. Isolation and Characterization of Staphyloferrin A, a Compound with Siderophore Activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459, *FEMS Microbiology Letters*, **1990**, 67, 201–206.
126. Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J., Zähler, H. Staphyloferrin A: a Structurally New Siderophore from Staphylococci, *European Journal of Biochemistry*, **1990**, 191, 65–74.
127. Drechsel, H., Freund, S., Nicholson, G., Haag, H., Jung, O., Zähler, H., Jung, G. Purification and Chemical Characterization of Staphyloferrin B, a Hydrophilic Siderophore from Staphylococci, *BioMetals*, **1993**, 6, 185–191.
128. Haag, H., Fiedler, H.-P., Meiwes, J., Drechsel, H., Jung, G., Zähler, H. Isolation and Biological Characterization of Staphyloferrin B, a Compound with Siderophore Activity from Staphylococci, *FEMS Microbiology Letters*, **1994**, 115, 125–130.
129. Seiffert, A., Zähler, H. Siderophore Production in Alkalophilic Bacilli, G. Kreysa, and A.J. Driesel, Eds.; Dechema Biotechnology Conferences, Vol. 5, VCH, Weinheim, **1992**, pp: 725–728.
130. Drechsel, H., Metzger, J., Freund, S., Jung, G., Boelart, J. R., Winkelmann, G. Rhizoferrin—a Novel Siderophore from the Fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *BioMetals*, **1991**, 4, 238–243.
131. Drechsel, H., Tschierske, M., Thieken, A., Jung, G., Zähler, H., Winkelmann, G. The Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin and It's Analogs Produced by Directed Fermentation, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **1995**, 14, 105–112.
132. Drechsel, H., Stephan, H., Lotz, R., Haag, H., Zähler, H., Hantke, K., Jung, G. Structure Elucidation of Yersiniabactin, a Siderophore from Highly Virulent *Yersinia* strains, *Liebigs Annalen*, **1995**, 1995, 1727–1733.
133. Cebulla, I. Gewinnung Komplexbildender Substanzen Mittels *Amycolatopsis orientalis*. *Doctoral Thesis*, Universität Tübingen, **1995**.
134. Andres, N., Wolf, H., Zähler, H., Rössner, E., Zeeck, A. Hormaomycin, a Novel Peptide Lactone with Morphogenetic Activity on *Streptomyces*, *Helvetica Chimica Acta*, **1989**, 72, 426–437.
135. Andres, N., Wolf, H., Zähler, H. Hormaomycin, a New Peptide Lactone Antibiotic Effective in Inducing Cytodifferentiation and Antibiotic Biosynthesis in Some *Streptomyces* species, *Zeitschrift für Naturforschung*, **1990**, 45c, 851–855.
136. Petersen, F., Zähler, H., Metzger, J.W., Freund, S., Hummel, R.-P. Germicidin, an Autoregulative Germination Inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551, *The Journal of Antibiotics*, **1993**, 46, 1126–1138.

137. Richter, M., Willey, J.M., Süssmuth, R., Jung, G., Fiedler, H.-P. Streptofactin, a Novel Biosurfactant with Aerial Mycelium Inducing Activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c, *FEMS Microbiology Letters*, **1998**, 163, 165–171.
138. Drautz, H., Zähler, H., Rohr, J., Zeeck, A. Urdamycins, New Angucycline Antibiotics from *Streptomyces fradiae*, I. Isolation, Characterization and Biological Properties. *The Journal of Antibiotics*, 39, **1986**, 1657–1669.
139. Zeeck, A., Rohr, J., Sheldrick, G.M., Jones, P.G., Paulus, E.F. Structure of the New Antibiotic and Cytotoxic Indicator Substance, Urdamycin A, *Journal of Chemical Research, (Synopses)* **1986**, 1986, 104–105.
140. Rohr, J. Zeeck, A. Urdamycins, New Angucycline Antibiotics from *Streptomyces fradiae*. II. Structural Studies of Urdamycins B to F, *The Journal of Antibiotics*, **1987**, 40, 459–467.
141. Rohr, J., Zeeck, A., Floss, H.G. Urdamycins, New Angucycline Antibiotics from *Streptomyces fradiae*, II. The Structures of Urdamycins C and D, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 126–129.
142. Rohr, J., Beale, J.M., Floss, H. Urdamycins, New Angucycline Antibiotics from *Streptomyces fradiae*. IV. Biosynthetic Studies of Urdamycins A–D, *The Journal of Antibiotics*, **1989**, 42, 1151–1157.
143. Korff, U. Strukturaufklärung, Synthese und Derivatisierung eines Pigments aus dem Stamm Tü 2484, *Doctoral Thesis*, Universität Tübingen, **1988**.
144. Alvarado-Kirigin, M. Monomeres und dimeres Cinnachinon aus *Streptomyces griseoflavus* (Tü 2484), *Doctoral Thesis*, Universität Tübingen, **1990**.
145. Keller-Schierlein, W., Geiger, A., Zähler, H., Brandl, M. The Esmeraldines A and B, Green Pigments from *Streptomyces antibioticus*, Strain Tü 2706, *Helvetica Chimica Acta*, **1988**, 71, 2058–2070.
146. Wessels, P., Göhr, A., Zeeck, A., Drautz, H., Zähler, H. Naphthgeranines, New Naphthoquinone Antibiotics from *Streptomyces* sp., *The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44, 1013–1018.
147. Ritzau, M., Drautz, H., Zähler, H., Zeeck, A. Metabolic Products of Microorganisms, 266. Serpentene, a Novel Polyene Carboxylic Acid from *Streptomyces*, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1993**, 1993, 433–435.
148. Hagmann, L., Keller-Schierlein, W., Wahl, B., Zähler, H. Pyridindolol Glucosides from *Streptomyces parvulus*, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 289–295.
149. Gröne, C. Strukturaufklärung der Depsichlorine: Neue Depsipeptid-Antibiotika aus *Streptomyces* Tü 1661, *Doctoral Thesis*, Universität Göttingen, **1991**.
150. Cullmann, H.J. Depsichlorine und Andere Metabolite aus *Streptomyces antibioticus* Tü 1661, *Doctoral Thesis*, Universität Tübingen, **1994**.

