

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENİZEL SÜNGERLERDEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE ELDE
EDİLEN METABOLİTLERİNİN BİYOAKTİVİTELERİNİN TARANMASI**

DOKTORA TEZİ

Ferhat Can ÖZKAYA

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL

HAZİRAN 2017

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENİZEL SÜNGERLERDEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE ELDE
EDİLEN METABOLİTLERİNİN BİYOAKTİVİTELERİNİN TARANMASI**

DOKTORA TEZİ

**Ferhat Can ÖZKAYA
(D120107006)**

Su Ürünleri Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL

HAZİRAN 2017

İKÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün D120107006 numaralı Doktora Öğrencisi Ferhat Can ÖZKAYA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**DENİZEL SÜNGERLERDEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE ELDE EDİLEN METABOLİTLERİNİN BİYOAKTİVİTELERİNİN TARANMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tefvik Tansel TANRIKUL
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi




Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Ezgi Sinem TURUNÇ
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi



Prof. Dr. Semih ENGİN
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi



Doç. Dr. Ali Yıldırım KORKUT
Ege Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi



Teslim Tarihi : 13 Haziran 2017
Savunma Tarihi : 21 Haziran 2017



ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince değerli katkılarını esirgemeyen yetişmemde büyük katkısı olan tez danışmanım Prof. Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL'a,

Heinrich Heine Üniversitesi, Farmasötik Biyoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapmış olduğum çalışmalarda beni destekleyen Prof. Dr. Peter PROKSCH, Dr. Weaam EBRAHİM ve Dr. Zhen Liu'ye,

Ayrıca çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Semih ENGİN, Öğrt. Gör. Tolga AKDEMİR ve Su Ürün. Yük. Müh. Arif Can KESKİN'e,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, ışığı ile yolumu aydınlatan, varlığı ile yaşamıma anlam katan Dr. Çiğdem Atalayın'a,

En zor zamanlarımda yanımda olan maddi ve manevi destekleri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme, babam Mustafa ÖZKAYA'ya, annem Duygu ÖZKAYA'ya ve kardeşim Ahmet Hasan ÖZKAYA'ya,

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) – 2214a Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı'na tez çalışmam kapsamında Heinrich Heine Üniversitesi, Farmasötik Biyoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapmış olduğum çalışmaları desteklediği için teşekkür ederim.

Haziran 2017

Ferhat Can Özkaya
Biyokimyager





İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ŞEKİL LİSTESİ	xvi
ÖZET	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Denizel Doğal Ürün Araştırmaları	3
2.2 Denizel Süngerlerle Doğal Ürün Araştırması	4
2.3 Sünger İlişkili Funguslarla Doğal Ürün Araştırmaları	7
2.4 OSMAC(One Strain Many Compounds - Tek Suş Pek Çok Bileşik) ve Ko- Kültür	10
3. MATERYAL	12
3.1 Sünger Örnekleri	13
3.2 Besiyerleri	12
3.3 Bakteriler	19
3.4 Cihazlar	19
3.5 Kullanılan Kimyasallar	21
3.6 Kullanılan Hücre Hatları.....	22
3.7 Kullanılan PZR Primeleri	22
4. YÖNTEMLER	23
4.1 Fungus İzolasyonu	23
4.2 Kültürasyon	24
4.3 Özütleme Çalışmaları	24
4.4 Biyoaktivite Taramaları	24
4.4.1 Seri dilüsyon yöntemi	25
4.4.2 Sitotoksisite taraması	26
4.5 Fungal İdentifikasyon	27
4.6 OSMAC (One Strain Many Compounds - Tek Suş Pek Çok Bileşik) ve Ko- Kültür.....	29
4.7 Kromatografi Denemeleri ve Metabolit İzolasyonu.....	30
4.8 Yapı Analizi	34
4.8.1 Marfey's Reaksiyonu	35
5. BULGULAR	37
5.1 Fungus İzolasyonu	39
5.2 Fungal Suşların İdentifikasyonu.....	40
5.3 Metabolit İzolasyonu Çalışmaları	42

5.3.1 <i>P. chrysogenum</i> 'dan metabolit izolasyonu	42
5.3.1.1. Conidiogenone B (1, bilinen bileşik).....	43
5.3.1.2. Conidiogenone C (2, bilinen bileşik).....	44
5.3.1.3. Cycloopenol (3, bilinen bileşik).....	47
5.3.1.4. Viridicatin (4, bilinen bileşik).....	49
5.3.2 <i>A. carneus</i> yapay deniz tuzu ile hazırlanan pirinç ortamından metabolit izolasyonu çalışmaları.....	50
5.3.2.1 Aniquinazoline E (5, yeni bileşik)	52
5.3.2.2 Sterigmatocystin (6, bilinen bileşik).....	56
5.3.2.3 O-Demetil Sterigmatocystin (7, bilinen bileşik).....	57
5.3.2.4 Sterigmatin (8, bilinen bileşik)	58
5.3.2.5 Versicolorin C (9, bilinen bileşik)	61
5.3.2.6 Averufin (10, bilinen bileşik)	64
5.3.2.7 Arugosin C (11, bilinen bileşik)	66
5.3.2.8 Norsolorinic Asit (12, bilinen bileşik)	68
5.3.2.9 Asteltoxin E (13, bilinen bileşik).....	70
5.3.3 <i>A. carneus</i> modifiye Czapek besiyerinden metabolit izolasyonu çalışmaları.....	74
5.3.3.1 Terrelumamide C (14, yeni bileşik)	76
5.3.3.2 Diorcinol (15, bilinen bileşik)	80
5.3.4 <i>A. carneus</i> ve <i>B. subtilis</i> fungus bakteri ko-kültür ortamından metabolit izolasyonu çalışmaları.....	82
5.3.4.1 Oksisterigmatocystin-C (16, bilinen bileşik)	85
5.3.4.2 Dihidroksisterigmatocystin (17, bilinen bileşik)	86
5.3.4.3 25-O-metilarugosin A (18, bilinen bileşik)	89
5.3.4.4 Nidurufin (19, bilinen bileşik)	92
5.4 Biyoaktivite Taramasının Sonuçları	94
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	97
KAYNAKLAR.....	101
EKLER	109
ÖZGEÇMİŞ	112

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: American Type of Culture Collection
Aseton-<i>d</i>₆	: Dötoryumlu aseton
CDA	: Czapek Dox Agar
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
COSY	: COrelated Spectroscopy
dak	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMSO-<i>d</i>₆	: Dötoryumlu dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ESI-MS	: Elektrospray iyonizasyon-kütle spektroskopisi
FDA	: Food and Drug Administration
FDAA	: N-(2,4-dinitro-5-fluorfenil)-L-alanine amide
HPLC	: Yüksek Basıncılı Likit Kromatografisi
HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	: Heteronuclear Single-Quantum Correlation
ITS	: Internal transcribed spacer
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LB	: Lysogeny Broth
lit	: Literatür
LC/MS	: Likit Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
LC/MS/MS	: Likit kromatografi/kütle spektroskopisi/kütle spektroskopisi
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
MeOH	: Metanol
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MHz	: Mega herz
MHB	: Müller Hinton Broth
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
OD	: Optik yoğunluk
OSMAC	: One Strain MANY Compounds – Tek Suş Pek Çok Molekül
PDA	: Patato Dekstroz Agar
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
ppm	: Parts per million – milyonda bir
RP	: Ters Faz
SAHA	: Suberoylanilide hidroksamik asit
Semi-Prep	: Semi Preparatif
TBE	: Tris/Borate/EDTA
VLK	: Vakum likit kromatografi
UHPLC	: Ultra Yüksek Basıncılı Likit Kromatografisi

UV-vis : Ultra viole visible



SEMBOLLER

α	: Gözlenen çevirme
$[\alpha]$: Özgül çevirme
$[\alpha]_D$: Optik çevirme
c	: Derişim (g/100 ml)
^{13}C	: Karbon spektrumu
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
CD_3Cl	: Dötöryumlu Kloroform
CO_2	: Karbon Dioksit
CD_3OD	: Dötöryumlu Metanol
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Demir (II) sülfat 7 sulu
g	: Gram
g	: Relatif Santrifüj Kuvveti
g/l	: Gram/Litre
g/mol	: Moleküler ağırlık
^1H	: Proton spektrumu
HCl	: Hidroklorik asit
J	: Yarımlama Sabiti
$^{\circ}\text{K}$: Kelvin
K_2HPO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
l	: Litre
l	: Uzunluk
m	: Metre
ml	: Mili Litre
mm	: Mili metre
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Magnezyum sülfat yedi sulu
μM	: Mikro molar
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO_3	: Sodyum hipoklorit
pH	: Çözelti İçindeki Hidrojen Güçü
δ	: Kimyasal kayma

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Proje kapsamında toplanan sünger örneklerinin istasyonlara göre dağılımı	12
Çizelge 5.1: Toplanan süngerlerden elde edilen fungal suşların listesi.....	37
Çizelge 5.2: Bileşik 1 ve 2'in elde edilen ¹ H datalarının literatür ile karşılaştırması	44
Çizelge 5.3: Bileşik 3'ün elde edilen ¹ H datalarının literatür ile karşılaştırması..	46
Çizelge 5.4: Aniquinazoline E (5) ¹ H ve ¹³ C NMR dataları (CDCl ₃)	53
Çizelge 5.5: Bileşik 6, 7 ve 8 elde edilen ¹ H datalarının karşılaştırılması (Asetone- <i>d</i> ₆).	58
Çizelge 5.6: Bileşik 9'un ¹ H dataları (Asetone- <i>d</i> ₆).	61
Çizelge 5.7: Bileşik 13'un ¹ H dataları (CDCl ₃).	70
Çizelge 5.8: Terrulamamide C'nin (14) ¹ H ve ¹³ C NMR dataları (DMSO- <i>d</i> ₆)	76
Çizelge 5.9: Bileşik 16 ve 17'in ¹ H dataları	86
Çizelge 5.10: Bileşik 18 ¹ H dataları (Asetone- <i>d</i> ₆).....	89
Çizelge 5.11: Bileşik 19'in ¹ H dataları	91
Çizelge 5.12: Fare lenfoma hücre hattı L5178Y'ye karşı biyoaktivite sonuçları	92
Çizelge 5.13: Antimikrobiyal aktivitesi taraması sonucunda akitivite gösteren moleküller ve MİK değerleri	92



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1:	<i>Tethya</i> sp. süngerinden izole edilmiş ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ilaç etken maddelerinin kimyasal yapıları	5
Şekil 2.2:	<i>Hemiastrella minor</i> süngerinden izole edilmiş ve Faz-I denemelerine alınmış hemiassterlin molekülünün kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3:	<i>Theonella swinhoei</i> süngerinden izole edilen bakteri kökenli bileşikler	7
Şekil 2.4:	Denizel süngerlerden izole edilen fungal suşlardan izole edilen farklı kimyasal yapıdaki molekül örnekleri.	9
Şekil 2.5:	Mikroorganizmaların sekonder metabolit üretiminden sorumlu gen bölgelerinin ve metabolit yollarının uyarılması	11
Şekil 3.1:	Poje kapsamında toplanan sünger örneklerinden bazıları; a.) <i>Agelas oroides</i> , b.) <i>Aplysina aerophoba</i>	13
Şekil 4.1:	<i>A. carneus</i> fungal suşunun yapay deniz sulu pirinç ortamından metabolit izolasyon şeması.....	36
Şekil 4.2:	<i>A. carneus</i> fungal suşunun modifiye Czapek ortamından metabolit izolasyon şeması	37
Şekil 4.3:	<i>A. carneus</i> fungal suşunun ko-kültür ortamından metabolit izolasyon şeması	38
Şekil 5.1:	<i>P. chrysogenum</i> suşunun izole edildiği coğrafik bölge	41
Şekil 5.2:	<i>A. carneus</i> suşunun izole edildiği coğrafik bölge.....	41
Şekil 5.3:	<i>P. chrysogenum</i> 'un pirinç ortamından izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.....	49
Şekil 5.4:	Ani quinazoline E'nin (5) COSY ve anahtar HMBC korelasyonları	54
Şekil 5.5:	Ani quinazoline E'nin (5) Marfey's reaksiyon sonucu	54
Şekil 5.6:	<i>Aspergillus carneus</i> 'un yapay deniz tuzu ile hazırlanmış pirinç ortamından izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları.....	73
Şekil 5.7:	Farklı besiyerlerinden izole edilen özütlerin profillerinin karşılaştırılması (yıldız sterigmatocystini göstermektedir) (analizler için özütler 1 mg/ml derişiminde hazırlanmıştır) (analizler için özütler 1 mg/ml derişiminde hazırlanmıştır)	74
Şekil 5.8:	Terrulamamide C'in (14) COSY ve anahtar HMBC korelasyonları	79
Şekil 5.9:	Terrulamamide C'in (14) Marfey's reaksiyon sonucu	79
Şekil 5.10:	<i>Aspergillus carneus</i> 'un modifiye Czapek besiyerinden izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları.....	81
Şekil 5.11:	<i>B. subtilis</i> , <i>A. carneus</i> ve <i>B. subtilis</i> ile <i>A. carneus</i> 'un ko-kültür özütlerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 5.12:	Ko-kültürde artışı belirlenen moleküllerin üretimlerinin karşılaştırılması	83
Şekil 5.13:	<i>Aspergillus carneus</i> 'un ko-kültür ortamından izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları	95
Şekil 5.14:	Proje kapsamında <i>A. carneus</i> 'un farklı besiyerlerinden izole edilen moleküllerin elde edildiği besiyerlerine göre dağılımı.....	96





DENİZEL SÜNGERLERDEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE ELDE EDİLEN METABOLİTLERİNİN BİYOAKTİVİTELERİNİN TARANMASI

ÖZET

Tez kapsamında sünger ilişkili fungusların izolasyonu, biyoaktif metabolitlerinin saflaştırılması, metabolit profillerinin OSMAC ve ko-kültür yöntemleri ile çeşitlendirilmesi, saflaştırılan moleküllerin yapılarının aydınlatılması ve biyoaktivite potansiyellerinin taranması hedeflenmiştir

Proje kapsamında, sünger ilişkili *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus carneus* suşlarından 19 bileşik izole edilmiş ve kimyasal yapıları spektral yöntemlerle (1D-2D NMR, MS) tayin edilmiştir.

İlk olarak *P. chrysogenum* suşu metabolit izolasyonu için seçilmiştir. Yapılan ayırma-saflaştırma işlemlerinden sonra 4 bilinen molekül izole edilmiştir; conidiogenone B (1), conidiogenone C (2), cyclophenol (3) and viridicatin (4). *A. carneus* suşunun yapay deniz tuzu ile hazırlanmış pirinç ortamından bir yeni doğal ürün – aniquinazoline E – (5) ve 8 bilinen bileşik (6 – 13) izole edilmiştir. Ardından laboratuvar koşullarında sessiz kalan gen bölgelerini aktive etmek için *A. carneus* suşu ile OSMAC (Bir Suş Pek Çok Molekül) ve ko-kültür denemeleri gerçekleştirilmiştir. OSMAC denemesinde, *A. carneus* 3 farklı besiyerinde (deniz tuzlu pirinç, modifiye Czapek besiyeri ve pirinç besiyeri) kültüre edilmiştir. Modifiye Czapek besiyerinden elde edilen özüt ile yapılan kimyasal işlemler sonucunda bir yeni bileşik – terrelumamide C – (14) ve yapay deniz tuzu ile hazırlanmış pirinç ortamında farklı bir bileşik (15) ile 7 (5 - 7, 9 – 11, 13) benzer bileşik izole edilmiştir. Bu sonuç farklı besiyerlerinin metabolit profiline etkisini kanıtlamıştır. Ko-kültür denemesi için *A. carneus* ve *B. subtilis* pirinç ortamında birlikte kültüre edilmiş ve metabolitlerin biyosentezinin indüklendiği HPLC analizleri ile gözlenmiştir. Biyosentezdeki artış 4 bileşiğin (6, 7, 9, 10) kantitatif artışının analizi ile de kanıtlanmıştır. Ayrıca, diğer iki ortamdan farklı ksanton ve antrakinin türevleri (16 – 19) izole edilmiştir.

Proje sonunda, 2 yeni 17 bilinen molekül elde edilmiş ve biyoaktivite potansiyelleri taranmıştır. 3 bileşik (5, 6, 13) fare lenfoma hücre hattı L5178Y'ye karşı kahhalalide F'den (IC₅₀; 4.3 µM) daha güçlü sitotoksik etki göstermiştir (IC₅₀; 0.19 – 0.43 µM). 2 bileşik (9 – 10) de *S. aureus* ATCC 700699, *E. faecium* ATCC 35667 ve *E. faecium* ATCC 700221'e karşı güçlü antimikrobiyal etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Doğal Ürün; Sünger İlişkili Funguslar; OSMAC, Ko-Kültür, Kromatografi, Yapı Tayini.

ISOLATION OF SPONGE ASSOCIATED FUNGI AND SCREENING OF BIOACTIVITIES OF THEIR METABOLITES

SUMMARY

The aim of this thesis is to isolate sponge associated fungi, purification of their bioactive compounds, diversify of metabolite profiles by OSMAC and co-cultivation, elucidation of chemical structures of pure compounds and screening of their bioactivity potential.

In this dissertation, two sponge-associated fungi *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus carneus*, led to isolation of 19 compounds. The chemical structures of pure compounds were elucidated by spectral experiments (1D-2D NMR, MS).

P. chrysogenum was the first fungus to be selected for chemical investigation. Four known compounds were isolated from this strain; conidiogenone B (**1**), conidiogenone C (**2**), cyclophenol (**3**) and viridicatin (**4**). Aniquinazoline E – new natural product (**5**) and 8 known (**6-13**) compounds (terpen, anthraquinone, xanthone and quinazolinone types) were isolated from sea salt rice medium of *A. carneus*. Then to activate the cryptic gene in laboratory conditions, OSMAC (One Strain Many Compounds) and co-cultivation were carried out with *A. carneus*. In OSMAC experiment three types of medium (sea salt rice medium, modified Czapek medium and rice medium) were used to improve the metabolite profile. As a result of chemical investigation of modified Czapek medium, terrelumamide C – one new (**14**) and one different compound (**15**) which was different from sea salt rice medium and 7 same compounds (**5 - 7, 9 - 11, 13**) with sea salt rice medium were yielded. These results proved that the impression of different medium effects on metabolite profiles. For co-culture experiment, *A. carneus* and *B. subtilis* were cultivated in rice medium. Inducing of metabolite biosynthesis was observed and it was proved by quantitative analysis of 4 induced compounds (**6, 7, 9, 10**). Besides, different xanthone and anthraquinone derivatives (**16 - 19**) were isolated from co-culture medium.

As a result of thesis, 2 new and 17 known compounds were yielded and their bioactivity potential was screened. 3 compounds (**5, 6, 13**) showed strong cytotoxic activity against to Murine lymphoma cell line L5178Y (IC₅₀; 0.19 – 0.43 μM) than positive control kahalalide F (IC₅₀; 4.3 μM) and 2 compounds (**9 - 10**) showed strong antimicrobial activity against to *S. aureus* ATCC 700699, *E. faecium* ATCC 35667 and *E. faecium* ATCC 700221.

Keywords: Natural Product, Sponge-associated fungi, OSMAC, Co-Culture, Chromatography, Structure Elucidation.



1. GİRİŞ

İnsanlık tarihin ilk çağlarından başlayarak karşılaştığı pek çok sorunun çözümü için bitkisel kaynaklı özütler kullanmıştır. Ardından geliştirilen teknolojiler ile bitkisel özütlerin içerdiği etken maddelerin eldesine yönelinmiştir. 20. yüzyılın başında penisilinin buluşu ile araştırmacılar yeni biyoaktif metabolitlerin eldesi için karasal mikroorganizmaları da değerlendirmeye başlamıştır [1, 2]. Penisilinin bulunuşunu takip eden yaklaşık 50 yıllık dönemde başta mikrobiyal hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli yüksek moleküller karasal mikroorganizmalardan izole edilmiştir [3]. Ancak belirli bir zamanın sonunda karasal kaynaklardan (bitki ve mikroorganizma) yapılan çalışmalarda bilinen moleküllerin eldesi tekrar etmeye başlamıştır ve günümüzde ortaya çıkan hastalıklara karşı etkin alternatifler sunulamamıştır [4, 5]. Bunun üzerine araştırmacılar yeni metabolitlerin eldesi için farklı habitatlarda yaşayan organizmaları doğal ürün kaynakları olarak değerlendirmişler. Günümüzde ise denizel ortamlarda yaşayan canlılar en sık araştırılan doğal ürün kaynaklarıdır. Denizel habitatlar barındırdıkları canlılara farklı metabolitlerin sentezi için özel yaşam koşulları sunmaktadır [6-10].

Son yıllarda doğal ürün araştırmalarında, denizel makroorganizmalarla birlikte yaşayan mikroorganizmalar üzerine en çok araştırma yapılan canlılardır. Denizel ortamlarda var olan fizikokimyasal etkenler ve makroorganizmaların bünyesinde bulunan mikrobiyal yaşam formu, denizel mikroorganizmaları iyi birer doğal ürün üreticisi haline getirmektedir. Özellikle fungusların genetik yapılarının bakterilere göre daha büyük olması, fungusları en önemli mikrobiyal doğal ürün kaynağı yapmaktadır [11, 12].

Denizel doğal ürün araştırmaları açısından Türkiye'nin sahip olduğu potansiyelin yeteri kadar değerlendirilemediği görülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar

incelendiğinde; Türkiye denizlerinden izole edilen sünger ilişkili bakteri, fungus veya sediment kaynaklı bakteriler ile çalışılmış olduğu görülmektedir [13-17]. Ancak yapılan çalışma sayısı dünya geneli ile karşılaştırıldığında çok düşüktür.

Doğal ürün araştırmacıları laboratuvar ortamında mikrobiyal suşların sahip olduğu biyoaktif metabolit potansiyellerinin tam olarak ifade edilemediğini tespit etmişler ve bu nedenle farklı yöntemler denemişlerdir. Uygulama kolaylığı açısından en sık kullanılan OSMAC (One Strain MAny Compounds – Tek Suş Pek Çok Bileşiktir) metodudur. Bu metodun en temel prensibi; metabolit üretim ortamının bileşenlerini değiştirerek mikrobiyal suşun sekonder metabolit üretiminden sorumlu gen bölgelerini veya metabolik yolları aktive etmektir [18]. Bir diğer yöntem ise mikrobiyal suşun doğal ortamını taklit etmeye dayanan ko-kültürdür. Bu yöntemde iki veya daha fazla organizmayı aynı üretim ortamında kültüre edilerek, doğada mikroorganizmalar arasında var olan rekabet ortamını laboratuvar koşullarında da sağlanmaktadır [19].

Yapılan araştırmada Ege Denizi'nden toplanan süngerlerle ilişkili fungusların izolasyonu, sentezledikleri biyoaktif metabolitlerin saflaştırılması, elde edilebilecek ürünleri OSMAC ve ko-kültür denemeleri ile çeşitlendirilmesi, saflaştırılan metabolitlerin yapılarının aydınlatılması ve elde edilen metabolitlerin biyoaktivite potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Denizel Doğal Ürün Araştırmaları

Doğal ürünler, ilaç endüstrisi tarafından geliştirilen pek çok farmasötik ürünün temel bileşenidir. İlaç şirketleri tarafından ilk geliştirilen terapötik formülasyonlarda karasal bitkilerden elde edilen saf bileşikler kullanılmıştır [1]. 20. yüzyılın başında Sir Alexdar Fleming'in *Penicillium notatum*'dan penisilini izole etmesi ile karasal mikroorganizmalar ilaç endüstrisi tarafından doğal ürün kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır [2]. Fleming'in çalışmalarını takiben kloramfenikol ve streptomisin gibi önemli biyoaktif metabolitler karasal mikroorganizmalardan elde edilmiştir [3]. Ancak belirli bir periyot sonunda yeni ilaç etken maddelerinin karasal organizmalardan eldesine yönelik çalışmalar birbirini tekrar etmeye başlamıştır. Bunun yanında doğal ürün çeşitliliğini organizmaların yaşadıkları doğal ortamlardan ve karşılaştıkları stres koşullarından etkilediği bulunmuştur [4]. Bunun üzerine araştırmacılar yeni doğal ürünlerin izolasyonu için daha az çalışılmış uç yaşam koşullarının olduğu alanlarında yaşayan organizmaları değerlendirmeye yönelmişlerdir. Özellikle denizel habitatların barındırdığı canlılara sentezledikleri moleküllerin çeşitliliğini arttırmasını sağlayacak önemli fizikokimyasal (pH, sıcaklık, tuzluluk, oksijen kısıtlaması, yaşamsal rekabet vb.) ve biyolojik stres şartları sunması, doğal ürün araştırmacılarını bu habitatlara yöneltmiştir [6-10].

Günümüzde denizel çevrelerde yaşayan organizmalar yeni kimyasal yapıların ve biyoaktif bileşiklerin eldesi için önemli bir kaynak haline gelmiştir [10, 20]. Denizel çevrelerden toplanan çeşitli organizmalardan izole edilen moleküller; antimikrobiyal, anti-tüberküloz, antiviral, antiparazitik, antihelmintik, antimalaryal, antiprotozoal, antikoagulant, antiplatelet, antienflamatuvar, antidiyabetik ve antikanserojen aktivite

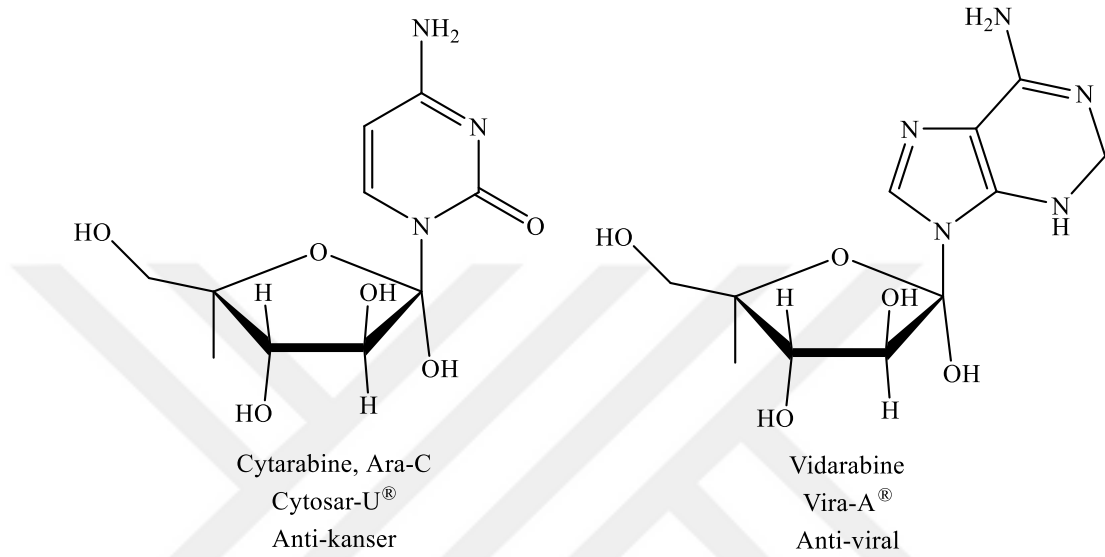
gösterebilmektedirler [21]. Yapılan bazı araştırmalarda ise izole edilen moleküllerin birden fazla biyoaktivite gösterdiği de rapor edilmiştir [22]. Ayrıca elde edilen bileşikler başka ilaç araştırmaları için de önemli öncül yapılar olarak değerlendirilmektedir [23].

Denizel doğal ürün araştırmalarına olan ilginin artması ile yıllık 200'den fazla yeni denizel ürün rapor edilmeye başlanmış ve 2010 yılının sonunda 15.000'den fazla yeni molekülün rapor edildiği tahmin edilmektedir [24].

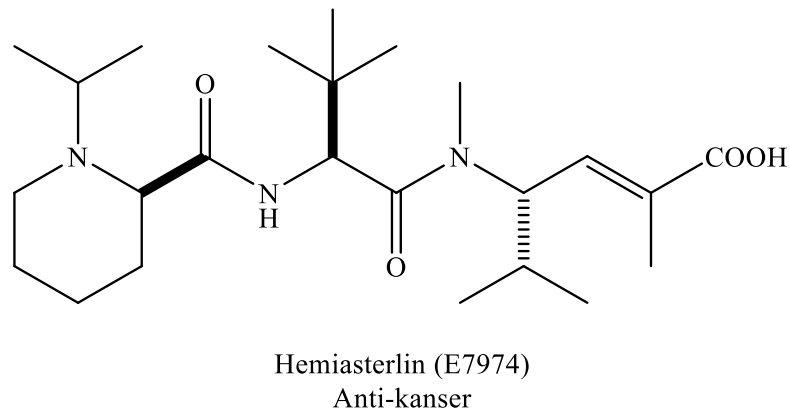
2.2 Denizel Süngerlerle Doğal Ürün Araştırmaları

Çok farklı denizel habitatlarda ve derinliklerde yaşayabilen süngerler (Porifera), yeryüzünde bilinen en eski metazonlardır. Yaşamlarını belirli bir substrata tutunup durağan halde sürdürürler ve besinsel ihtiyaçlarını buldukları ortamdaki suyu filtre ederek sağlamaktadırlar. Bir kilogram ağırlığındaki sünger gün boyu yaklaşık 24 m³ suyu filtre edebilmektedir [25]. Araştırmacılar tarafından 15.000 sünger türü tanımlanmış ve *Calcarea* (5 order, 24 aile), *Desmospongiae* (15 order, 92 aile) ve *Hexactinellida* (6 order, 20 aile) olmak üzere üç temel sınıfa ayrılmıştır. Ama var olan sünger çeşitliğinin bu rakamın çok daha üstünde olduğu tahmin edilmektedir [26, 27]. Süngerler evrimsel süreçlerinde rakiplerinden kaçmak yerine kimyasal savunma sistemleri geliştirmişlerdir [27, 28]. Herhangi bir saldırı anında, mikrobiyal enfeksiyonlarla karşılaştıklarında veya sesil organizmaların vücutlarına tutunmaya çalıştıklarında çeşitli sekonder metabolitler salgılayarak kendilerini korumaya ve yaşamlarını devam ettirmeye çalışırlar [29, 30]. Süngerler tarafından salgılanan bu doğal ürünler biyomedikal olarak önemli bir potansiyele sahiptirler ve yeni biyoaktif moleküller açısından öncül moleküller olabilmektedirler [31, 32]. Bu durum denizel makroorganizmalarla yapılan doğal ürün araştırmalarında süngerleri en zengin kaynak haline getirmektedir. 2008 ile 2012 yılları arasında süngerlerden 1499 yeni molekül

izole edilmiş ve bu zaman aralığında rapor edilen denizel doğal ürünlerin % 30'unu oluşturmaktadır [33-37].



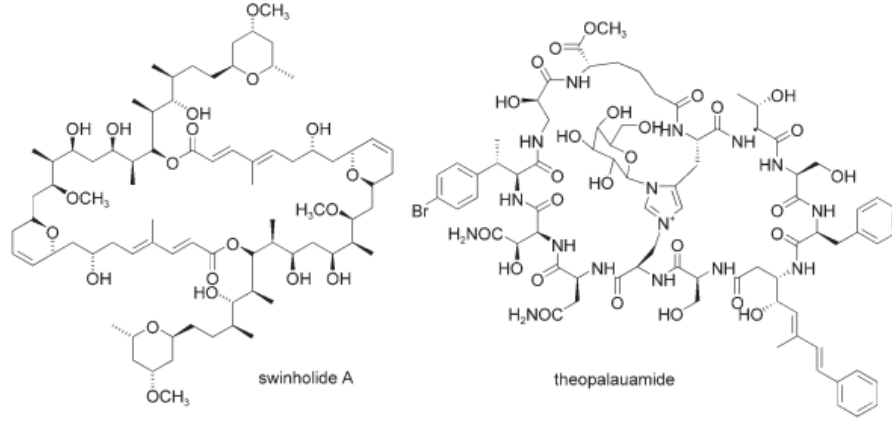
Şekil 2.1: *Tethya* sp. Süngerinden izole edilmiş ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ilaç etken maddelerinin kimyasal yapıları [38].



Şekil 2.2: *Hemiasterella minor* süngerinden izole edilmiş ve Faz-I denemelerine alınmış hemiasterlin molekülünün kimyasal yapısı [38].

Süngerlerin biyokütlelerinin yaklaşık % 50 – 60'ını mikroorganizmalar oluşturmaktadır [39]. Süngerler ve mikroorganizmalar arasında simbiyotik bir etkileşim bulunmaktadır. Süngerler mikroorganizmalara barınacak yer sağlarken, mikroorganizmalarda süngerlerin metabolik atıkların sindirilmesini, iskeletlerinin sabit kalmasını ve koruyucu metabolitlerin üretimi bakımından süngerleri desteklemektedirler [40]. Gelişen kimyasal ve biyolojik tekniklerle yapılan çalışmalarda süngerlerden izole edilmiş bazı moleküllerin mikrobiyal kaynaklı olduğu belirlenmiştir [5, 22, 23]. Örneğin swinholide A ve theopalauamide (Şekil 2.3) ilk olarak süngerlerden izole edilmiştir. Ancak sonrasında yapılan çalışmalarda süngerlerin bünyesinde yaşayan siyanobakteriler tarafından sentezlendiği tespit edilmiştir [41]. Süngerler ve mikroorganizmalar arasında var olan karşılıklı ilişkinin belirlenmesinden sonra süngerlerle birlikte yaşayan mikroorganizmalara olan ilgi arttırmıştır. Ayrıca geliştirilen metagenomik yöntemlerle yapılan çalışmalarda süngerlerle birlikte yaşayan ve daha kültüre edilememiş mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu durum gelecekte yeni doğal ürünlerin eldesi için vaad edicidir [42, 43]. Bunun yanında süngerlerle birlikte yaşayan mikroorganizmaların kültüre edilebilme olanaklarının elverişli oluşu, metabolik yollarının çeşitliliğinin süngerlere göre daha

geniş olması ve koşullara göre metabolit profillerini değiştirebilmeleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir [44].



Şekil 2.3: *Theonella swinhoei* süngerinden izole edilen bakteri kökenli bileşikler [41].

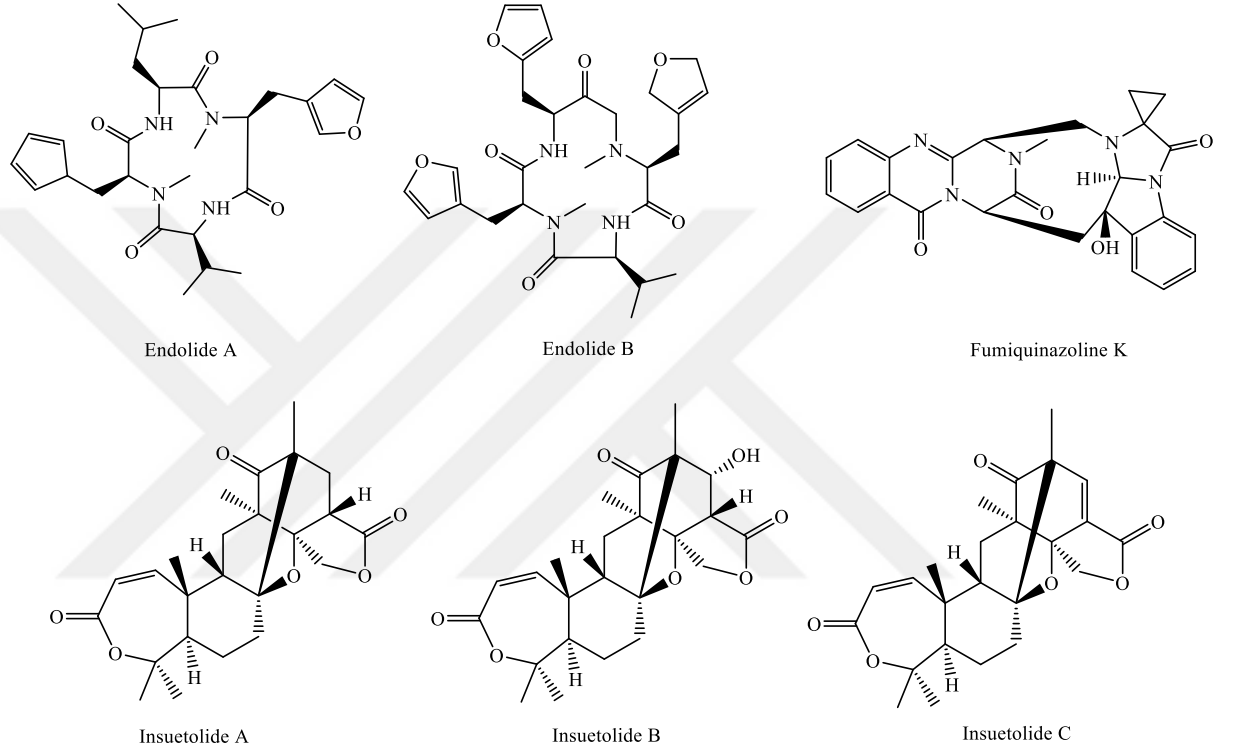
2.3 Sünger İlişkili Funguslardan Doğal Ürün Araştırmaları

Moleküler tekniklerle denizel funguslar üzerine yapılan araştırmalarda, fungal suşların termal ekosistemlerden polar ekosistemlere kadar çeşitli alanlarda yaşabildiği ve yaşadığı doğal çevreye göre metabolit profillerinin değişebildiği saptanmıştır [45, 46]. Funguslar denizel ortamlarda var olan ekstrem fizikokimyasal zorluklarla mücadele etmek zorundadırlar. Ayrıca denizel makroorganizmalarla birlikte yaşayan funguslar büyük bir mikrobiyal rekabet içindedir. Belirli bir hacim içinde besin, yaşama alanı ve neslini devam ettirme mücadelesi sırasında rakiplerine karşı avantaj sağlamayabilmek için biyokimyasal yollarını değiştirerek yeni moleküller sentezleyebilmektedirler. Bu da büyük bir mikrobiyal topluluk barındıran süngerlerden izole edilen mikroorganizmaları en zengin doğal ürün kaynağı haline getirmektedir. Özellikle genetik yapılarının büyüklüğü nedeniyle süngerlerle birlikte yaşayan funguslar en verimli doğal ürün kaynakları olarak kabul edilmektedir. Böylece mikroorganizma ve süngerler arasındaki simbiyotik etkileşimin en önemli aktörü olmaktadır [12, 47]. Bunun yanında karasal bitkilere ve denizel omurgasızlara göre kültüre edilebilmeleri

için özel alanlara ihtiyaç duyulmaması, ucuz kültür ortamlarında üretimlerinin yapılabilmesi, büyük ölçekli üretim proseslerinin geliştirilmesinin kolay olması ve çeşitli çevre şartlarına ihtiyaç duymamaları sürdürülebilir üretim açısından avantajlarıdır [48]. Ayrıca karmaşık kimyasal yapılara sahip moleküllerin sentetik yollarla endüstriyel üretiminin ekonomik ve uygulanabilir olmayışı sürdürülebilir uygulamalar açısından fungal suşların bir diğer avantajıdır [49].