151. Keller-Schierlein, W., Müller, A., Hagmann, L., Schneider, U., Zähler, H. (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-2-propenoic Acid and (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-2-propenamide from *Streptomyces parvulus*, Strain Tü 2480, *Helvetica Chimica Acta*, **1985**, 68, 559–562.
152. Grote, R., Zeeck, A., Stümpfel, J., Zähler, H. Metabolic Products of Microorganisms, 256. Pyrrolams, New Pyrrolizidinones Produced by *Streptomyces olivaceus*, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1990**, 1990, 525–530.
153. Hoff, H., Drautz, H., Fiedler, H.-P., Zähler, H., Schultz, J.E., Keller-Schierlein, W., Philipps, S., Ritzau, M., Zeeck, A. Obscurolides, a Novel Class of Phosphodiesterase Inhibitors from *Streptomyces*. I. Production, Isolation, Structural Elucidation and Biological Activity of Obscurolides A1 to A4, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45, 1096–1107.
154. Potterat, O., Zähler, H., Metzger, J.W., Freund, S. 5-Phenylpentadienoicacid Derivatives from *Streptomyces* sp., *Helvetica Chimica Acta*, **1994**, 77, 569–574.
155. Keller-Schierlein, W., Bahnmüller, U., Dobler, M., Bielecki, J., Stümpfel, J., Zähler, H. Isolation and Structure Elucidation of Differolide, *Helvetica Chimica Acta*, **1986**, 69, 1833–1836.
156. Müller, A., Keller-Schierlein, W., Bielecki, J., Rak, G., Stümpfel, J., Zähler, H. (2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*R*)-2,3,4-Trihydroxy-6-methylcyclohexanone from Two Strains of Actinomycetes, *Helvetica Chimica Acta*, **1988**, 69, 1829–1832.
157. Rapp, C., Jung, G., Isselhorst-Scharr, C., Zähler, H. A New Member of the Class of Antibiotics with Thiotetronic Acid Structure Isolated from *Streptomyces olivaceus* Tü 3010, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1988**, 1988, 1043–1047.
158. Grote, R., Zeeck, A., Drautz, H., Zähler, H. Colabomycins, New Antibiotics of the Manumycin Group from *Streptomyces griseoflavus*, I. Isolation, Characterization and Biological Properties, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 1178–1185.
159. Grote, R., Zeeck, A., Beale Jr., J.M. Colabomycins, New Antibiotics of the Manumycin Group from *Streptomyces griseoflavus*. II. Structure of Colabomycin A, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 1186–1195.
160. Burkhardt, K., Fiedler, H.-P., Grabley, S., Thiericke, R., Zeeck, A. New Cineromycins and Musacins Obtained by Metabolite Pattern Analysis of *Streptomyces griseoviridis* (FH-S 1832), I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity, *The Journal of Antibiotics*, **1996**, 49, 432–437.
161. Grote, R., Zeeck, A., Drautz, H., Zähler, H. 2880-II, a Metabolite Related to Ferulic Acid from *Streptomyces griseoflavus*, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 1275–1276.
162. Niederer, D., Séquin, U., Drautz, H., Zähler, H. (3*S*,5*R*,6*E*,8*E*)-Deca-6,8-diene-1,3,5-triol, a New Metabolite from *Streptomyces fimbriatus* (Millard et Burr 1926), *Helvetica Chimica Acta*, **1990**, 73, 2129–2135.

163. Wessels, P. Strukturaufklärung neuer Naphthochinon-Antibiotika aus *Streptomyces* Tü 3556 und Beiträge zum Chemischen Screening mit Extrem Thermophilen Archaeobakterien, *Doctoral Thesis*, Universität Göttingen, **1990**.
164. Potterat, O., Zähler, H., Volkmann, C., Zeeck, A. Exfoliamycin and Related Metabolites, New Naphthoquinone Antibiotics from *Streptomyces exfoliatus*, *The Journal of Antibiotics*, **1993**, 46, 346–349.
165. Volkmann, C., Zeeck, A., Potterat, O., Zähler, H., Bohnen, F.-M., Herbst-Irmer, R. The Structures of the Exfoliamycins, *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48, 431–432.
166. Braun, D., Pauli, N., Séquin, U., Zähler, H. New Butenolides from the Photoconductivity Screening of *Streptomyces antibioticus* (Waksman and Woodruff) Waksman and Henrici 1948, *FEMS Microbiology Letters*, **1995**, 126, 37–42.
167. Fiedler, H.-P., Rohr, A., Zeeck, A. Elloramycins B, C, D, E and F: Minor Congeners of the Elloramycin Producer *Streptomyces olivaceus*, *The Journal of Antibiotics*, **1986**, 39, 856–859.
168. Fiedler, H.-P. Identification of New Elloramycins, Anthracycline-like Antibiotics, in Biological Cultures by High-Performance Liquid Chromatography and Diode Array Detection, *Journal of Chromatography A*, **1986**, 361, 432–436.
169. Rohr, J., Eick, S., Zeeck, A., Reuschenbach, P., Zähler, H., Fiedler, H.-P. Tetracenomycins B3 and D3, Key Intermediates of the Elloramycin and Tetracenomycin C Biosynthesis, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 1066–1073.
170. Geiger, A., Keller-Schierlein, W., Brandl, M., Zähler, H. Phenazines from *Streptomyces antibioticus* Strain Tü 2706, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41, 1542–1551.
171. König, W.A., Hahn, H., Rathmann, R., Hass, W., Keckeisen, A., Hagenmaier, H., Bormann, C., Dehler, W., Kurth, R., Zähler, H. Three Novel Amino Acids from the Nikkomycin Complex—Structure Elucidation and Synthesis, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1986**, 1986, 407–421.
172. Decker, H., Bormann, C., Fiedler, H.-P., Zähler, H., Heitsch, H., König, W.A. Isolation of New Nikkomycins from *Streptomyces tendae*, *The Journal of Antibiotics*, **1989**, 42, 230–235.
173. Heitsch, H., König, W.A., Decker, H., Bormann, C., Fiedler, H.-P., Zähler, H. Structure of the New Nikkomycins Pseudo-Z and Pseudo-J, *The Journal of Antibiotics*, **1989**, 42, 711–717.
174. Bormann, C., Mattern, S., Schrenpf, H., Fiedler, H.-P., Zähler, H. Isolation of *Streptomyces tendae* Mutants with an Altered Nikkomycin Spectrum, *The Journal of Antibiotics*, **1989**, 42, 913–918.