Sünger ilişkili funguslarla yapılan çalışmalardan çok farklı kimyasal yapıda ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip moleküller rapor edilmiştir. Avusturalya'nın Sidney kıyılarından toplanan *Callyspongia sp. Cf. C. Flammaea* süngerinden izole edilen *Stachylidium sp.* fungal suşundan yeni peptid yapısında olan endolide A ve B molekülleri izole edilmiştir. Yapılan biyoaktif çalışmalarının sonunda endolide A'nın vasopressin reseptör 1a'ya affinite göstererek kandaki su dengesinin regülasyonunda, endolide B'nin serotonin reseptör 5HT2b'ye affinite göstererek serotonin salgısını regüle edebildiği tespit edilmiştir. Gelecekte yapılacak klinik ilaç araştırmaları için önemli birer öncül bileşik olarak görülmektedirler [50]. Kuzey Adriyatik Denizi'nin Rovinj (Hırvatistan) kıyılarından toplanan *Tethya aurantium* süngerinden izole edilen *Aspergillus sp.* fungal suş ile yapılan doğal ürün çalışmaları sonucunda, nadir görülen 1-aminosiklopropan-1-karboksilik halkasına sahip olan fumiquinazoline K izole edilmiştir [51]. İsrail'in Sdot-Yam kıyılarından toplanan *Psammocinia sp.* süngerinden izole edilen *Aspergillus insuetus* üzerine yapılan kimyasal analizler sonucunda yeni meroterpenoid yapısında insuetolide A, B

ve C izole edilmiştir. Yapılan biyoaktivite taramalarında insuetolide bileşiklerinin *Neurospora crassa*'ya karşı antifungal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir [52].



Şekil 2.4: Denizel süngerlerden izole edilen fungal süşlerden izole edilen farklı kimyasal yapıdaki molekül örnekleri

Türkiye denizlerinden izole edilen funguslar ise doğal ürün araştırmalarında çok az değerlendirilmiştir [15, 16]. Ayrıca çalışma alanı olarak seçilen Ege Denizi'nin kirlilik seviyesinin yüksek oluşu, son yıllarda aşırı ısınması, uluslararası gemi ticaretine açık olması ve bir iç deniz oluşundan kaynaklanan farklı stres koşulları denizel canlılar

üzerine yeni moleküllerin sentezi için önemli stres koşullarını ortaya çıkarmaktadır [53-55].

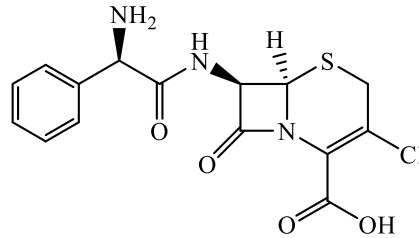
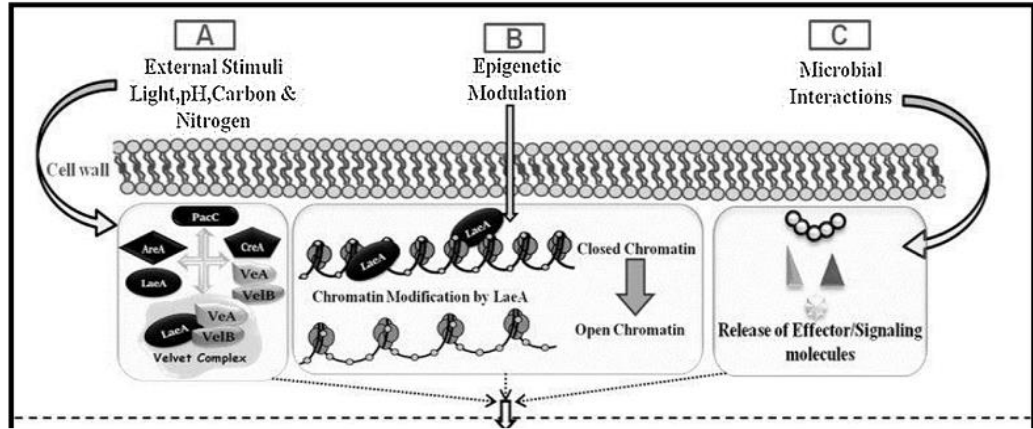
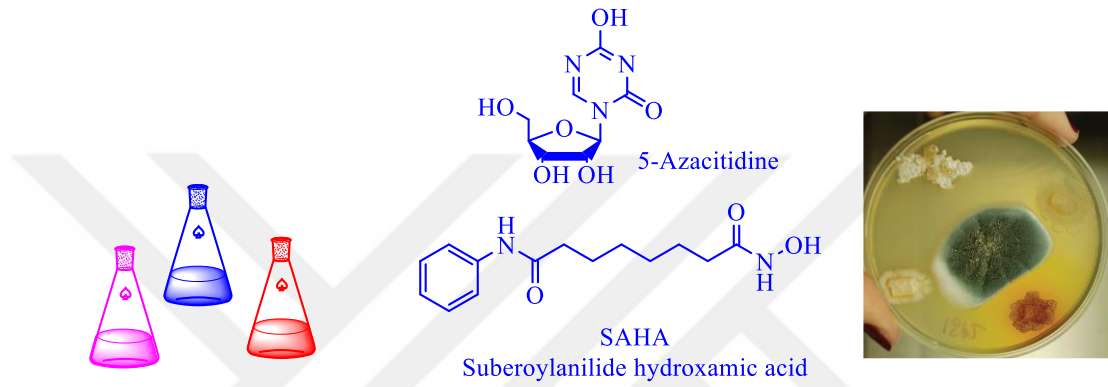
2.4 OSMAC (One Strain MANY Compounds – Tek Suş Pekçok Bileşik) ve Ko-Kültür

Doğada mikrobiyal suşlar çeşitli stres koşullarında ve farklı substratları kullanma durumunda kalmaktadırlar. Ancak laboratuvar koşullarında doğal ortamlarında karşılaştıkları pek çok etkenden uzakta ve güvende kültüre edilmektedirler. Bu durum mikroorganizmaların genetik analizlerle de belirlenen gerçek sekonder metabolit üretim potansiyellerinin açığa çıkmasını engellemektedir. Bundan dolayı araştırmacılar mikroorganizmaların sekonder metabolit üretiminden sorumlu gen bölgelerini veya metabolik yollarını laboratuvar koşullarında aktive etmek için farklı yöntemler denemiştir. Bunlar; OSMAC (One Strain MANY Compounds – Tek Suş Pekçok Bileşik), epigenetik modifikasyonlar, ko-kültür, ribozom mühendisliği ve genetik mutasyon denemeleri olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.5)[18, 19].

OSMAC (One Strain MANY Compounds – Tek Suş Pekçok Bileşik) denemelerinde mikrobiyal suşun laboratuvar koşullarında üretim şartlarını (sıcaklık, pH vb.) veya besiyeri bileşiminin değiştirilmesi ile sekonder metabolit profillerinin değiştirilmesi amaçlanmaktadır (Şekil 2.5). Mikroorganizmanın bünyesinde bulunan ve laboratuvarın güvenli koşullarında suskun kalan biyokimyasal ve genetik süreçlerin aktivitesi için uygulaması en kolay yöntemdir [18].

Mikroorganizmalar, doğada çok farklı türden mikroorganizmaların olduğu, büyük bir mikrobiyal topluluğun içinde yaşamaktadırlar. Yaşadıkları çevrede etraflarında bulunan mikroorganizmalar ile kısıtlı kaynaklar için rekabet halindedirler. Bu rekabette üstünlük sağlamak veya kendilerini korumak için geliştirdikleri çeşitli savunma mekanizmaları, araştırmacıların hedeflediği biyoaktif moleküllerin kaynağıdır [56]. Laboratuvar koşullarında ise mikroorganizmaların doğal ortamlarını

taklit etmek amacıyla ko-kültür denemeleri yapılmaktadır. Bu yöntemde iki veya daha fazla mikroorganizma aynı besiyeri içinde kültüre edilirler ve oluşturulan rekabet ortamı ile biyoaktif metabolit sentezinin artırılması veya çeşitlendirilmesi hedeflenir (Şekil 2.5) [19].



Şekil 2.5: Mikroorganizmaların sekonder metabolit üretiminden sorumlu gen bölgelerinin ve metabolit yollarının uyarılması [57]

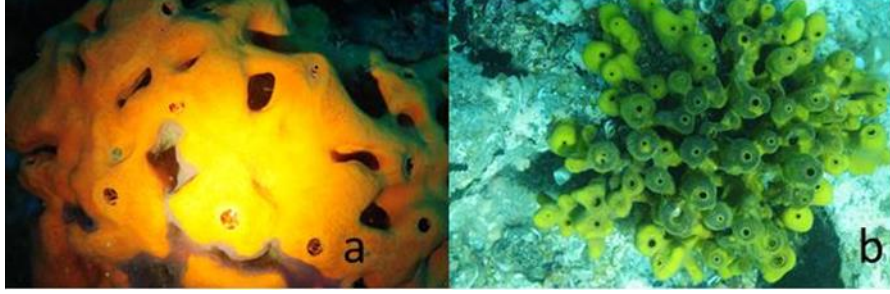
3 MATERYAL

3.1 Sünger Örnekleri

Tez kapsamında fungal suşların kaynağı olarak seçilen süngerler balıkçılar ile iletişime geçilerek 10 m derinlikten çekilen trol ağlarından toplanmıştır. Süngerlerin toplanmasında sırasında 620 göz büyüklüğünde modifiye trol ağı ve polietilen düğümlü 40 mm 210d/27 numara iplik kalınlığında 165 çevre göz sayısında 5 metre trol torbası kullanılmıştır. Proje kapsamında Enez-Edirne ve Aliğa-İzmir bölgelerinden 6 adet sünger örneği toplanıp, soğuk zincir korunarak (+4°C'de) laboratuvara getirilmiştir. Toplanan süngerler ve lokasyonları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Proje kapsamında toplanan sünger örneklerinden bazıları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Proje kapsamında toplanan sünger örneklerinin istasyonlara göre dağılımı.

Sünger Kodu	Sünger İsmi	Lokasyon	Derinlik
1.1.	<i>Axinella polypoides</i>	Enez-Edirne	10 m
1.2.	<i>Petrocia ficiformis</i>	Enez-Edirne	10 m
1.3.	<i>Chondrosia reniformis</i>	Enez-Edirne	10 m
1.4.	<i>Aplysina aerophoba</i>	Enez-Edirne	10 m
1.5.	<i>Spongia officinalis</i>	Enez-Edirne	10 m
5.1	<i>Agelas oroides</i>	Aliğa-İzmir	10 m



Şekil 3.1: Proje kapsamında toplanan sünger örneklerinden bazıları; a.) *Agelas oroides*, b.) *Aplysina aerophoba*

3.2 Besiyerleri

Besiyeri 1: Malt ekstrakt agar (MEA)

Aşağıda ortam içeriği belirtilen malt ekstrakt besiyerinin pH'ı 7.2 – 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize

edilmiştir. Bu besiyeri fungal suşların izolasyonunda ve fungal kültürlerin kısa süreli stoklanmasında kullanılmıştır [58].

Malt Ekstrakt Besiyeri İçeriği

Malt ekstrakt (Merck, Almanya)	15 g
Agar (Merck, Almanya)	15 g
Yapay deniz tuzu (Sigma-Aldrich, Almanya)	3.5 g
Gentamisin (Sigma-Aldrich, Almanya)	0.2 g
Distile su	1 l
pH	7.2-7.4

Besiyeri 2: Potato dekstroz agar (PDA)

Aşağıda ortam içeriği belirtilen ticari patato dekstroz agar (Merck-Almanya) besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır [58].

Potato Dekstroz Agar Besiyeri İçeriği

Patato Dekstroz Agar (Merck, Almanya)	24 g
Yapay deniz tuzu (Sigma-Aldrich, Almanya)	3.5 g
Gentamisin (Sigma-Aldrich, Almanya)	0.2 g

Distile su	1 l
pH	7.2-7.4

Besiyeri 3: Czapek Dox Agar (CDA)

Aşağıda ortam içeriği belirtilen ticari Czapek dox agar (CDA) (Merck-Almanya) besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır [59].

Czapek Dox Agar Besiyeri İçeriği

Czapek Dox Agar (Merck, Almanya)	50 g
Yapay deniz tuzu (Sigma-Aldrich, Almanya)	3.5 g
Gentamisin (Sigma-Aldrich, Almanya)	0.2 g
Distile su	1 L
pH	7.2 – 7.4

Besiyeri 4: Katı Pirinç Ortamı

100 g pirincin içine 3.5 g yapay deniz tuzu ve 110 ml distile su eklenip 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri fungal izolatlardan biyoaktif metabolit üretimi için yapılan kültüvasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca distile su ile hazırlanmış formu fermentasyon için kullanılmıştır [58].

Besiyer 5: Modifiye Czapek Besiyeri

Aşağıda ortam içeriği belirtilen modifiye Czapek besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri kültürasyon çalışmalarında kullanılmıştır [60].

Modified Czapek Besiyeri İçeriği

Glukoz (Merck, Almanya)	10 g/l
Mannitol (Merck, Almanya)	20 g/l
Sakkaroz (Merck, Almanya)	20 g/l
Maya ekstrakt (Merck, Almanya)	3 g/l
Mısır şurubu (Merck, Almanya)	1 g/l
Pepton (Merck, Almanya)	10 g/l
Triptofan (Merck, Almanya)	0.5 g/l
K ₂ HPO ₄ (Merck, Almanya)	0.5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck, Almanya)	0.5 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck, Almanya)	0.1 g/l
Agar-Agar (Merck, Almanya)	15 g/l
Distille Su	1000 ml
pH	7.2-7.4

Besiyer 6: MexA Besiyeri

Aşağıda ortam içeriği belirtilen MexA besiyeri 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri saflaştırılan fungal suşların uzun süre stoklanmasında kullanılmıştır [58].

MexA Besiyeri İçeriği

Malt ekstrakt (Merck-Almanya)	20 g
Maya ekstraktı (Merck-Almanya)	0.1 g
Gliserol (Merck-Almanya)	50 g
Agar (Merck-Almanya)	20 g
Distile su	1 l

Besiyeri 7: Lysogeny Broth Besiyeri

Aşağıda ortam içeriği belirtilen Lysogeny Broth besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri ko-kültür denemesinde kullanılan *Bacillus sbutilis* 162 trpC2 suşunun kültüre edilmesinde kullanılmıştır [61].

Lysogeny Broth Besiyeri İçeriği

Tripton (Merck, Almanya)	10 g
Maya Ekstraktı (Merck, Almanya)	5 g
NaCl (Merck, Almanya)	5 g
Distile Su	1000 ml
pH	7.2-7.4

Besiyeri 8: Müller Hinton Broth Besiyeri

Aşağıda ortam içeriği belirtilen Müller Hinton besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri biyoaktivite taramasında kullanılan insan patojenlerinin kültüvasyonunda kullanılmıştır.

Müller Hinton Broth Besiyeri İçeriği

Meat infusion (Merck, Almanya)	2 g
Kazein hidrolizat (Merck, Almanya)	17.5 g
Çözünür nişasta (Merck, Almanya)	1.5 g
Distile Su	1 l
pH	7.2-7.4

3.3 Bakteriler

Fungal suşlardan elde edilen metabolitlerin antimikrobiyal aktivitelerin taranmasında aşağıda belirtilen insan patojenleri kullanılmıştır.

- Çoklu antibiyotik duyarlı (amfisilin, karyomiksin, sefalekssin, sefaloglisin, sefaloridin sephalomisin, sefalotin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, kanamisin, novobiosin, tetrasiklin) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Çoklu antibiyotik dirençli (metisilin, oksasilin, vankomisin) *Staphylococcus aureus* ATCC 700699
- Vankomisin duyarlı *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* ATCC 51299
- *Enterococcus faecium* ATCC 35667
- Vankomisin ve teikoplanin dirençli *Enterococcus faecium* (ATCC 700221)
- Çoklu antibiyotik dirençli (seftazidim, gentamisin, tikarsilin, piperasilin, aztreonam, sefepim, siprofloksazin, imipenen, meropemem) *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA 1605

Ko-kültür denemesinde ise *Bacillus subtilis* 168 trpC2 suşu kullanılmıştır.

3.4 Cihazlar

- Otoklav (Hirayama-Japonya)
- İnkübatör (Incucell-Almanya)
- Kabin (Thermo Scientific Biological Safety Cabinets Class II - ABD)

- Terazi (Sartorius-Almanya)
- Hot plate (Heilpdoph-Almanya)
- Evaporatör (Heidolph-Almanya)
- UV Görüntüleyici (Camag-İsviçre)
- 600 MHz işletim frekanslı Bruker marka NMR spektroskopisi (Ameirka Birleşik Devletleri)
- HR-MS (Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi) (Thermo-Scientific – Amerika Birleşik Devletleri)
- Düşük Çözünürlüklü kütle spektroskopisi: Elektron impact kütle spektroskopisi (EI-MS): Finnigan MAT8430 (Thermo-Scientific – Amerika Birleşik Devletleri)
- Geri soğutucu (Heidolph-Almanya)
- Analitik yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemi (HPLC):
 - Pompa: Dionex P580 ALPG (Thermo Scientific, ABD)
 - Detektör: Dionexphotodiode Array Detector UVD 340S (Thermo Scientific, ABD)
 - Kolon ısıtıcı: STH 585 (Thermo Scientific, ABD)
 - Otomatik örnekleyici: ASI-100T (Thermo Scientific, ABD)
 - HPLC programı: Chromeleon (V. 6.3) (Thermo Scientific, ABD)
 - HPLC kolonu: Knauer (125 × 4 mm, ID) (Knauer, Almanya)
- Semi-preparative HPLC Sistemi;
 - Pompa: Merck Hitachi L-7100 (Hitachi, Japonya)
 - Detektör: Merck Hitachi UV detector-7400 (Hitachi, Japonya)
 - Knauer (300 × 8 mm, ID) (Knauer, Almanya)
- Optik rotasyon cihazı: Perkin-Elmer-241MC polarimetre (Perkin-Elmer, ABD)

- Liyofilizatör (Crist, Almanya)

3.5 Kullanılan Kimyasallar

- Metanol (Merck-Almanya)

- Etilasetat (Merck-Almanya)

- *n*-Hekzan (Merck-Almanya)

- Aseton (Merck-Almanya)

- Kloroform (Merck-Almanya)

- Silika jel (Merck-Almanya)

- Sephadex LH20 (GE Healthcare-İsviçre)

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)

- NaCl (Merck-Almanya)

-K₂HPO₄ (Merck-Almanya)

- MgSO₄.7H₂O (Merck-Almanya)

- FeSO₄.7H₂O (Merck-Almanya)

- Yapay deniz tuzu (Sigma, Almanya)

- NMR çözücüleri

- Acetone-*d*₆ (Merck, Almanya)

- Chloroform-*d*₆ (Merck, Almanya)

- DMSO-*d*₆ (Merck, Almanya)

- Methanol-*d*₆ (Merck, Almanya)

- FDAA; N-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanine amide (Marfey's Reaktifi) (Sigma-Aldrich, Almanya)

3.6 Kullanılan Hücre Hatları

- Fare lenfomam hücre hattı L5178Y

3.7 Kullanılan PZR Primerleri

- ITS1 (Forward, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

- ITS4 (Reverse, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')



4. YÖNTEMLER

4.1 Fungus izolasyonu

Fungal suşların süngerlerden izolasyonu İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Fungus izolasyonu için yapılan denemeler ön hazırlık ve kültürasyon olarak iki aşamada yapılmıştır.

İlk aşamada sünger üzerinde bulunan debris ve istenmeyen organizmaların uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Bunun için toplanan sünger örnekleri steril deniz suyu ile 3 defa çalkanarak yıkanmıştır. Böylece örnek yüzeyine yapışmış debris (toprak, taş vb.) uzaklaştırılmıştır. Ardından örnekler % 70 etanolün (v/v) içinde 60-120 saniye bekletilerek örneklerin dış yüzeyinden istenmeyen mikroorganizmalardan arındırılması amaçlanmıştır. Bu işlem süngerin iç dokusunda yaşayan mikroorganizmaların zarar görmemesi için steril pamuklarla kurularak sonlandırılmıştır. Böylece süngerle ilişkili olmayan organizmalar ve izolasyon sırasında kontaminasyona neden olabilecek etkenler elimine edilmiştir.

İkinci aşamada, sünger örnekleri steril edilmiş bıçaklarla 1cm x 1cm boyutlarında kesilerek izolasyon için hazırlanmış ve 0.2 g/l antibiyotik içeren malt ekstrakt agarlı (15 g/l malt ekstrakt, 20 g/l agar, 1 l doğal deniz suyu, pH 7.4-7.8), potato dextrose agarlı (20 g/l patotato desktrorse agar, 1 l doğal deniz suyu, pH 7.4-7.8) ve Czapek dox agarlı (50 g Czapek dox agar, 1 l doğal deniz suyu, pH 7.4 – 7.8) petrilere yerleştirilmiş ve petriler parafilmle sarılarak laboratuvar koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık iki haftalık inkübasyon süresince fungusların üremeleri takip edilerek, büyüme durumlarına ve morfolojik farklılıklarına göre funguslar temiz malt ekstrakt

agarlı petrilere aktırılarak saflaştırılmıştır. İzolasyon aşamasında ilk petrilere bakteriyel üremeyi baskılamak için 0.2 g/l gentamisin eklenmiştir [58].

4.2 Kültüvasyon

Tez kapsamında saflaştırılan fungal suşlar bölüm 2.1’de belirtilen besiyeri 4 ve 5’de kültüre edilmiştir. Bunun için formülasyonu belirtilen besiyeri hazırlanarak sterilize edilmiş, ardından malt ekstrakt agarda kültüre edilen saf suşlardan steril bıçakla birkaç parça suşu içeren agar, besi yerlerinin içine ilave edilmiştir. Ardında 4 hafta boyunca laboratuvar koşullarında hareketsiz bir şekilde kültüre edilmiştir [58, 60].

4.3 Özütleme Çalışmaları

Kültüvasyon çalışmalarının ardından fermantasyonun yapıldığı erlenlerdeki besiyerlerinin üzerine 300 ml etilasetat eklenmiş ve bir gece boyunca karıştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen özüt ilk olarak saf su ile yıkanmış ve içeriğinde olan tuz, nişasta gibi bileşikler ile besiyeri artıkları uzaklaştırılmıştır. Temizlenen etilasetat 40°C’de vakum altında kurutulmuştur. Kurutulan özüt 1:1 oranında % 90 metanol:n-hekzan karışımı ile çözündürölüp sıvı:sıvı (liquid-liquid extraction) ayırımı yapılmıştır. Bu işlem sonrasında % 90 metanol fazı 40°C’de vakum altında kurutulmuş ve kromatografik ayırma-saflaştırma işlemlerine kullanılmıştır [58, 60].

4.4 Biyoaktivite Taramaları

Tez kapsamında saflaştırılan moleküllerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 3. 2’de belirtilen test organizmalarına ve sitotoksik aktiviteleri Bölüm 3.5 belirtilen hücre hattına karşı taranmıştır. İnsan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite minimum inhibitör konsantrasyonu belirlemek amacıyla seri dilüsyon yöntemler ile Heinrich Heine Üniversitesi, Farmasötik Biyoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü gerçekteşirilmiştir [62]. Sitotoksite taraması ise fare lenfoma hücre hattı L5178Y’ye karşı Johannes Gutenberg Üniversitesi Fizyolojik Kimya Enstitüsü’nde klasik MTT

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [63].

4.4.1 Seri dilüsyon yöntemi

Proje kapsamında saf moleküllerin minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK) için CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) tarafından belirlenen standart yöntem ile yapılmıştır [62] ve bölüm 3.2'de belirtilen *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 700699), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Enterococcus faecium* (ATCC 35667), *Enterococcus faecium* (ATCC 700221) ve *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA 1605) organizmaları test için kullanılmıştır.

İlk olarak denemede kullanılacak test organizmalarının Müller Hinton Agar (MHA) besiyerini içeren petrilerde 24 saatlik aktif kültürleri elde edilmiştir. Ardından 0.5 Mcfarland standardına göre hücre süspansiyonları steril serum fizyolojik (%0.87 NaCl) kullanılarak hazırlanmıştır. Test edilecek saf moleküller 125 - 0.24 µg/ml derişim aralığında taranmıştır. Mikro kuyucuklar içeren 96'lık plakalarda denemeler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak saf moleküller 1 mg/ml olacak şekilde stok solusyonları dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmıştır. Ardından denemelerin yapılacağı sıraların ilk ve son kuyucukları boş bırakılarak geride kalan kuyucuklara 20 µl Müller Hinton Broth (MHB) sıvı besiyeri konulmuştur. Sonrasında ilk kuyucuğa 40 µl stok solusyon aktarılmış ve buradan 20 µl alınıp ikinci kuyucuğa aktarılmıştır. Bu işlem son kuyucuğa kadar tekrarlanmıştır. Aktarma işleminden sonra kuyucuklara ardışık şekilde 160 µl MHB eklenmiş ve son olarak 0.5 Mcfarland bakteri solusyonundan 20 µl eklenerek kuyucukların hacimleri 200 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bakteri, besiyeri ve etken madde karışımları 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklarda mikrobiyal büyümenin gözleendiği ilk kuyucuk ile bu kuyucuktan önceki derişim aralığı minimum inhibitör derişim aralığı olarak kayıt edilmiştir. Ayrıca 650 nm'de kuyucuklardaki bulanıklık ölçülmüştür. Bu deneme her bir patojen

için üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Denemde DMSO negatif kontrol, rifamisin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.4.2 Sitotoksosite taraması

Hücre kültürü ile yapılan taramalarda klasik MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) yöntemi kullanılmıştır [63]. Bu yöntemde ilk olarak saf moleküller % 96'lık (v/v) etanol ile çözündürülerek derişimleri 10 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Ekspansiyel olarak büyüyen hücreler hasat edilmiş ve 100 µl'de 1×10^4 hücre/ml olarak şekilde 96'lık ELISA Plaklarına aktarılmıştır. Kuyucuklarda bulunan hücrelerin üzerine son derişimi 3-10 µg/ml olacak şekilde seyreltilerek saf moleküller konulmuştur. Test plakları 37°C'de % 5'lik CO₂'lik etüvde 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 5 mg/ml (fizyolojik tampon solüsyonu; 1.5 mM KH₂PO₄, 6.5 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.2) derişimdeki MTT solüsyonundan 20 µl eklenmiştir. Hücreler, 4 saat 37°C'de % 5'lik CO₂'lik etüvde inkübasyona bırakılmış ve ardından % 1'lik formaldehit ve % 1'lik kalsiyum klorür ile fikse edilmiştir. Hücreler 95:5 izopropanol:formik asit karışımı kullanılarak parçalanmıştır. En sonunda hücre içerisinde MTT'nin dönüşüm ürünü olan formazan molekülünün 570 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen verilerden aşağıda belirtilen formüle göre yüzde canlılık değerleri belirlenmiştir. Tüm denemeler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak etanolun eklendiği hücre

hatları kullanılmıştır. Taramada kahhalalide F (EC₅₀ = 4.3 µM) pozitif kontrol olarak denemelerde kullanılmıştır.

$$\% S = \frac{M - B1}{B2 - B1}$$

% S; yüzde canlılık

M; Metabolit uygulanan hücrelerin absorbansı

B1; Boş hücre kültürü ortamının absorbansı

B2; Herhangi bir maddenin uygulanmadığı hücre hatlarının absorbansı

4.5 Fungal İdentifikasyon

İzole edilen suşlardan seçilen örneklerinin rDNA'ları izole edilmiş ve ITS1 (internal transcribed spacer) bölgesi dizi analizlerine dayalı olarak tür tanımlaması yapılmıştır. Bu deneme de iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Heinrich Heine Üniversitesi, Farmasötik Biyoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde fungal DNA'lar izole edilip polimeraz zincir reaksiyonu (PRZ) ile çoğaltılmış, ikinci aşamada ise izole edilen DNA'lardan sekanslama işlemleri GATC-Biotech (Köln-Almanya) firmasından hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

DNA izolasyonunda Zymo Research (ABD) DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İlk olarak MEA besiyerinde kültüre edilen fungal suşlardan 50-100 mg fungal misel ZR bashingbead® içeren tüplere toplanmış ve üzerine kit ile birlikte hazır gelen liziz tamponundan 750 µl eklenmiştir. Hazırlanan karışım 5 dakika boyunca vortekslenerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Parçalanmış hücre karışımı 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz Zymo-spin™ IVspin Filter'e transfer edilmiştir. Transfer işleminden sonra tekrar 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Burada özel olarak hazırlanan filtrelerde DNA tutulmuş, hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. Hücre artıklarından arındırılan DNA'yı tutan filtre üzerine 1200 µl DNA bağlanma tamponu eklenerek tutulan DNA'lar filtreden süzülmüştür. Süzülen DNA örneğinden 800 µl Zymo-Spin IIC Column'a aktarılıp, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Aynı

işlem geride kalan DNA örneği için ikinci kez tekrar edilmiştir. Ardından filtrenin üzerine önce 200 µl Pre-Wash Buffer eklenerek 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve aynı filtre üzerine 500 µl Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer eklenip 10.000 g'de 1 dakika daha santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Son olarak DNA'nın bağlı olduğu Zymo-Spin IIC Column temiz 1.5 ml'lik eppendorfa taşınmış ve üzerine 75 µl DNA Elution Buffer eklenip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Tüm bu işlemlerin sonunda ultra saf DNA PRZ denemesi için hazır hale gelmiştir.

Saflaştırılmış DNA'ların PZR ile çoğaltılmalarında ITS1 (Forward, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'') ve ITS4 (Reverse, 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'') evrensel primerler kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları için yine Zymo Research firmasının belirlemiş olduğu protokol takip edilmiştir. Buna göre, 25 µl Hot Start Master Mix, 1 µl ITS1 primeri, 1 µl ITS4 primeri, 2 µl kalıp DNA ve 21 µl nükleaz içermeyen su karışımı PZR tüpleri içinde hazırlanmıştır. Polimeraz reaksiyonu şartları, 95°C'de 2 dk (ön denatürasyon), 95 °C'de 1 dk (denatürasyon), 55°C'de 1 dk (primerlerin bağlanma aşaması), 72°C'de 1 dk (yeni sentezlenen DNA zincirlerinin uzaması) ve 72°C'de 5 dk (son uzama) olacak şekilde programlanmış ve denatürasyon, primer bağlanması, uzama aşamaları 35 kez tekrarlanarak DNA miktarı arttırılmıştır.

PZR reaksiyonunun sonunda elde edilen DNA'ların agaroz jel elektroforez yöntemi ile sekanslama işlemi için yeterli saflıkta olup olmadıkları kontrol edilmiştir. İlk olarak 1 g agaroz jel, 100 ml TBE (Tris/Borate/EDTA) Buffer ve 10 µl SYBR Safe DNA Jel Stain boyası karıştırılmıştır. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz çözününceye kadar ısıtılmış ve ardından agaroz jel elektroforez cihazına dökülmüştür. Katılaşması beklenmeden DNA'ların yükleneceği kuyucukların oluşturulması için jel üzerine tarak yerleştirilmiş ve katılaşmaya bırakılmıştır. Bu sırada çoğaltılan DNA'dan 20 µl alınıp, 4 µl 6X gel loading dye ile karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan DNA ve boya karışımı agaroz jel üzerinde hazırlanan kuyucuklara yüklenmiştir. Agaroz jelin döküldüğü sistem daha sonra TBE Buffer içerisine yerleştirilmiş ve jelin üstünü kaplayacak şekilde TBE Buffer ile tamamlanmıştır. Son olarak jel sistemi elektrik güç kaynağına bağlanmış ve 75 V'da 45 dakika boyunca DNA'ların yürümesi sağlanmıştır.

DNA'ların yürütülmesi bittikten sonra jel sistemden alınarak UV ışık altında DNA'ların saflıkları kontrol edilmiştir. Saf olan DNA'lar yine Zymo Research firmasının Gel Recovery Kiti protokolüne göre agaroz jelden izole edilmiştir. Elde edilen saf DNA'lardan 7.5 µl alınıp üzerlerine 2.5 µl ITS1 primeri eklenerek sekanslama işlemine gönderilmiştir.

4.6 OSMAC (One Strain many Compounds – Tek Suş Pekçok Bileşik) ve Ko-Kültür Denemeleri

Proje kapsamında *Aspergillus carneus* suşu ile OSMAC ve ko-kültür denemeleri yapılmıştır.

OSMAC denemesi için *A. carneus* suşu yapay deniz sulu katı pirinç ortamında, saf sulu katı pirinç ortamında ve modifiye Czapek besiyerinde kültüre edilerek besiyeri içeriklerinin farklanmasının seçilen suşun ürün profiline olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır [18, 58, 60]. Bunun için Bölüm 3.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan besiyerlerine fungal suşu içeren agarlı parçaları atılmış ve 4 hafta boyunca kültüre edilmiştir. Sonrasında bölüm 4.3'de belirtildiği gibi özütlenmiştir.

Ko-kültür denemesinde ise, *A. carneus* suşu *Bacillus subtilis* 168 trpC2 ile birlikte aynı kültür kabında kültüre edilmiştir. Bu denemede hücreler arasındaki etkileşimin sekonder metabolit üretim profiline ve moleküllerin biyosentezine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır [19]. Denemede ilk olarak *B. Subtilis* lysogeny broth (LB) sıvı besiyerinde 37°C'de 200 rpm karıştırma hızında eksponansiyel fazın ortasına kadar kültüre edilmiştir. Ardından bakteri hücreleri LB besiyeri ile seyreltilerek optik yoğunluğu 600 nm'de 0.2 – 0.4 (OD₆₀₀ of 0.2 – 0.4) olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 20 ml, 100 g pirinç ile hazırlanmış besiyerlerinin üzerine eklenerek, 37°C'de dört gün inkübe edilmiştir. Dördüncü günün sonunda bakteri içeren pirinç ortamlarının üzerine fungus içeren agarlı besiyeri eklenerek 4 hafta kültüre edilmiştir. Fungusun tek kültürü ve bakterinin tek kültürü kontrol amaçlı hazırlanarak aynı süre içinde fermentasyonları yapılmıştır. Kültürasyon sonunda tüm

besiyerleri 300 ml etilasetat ile özütlenmiş ve her bir erlenden elde edilen özütün içerikleri HPLC kromatogramları ile karşılaştırılmıştır [61].

4.7 Kromatografi Denemeleri ve Metabolit İzolasyonu

Kromatografi, örneğin içindeki molekül veya moleküllerin mobil faz ile durağan faz arasındaki farklı etkileşimler sonucu ayrılmasında veya analizinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle ayırım örneğin içerisindeki maddelerin durağan faz ile hareketli faz arasında olan affinite farkıyla olur. Maddeler süreç içerisinde durağan fazda kendilerine özgü şekilde farklı hızlarda hareket ederler [58].

Denemelerde ince tabaka kromatografi (İTK) denemeleri, alüminyum plaklar üzerine silika jel yüklenerek hazırlanmış plakalarda (60 F254 layer thickness 0.2 mm, Merck) yapılmıştır. Ham özütlerin ve ilerleyen ayırma saflaştırma işlemlerin izlenmesinde ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 9:1 kloroform:metanol kullanılmıştır. İTK plakları yürütme işleminin ardından 254 nm ve 366 nm dalga boylarında UV lamba altında incelenmiştir.

Vakum likit kromatografisi (VLK) denemelerinde, özel cam kolona silika jel doldurulmuş ve üzerine ham özüt eklenmiştir. Ardından kolondan 500'er ml *n*-hekzan:etilasetat (100:0-0:100), diklorometan:metanol (100:0-0:100) ve aseton:trifluoroasetik asit (100: % 0.1) karışımları vakum altında geçirilerek fraksiyonlama işlemi yapılmıştır. Burada da ham özütün içinde bulunan moleküller mobil faz ve durağan faz arasındaki etkileşimlerle gruplandırılmıştır.

Bir diğer açık kolon uygulamasında Sephadex LH 20 dolgu maddesi ile cam kolonlar hazırlanmıştır. Bu denemede kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Sephadex LH 20 fraksiyonların içerisinde bulunan moleküller, molekül ağırlığına göre ayırım sağlamaktadır. Kullanılmak istenilen organik çözünen veya çözünen sisteminde çözünen moleküller Sephadex LH 20'nin içinden geçerken molekül ağırlıklarına göre farklı

hızlarda hareket etmektedir. Bu da moleküllerin fraksiyonlanmasını veya saflaştırılmasını sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda, ayırma saflaştırma işlemlerinin kontrolü ve ilerleyen adımların belirlenmesinde ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC-Thermo Scientific-ABD) sistemi kullanılmıştır. Sistem otomatik olarak kontrol edilmektedir. Hareketli faz olarak metanol ve nanopure su ile hazırlanmış pH 2 formik asit tamponundan oluşan karışım zamana bağlı artan gradientte kullanılmaktadır. Sistem, otomatik olarak hazırlanan örnekten 20 µl alıp RP C18 kolona enjekte etmektedir. Enjeksiyon sonrasında 0. dakikada 10:90 metanol:formik asit ile başlayıp 35. dakikada 100:0 metanol:formik asit karışımına ulaşmaktadır. Kolondan ayrılan moleküller Photodiode Array Detector UVD 340S ile 4 farklı dalga boyunda (235 nm, 254 nm, 280 nm ve 340 nm) analiz edilmektedir.

Küçük miktardaki fraksiyonları saflaştırmak için Semi-Preperatif yüksek basınçlı likit kromatografi cihazı (Semi-Prep HPLC, Hitachi) kullanılmıştır. Bu cihazda ayırma yapılacak fraksiyonun HPLC kromatogramına göre metanol ve % 0.1 trifluoro asetik asit (v/v) karışımı oranlanarak ayırma saflaştırma işlemi yapılmıştır. Sisteme 3 mg/ml derişiminde 100 µl elle enjeksiyon yapılmıştır. 5 ml/dakika akış hızında çalışılmıştır. Hazır doldurulmuş RP C18 kolon kullanılmıştır. Sistemde yapılan saflaştırma işlemi UV detektör ile izlenmektedir. Bu araştırma kapsamında yapılan fungal metabolitlerin ayırma saflaştırma işlemleri Heinrich Heine Üniversitesi, Farmasötik Biyoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Tez projesi kapsamında ilk olarak Aliğa'daki (İzmir) yerel balıkçıların ağından alınan *Agelas oroides* süngerinden izole edilen *Penicillium chrysogenum* metabolit izolasyonu için seçilmiştir. *P. chrysogenum* suşu da ilk olarak yapay deniz tuzu (Sigma) ile hazırlanmış katı pirinç ortamında küçük çapta üretimi yapılmış ve Bölüm 4.3'de belirtildiği gibi özütlenmiştir. Özütleme işleminin ardından 1.5 gr ham özüt elde edilmiştir. Ham özüt asetonunun mobil faz olarak kullanıldığı Sephadex LH 20 açık kolonunda fraksiyonlanarak 6 alt fraksiyona (P1-6) ayrılmıştır. P1 (300 mg) alt fraksiyonu metanolün hareketli faz olarak kullanıldığı Sephadex LH 20 ile

doldurulmuş açık kolona uygulanmış ve üç alt fraksiyona (P1A-C) ayrılmıştır. P1B (70 mg) alt fraksiyonu son olarak Semi-Prep HPLC uygulanarak Conidiogenone B (**1**, 0.5 mg) ve Conidiogenone C (**2**, 0.5 mg) bileşikleri izole edilmiştir. Yapılan ilk fraksiyonlamadan elde edilen fraksiyon P3'de (250 mg) metanolun mobil faz olarak kullanıldığı Sephadex LH 20 kolonunda fraksiyonlanarak üç alt fraksiyona (P3A-C) ayrılmıştır. P3B (50 mg) fraksiyonu Semi-Prep HPLC'ye uygulanarak cyclophenol (**3**, 0.5 mg) ve viridicatin (**4**, 0.5 mg) izole edilmiştir.