175. Decker, H., Walz, F., Bormann, C., Zähler, H., Fiedler, H.-P. Nikkomycins Wz and Wx, New Chitin Synthetase Inhibitors from *Streptomyces tendae*, *The Journal of Antibiotics*, **1990**, 43, 43–48.
176. Decker, H., Pfefferle, U., Bormann, C., Zähler, H., Fiedler, H.-P., van Pée, K.-H., Rieck, M., König, W.A. Enzymatic Bromination of Nikkomycin Z, *The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44, 626–634.
177. Schüz, T.C., Fiedler, H.-P., Zähler, H., Rieck, M., König, W.A. Nikkomycins Sz, Sx, Soz and Sox, New Intermediates Associated to the Nikkomycin Biosynthesis, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45, 199–206.
178. Decker, H., Zähler, H., Heitsch, H., König, W.A., Fiedler, H.-P. Structureactivity Relationships of the Nikkomycins, *Journal of General Microbiology*, **1991**, 137, 1805–1813.
179. Fiedler, H.-P., Kulik, A., Schüz, T.C., Volkmann, C., Zeeck, A. Juglomycin Z, a New Naphthoquinone Antibiotic from *Streptomyces tendae*, *The Journal of Antibiotics*, **1994**, 47, 1116–1122.
180. Ritzau, M., Philipps, S., Zeeck, A., Hoff, H., Zähler, H. Obscurolides, a Novel Class of Phosphodiesterase Inhibitors from *Streptomyces*. II. Minor Components Belonging to the Obscurolide B to D Series, *The Journal of Antibiotics*, **1993**, 46, 1625–1628.
181. Volkmann, C., Hartjen, U., Zeeck, A., Fiedler, H.-P. Naphthgeranine F, a Minor Congener of the Naphthgeranine Group Produced by *Streptomyces violaceus*, *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48, 522–524.
182. Blum, S., Fiedler, H.-P., Groth, I., Kempter, C., Stephan, H., Nicholson, G., Metzger, J.W., Jung, G. Echinoserine, a New Member of the Quinoxaline Group, Produced by *Streptomyces tendae*, *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48, 619–625.
183. Blum, S., Groth, I., Rohr, J., Fiedler, H.-P. Biosynthetic Capacities of Actinomycetes. 5. Dioxolides, Novel Secondary Metabolites from *Streptomyces tendae*, *Journal of Basic Microbiology*, **1996**, 36, 19–25.
184. Pfefferle, C., Breinholt, J., Gürtler, H., Fiedler, H.-P. 1-Hydroxy-4-methoxy-2-naphthoic Acid, a Herbicidal Compound Produced by *Streptosporangium cinnabarinum* ATCC 31213, *The Journal of Antibiotics*, **1997**, 50, 1067–1068.
185. Hölzel, A., Kempter, C., Metzger, J.W., Jung, G., Groth, I., Fritz, T., Fiedler, H.-P. Spirofungin, a New Antifungal Antibiotic from *Streptomyces violaceusniger* Tü 4113, *The Journal of Antibiotics*, **1998**, 51, 487–495.
186. Fiedler, H.-P., Nega, M., Pfefferle, C., Groth, I., Kempter, C., Stephan, H., Metzger, J.W. Kanchanamycins, New Polyol Macrolide Antibiotics Produced by *Streptomyces olivaceus* Tü 4018, I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities, *The Journal of Antibiotics*, **1996**, 49, 101–107.

187. Stephan, H., Kempter, C., Metzger, J.W., Jung, G., Potterat, O., Pfefferle, C., Fiedler, H.-P. Kanchanamycins, New Polyol Macrolide Antibiotics Produced by *Streptomyces olivaceus* Tü 4018, II. Structure Elucidation, *The Journal of Antibiotics*, **1996**, 49, 109–113.
188. Pfefferle, C., Kempter, C., Metzger, J.W., Fiedler, H.-P. (*E*)-4-oxonon-2-enoic acid, an Antibiotically Active Fatty Acid Produced by *Streptomyces olivaceus* Tü 4018, *The Journal of Antibiotics*, **1996**, 49, 135–137.
189. Maier, A., Müller, J., Schneider, P., Fiedler, H.-P., Groth, I., Tayman, F.S.K., Teltschik, F., Günther, C., Bringmann, G. (*2E,4Z*)-Decadienoic Acid and (*2E,4Z,7Z*)-Decatrienoic Acid, Two Herbicidal Metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 6105, *Pesticide Science*, **1999**, 55, 733–739.
190. Breinholt, J., Kulik, A., Gürtler, H., Fiedler, H.-P. Tigloside: a New Tigloylated Tetrasaccharide from *Amycolatopsis* sp., *Acta Chemica Scandinavica*, **1998**, 52, 1239–1242.
191. Pfefferle, C., Breinholt, J., Olsen, C.E., Kroppenstedt, R.M., Gürtler, H., Fiedler, H.-P. Kyanomycin, a Complex of Unusual Anthracycline-Phospholipid Hybrid from *Nonomuria* species, *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 295–298.
192. Schimana, J., Fiedler, H.-P., Groth, I., Süßmuth, R., Beil, W., Walker, M., Zeeck, A. Simocyclinones, Novel Cytostatic Angucyclinone Antibiotics Produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040, I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities, *The Journal of Antibiotics*, **2000**, 53, 779–787.
193. Schimana, J., Walker, M., Zeeck, A., Fiedler, H.-P. Simocyclinones: Diversity of Metabolites is Dependent on Fermentation Conditions, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2001**, 27, 144–148.
194. Holzenkämpfer, M., Walker, M., Zeeck, A., Schimana, J., Fiedler, H.-P. Simocyclinones, Novel Cytostatic Angucyclinone Antibiotics Produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040, II. Structure Determination and Biosynthesis, *The Journal of Antibiotics*, **2002**, 55(3), 301–307.
195. Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H.-P., Schmidt, J. Li, S.-M., Heide, L. Cloning and Analysis of the Simocyclinone Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040, *Archives of Microbiology*, **2002**, 178, 102–114.
196. Kuhn, W. Untersuchungen zur Produktion der Esmeraldine und der Physiologie von *Streptomyces antibioticus*, *Doctoral Thesis*, Universität Tübingen, **1993**.
197. Buckingham, J., Thompson, S. Dictionary of Natural Products and Other Information Sources for Natural Products Scientists, *Royal Society of Chemistry*, London, **1997**, 53–67.
198. Bringmann, G., Messer, K., Saeb, W., Peters, E.M., Peters, K. The Absolute Configuration of (+)-isoshinanolone and in Situ LC–CD Analysis of Its Stereoisomers from Crude Extracts, *Phytochemistry*, **2001**, 56, 387–391.

- 199.** Bringmann, G., Lang, G. Full Absolute Stereostructures of Natural Products Directly From Crude Extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD 'Triad' W.E.G. Müller Ed.; Marine Molecular Biotechnology, *Springer Verlag*, Berlin, **2003**, pp: 89–116
- 200.** Oka, I., Frauendorf, H., Laatsch, H. "37. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie", *Poster*, Leipzig, **2004**.
- 201.** Bringmann, G., Busemann, S. The Quantumchemical Calculation of CD Spectra: The Absolute Configuration of Chiral Compounds from Natural or Synthetic Origin, P. Schreier, M. Herderich, H.U. Humpf, W. Schwab, Eds. Natural Product Analysis, Vieweg, *Braunschweig*, **1998**, pp: 195–212.
- 202.** Williams, S.T., Goodfellow, M., Aderson, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici **1943**, S.T., Williams, M.E. Sharpe, J.P. Holt, Eds.; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, *Williams and Wilkins*, **1989**, 4, 2452–2492
- 203.** Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A. Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen, *Applied and Environmental Microbiology*, **1993**, 59, 3889–3905.
- 204.** Miyadoh, S. Research on Antibiotic Screening in Japan Over the Last Decade: a Producing Microorganism Approach, *Actinomycetologica*, **1993**, 7, 100–106.
- 205.** Goodfellow, M., Williams, E. New Strategies for the Selective Isolation of Industrially Important Bacteria, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **1986**, 4, 213–262.
- 206.** Mehling, A., Wehmeir, F., Piepersberg, W. Nucleotide Sequence of Streptomycete 16S Ribosomal DNA: Towards a Specific Identification System for Streptomyces Using PCR, *Microbiology*, **1995**, 141, 2139–2147.
- 207.** Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R., Sioud, S., Salem, M., Bejar, S. Isolation, Purification and Partial Characterization of Antibacterial Activities Produced by a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US24 strain, *Research in Microbiology*, **2003**, 154, 345–352.
- 208.** Fguira, L.F.B., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R.B., Mellouli, L., Laatsch, H. Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities of Newly Isolated *Streptomyces* sp. strain US80, *Research in Microbiology*, **2005**, 156, 341–347.
- 209.** Zheng, Z., Zeng W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., Su, W. Detection of Antitumor and Antimicrobial Activities in Marine Organism Associated Actinomycetes Isolated from the Taiwan Strait, China, *FEMS Microbiology Letters*, **2000**, 188, 87–91.
- 210.** Hayakawa, M., Yoshida, Y., Limura, Y. Selective Isolation of Bioactive Soil Actinomycetes Belonging to the *Streptomyces violaceusniger* Phenotypic Cluster, *Journal of Applied Microbiology*, **2004**, 96, 973–981.