İkinci olarak Aliğa'daki yerel balıkçıların ağından alınan *Agelas oroides* süngerinden izole edilen *A. carneus* fungusu yapay deniz tuzu ile hazırlanan katı pirinç ortamında, modifiye Czapek besiyerinde ve saf su ile hazırlanan pirinç ortamında *B. subtilis* ile ko-kültüre edilmiş ve bu ortamlarının özütlerden metabolit izolasyonu yapılmıştır. Tüm üretim ortamları Bölüm 4.3'de belirtildiği gibi özütlenerek kromatografik ayırma-saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur. *A. carneus* suşu ilk olarak yapay deniz tuzu ile oluşturulan katı pirinç ortamından metabolit izolasyonu çalışılmıştır. 1.5 g ham özüt önce vakum likit kromatografi (VLK) yöntemiyle *n*-hekzan:etilasetat (100:0 – 0:100), diklorometan:metanol (100:0 – 0:100) ve aseton:trifluoroasetik asit (100:% 0.1) çözgen sistemleri ile 9 alt fraksiyona (A1-9) ayrılmıştır. A3 (18 mg) fraksiyonu Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve aniquinazoline E (**5**, 2.4 mg) elde edilmiştir. Ardından A1 fraksiyonu (145 mg) metanol ile çözündürülmüş ve santrifüj edilerek çözünmeden halde kalan partiküller ayrılmıştır. Çözünmeden kalan kısmın yapısı sterigmatocystin (**6**, 7 mg) olarak aydınlatılmıştır. A1 alt fraksiyonun metanol ile çözünen kısmı (138 mg) derişitirilip, Semi-Prep HPLC'ye uygulanmış ve O-demetil sterigmatocystin (**7**, 3.5 mg), sterigmatin (**8**, 1.5 mg), versicolorin C (**9**, 3.0 mg), averufin (**10**, 9.0 mg), arugosin C (**11**, 3.0 mg) ve norsolorinic asit (**12**, 3.0 mg) izole edilmiştir. A4.2 (320 mg) fraksiyonu aseton ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonunda fraksiyonlanmıştır. Bu kolondan elde edilen A4.2.1 (105 mg) alt fraksiyonu Semi-Prep HPLC ile saflaştırılarak asteltoksin E (**13**, 1.5 mg) izole edilmiştir.

A. Carneus suşunun modifiye Czapek besiyerinde büyük çapta üretiminin ardından elde edilen ham özüt (1.5 g) ilk olarak silika jel ile hazırlanmış VLK'da artan gradientte *n*-hekzan:etilasetat (100:0 – 0:100), diklorometan:metanol (100:0 – 0:100)

ve aseton:trifluoro asetik asit (100:% 0.1) çözügen sistemleri ile 11 fraksiyona (C1-11) ayrılmıştır. C2 (500 mg) alt fraksiyonu aseton ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonu ile üç alt fraksiyona (C2.1-3) ayrıl ve averufin (**10**, 5 mg) kolondan saf olarak alınmıştır. C2.2 alt fraksiyonu (17 mg) Semi-Prep HPLC sistemi ile saflaştırılmış ve diorcinol (**15**, 3 mg) izole edilmiştir. VLK denemesinden elde edilen C3 fraksiyonu (200 mg) aseton ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonu ile üç alt fraksiyona (C3.1-3) ayrılmış ve sterigmatocystin (**6**, 15 mg) kolondan saf olarak elde edilmiştir. Alt fraksiyon C3.1 (100 mg) Semi-Prep HPLC ile fraksiyonlanmış ve aniquinazoline E (**5**, 2 mg) saflaştırılmıştır. C3.2 alt fraksiyonu (60 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve versicolorin C (**9**, 2 mg) izole edilmiştir. Modifiye Czapek besiyerinden elde edilen VLK fraksiyonlarından C7 (500 mg) metanol ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonu ile yedi alt fraksiyona (C7.1-7) ayrılmıştır. Alt fraksiyonlardan C7.1 (50 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve asteltoksin E (**12**, 1 mg) izole edilmiştir. Bir diğer alt fraksiyon C7.2 (200 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve terrelumamide C (**15**, 3 mg) elde edilmiştir.

A. carneus suşu saf sulu pirinç ortamında tek ve *B. subtilis* bakterisi ile birlikte kültüre edilmiştir. Kültürasyon sonunda ürün profilleri analitik HPLC ile karşılaştırılmış ve ko-kültür ortamından elde edilen özütten metabolit izolasyonu yapılmıştır. 5 gr ham özüt ilk olarak VLK'da artan gradientteki *n*-hekzan:etilasetat (100:0 – 0:100), diklorometan:metanol (100:0 – 0:100) ve aseton:trifluoro asetik asit (100:% 0.1) çözügen sistemleri ile 10 fraksiyona (CC1-10) ayrılmıştır. VLK fraksiyonların CC1 (480 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve 25-O-metilarugosin (**16**, 2 mg) izole edilmiştir. CC2 (1.7 g) aseton ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonu ile 10 alt fraksiyona (CC2.1-10) ayrılmıştır. Alt fraksiyonlardan C2.2 (100 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve aniquinazoline E (**5**, 1.6 mg), O-demetil sterigmatocystin (**7**, 2.0 mg) ve arugosin C (**10**, 3.4 mg) elde edilmiştir. Bir diğer alt fraksiyon CC2.4 (140 mg) Semi-Prep HPLC'ye uygulanmış ve averufin (**9**, 4.0 mg) ve versicolorin C (**8**, 3.0 mg) izole edilmiştir. CC2.6 (100 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve diorcinol (**13**, 1.5 mg). CC2.8 (120 mg) fraksiyonu da Semi-Prep HPLC'ye uygulanmış ve oksi-sterigmatocystin C (**17**, 1.5 mg) ve dihidroksi-sterigmatocystin (**18**, 1.5 mg) izole

edilmiştir. CC4 fraksiyonu (230 mg) aseton ile hazırlanmış Sephadex LH 20 kolonunda 3 alt fraksiyona (CC4.1-3) ayrılmıştır. Alt fraksiyonlardan CC4.3 (30 mg) Semi-Prep HPLC ile saflaştırılmış ve nidurufin (**19**, 3 mg) izole edilmiştir.

4.8 Yapı Analizi

Yapı tayini için ilk olarak bileşiklerin molekül ağırlıkları likit kromatografi-kütle spektroskopisi (LC/MS) cihazı olan Finnigan LCQ-DECA (Thermo Scientific, ABD) (HPLC/ESI-MS) kullanılmıştır. Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HR-MS) yöntemi ile molekül formülü belirlenmiştir. Bunun için Micromass Qtof 2 mass spectrometer (Water, ABD) (LC/MS/MS) cihazı kullanılmıştır.

Moleküllerin kimyasal yapıları nükleer magnetik rezonans (NMR) analizleri ile tamamlanmıştır. Analizi yapılacak örnekler dötoryum içeren çözücülerle çözdürülüp Bruker Avance III 600 spectrometer NMR cihazında 300°K'de yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen spektrumlardan kimyasal kaymalar (δ) ppm ölçeğinden ve yarıma sabitleri (J) Hz ölçeğinde kayıt edilmiştir.

Polarize ışık saf bir molekülden oluşan çözeltinin içinden geçerken belirli bir açıda çevrilir. Bu çevrim ışığın karşılaştığı kiral moleküllerin sayısına bağlıdır. Bundan dolayı ölçümler belirli bir derişimde yapılmakta ve elde edilen çevrim açıları özgül çevirme $[\alpha]$ olarak tanımlanır. Bu değer aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

Burada $[\alpha]$: özgül çevirme,

α : gözlenen çevirme,

c : g/100 ml cinsinden derişim

l : desimetre cinsinden tüpün uzunluğu (1dm = 10 cm)

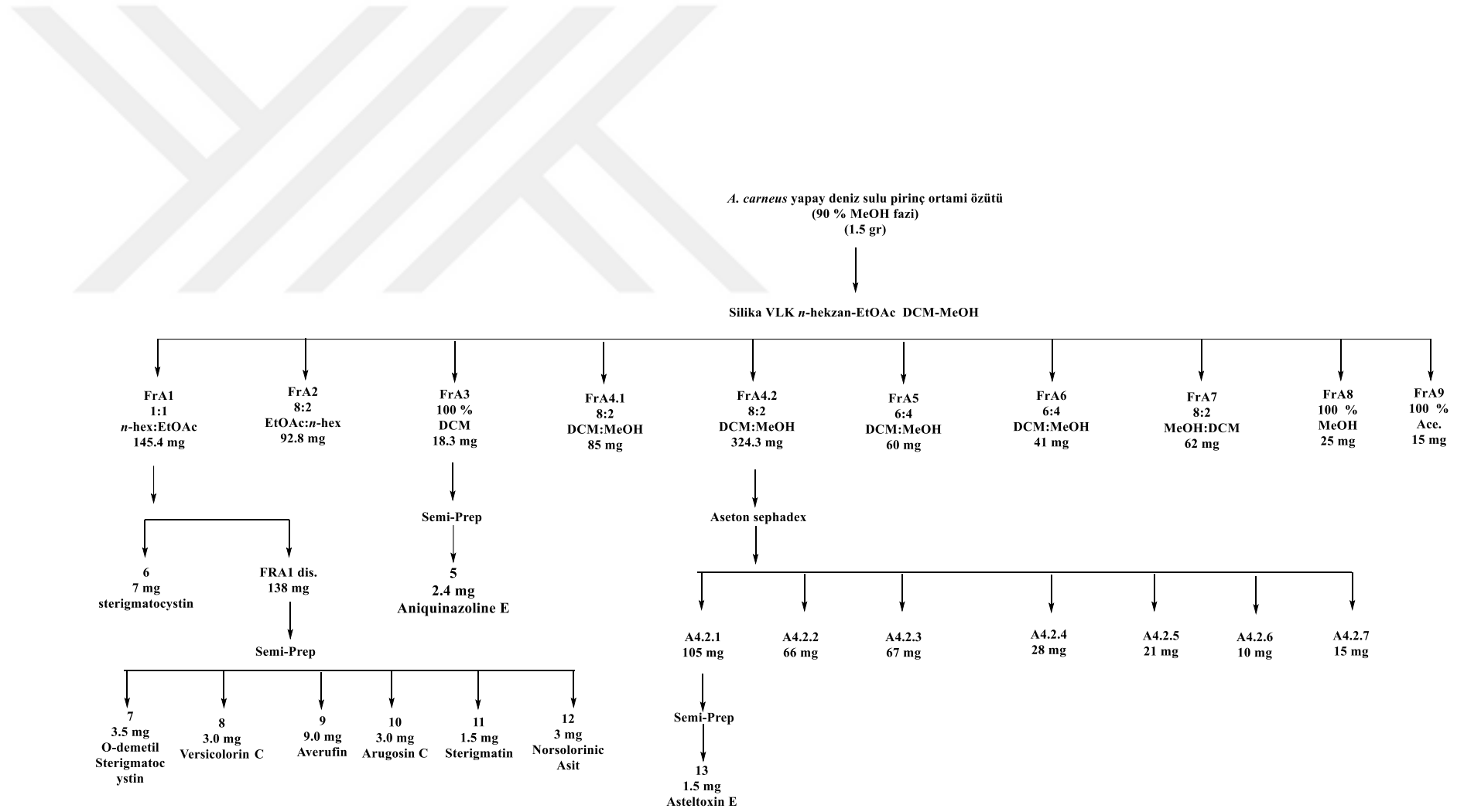
Ayrıca özgül çevirme kullanılan ışığın dalga boyunada bağlıdır ve günümüzde sodyum lambasının D çizgisi (589 nm) kullanılır. Projede izole edilen moleküllerin optik rotasyonu Perkin-Elmer-241MC polarimeter cihazı ile ölçülmüş ve elde edilen

ölçümler literatür bilgileri ile karşılaştırılarak moleküllerin üç boyutlu yapıları tespit belirlenmiştir.

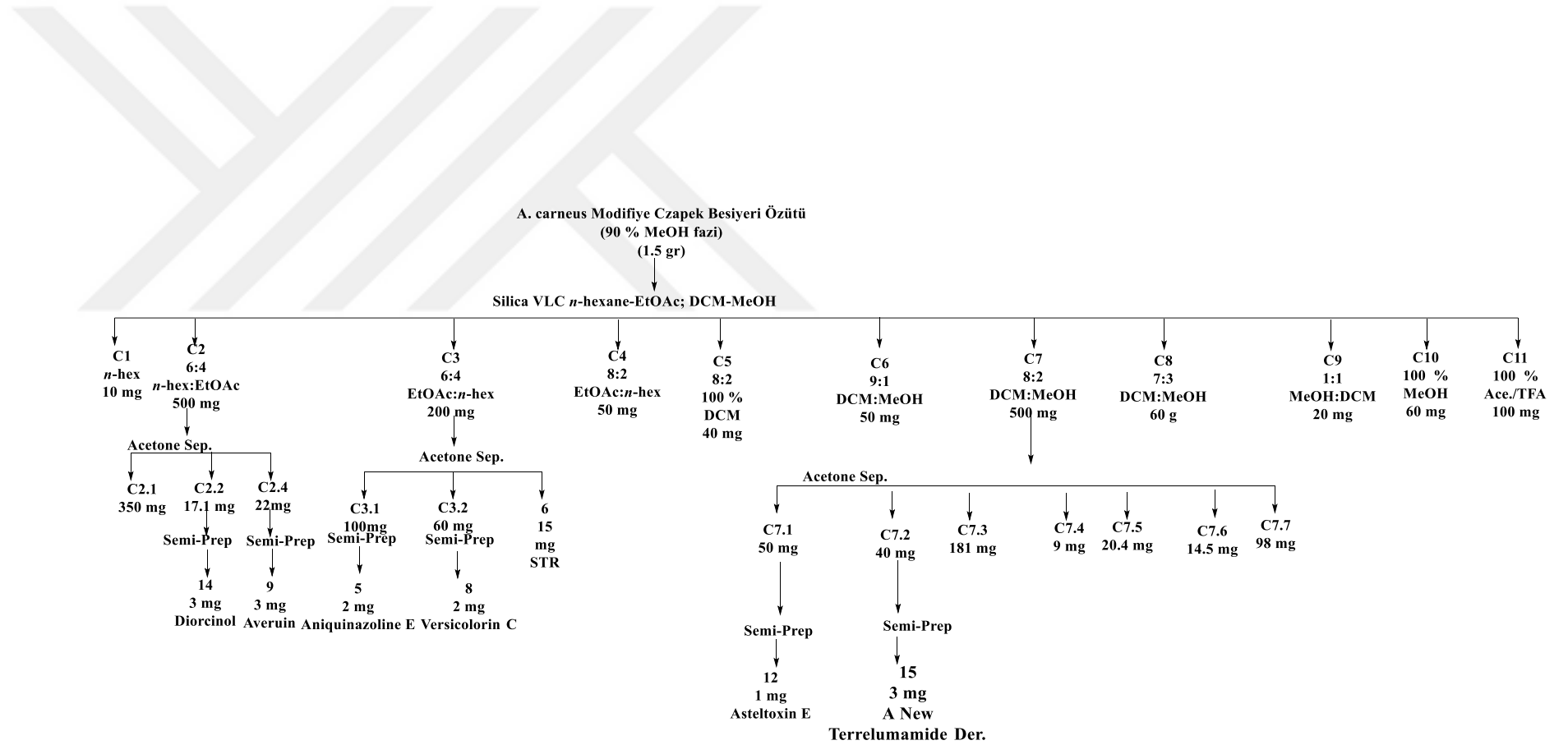
4.8.1 Marfey's reaksiyonu

İzole edilip yapıları aydınlatılan bileşiklerdeki amino asitlerin absolute konfigürasyonlarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Yöntemde ilk olarak asidik koşullarda peptid bağları yıkılarak amino asit içeriği ortaya çıkarılır. Sonrasında amino asit(ler) derivatize edilir ve HPLC'de standart amino asitlerle alıkonma zamanları karşılaştırılarak absolute konfigürasyon belirlenir.

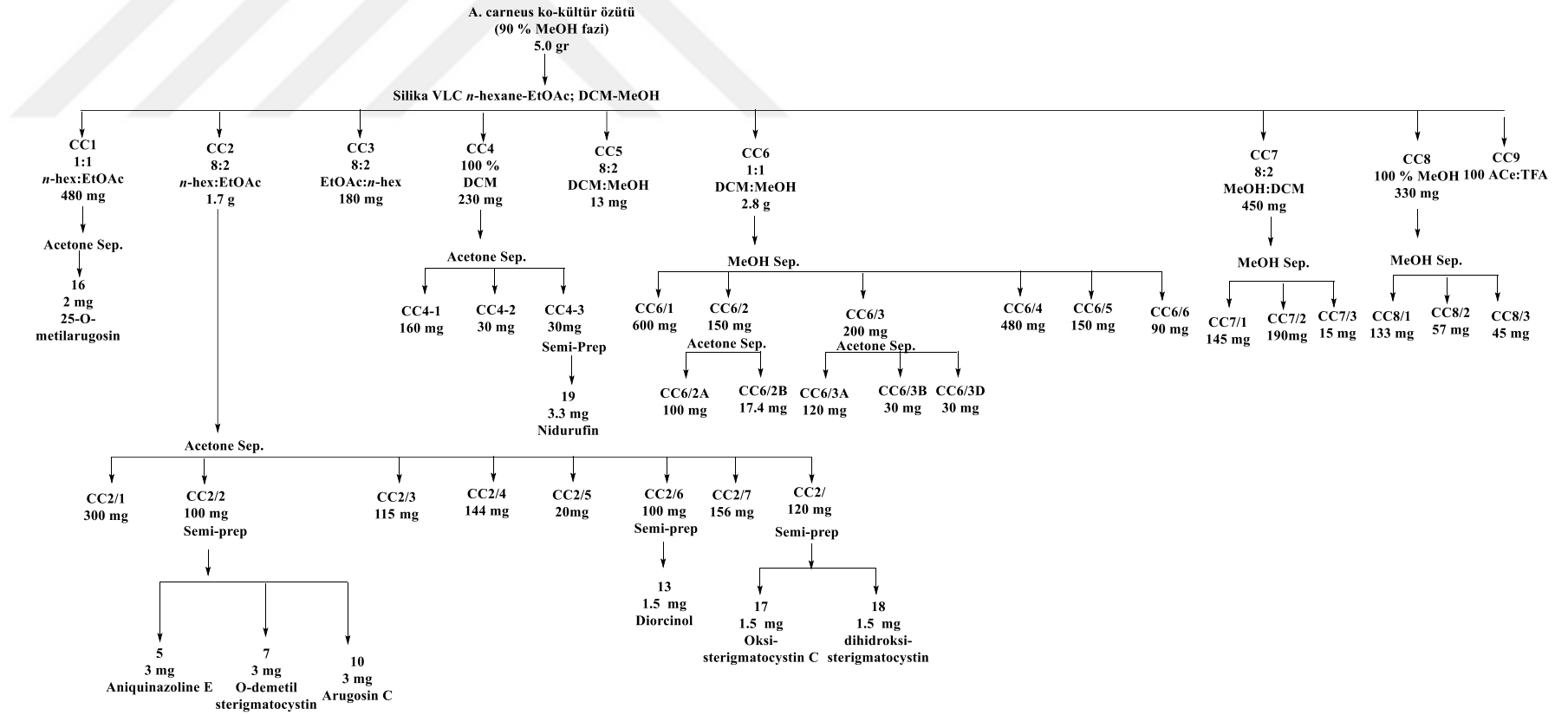
Denemede ilk olarak 0.5 mg bileşik 1 ml 6 N HCl içinde çözündürüldü ve 110°C'de 24 saat inkübe edildi. Ardından karışım soğutulup liyofilizatörde kurutuldu. Kuruyan örneğe 100 µl of FDAA (1% N- α -(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide asetonda) ve 20 µl 1 M NaHCO₃ eklenip, 40°C'de 1 saat inkübe edildi. Son olarak reaksiyonu durdurmak için 10 µl of 2 M HCl eklendi ve bir gece liyofilizatörde kurutuldu. Kurutmadan sonra kalan örnek HPLC gradient metanolde çözündürülüp HPLC'de alıkonma zamanı, benzer işlemlerden geçirilen *D*- ve *L*- amino asit türevlerinin alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak amino asitin absolute konfigürasyonu belirlendi [64].



Şekil 4.1: *A. Carneus* fungal suşunun yapay deniz sulu pirinç ortamından metabolit izolasyon şeması



Şekil 4.2: *A. Carneus* fungal süşunun modifiye Czapek ortamından metabolit izolasyon şeması



Şekil 4.3: *A. Carneus* fungal suşunun ko-kültür ortamından metabolit izolasyon şeması

5 BULGULAR

5.1 Fungus İzolasyonu

Yapılan tez çalışması kapsamında fungus izolasyonu çalışmaları sonucunda 2 farklı istasyondan toplanan 5 sünger (Çizelge 5.1) örneğinden toplamda 20 adet fungal suş saflaştırılmıştır. Tez projesi kapsamında süngerlerden izole edilerek saflaştırılan fungal suşlar Çizelge 5.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 5.1: Toplanan süngerlerden izole edilen fungal suşların listesi.

İstasyon Kodu	İstasyon Adı	Sünger Kodu	Stok İzolat Kodu
1	ENEZ EDİRNE	1.a.	1.a.1.
			1.a.2.
			1.a.2.b
			1.a.5.
			1.a.6.
			1.a.9.
		1.b.	1.b.1.
		1.c.	1.c.1.
			1.c.1.a
			1.c.3.
			1.c.4.
			1.c.4.a
			1.c.5.
			1.c.5.a
			1.c.8.
		1.c.9.	
		1.d.	1.d.1.
1.d.2.			
2	ALİAĞA İZMİR	2.a	2.a.1
			2.a.2

5.2 Fungal Suşların Tanılanması

Tez projesi kapsamında izole edilen fungal suşlardan ürün profillerine göre değerlendirilerek biyoaktif metabolit izolasyonu için seçilen fungal suşlar bölüm 4.5’de anlatıldığı gibi DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen DNA’lar sekanslama işlemi yaptırılarak türleri tayin edilmiştir. Tanılama sonuçları ve DNA sekansları aşağıda verilmiştir.

2.a.1: *Penicillium chrysogenum*

TGAGGCTCTGGGTACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGG
CGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGGCCCGCG
CCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAA
AATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAG
TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTG
GGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCA
CCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGCAGGCC
CGGCCGGCGCTTGCCCATCAACCAACTTTTCTATCCGGGTTGATCTCGC
ATCAGGTTCCGGATCCCGCTGAACTTCTCCATATCTAGCAGAGGATAAAT
ACCGAGTGAGGG

2.a.2: *Aspergillus carneus*

CCTCCGGGCGCCACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGG
CGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACTTCATGC
CTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCA
ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
CTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCACCCCGGGGGA

CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGG
GCTTTGTCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGACGTCCA
ACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG

P. chrysogenum

Kngdom: Fungi
Division: Ascomycota
Class: Eurotiomycetes
Order: Eurotiales
Family: Trichocomaceae
Genus: *Penicillium*
Species: *P. chrysogenum*



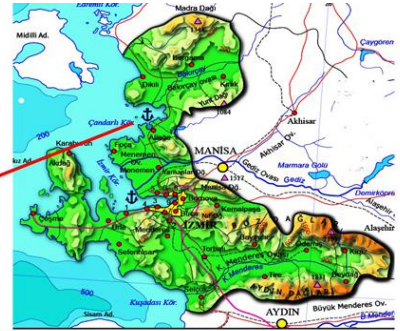
Aliğa-İzmir
Derinlik: 10 m



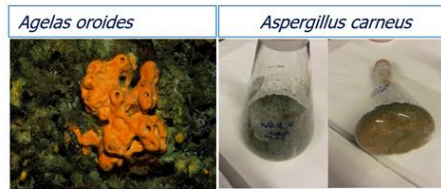
Şekil 5.1: *P. chrysogenum* suşunun izole edildiği coğrafik bölge.

A. carneus

Kngdom: Fungi
Division: Ascomycota
Class: Eurotiomycetes
Order: Eurotiales
Family: Aspergillaceae
Genus: *Aspergillus*
Species: *A. carneus*



Aliğa-İzmir
Derinlik: 10 m



Şekil 5.2: *A. carneus* suşunun izole edildiği coğrafik bölge.

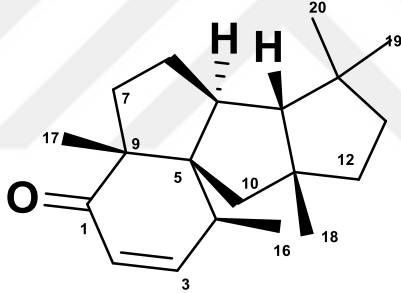
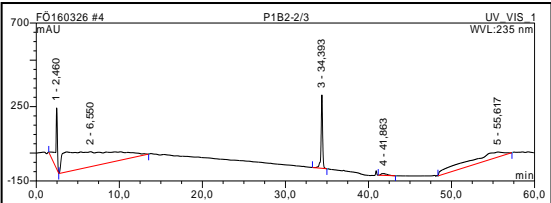
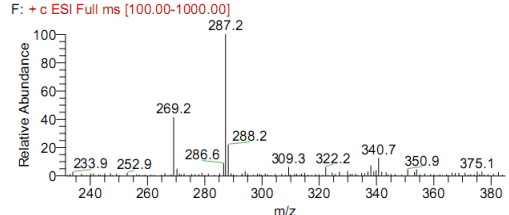
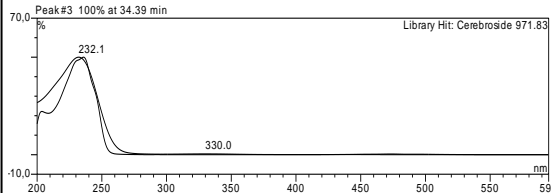
5.3 Metabolit İzolasyonu Çalışmaları

Yapılan fungus izolasyonu çalışmalarının ardından saf fungal kültürler yapay deniz tuzu ile hazırlanan pirinç ortamlarında kültüre edilmiş ve etilasetat özütlerinin ürün profilleri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda iki fungal suş *P. chrysogenum* ve *A. carneus* metabolit izolasyonu için aday organizmalar olarak belirlenmiştir.

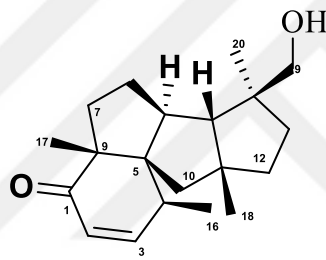
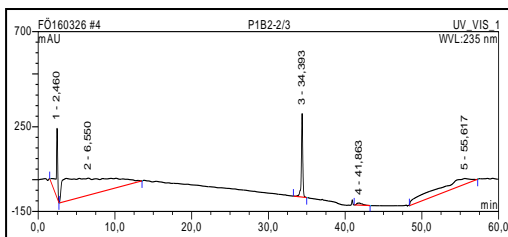
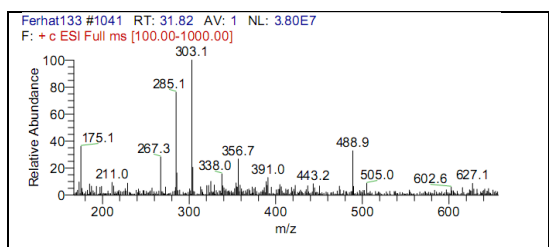
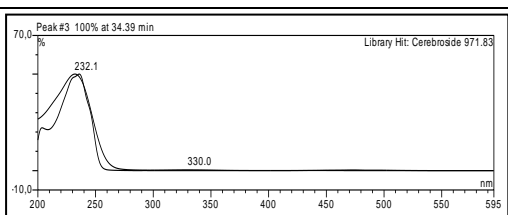
5.3.1 *P. chrysogenum*'dan metabolit izolasyonu çalışmaları

İlk olarak Aliğa istasyonundan toplanan *Agelas oroides* süngerinden izole edilen *P. chrysogenum*, metabolit izolasyonu için seçilen ilk fungal suştur. Yapılan kromatografik işlemler sonucunda dört tane bilinen molekül izole edilmiştir; Conidiogenone B (1), Conidiogenone C (2), Cycloopenol (3) ve Viridicatin (4).

5.3.1.1 Conidiogenone B (1, bilinen bileşik)

Conidiogenone B	
Örnek Kodu	P1B2-3.4
Biyolojik Kaynak	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Örnek Miktarı	0.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Beyaz amorf katı
Moleküler Formül	C ₂₀ H ₃₀ O
Moleküler Ağırlık	286 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁰ = - 6.2 (c 0.55, MeOH)
Alıkonma Zamanı (HPLC)	34.3 dak. (Standart gradient)
	
	
	(-) ESI-MS: iyonize olmamıştır

5.3.1.2. Conidiogenone C (2, bilinen bileşik)

Conidiogenone C	
Örnek Kodu	P1B2-2.3
Biyolojik Kaynak	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Örnek Miktarı	0.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Beyaz amorf katı
Moleküler Formül	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
Moleküler Ağırlık	302 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁰ = - 11.8 (c 0.04, MeOH)
Alıkonma Zamanı (HPLC)	34.3 dak. (Standart gradient)
	
	
	(-) ESI-MS: iyonize olmamıştır

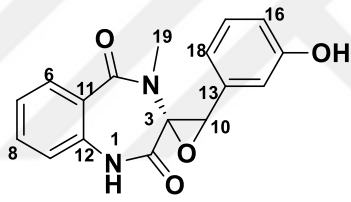
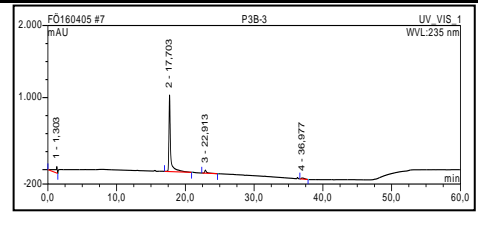
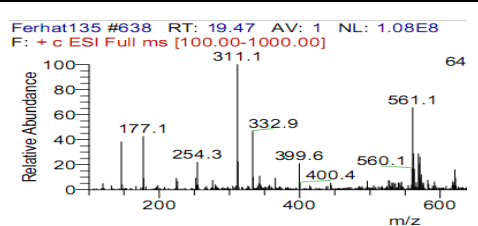
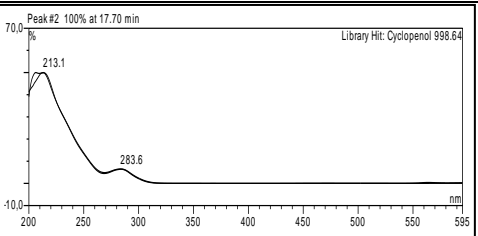
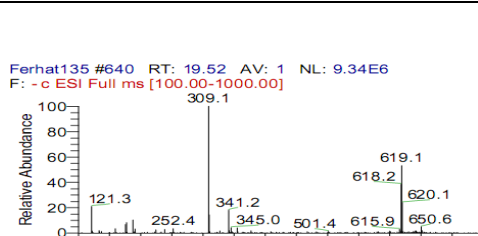
Beyaz katı amorf halde izole edilen bileşik **1**, λ_{\max} (MeOH) 232.1 nm'de maksimum UV absorbansı tespit edilmiştir. Molekülün ESI-MS (LC/MS) spekturumu m/z 287.12'de $[M+H]^+$ (+ mod) ve m/z 285.12'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon pikleri vermiştir. Buradan bileşiğin molekül ağırlığı 286 g/mol olarak tespit edilmiştir. Ardından 1H spekturumu Du ve ark. (2009) [65] ile karşılaştırılarak bileşiğin yapısı conidiogenone B olarak tayin edilmiştir. Beyaz amorf halde izole edilen bileşik **2**, λ_{\max} (MeOH) 232.1 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. Bileşiğin ESI-MS (LC/MS) spekturumu m/z 303.1'de $[M+H]^+$ (+ mod) moleküler iyon piki vermiştir. Ancak negative modda moleküler iyon piki vermemiştir. Yapılan 1H spekturumu analizinde bileşik **1** ile yapısal olarak benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ancak molekül ağırlığı bileşik **1**'e göre bir oksijen atomu kadar fazla olduğu belirlenmiştir. Buna göre Du vd. (2009) [65] elde ettiği verilerle karşılaştırmasıyla molekülün yapısı conidiogenone C olarak tayin edilmiştir. Ayrıca yapılan optik rotasyon ölçümünde literatür ile benzer sonuç elde edilmiştir. Literatür ile karşılaştırılmalı NMR dataları Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2: Bileşik 1 ve 2'nin elde edilen ¹H datalarının literatür ile karşılaştırılması

No.	Conidiogenone B (lit) δ ppm, J, Mhz	Conidiogenone B δ ppm, J, Mhz	Conidiogenone B (lit) δ ppm, J, Mhz	Conidiogenone B δ ppm, J, Mhz
1				
2	5.97, dd, 9.9, 1.1	5.97, dd, 10.0, 1.3	5.97, dd, 9.9, 1.1	5.98, dd, 10.1, 1.2
3	6.93, dd, 9.9, 6.1	6.94, dd, 10.0, 6.0	6.93, dd, 9.9, 6.1	6.94, dd, 10.1, 5.8
4	2.66-2.70, m	2.69-2.65, m	2.70-2.75, m	
6	2.25, dd, 9.4, 5.0	2.25, dd, 9.6, 5.4	2.32, dd, 8.2, 4.9	2.32, td, 10.7, 3.7
7a	1.58-1.61, m	1.52-1.49, m	1.70-1.73, m	
7b	1.16-1.19, m		1.20-1.23, m	
8a	2.10, dd, 12.7, 6.0	2.09, m	2.13, ddd, 11.5, 5.5, 1.7	2.13, m
8b	1.66-1.68, m	1.66-1.69, m	1.66-1.69, m	1.62-1.65, m
9				
10a	1.98, d, 14.2	1.98, d, 14.5	2.01, d, 14.8	2.01, d, 14.7
10b	1.64, d, 14.2	1.64, m	1.64, d, 14.8	1.68, d, 14.7
11				
12a	1.65-1.68, m	1.66-1.69, m	1.65-1.68, m	
12b	1.60-1.63, m	1.59-1.61, m	1.60-1.63, m	
13a	1.56-1.58, m	1.56-1.59, m	1.52-1.55, m	
13b	1.48-1.51, m	1.49-1.52, m	1.43-1.47, m	
14				
15	1.39, d, 5.0	1.34, d, 5.5	1.58, d, 4.9	1.58, d, 5.2
16	1.20, d, 7.2	1.20, d, 7.2	1.22, d, 7.1	1.22, d, 7.3
17	1.18, s	1.18, s	1.19, s	1.19, s
18	1.28, s	1.28, s	1.21, s	1.20, s
19a	0.96, s	0.96, s	0.99, s	0.99, s
19b				
20a	1.06, s	1.05, s	3.41, d, 11.0	3.41, d, 10.1
20b			3.38, d, 11.0	3.39, d, 10.1

150 MHz'de CDCl₃ içinde ölçümler yapılmıştır.

5.3.1.3. Cyclophenol (3, bilinen bileşik)

Cyclophenol	
Örnek Kodu	P3B-3
Biyolojik Kaynak	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Örnek Miktarı	0.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Beyaz amorf katı
Moleküler Formül	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄
Moleküler Ağırlık	310 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁰ = + 237.4 (c 0.13, MeOH)
Alıkonma Zamanı (HPLC)	17.7 dak. (Standart gradient)
	
	
	

Beyaz amorf katı halde izole edilen bileşik **3** ve λ_{\max} (MeOH) 213.1 ve 283.6 nm'de maksimum UV absorbans göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 311.1'de $[M+H]^+$ (+ mod) ve m/z 309.1'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon piki vermiştir. Buradan hareketle bileşiğin moleküler ağırlığı 310 g/mol olarak bulunmuştur. Proton spektrumu ve LC/MS sonuçları Li vd. (2014) [66] ile karşılaştırıldığında, bileşiğin kimyasal yapısı bilenen diterpen türevi olan cyclopenol olarak tayin edilmiştir. Bileşiğin literatür ile karşılaştırmalı NMR dataları Çizelge 5.3'de verilmiştir.

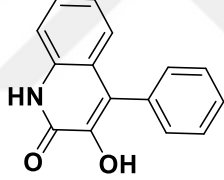
Çizelge 5.3: Bileşik **3**'ün elde edilen 1H datalarının literatür ile karşılaştırılması

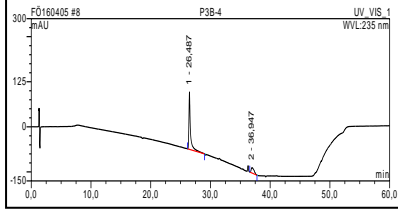
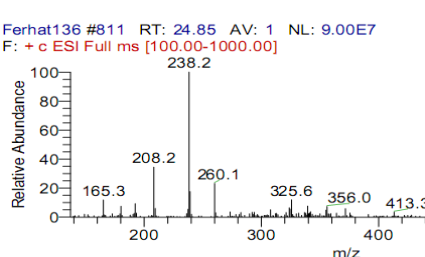
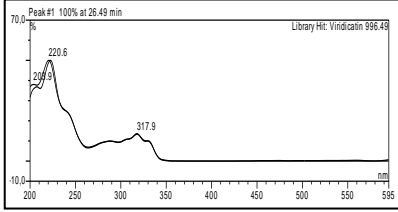
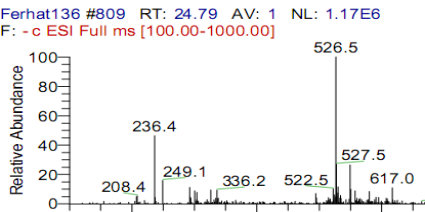
No.	Cyclopenol (lit)* δ ppm, J, Mhz	Cyclopenol** δ ppm, J, Mhz
1		
2		
3		
4		
5		
6	7.15, m	7.07, m
7	7.16, m	7.19, td, 7.6, 1.1
8	7.56, m	7.51, ddd, 8.0, 7.3, 1.6
9	7.17, m	7.33, dd, 7.8, 1.6
10	4.08, s	3.94, s
11		
12		
13		
14	6.15, t, 1.8	6.12, t, 2.1
15		
16	6.70, dd, 7.7, 1.8	6.74, dd, 8.1, 2.6
17	7.01, dd, 7.7, 7.7	7.00, m
18	6.11, d, 7.7	6.12, m
19	3.16, s	3.23, s

*100 MHz'de MeOD içinde ölçülmüştür. ** 150 MHz'de $CDCl_3$ içinde ölçülmüştür.