211. Cao, L., Qui, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S. Isolation and Characterization of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Roots, *Letters in Applied Microbiology*, **2004**, 39, 425–430.
212. Birber, B., Nuske, J., Ritzau, M., Grafe, U. Alnumycin, a New Naphthoquinone Antibiotic Produced by an Endophytic *Streptomyces* sp, *The Journal of Antibiotics*, **1998**, 51, 381–382.
213. Chu, M., Mierzwa, R., He, L., Xu, L., Gentile, F., Terracciano, J. et al. Isolation and Structure Elucidation of Two Novel Deformylase Inhibitors Produced by *Streptomyces* sp., *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 3549–3551.
214. Sujatha, P., Bapi-Raju, K.V.V.S.N., Ramana, T. Studies on a New Marine Streptomycete BT-408 Producing Polyketide Antibiotic SBR-22 Effective Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Microbiological Research*, **2005**, 160, 119–126.
215. Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong, S. Isolation of Endophytic Actinomycetes from Selected Plants and Their Antifungal Activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2003**, 19, 381–385.
216. Hossain, M.S., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Mondol, M.A.M., Bhuiyan, M.S.A., Gray, A.I., Flores, M.E., Rashid, M.A. Amides from the Fungus *Streptomyces hygroscopicus* and Their Antimicrobial Activity, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2147–2151.
217. Bouizgarne, B., El-Hadrami, I., Ouhdouch, Y. Novel Production of Isochainin by a Strain of *Streptomyces* sp. Isolated from Rhizosphere Soil of the Indigineous Moroccan Plant *Argania spinosa* L., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2006**, 22, 423–429.
218. Maskey, R.P., Grün-Wollny, I., Fiebig, H.H., Laatsch, H. Akashins A, B, and C: Novel Chlorinated Indigoglycosides from *Streptomyces* sp. GW48/1497, *Angewandte Chemie International Edition*, **2002**, 41(4), 597–599.
219. Abdelfattah, M., Maskey, R.P., Asolkar, R.N., Grün-Wollny, I., Laatsch, H. Seitomycin: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity of a New Angucycline Antibiotic from a Terrestrial Streptomycete, *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 56(6), 539–542.
220. Fotso, S., Maskey, R.P., Grün-Wollny, I., Schulz, K.-P., Munk, M., Laatsch, H. Bhimamycin A-E and Bhimanone: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity of Novel Quinone Antibiotics from a Terrestrial Streptomycete, *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 56(11), 931–941.
221. Maskey, R.P., Grün-Wollny, I. Laatsch, H. Isolation and Structure Elucidation of Diazaquinomycin C from a Terrestrial *Streptomyces* sp. and Confirmation of the Akashin Structure, *Natural Product Research*, **2005**, 19(2), 137–142.

222. Apichaisataienchote, B., Korpraditskul, V., Fotso, S., Laatsch, H. Aerucine, an Antibiotic from *Streptomyces fradiae* SU-1, *Kasetsart Journal (Natural Science)*, **2006**, 40, 335–340.
223. Maskey, R.P., Fotso, S., Sevvana, M., Uson, I., Grün-Wollny, I., Laatsch, H. Kettapeptin: Isolation, Structure Elucidation and Activity of a New Hexadepsipeptide Antibiotic from a Terrestrial *Streptomyces* sp., *The Journal of Antibiotics*, **2006**, 59(5), 309–314.
224. El-Gendy, M.M.A., Shaaban, M., Shaaban, K.A., El-Bondkly, A.M. Laatsch, H. Essramycin: A First Triazolopyrimidine Antibiotic Isolated from Nature, *The Journal of Antibiotics*, **2008**, 61(3), 149–157.
225. Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., Asada, M. Pladienolides, New Substances from Culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107, III. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activities, *The Journal of Antibiotics*, **2004**, 57(3), 188–196.
226. Koizumi, F., Hasegawa, A., Yoshida, M., Matsuda, Y., Nakanishi, S. EI-2346, a Novel Interleukin-1 β Converting Enzyme Inhibitor Produced by *Streptomyces* sp. E-2346, II. Structure Elucidation, *The Journal of Antibiotics*, **2004**, 57(4), 289–290.
227. Graziani, E.I., Summers, M.Y., Janso, J.E., Yu, K., Bernan, V.S., Greenstein, M., Carter, G.T. Isolation, Structure Determination and Biological Activity of 15-Deoxy-7,32-*O*-didesmethylrapamycin from the Soil Actinomycete LL-D45042, *The Journal of Antibiotics*, **2004**, 57(7), 462–464.
228. Fukuda, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Tomoda, H., Omura, S., Phenatic Acids A and B, New Potentiators of Antifungal Miconazole Activity Produced by *Streptomyces* sp. K03-0132, *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58(4), 252–259.
229. Igarashi, M., Takahashi, Y., Shitara, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Miyake, T., Akamatsu, Y., Caprazamycins, Novel Lipo-nucleoside Antibiotics, from *Streptomyces* sp., II. Structure Elucidation of Caprazamycins, *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58(5), 327–337.
230. Takahashi, K., Yoshihara, T., Kurosawa, K. Ushikulides A and B, immunosuppressants produced by a strain of *Streptomyces* sp., *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58(6), 420–424.
231. Chen, G., Lin, B., Lin, Y., Xie, F., Lu, W., Fong, W.-F. A New Fungicide Produced by a *Streptomyces* sp. GAAS7310, *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58(8), 519–522.
232. Radzom, M., Zeeck, A., Antal, N., Fiedler, H.-P. Fogacin, a Novel Cyclic Octaketide Produced by *Streptomyces* Strain Tü 6319, *The Journal of Antibiotics*, **2006**, 59(5), 315–317.
233. Sontag, B., Gerlitz, M., Paululat, T., Rasser, H.-F., Grün-Wollny, I., Hansske, F.G. Oxachelin, a Novel Iron Chelator and Antifungal Agent from *Streptomyces* sp. GW9/1258, *The Journal of Antibiotics*, **2006**, 59(10), 659–663.