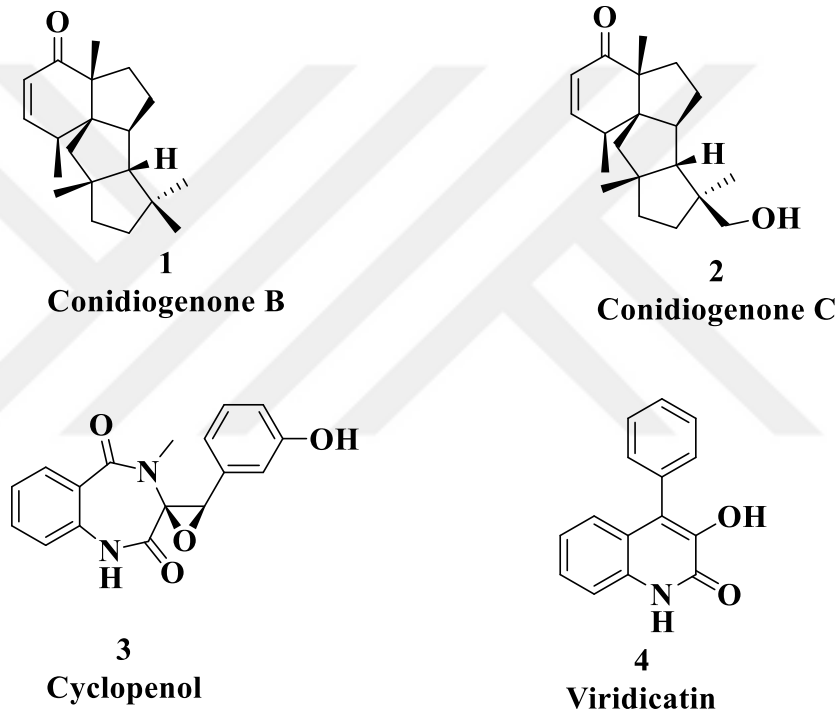
5.3.1.4. Viridicatin (4, bilinen bileşik)

Viridicatin	
Örnek Kodu	P3B-4
Biyolojik Kaynak	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Örnek Miktarı	0.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Beyaz amorf katı
Moleküler Formül	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂
Moleküler Ağırlık	237 g/mol
Alıkonma zamanı (HPLC)	17.7 dak. (Standart gradient)

O=C1C(O)C2=CC=C(C=C2)N1c3ccccc3

	 <p>Ferhat136 #811 RT: 24.85 AV: 1 NL: 9.00E7 F: +c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>
	 <p>Ferhat136 #809 RT: 24.79 AV: 1 NL: 1.17E6 F: -c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>

Beyaz amorf katı halde izole edilen bileşik **4** (Viridicatin) λ_{\max} (MeOH) 203.9, 220.6 ve 317.9 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 238.2'de $[M+H]^+$ (+ mod) ve 236.4'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon piki vermiştir. Buradan bileşiğin moleküler ağırlığının 237 g/mol olduğu belirlenmiştir. Yapılan 1H NMR spektrumu analizinin Kobayashi ve Harayama (2009) [67] ile karşılaştırıldığı bileşiğin yapısı bilenen diterpen türevidir olan viridicatin olduğu tayin edilmiştir.



Şekil 5.3. *P. chrysogenum*'un piriç ortamından izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.

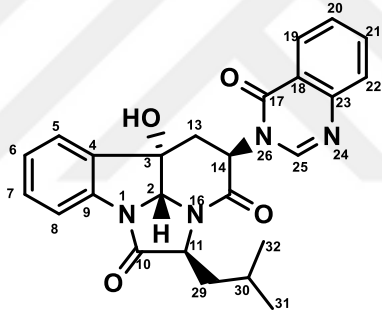
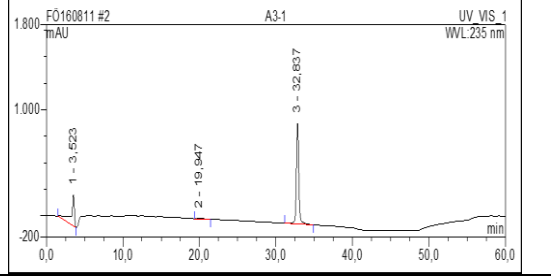
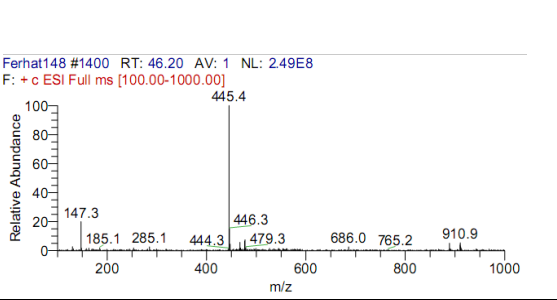
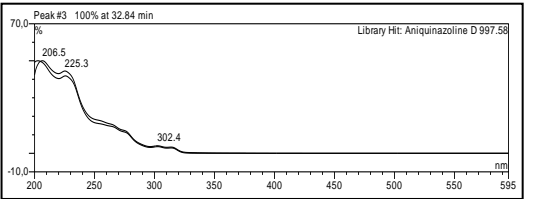
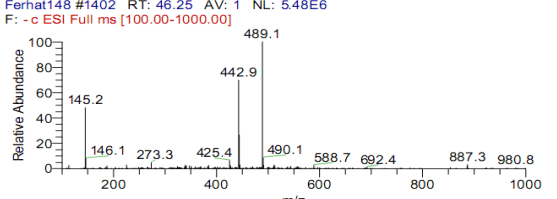
5.3.2 *A. carneus* yapay deniz tuzu ile hazırlanan piriç ortamından metabolit izolasyonu çalışmaları

A. carneus ile yapılan çalışmalarda ilk olarak yapay deniz tuzu ile hazırlanmış piriç ortamından metabolit izolasyonu yapılmış ve aniquinazoline E (**5**), sterigmatocystin,

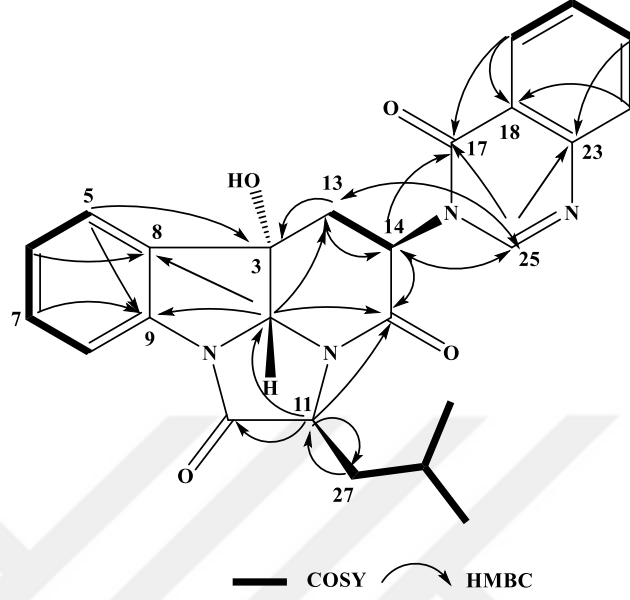
(6), O-demetil sterigmatocystin (7), sterigmatin (8), versicolorin C (9), averufin (10), arugosin C (11), norsolorinic asit (12) ve asteltoksin E (13) elde edilmiştir.



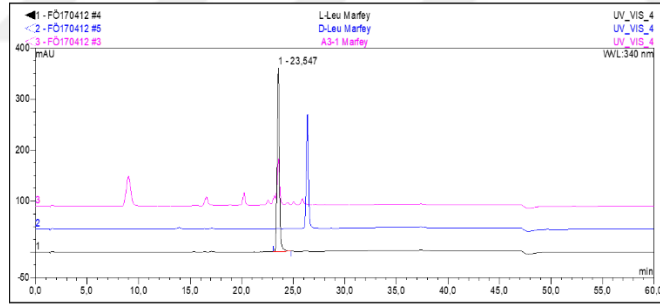
5.3.2.1. Aniquinazoline E (5, yeni bileşik)

Aniquinazoline E	
Örnek Kodu	A3-1
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	2.4 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı kahve rengi katı
Moleküler Formül	C ₂₅ H ₂₄ N ₄ O ₄
Moleküler Ağırlık	444 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁰ = : -55 (c 0.37, MeOH)
Alıkonma Zamanı	32.8 dak. (Standart gradient)
	
	
	

Sarı kahverengi katı formda izole edilen bileşik **5**, λ_{max} (MeOH) 206.5, 225.3 ve 302.4 nm'de maksimum UV absorbans göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 445.4'de $[\text{M}+\text{H}]^+$ (+ mod) ve 442.9'da $[\text{M}-\text{H}]^-$ (- mod) moleküler iyon pikleri vermiştir. Yapılan yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi analizinde (HRESI-MS) m/z 445.18'de $[\text{M}+\text{H}]^+$ (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve molekül formülü $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$ olarak tayin edilmiştir. NMR dataları analiz edildiğinde bileşiğin kimyasal yapısının (-)-chaetominine ve analoglarının kimyasal olarak sentezinde kullanılan ara bir bileşik olan (2R,4R,5as,9cr)-4,5,5a,9c-Tetrahydro-5a-hydroxy-2-isobutyl-4-(4-oxo-3(4H)-quinazolinyl)-3H-2a,9b-di-azacyclopenta[jk]fluorene-1,3(2H)-dione ile benzer olduğu belirlenmiştir [68]. Ancak bu bileşik daha önce doğal bir kaynaktan izole edilmemiş ve tüm NMR dataları raporlanmamıştır. Ayrıca bileşiğin NMR dataları denizel *Aspergillus nidulans*'dan saflaştırılan aniquinazoline D ile benzer karbon iskeletine sahip olduğu görülmüştür [69]. Aniquinazoline D'nin C-11 pozisyonunda (δ_{C} 62.3) izopropil grubu bağlıyken, bileşik **5**'de C-11(δ_{C} 62.3) pozisyonuna izobutil grubu bağlanmıştır. Butil grubunun moleküldeki pozisyonu HMBC (Heteronuclear multiple quantum correlation) spektrumunda H ve C atomları arasındaki uzun mesafeli etkileşimlerin analizi ile belirlenmiştir (Şekil 5.4). Ayrıca molekülün içerdiği lösin amino asitinin konfigürasyonunun L- formunda olduğu Marfey's reaksiyonu ile belirlenmiştir (Şekil 5.5). Aniquinazoline D ve bileşik **5**'in NMR dataları ve optik rotasyonları karşılaştırıldığında $[[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55$ (c 0.37, MeOH)] değerlerin birbiri ile benzer oldukları belirlenmiştir. Bu da bileşik **5**'in aniquinazoline D gibi 1*S*, 3*S*, 11*R* 14*R* absolute konfigürasyonuna sahip olduğunu kanıtlanmıştır. Denemelerden elde edilen verilere göre bileşik **5** aniquinazoline E olarak adlandırılmıştır.



Şekil 5.4: Aniquinazoline E'nin (5) COSY ve anahtar HMBC korelasyonları



Şekil 5.5: Aniquinazoline E'nin (5) Marfey's reaksiyon sonucu

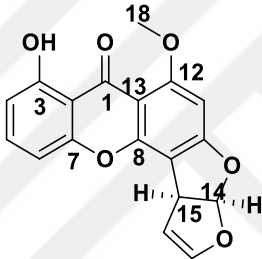
Çizelge 5.4: Aniquinazoline E'nin (5) ¹H ve ¹³C NMR dataları (CDCl₃)

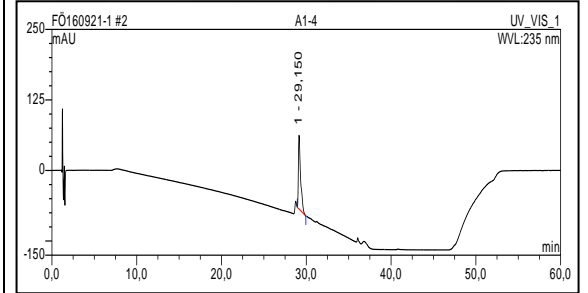
Position	δ _C	δ _H Mult., <i>J</i> in Hz	HMBC (H-C)
1			
2	84.3	6.01, s	C-3, C-4, C-9, C-13, C-15
3	75.2		
3-OH		6.34 br, s	
4	135.1		
5	123.5	7.42, dd, 7.4, 1.1	C-3, C-7, C-9
6	126.5	7.26, td, 7.6, 1.1	C-4, C-5, C-8
7	131.6	7.46, td, 7.7, 1.2	C-5, C-8, C-9
8	116.1	7.61, m	C-4, C-8
9	139.1		
10	173.3		
11	62.3	4.86, dd, 4.90, 10.5	C-2, C-10, C-15, C-27, C-28
12			
13	36.5	α: 2.5, dd, 5.3, 15.2 β: 3.14, dd, 5.3, 15.2	C-2, C-3, C-14, C-15
14	56.7	5.11, t, 5.1	C-3, C-13, C-15, C-17, C-25
15	163.2		
16			
17	161.0		
18	121.9		
19	126.1	8.35, dd, 8.0, 1.5	C-17, C-21, C-23
20	127.8	7.60, m	C-18, C-19, C-21
21	135.6	7.87, ddd, 8.6, 7.2, 1.5	C-19, C-23
22	126.4	7.78, d, 8.1	C-18, C-20
23	145.6		
24			
25	145.8	8.38, br s	C-14, C-17, C-23
26			
27	37.6	27α, 1.83, m 27β, 2.05, m	C-10, C-11, C-29, C-30
28	26.18	1.86, m	C-11, C-27, C-30
29	22.6	1.10, d, 6.5	C-27, C-28, C-30
30	21.9	1.13, d, 6.5	C-27, C-28, C-29

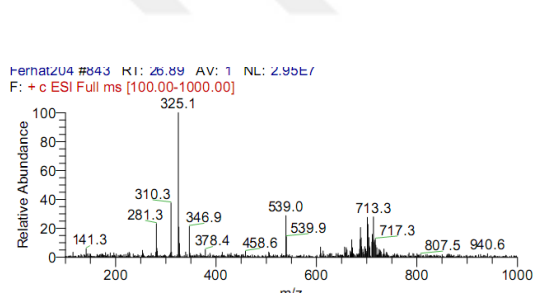
¹³C dataları HSQC ve HMBC spektrumlarından çıkarılmıştır. Ölçümler 600 ve 150 MHz'de kayıt edilmiştir.

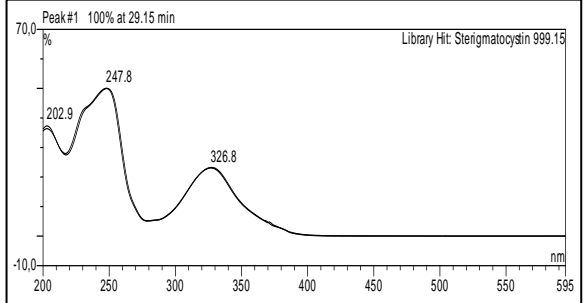
5.3.2.2. Sterigmatocystin (6, bilinen bileşik)

Sterigmatocystin	
Örnek Kodu	A1-cry/A1-4
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	7.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı kristal
Moleküler Formül	$C_{18}H_{12}O_6$
Moleküler Ağırlık	324 g/mol
Alıkonma Zamanı	29.15 dak. (Standart gradient)







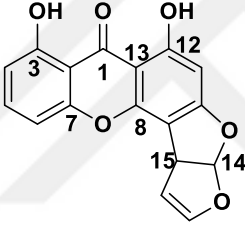


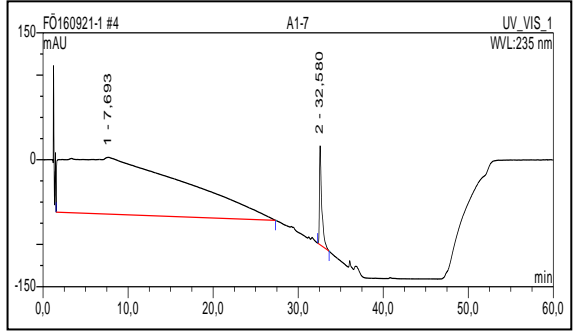
Library Hit: Sterigmatocystin 999.15

(-) ESI-MS: iyonize olmamıştır

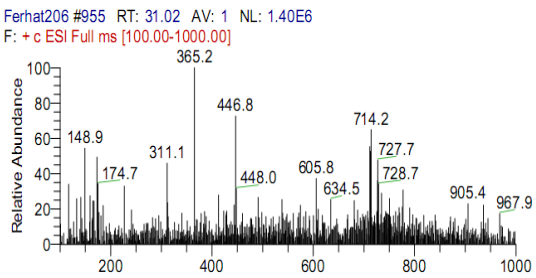
5.3.2.3 O-Demetil Sterigmatocystin (7, Bilinen Bileşik)

O-Demethyl Sterigmatocystin	
Örnek Kodu	A1-7
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı kristal
Moleküler Formül	C ₁₇ H ₁₀ O ₆
Moleküler Ağırlık	310 g/mol
Alıkonma Zamanı	32.58 dak. (Standart gradient)

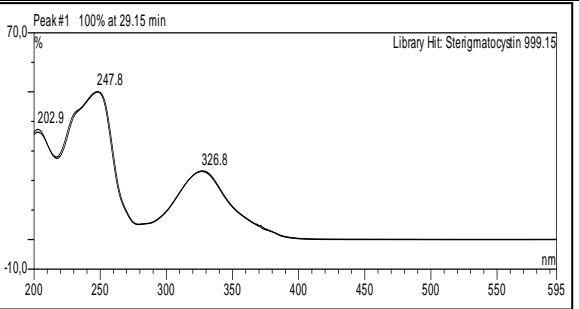




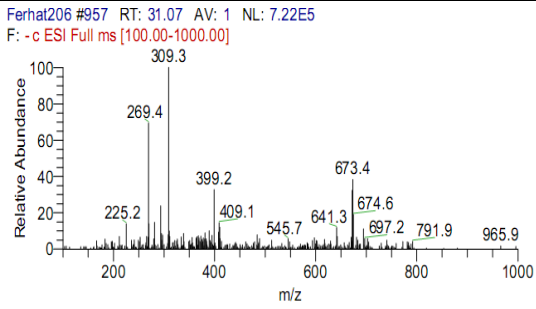
F0160921-1 #4 A1-7 UV_VIS_1
WVL:235 nm
1 - 7.693
2 - 32.580



Ferhat206 #955 RT: 31.02 AV: 1 NL: 1.40E6
F: +c ESI Full ms [100.00-1000.00]



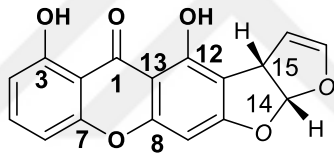
Peak #1 100% at 29.15 min
Library Hit: Sterigmatocystin 999.15

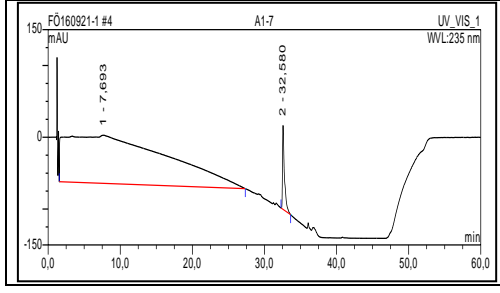


Ferhat206 #957 RT: 31.07 AV: 1 NL: 7.22E5
F: -c ESI Full ms [100.00-1000.00]

5.3.2.4 Sterigmatin (8, Bilinen Bileşik)

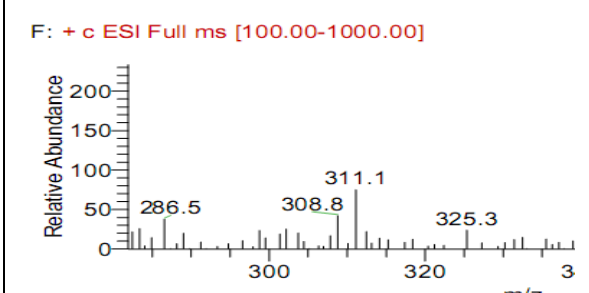
Sterigmatin	
Örnek Kodu	A1-8
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	1.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı Kristal
Moleküler Formül	$C_{17}H_{10}O_6$
Moleküler Ağırlık	310 g/mol
Alıkonma zamanı (HPLC)	32.58 dak. (Standart gradient)





FÖ160921-1 #4 A1-7 UV_VIS_1
WVL:235 nm

1 - 7.693
2 - 32.580

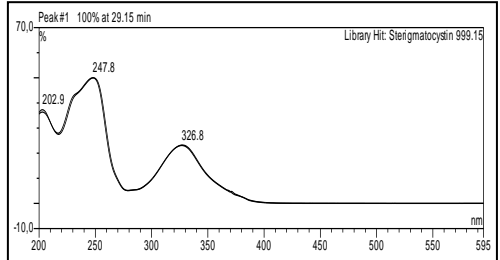


F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

Relative Abundance

286.5 308.8 311.1 325.3

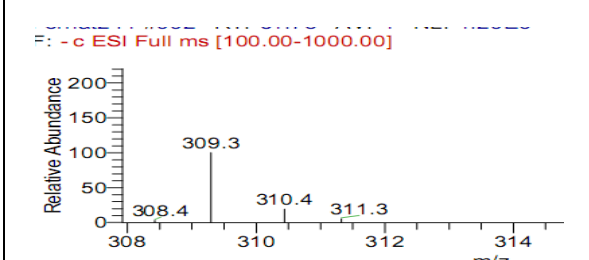
m/z



Peak #1 100% at 29.15 min
Library Hit: Sterigmatocystin 999.19

202.9 247.8 326.8

nm



I: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

Relative Abundance

308.4 309.3 310.4 311.3

m/z

Sarı kristal formda A1 fraksiyonunda çökelen bileşik **6**, λ_{\max} (MeOH) 202.9, 247.8 ve 326.8 nm'de maksimum UV absorbans göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 325.1'de $[M+H]^+$ (+ mod) moleküler iyon piki vermiştir. Yapılan 1H NMR spektrumu analizi ile bileşiğin yapısı sterigmatocystin olarak tayin edilmiştir. Bileşik 7 ve 8'in UV absorbans ve proton NMR spektrumları değerlendirildiğinde sterigmatocystin ile benzer şekilde ksanton ve furan gruplarının konjugasyonu ile oluştuğu belirlenmiştir. Ancak bileşik 7 ve 8'in sterigmatocystinden farklı olarak ksanton gruplarında C-12 karbonuna bağlı metoksi (O-CH₃) grubunun yerine hidroksil grubu bulunmaktadır. Bu da bileşik 7 ve 8'in moleküler ağırlıklarının sterigmatocystinden 14 amu (atomic mass unit) kadar küçük olması ve NMR spektrumunda δ_H 11.8'de siglet OH protonun sinyalinin varlığı ile kanıtlanmıştır. Furan halkasının ksanton grubuna bağlantığı noktalarının bileşik 7 ve 8'deki farklılığı HMBC koralasyonları ve Hamasaki vd. (1965) [70] yaptığı çalışma ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.5: Bileşik 6, 7 ve 8'in elde edilen ¹H datalarının karşılaştırılması.