234. Lu, C., Shen Y. A Novel Ansamycin, Naphthomycin K from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, **2007**, 60(10), 649–653.
235. Xie, Y., Chen, R., Si, S., Sun, C., Xu H. A New Nucleosidyl-Peptide Antibiotic, Sansanmycin, *The Journal of Antibiotics*, **2007**, 60(2), 158–161.
236. Graf, E., Schneider, K., Nicholson, G., Ströbele, M., Jones, A.L., Goodfellow, M., Beil, W., Süßmuth, R.D., Fiedler H.-P. Elloxazinones A and B, New Aminophenoxazinones from *Streptomyces griseus* Acta 2871, *The Journal of Antibiotics*, **2007**, 60(4), 277–284.
237. Fukumoto, A., Kim, Y.-P., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shiomi, K., Tomoda, H., Omura S. Cyslabdan, a New Potentiator of Imipenem Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Streptomyces* sp. K04-0144, I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Structural Elucidation, *The Journal of Antibiotics*, **2008**, 61(1), 1–6.
238. Fukumoto, A., Kim, Y.-P., Hanaki, H., Shiomi, K., Tomoda, H., Omura S. Cyslabdan, a New Potentiator of Imipenem Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Streptomyces* sp. K04-0144 II. Biological Activities, *The Journal of Antibiotics*, **2008**, 61(1), 7–10.
239. Motohashi, K., Sue, M., Furihata, K., Ito, S., Seto, H. Terpenoids Produced by Actinomycetes: Napyradiomycins from *Streptomyces antimycoticus* NT17, *Journal of Natural Products*, **2008**, 71, 595–601.
240. Kang, Y.-S., Lee, Y., Cho, S.K., Lee, K.-H., Kim, B.-J., Kim, M., Lim, Y., Cho, M. Antibacterial Activity of a Disaccharide Isolated from *Streptomyces* sp. Strain JJ45 Against *Xanthomonas* sp., *FEMS Microbiology Letters*, **2009**, 294, 119–125.
241. Li, J., Cai, W., Cai, J. The Characteristics and Mechanisms of Pyridine Biodegradation by *Streptomyces* sp., *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 165, 950–954.
242. Guo, Z., Shen, L., Ji, Z., Zhang, J., Huang L., Wu, W. NW-G01, a Novel Cyclic Hexadepsipeptide Antibiotic, Produced by *Streptomyces alboflavus* 313: I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physicochemical Properties and Antibacterial Activities, *The Journal of Antibiotics*, **2009**, 62, 201–205.
243. Yılmaz, E. İ. , Yavuz, M., Kızıllı, M. Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomyces Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 24(8), 1461–1470.
244. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition, *Prentice Hall*, New Jersey, 2003, pp: 416–420.
245. Keiser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater K.F., Hopwood, D.A. General Introduction to Actinomycete Biology. Practical *Streptomyces* Genetics. 1st Edn., *John Innes Foundation*, England, **2000**, pp: 1–21.

246. Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S. Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes, *Bacteriological Reviews*, **1976**, 40, 469–524.
247. Flårdh, K. Growth Polarity and Cell Division in *Streptomyces*, *Current Opinion in Microbiology*, **2003**, 6, 564–571.
248. http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap11/Chapter_11A.html (15.05.2009).
249. Goriely, A., Tabor, M. Biomechanical Models of Hyphal Growth in Actinomycetes, *Journal of Theoretical Biology*, **2003**, 222, 211–218.
250. Bibb, M.J. Regulation of Secondary Metabolism in Streptomyces, *Current Opinion in Microbiology*, **2005**, 8(2), 208–15.
251. Jonsbu, E., McIntyre, M., Nielsen, J. The Influence of Carbon Sources and Morphology on Nystatin Production by *Streptomyces noursei*, *Journal of Biotechnology*, **2002**, 95, 133–144.
252. http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/micro_images.shtml (15.05.2009).
253. Merck AG., Anfärbereagenzien für die Dünnschicht–und Papier–Chromatographie, Darmstadt, **1980**.
254. Vilches, C., Mendez, C., Hardisson, C., Salas, J.A. Biosynthesis of Oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: Influence of Nutritional Conditions and Development of Resistance, *Journal of General Microbiology*, **1990**, 136, 1447–1454.
255. Clark, C.L., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. Antipeumococcal Activities of Levofloxacin and Clarithromycin as Determined by Agar Dilution, Microdilution, E-Test and Disk Diffusion Methodologies, *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**, 36(12), 3579–3584.
256. Durackova Z., Betina V., Hornikova B., Nemeč P. Toxicity of Mycotoxins and Other Fungal Metabolites to *Artemia salina* Larvae, *Zentralbl. Bakteriologie*, **1977**, 132(4) 294–299.
257. Rhalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frank, E. A Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Anti-Fungal Compounds from Higher Plants, *Phytochemical Analysis*, **1991**, 2(5), 199–203.
258. Lackner, H. Three-Dimensional Structure of the Actinomycins. *Angewandte Chemie International Edition*, **1975**, 14(6): 375–386.
259. Brockmann, H. Structural Differences of the Actinomycins and Their Derivatives, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1960**, 89(2), 323–335.
260. Katz, E. Influence of Valine, Isoleucine, and Related Compounds on Actinomycin Synthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, **1960**, 235(4), 1090–1094.

261. Waksman, S. A. Actinomycin: Nature, Formation, and Activities, *Interscience*, New York **1968**, pp: 231.
262. Waksman, S.A., Woodruff, H.B. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1940**, 45, 609–614.
263. Lackner, H., Bahner, I., Shigematsu, N., Pannel, L.K., Mauger, A.B. Structures of Five Components of the Actinomycin Z Complex from *Streptomyces fradiae*, Two of Which Contain 4-Chlorothreonine, *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 352–356.
264. Green, D.M. Wilm's Tumour, *European Journal of Cancer*, **1997**, 33(3), 409–418.
265. Womer, R.B. Soft Tissue Sarcomas, *European Journal of Cancer*, **1997**, 33, 2230–2234.
266. Guo, J., Wu, T., Bess, J., Henderson, L.E., Leving, J.G. Actinomycin D Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Minus-Strand Transfer in *In Vitro* and Endogenous Reverse Transcriptase Assays, *Journal of Virology*, **1998**, 72(8), 6716–6724.
267. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, *Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag*, **1996**.
268. Clark, R.D., Hedden, G.L., Kluge, A.F., Maddox, M.L., Spires, H.R., Long, P.F. Enhancement of the activity of the Antibiotic Laidlomycin by Acylation and the ¹³C NMR Spectra of Laidlomycin and its Esters, *The Journal of Antibiotics*, **1982**, 35(11), 1527–1537.
269. Gorman, M., Chamberlin, J.W., Hamill, R.L. Monensin, a New Biologically Active Compound. V. Compounds Related to Monensin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Bethesda)*, **1967**, 7, 363–368.
270. Dirlam, J.P., Belton, A.M., Bordner, J., Cullen, W.P., Huang, L.H., Kojima, Y., Maeda, H., Nishiyama, S., Oscarson, J.R., Ricketts, A.P., Sakakibara, T., Tone, J., Yamada, M. CP-82,996, a Novel Diglycoside Polyether Antibiotic Related to Monensin and Produced by *Actinomadura* sp., *Journal of Industrial Microbiology*, **1990**, 6(2), 135–142.
271. Ruff, M.D. Veterinary Applications, J.W. Westley, Ed.; Polyether Antibiotics, *Marcel Dekker*, New York. **1982**, Vol. 1, 303–332.
272. Mollenhauer, H.H., Morré, D.J., Rowe, L.D. Alteration of Intracellular Traffic by Monensin; Mechanism, Specificity and Relationship to Toxicity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1990**, 1031,(2), 225–246.

273. Huczynski, A., Stefańska, J., Przybylski, P., Brzezinski B., Bartl, F. Synthesis and Antimicrobial Properties of Monensin A Esters, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18(8), 2585–2589.
274. Amade, P., Mallea, M., Bouaicha, N. Isolation, Structural Identification and Biological Activity of two Metabolites Produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory, *The Journal of Antibiotics*, **1994**, 47(2), 201–207.
275. Uyeda, M., Suzuki, K., Shibata, M. 3315-AF2, a Cell Aggregation Factor Produced by *Streptomyces* sp. Strain No. A-3315, *Agricultural Biology and Chemistry*, **1990**, 54, 251–252.
276. Mai, L.P., Guéritte, F., Dumontet, V., Tri, M.V., Hill, B., Thoison, O., Guénard, D., Sévenet, T. Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*, *Journal of Natural Products*, **2001**, 64(9), 1162–1168.
277. Santos, R.N, Silva, M.G.V., Filho, R.B. Chemical Constituents Isolated from the Wood of *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae) *Química Nova*, **2008**, 31(8), 1979–1981.
278. Yavuz, M., Laatsch, H., Yılmaz, E. İ. ve Kızıl, M. The Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Terrestrial *Streptomyces* sp. AA50, *XXII. Ulusal Kimya Kongresi*, Mağusa-K.K.T.C., **2008**, BKS-002.
279. Hata, K., Baba, K., Kozawa, M. Chemical Studies Heartwood of *Cassia garrettiana* Craib, I. Anthraquinones including Cassialoin, a New Anthrone C-Glycoside, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1978**, 26(12), 3792–3797.
280. Kitanaka, S., Takido, M. Studies on the Constituents of the Seeds of *Cassia obtusifolia* Linn, The Structures of Three New Anthraquinones, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1984**, 32(3), 860–864.
281. Alemayehu, G., Abegaz, B., Snatzke, G., Duddeck, H. Bianthrones from *Senna longiracemosa*, *Phytochemistry*, **1993**, 32(5), 1273–1277.
282. Coopoosamy, R.M., Magwa, M.L. Antibacterial Activity of Chrysophanol Isolated from *Aloe excelsa* (Berger), *African Journal of Biotechnology*, **2006**, 5(16), 1508–1510.
283. Van Eijk, G.W. Chrysophanol and Emodin from *Drechslera catenaria*, *Phytochemistry*, **1974**, 13(3), 650.
284. Hilker, M., Schulz, S. Anthraquinones in Different Development Stages of *Galeruca tanacetii* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Journal of Chemical Ecology*, **1991**, 17(11), 2323–2332.
285. Mishchenko, N.P., Stepanenko, L.S., Krivoshchekova, O.E., Maksimov, O.B. Anthraquinones of the Lichen *Asahinea chrysantha*, *Chemistry of Natural Compounds*, **1980**, 16, 117–121.

- 286.** Agarwal, S.K., Singh, S.S., Verma, S., Kumar, S. Antifungal Activity of Anthraquinone Derivatives from *Rheum emodi*, *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72, 43–46.
- 287.** Semple, S.J., Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P. In vitro Antiviral Activity of the Anthraquinone Chrysophanic Acid Against Poliovirus, *Antiviral Research*, **2001**, 49, 169–178.
- 288.** Bringmann, G., Noll, T.F., Gulder, T.A.M., Grüne, M., Dreyer, M., Wilde, C., Pankewitz, F., Hilker, M., Payne, G.D., Jones, A.L., Goodfellow, M., Fiedler, H.-P. Different Polyketide Folding Modes Converge to an Identical Molecular Architecture, *Nature Chemical Biology*, **2006**, 2(8), 429–433
- 289.** McCormick, J.R.D., Elmer, J.R. Biosynthesis of Tetracyclines. X. Protetrone, *Journal of The American Chemistry Society*, **1968**, 90, 7126–7127.
- 290.** Kojiri, K., Ihara, M., Nakajima, S., Kawamura, K., Funaishi, K., Yano, M., Suda, H. Endothelin-Binding Inhibitors, BE-18257A and BE-18257B I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Characterization, *The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44(12), 1342–1347.
- 291.** Nakajima, S., Niiyama, K., Ihara, M., Kojiri, K., Suda, H. Endothelin-Binding Inhibitors, BE-18257A and BE-18257B II. Structure Determination, *The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44(12), 1348–1356.
- 292.** Miyata, S., Hashimoto, M., Masui, Y., Ezaki, M., Takase, S., Nishikawa, M., Kiyoto, S., Okuhara, M., Kohsaka, M. WS-7338, New Endothelin Receptor Antagonists Isolated from *Streptomyces* sp. No. 7338 I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-Chemical Properties and Biological Activities, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45(1), 74–82.
- 293.** Miyata, S., Hashimoto, M., Fujie, K., Nishikawa, M., Kiyoto, S., Okuhara, M., Kohsaka, M. WS-7338, New Endothelin Receptor Antagonists Isolated from *Streptomyces* sp. No. 7338 II. Biological Characterization and Pharmacological Characterization of WS-7338 B, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45(1), 83–87.
- 294.** Miyata, S., Fukami, N., Neya, M., Takase, S., Kiyoto, S. WS-7338, New Endothelin Receptor Antagonists Isolated from *Streptomyces* sp. No. 7338 III. Structures of WS-7338 A, B, C and D and Total Synthesis of WS-7338 B, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45(5), 788–791.
- 295.** Roginsky, V., Lissi, E.A. Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food, *Food Chemistry*, **2005**, 92, 235–254.
- 296.** Blois, M.S., Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, **1958**, 181, 1199–1200.
- 297.** Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N. Determination of Antioxidant Activity and Antioxidant Compounds in Wild Edible Mushrooms, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2007**, 20, 337–345.

298. Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction Prepared from Glucoseamine, *Japanese Journal of Nutrition*, **1986**, 44, 307–315.
299. Ardestani, A., Yazdanparast, R. Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of *Achillea santolina*, Extracts. *Food Chemistry*, **2007**, 104, 21–29.
300. Tian, B., Hua, Y. Concentration-Dependence of Prooxidant and Antioxidant Effects of Aloin and Aloe-Emodin on DNA, *Food Chemistry*, **2005**, 91, 413–418.
301. Qian, Z.J., Jung, W.K., Byun, H.G., Kim, S.K. Protective Effect of an Antioxidative Peptide Purified from Gastrointestinal Digests of Oyster, *Crassostrea gigas* Against Free Radical Induced DNA Damage, *Bioresource Technology*, **2008**, 99(9), 3365–3371.
302. Wu, C.C., Lu, Y.H., Wei, B.L., Yang, S.C., Won, S.J., Lin, C.N. Phloroglucinols with Prooxidant Activity from *Garcinia subelliptica*, *Journal of Natural Products*, 2008, 71(2), 246–250.
303. Lin, C.N., Chen, H.L., Yen, M.H. Flavonoids with DNA Strand-Scission Activity from *Rhus javanica* var. *roxburghiana*, *Fitoterapia*, **2008**, 79, 32–36.
304. Kaneda, M., Naid, T., Kitahara, T., Nakamura, S., Hirata, T., Suga, T. Carbazomycins G and H, Novel Carbazomycin-Congeners Containing a Quinol Moiety, *The Journal of Antibiotics*, **1988**, 41(5), 602–608.
305. Knölker, H.-J., Fröhner, W. Transition Metal Complexes in Organic Synthesis, Part 38. First Total Synthesis of Carbazomycin G and H, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38(23), 4051–4054.
306. Knölker, H.-J., Fröhner, W. Palladium-Catalyzed Total Synthesis of the Antibiotic Carbazole Alkaloids Carbazomycin G and H, *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1998**, (2), 173–175.
307. Hitotsuyanagi, Y., Fujiki, H., Suganuma, M., Aimi, N., Sakai, S., Endo, Y., Shudo, K., Sugimura, T. Isolation and Structure Elucidation of Teleocidin B-1, B-2, B-3, and B-4, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1984**, 32(10), 4233–4236.
308. Takashima, M.; Sakai, H. A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*, Part I. Production, Isolation and Chemical Studies, *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, **1960**, 24(7), 647–651.
309. Takashima, M.; Sakai, H. A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*, Part II. Biological Studies of Teleocidin, *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, **1960**, 24(7), 652–655.
310. Takashima, M.; Sakai, H.; Arima, K. A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*, Part III. Production, Isolation and Chemical Characterization of Teleocidin B, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1962**, 26, 660–668.

311. Fujiki, H., Sugimura, T., New Potent Tumour Promoters: Teleocidin, Lyngbyatoxin A and Aplysiatoxin, *Cancer Surveys*, **1983**, 2, 539–556.
312. Cardellina II, J.H., Marner, F.J., Moore, R.E. Seaweed Dermatitis: Structure of Lyngbyatoxin A, *Science*, **1979**, 204, 193–195.
313. Sakai, S., Hitotsuyanagi, Y., Aimi, N., Fujiki, H., Suganuma, M., Sugimura, T., Endo, Y., Shudo, K. Absolute configuration of Lyngbyatoxin A (Teleocidin A-1) and Teleocidin A-2, *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27(43), 5219–5220.
314. Sakai, S., Aimi, N., Yamaguchi, K., Hitotsuyanagi, Y., Watanabe, C., Yokose, K., Koyama, Y., Shudo, K., Itai, A. Elucidation of the Structure of Olivoretin A and D (Teleocidin B), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1984**, 32(1), 354–357.
315. Irie, K., Hirota, M., Hagiwara, N., Koshimidzu, K., Hayashi, H., Murao, S., Tokuda, H., Ito, Y. The Epstein-Barr Virus Early Antigen Inducing Indole Alkaloids, (-)-Indolactam V and Its Related Compounds, Produced by Actinomycetes, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1984**, 48(5), 1269–1274.
316. Irie, K., Kajiyama, S., Funaki, A., Koshimidzu, K., Hayashi, H., Arai, M. Biosynthesis of (-)-Indolactam V, the Basic Ring-Structure of Tumor Promotes Teleogidins, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31(1), 101–104.
317. Edwards, D. J., Gerwick, W. H. Lyngbyatoxin Biosynthesis: Sequence of Biosynthetic Gene Cluster and Identification of a Novel Aromatic Prenyltransferase, *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, 126(37), 11432–11433.
318. Irie, K., Nakagawa, Y., Tomimatsu, S., Ohigashi, H. Biosynthesis of the Monoterpenoid Moiety of Teleocidins via the Non-mevalonate Pathway in *Streptomyces*, *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39(43), 7929–7930.
319. Irie, K., Kajiyama, S., Funaki, A., Koshimidzu, K., Hayashi, H., Arai, M. Biosynthesis of Indole Alkaloid Tumor Promoters Teleocidins (I) Possible Biosynthetic Pathway of the Monoterpenoid Moieties of Teleocidins, *Tetrahedron*, **1990**, 46(8), 2773–2788.
320. Takashima, M., Sakai, H, Arima, K. A New Toxic Substance, Teleocidin Produced by *Streptomyces*. Part IV. Degradative Studies of Hydroteleocidin B and Teleocidic Anhydride, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1962**, 26, 669–678.
321. Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M., Sugimura, T., Moore, R. E. Indole Alkaloids: Dihydroteleocidin B, Teleocidin, and Lyngbyatoxin A as Members of a New Class of Tumor Promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **1981**, 78(6), 3872–3876.
322. Moore, R. E. Toxins, Anticancer Agents, and Tumor Promoters from Marine Prokaryotes, *Pure and Applied Chemistry*, **1982**, 54(10), 1919–1934.

- 323.** Fujiki, H., Suganuma, M., Hakii, H., Bartolini, G., Moore, R. E., Takayama, S., Sugimura, T. A Two-stage Mouse Skin Carcinogenesis Study of Lyngbyatoxin A, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **1984**, 108(1), 174–176.
- 324.** Fujiki, H., Sugimura, T. New Classes of Tumor Promoters: Teleocidin, Aplysiatoxin, and Palytoxin, *Advances in Cancer Research*, **1987**, 49, 223–264.
- 325.** Nishizuka, Y. Intracellular Signaling by Hydrolysis of Phospholipids and Activation of Protein Kinase C, *Science*, **1992**, 258, 607–614.
- 326.** Stillman, B. Cell Cycle Control of DNA Replication, *Science*, **1996**, 274, 1659–1663.
- 327.** Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions, *Chemical Reviews*, **2001**, 101(8), 2353–2364.
- 328.** Kishi, Y., Rando, R.R. Structural Basis of Protein Kinase C Activation by Tumor Promoters, *Accounts of Chemical Research*, **1998**, 31(4), 163–172.
- 329.** Okabe, K., Muratake, H., Natsume, M. Synthesis of Teleocidins A, B and Their Congeners. Part 3. Synthesis of Dihydroteleocidin B-4 (Dihydroteleocidin B), Teleocidin B-3 and Teleocidin B-4, *Tetrahedron*, 47(40), 8559–8572.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Murat YAVUZ
Doğum Tarihi : 16.01.1978
Doğum Yeri : Suşehri/SİVAS
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280–Diyarbakır
Telefon : **İş** : (0412) 248 85 50–51 (Dahili 3054)
Faks : (0412) 248 80 03
Ev : (0412) 224 04 02
GSM : (0535) 563 33 55
E-Mail : myavuz@dicle.edu.tr

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1983–Haziran 1994

İlkokul öğrenimimi Sivas'ın Suşehri İlçesinin Bostancık Köyü İlkokulunda, Ortaokulu İstanbul Gürpınar Azime Yılmaz İlköğretim Okulunda ve Lise Eğitimime İstanbul Büyük Çekmece Lisesinde başlayıp Sivas Suşehri Lisesinde tamamladım.

Eylül 1994–Temmuz 1998

D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü dönem birincisi olarak bitirdim.

Eylül 1998–Aralık 2000

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “**Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) ve Kızıl Çam (*Pinus brutia* Ten.) Reçinelerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması**” adlı yüksek lisans tezini Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN danışmanlığında tamamladım.

Eylül 2005–Şubat 2010

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “**Lokal *Streptomyces* Türlerinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması**” adlı doktora tezini Doç. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında tamamladım.

Haziran 1999–Mevcut Tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

ESERLER

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

A1. Kızıl, M., Kızıl, G., **Yavuz, M.** ve Aytekin, Ç., “Antimicrobial Activity of the Resins Obtained from the Roots and Stems of *Cedrus libani* and *Abies cilicica*” *Applied Biochemistry and Microbiology*, **38 (2)**, 144–146, 2002.

A2. Kızıl, M., Kızıl, G., **Yavuz, M.** ve Aytekin, Ç., “Antimicrobial Activity of the Tar Obtained from the Roots and Stems of *Pinus brutia*” *Pharmaceutical Biology*, **40 (2)**, 135–138, 2002.

A3. Tatlı, M., Güzel, A., Kızıl, G., Kavak, V., **Yavuz, M.** ve Kızıl, M., “Comparison of the Effects of Maternal Protein Malnutrition and Intrauterine Growth Restriction on Redox State of Central Nervous System in Offspring Rats” *Brain Research*, **1156**, 21–30, 2007.

A4. Kızıl, G., Kızıl, M., **Yavuz, M.**, Emen, S. ve Hakimoğlu, F., “Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroides*” *Pharmaceutical Biology*, **46 (4)**, 231–242, 2008.

A5. Yılmaz, E. İ., **Yavuz, M.** ve Kızıl, M., “Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomyces Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24 (8)**, 1461–1470, 2008.

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

B1. Tatlı, M., Güzel, A., Kızıl, G., Kavak, V., **Yavuz, M.** ve Kızıl, M., “Effects of Maternal Protein Malnutrition and Intrauterine Growth Restriction on Redox State of Central Nervous System in Offspring Rats” 8th International Congress of Vertebrate Morphology, *Oral presentation*, ICVM 8-Abstracts, pp 12, Paris, 16-21 July 2007.

B2. Kızıl, G., **Yavuz, M.**, Çeken, B., Emen, S. ve Kızıl, M., “Antioxidant Activity and Protective Effect of Ethanol Extract of *Hypericum scabrum* L. on Protein Oxidation” An Advanced Course Sponsored by FEBS, IUBMB and IFCC, “*Mechanisms, Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications*”, P22, Kemer, Antalya, 15-20 April 2009.

B3. Altaş, S., **Yavuz, M.** ve Aytekin, Ç., “Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts and Fractions of *Cedrus libani* Resin” International Symposium on Drug Research & Development “*From Chemistry to Medicine*”, DRD 2009, P18, Ankara, 04-07 May 2009.

B4. Çeken, B., Kızıl, G., **Yavuz, M.** ve Kızıl, M., “Evaluation of Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Hypericum retusum* and Its Protective Effect on Protein Oxidation” 34th FEBS Congress “*Life’s Molecular Interactions*”, P8–27, Prague, Czech Republic, 04-09 July 2009.

C. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

C1. Yavuz, M., Kızıl, M., Kızıl, G. ve Aytekin, Ç., “Kızıl Çam (*Pinus brutia*)’dan Elde Edilen Katranın *in vitro* Antimikrobiyal Aktivitesi” *XIV. Ulusal Kimya Kongresi*, BK-P28, 462, Diyarbakır, 2000.

C2. Kızıl, M., Kızıl, G. Yavuz, M., Aytekin, Ç. ve Pirinçcioğlu, N., “*Cedrus libani* ve *Abies cilicica*’dan Elde Edilen Reçinelerin *in vitro* Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması” *XV. Ulusal Kimya Kongresi*, BK-P21, İstanbul, 2001.

C3. Barış, D., Çeken, B., Yavuz, M., Kızıl, M. ve Aytekin, Ç., “*Pistacia lentiscus* Ağacından Elde Edilen Mastic Sakızının *in vitro* Antimikrobiyal ve Antioksidant Özelliklerinin Araştırılması” *XVIII. Ulusal Kimya Kongresi*, BK-487, 487, Kars, 2004.

C4. Kızıl, G., Toker, Z., Kızıl, M. ve Yavuz, M., “*Hypericum hyssopifolium*’um Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin GC/MS ile Analizi ve Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi” *XVIII. Ulusal Kimya Kongresi*, BK-532, 532, Kars, 2004.

C5. Kızıl, M., Barış, D., Çeken, B., Yavuz, M. ve Aytekin Ç., “Bazı *Achillea* Türlerinin *in vitro* Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması” *XIX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP-87, 514, Kuşadası, 2005.

C6. Barış, D., Kızıl, M., Çeken, B., Yavuz, M. ve Aytekin Ç., “Bazı *Hypericum* Türlerinin *in vitro* Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması” *XIX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP-103, 530, Kuşadası, 2005.

C7. Yavuz, M., Yılmaz, E. İ. ve Kızıl, M., “Farklı Habitatlardan İzole Edilen Lokal *Streptomyces* Türlerinin Ürettikleri Biyoaktif Metabolitlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi” *XX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP-27, Kayseri, 2006.

C8. Kızıl, G., Kızıl, M., ve Yavuz, M., “*Hypericum triquetrifolium* ve *Hypericum scabroides* Bitkisinin Antioksidant Etkilerinin Araştırılması” *XXI. Ulusal Kimya Kongresi*, BIY-037P, Malatya, 2007.

C9. Yılmaz, E. İ., Yavuz, M., ve Kızıl, M., “Endemik Bitki Rizosferlerinden Aktinomiset İzolsayonu, Teşhisi ve Biyoaktif Metabolitlerinin Araştırılması” *XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, S-EB14, Antalya, 2007.

C10. Yavuz, M., Laatsch, H., Yılmaz, E. İ. ve Kızıl, M., “The Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Terrestrial *Streptomyces* sp. AA50” *XXII. Ulusal Kimya Kongresi*, BKS-002, Mağusa-K.K.T.C., 2008.

C11. Yavuz, M., Yılmaz, E. İ., Kızıl, M. ve Laatsch, H., “*Streptomyces* sp. AS42’nin Ürettiği Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Yapılarının Aydınlatılması” *XXIII. Ulusal Kimya Kongresi*, BP-028, Sivas, 2009.