Sterigmatocystin (Acetone-d ₆)		O-Demethyl Sterigmatocystin (Acetone-d ₆)		Sterigmatin (Acetone-d ₆)	
Pozisyon	δ _H , Mult, J Hz	Pozisyon	δ _H , Mult, J Hz	Pozisyon	δ _H , Mult, J Hz
1		1		1	
2		2		2	
3		3-OH	12.8, s	3-OH	12.1, s
3-OH	13.41, s	4	7.09, dd, 8.3, 1.0	4	6.81, dd, 8.2, 0.9
4	6.94, m	5	7.75, t, 8.3	5	7.72, t, 8.3
5	7.60, t, 8.3	6	6.83, d, 8.3	6	7.00, dd, 8.3, 0.9
6	6.95, d, 1.1	7		7	
7		8		8	
8		9		9	6.58, s
9		10	6.40, s	10	
10	6.65, s	11		11	
11		12		12	
12		12-OH	11.8, s	12-OH	11.8, s
13		13		13	
14	5.55, t, 2.6	14	5.56, m	14	5.62, s
15	4.91, dt, 7.2, 2.3	15	4.93, dt, 7.0, 2.2	15	4.77, dt, 7.1, 2.2
16	6.65, dd, 2.8, 2.1	16	6.67 dd, 2.8, 2.1	16	6.64 dd, 2.8, 2.1
17	6.72, dd, 8.3, 1.0	17	6.96, d, 7.1	17	5.45, t, 2.6
18	3.97, s	18		18	

Ölçümler 150 MHz'de kayıt edilmiştir.

5.3.2.5 Versicolorin C (9, bilinen bileşik)

Versicolorin C	
Örnek Kodu	A1-6
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	C ₁₈ H ₁₂ O ₇
Moleküler Ağırlık	340 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	26.56 dak. (Standart gradient)

erhat205 #922 RT: 29.64 AV: 1 NL: 3.37E6
: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

Peak#1 100% at 31.58 min
Library Hit: Lunatin 976.61

Ferhat205 #920 RT: 29.58 AV: 1 NL: 3.05E6
F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

Kırımızı toz halinde izole edilen bileşik **9** λ_{\max} (MeOH) 201.3, 221.1 ve 289.0 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 341.1'de $[M+H]^+$ (+ mod), m/z 339.2'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon piki vermiştir. HRESI-MS analizinde m/z 341.0655'de $[M+H]^+$ (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve buradan hareketle moleküler formülü $C_{18}H_{12}O_7$ olarak belirlenmiştir. UV-vis spektrumu tipik olarak antrakinin patterni göstermiştir. Proton spektrumun incelendiğinde düşük alandan iki tane aromatik hidroksi sinyali (OH-8, δ_H 12.51, 1H, s; OH-6, δ_H 12.21, 1H, s) ve aromatik bölgede 4 süstitüentli benzil (H-7, δ_H 6.69, 1H, d, $J= 2.0$; H-5, δ_H 7.26, 1H, d, $J= 2.0$) grubu ve bir singlet aromatic proton sinyali (δ 7.14, 1H, s) UV-vis spektrumun gösterdiği antrakinon yapısının tayin edilmesini sağlamıştır. Ayrıca bileşik **9** bir oksijene komşuluğu olan iki kiral metin (H-1' δ_H 5.52, s; H-2', δ_H 3.62, 1H, m), bir oksijene bağlı metilen (H-4' β , δ_H 4.21, 1H, m; H-4' α , δ_H 4.14, 1H, m) ve bir olefinik metilen (H-3' β , δ_H 1.84, 1H, m; H-3' α , δ_H 2.26, 1H, m) grubu olduğu ve proton sinyallerinden elde edilen yarılmama sabitlerinin literatür ile karşılaştırılması sonucunda antrakinin iskeletine bağlı furan halkasının yapısı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Zhu vd. (2004) [71] yaptığı çalışmalar ile değerlendirildiğinde bileşik **9**'un kimyasal yapısı versicolorin C olarak tayin edilmiştir.

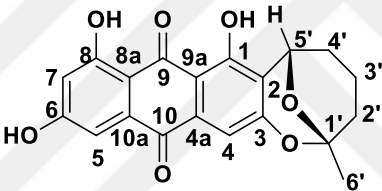
Çizelge 5.6: Bileşik 9'un ¹H dataları (Acetone-*d*₆)

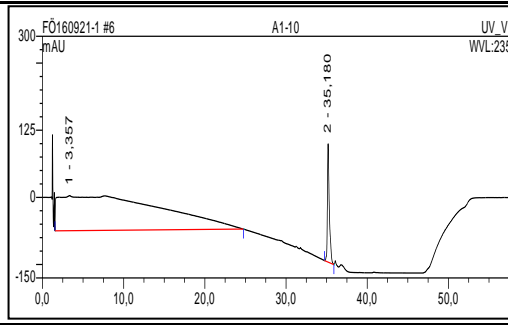
Position	δ_H , Mult., <i>J</i> Mhz
1	
2	
3	
4	7.14, s
5	7.26, d, 2.0
6	
7	6.69, d, 2.0
8	
8a	
9	
9a	
10	
1'	6.53, d, 5.7
2'	3.62, m
3'	α , 2.24, m β , 1.84, m
4'	α , 4.14, m β , 4.21, m

Ölçümler 150 MHz'de kayıt edilmiştir.

5.3.2.6 Averufin (10, Bilinen Bileşik)

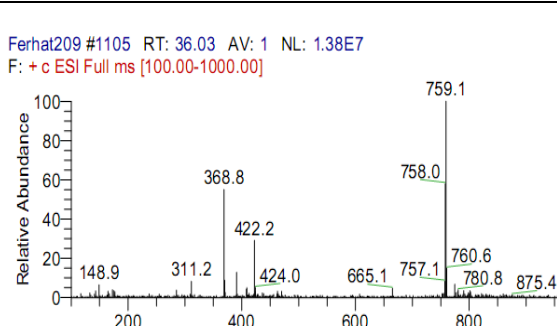
Averufin	
Örnek Kodu	A1-10
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	C ₂₀ H ₁₆ O ₇
Moleküler Ağırlık	368 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	35.18 dak. (Standart gradient)





FÖ160921-1 #6 A1-10 UV_VI WVL:238

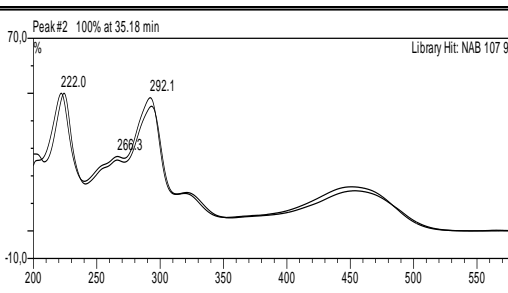
1 - 3.357 2 - 35.180



Ferhat209 #1105 RT: 36.03 AV: 1 NL: 1.38E7

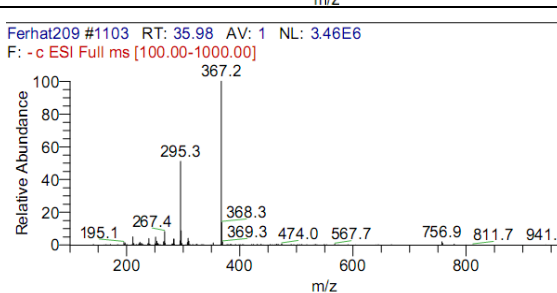
F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

148.9 311.2 368.8 422.2 424.0 665.1 757.1 759.1 760.6 780.8 875.4



Peak#2 100% at 35.18 min Library Hit: NAB 107 992

222.0 269.3 292.1



Ferhat209 #1103 RT: 35.98 AV: 1 NL: 3.46E6

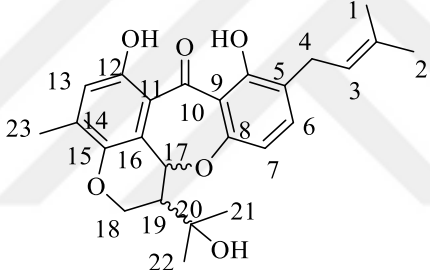
F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

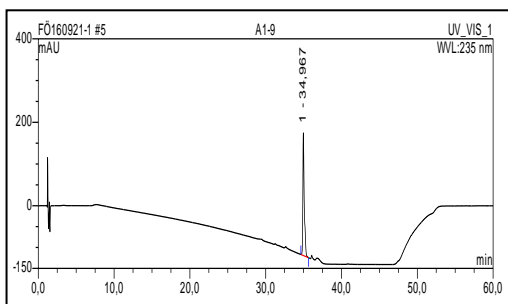
195.1 267.4 295.3 367.2 368.3 369.3 474.0 567.7 756.9 811.7 941.

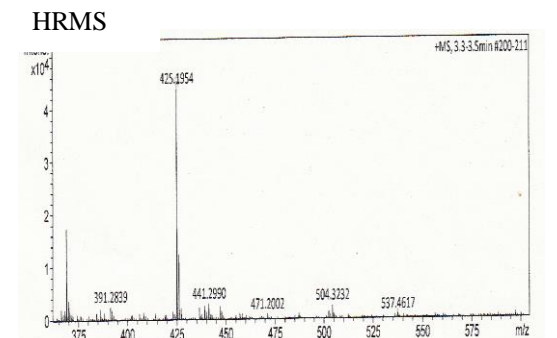
Kırmızı toz halinde izole edilen bileşik **10**'un ESI-MS analizinde m/z 368.8'de $[M+H]^+$ (+ mod) ve m/z 367.2'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon piki vermiştir. HRESI-MS analizinde de m/z 369.0965 $[M+H]^+$ de (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve buradan moleküler formülünün $C_{20}H_{16}O_7$ olduğu bulunmuştur. Bileşiğin UV spektrumu bileşik 9 ile benzer UV-vis patternne (λ_{max} (MeOH) 201.3, 221.1 ve 289.0 nm) sahip olduğu belirlenmiştir. Ardından yapılan 1H spektrumu analizinde bileşik 9 ile benzer antrakinin iskeletine sahip olduğu (OH-8, δ_H 12.61, 1H, s; OH-6, δ_H 12.24, 1H, s; H-5, δ_H 7.27 1H, d, $J= 2.4$ Hz; H-4, δ_H 7.15, 1H, s; H-7, δ_H 6.66 1H, d, $J= 2.4$ Hz) ve bileşiğin yan zinciri bileşik 9'a göre bir tane fazladan metil (H-6', δ_H 1.56, 3H, s) ve bir tane fazla metilen grubunun (H-2', δ_H 1.74 – 1.94, m) bulunduğu tespit edilmiştir. Bu da iki molekül arasındaki 28 amu'luk moleküler ağırlık farkını açıklamaktadır. Spektral analizler sonucunda elde edilen bilgiler Sahou vd. (2008) [72] ile karşılaştırıldığında bileşik **10**'un kimyasal yapısının averufin olduğu tayin edilmiştir.

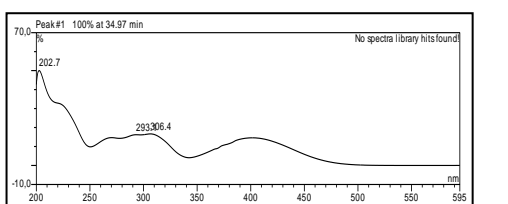
5.3.2.7 Arugosin C (11, bilinen bileşik)

Arugosin C	
Örnek Kodu	A1-9
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	$C_{25}H_{28}O_6$
Moleküler Ağırlık	424 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	35.18 dak. (Standart gradient)



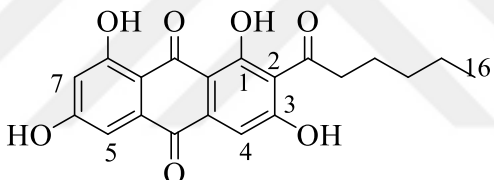
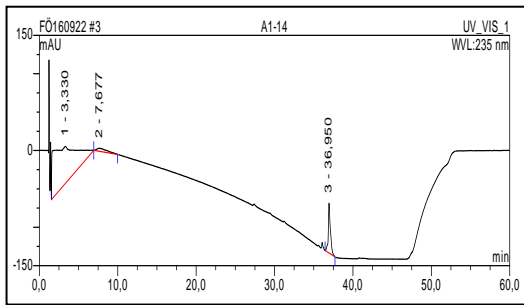
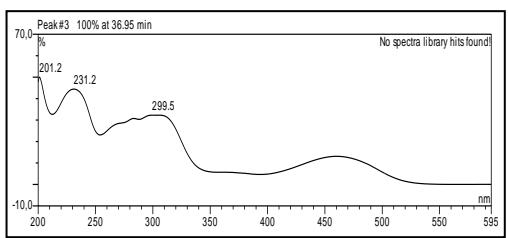
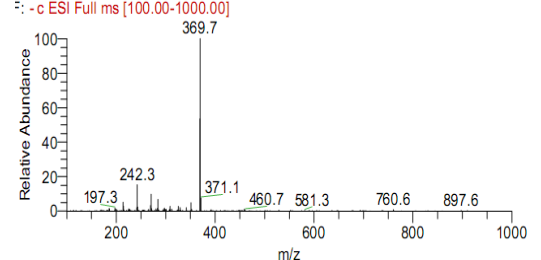






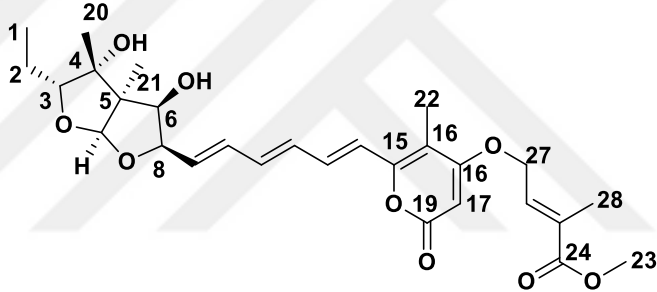
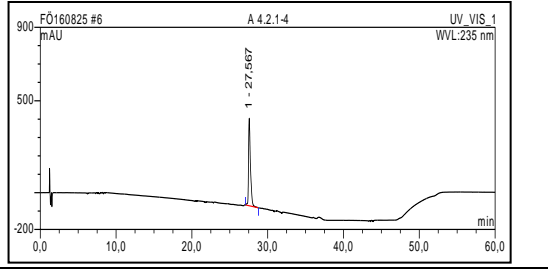
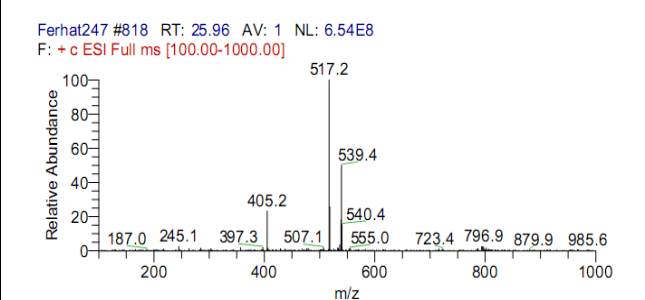
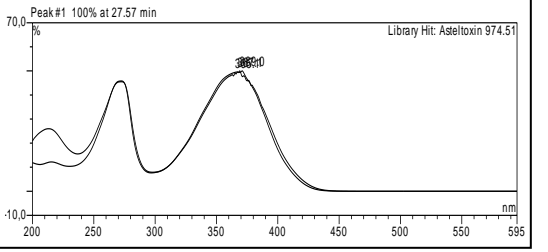
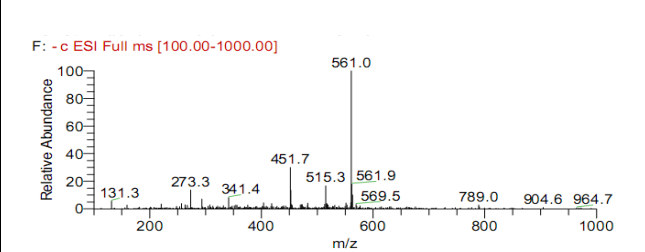
Kırımızı toz halinde izole edilen bileşik **11** λ_{\max} (MeOH) 202.7, 293.3 ve 306.4 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. HRESI-MS analizinde m/z 425.1954'de $[M+H]^+$ (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve buradan hareketle moleküler formülü $C_{25}H_{28}O_6$ olarak belirlenmiştir. Proton spektrumu incelendiğinde bileşiğin bir tane 4 süstitüentli benzil (H-7, 1H δ_H 6.48, d, $J= 8.3$ Hz; H-6, 1H, δ_H 7.38, d, $J= 8.3$ Hz), bir tane 5 süstitüentli benzil (H-13, 1H, δ_H 6.84, s), bir tane benzile bağlı metil (H-23, 3H, δ_H 2.23, s), 4 tane metil (H-1, 3H, s, δ_H 1.72; H-2, 3H, δ_H 1.72, s; H-21, 3H, δ_H 1.24, s; H-22, 3H, s, δ_H 1.29), iki tane metilen (H-3, 2H, δ_H 1.72, dd, $J= 6.0, 1.8$ Hz; H-18a, 1H, δ_H 4.20, dd, $J= 11.6, 7.9$ Hz; H-18b, 1H, δ_H 4.42, dd, $J= 11.6, 7.9$), bir tane kiral proton (H-19, 1H, δ_H 2.41, ddd, $J= 7.9, 5.0, 4.1$ Hz) ve bir tane oksijene bağlı kiral proton (H-17, 1H, δ_H 5.33, tddd, $J= 6.0, 2.9, 1.4$ Hz) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen spektral analiz sonuçları Liu vd. (2014) [73] ile değerlendirildiğinde bileşik **11**'in kimyasal yapısının arugosin C olduğu tayin edilmiştir.

5.3.2.8 Norsolorinic Asit (12, bilinen bileşik)

Norsolorinic Asit	
Sinonim(s)	
Örnek Kodu	A1-14
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	$C_{25}H_{28}O_6$
Moleküler Ağırlık	368 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	36.95 min (Standart gradient)
	
	(+) ESI-MS: iyonize olmamıştır
	

Kırımızı toz halinde izole edilen bileşik **12** λ_{\max} (MeOH) 201.2, 231.2 ve 299.5 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 369.7'de [M-H]⁻ (-mod) moleküler iyon piki vermiştir. UV-vis spektrumunda antrakinon ve olefinik paterni birlikte göstermiştir. Proton spektrumunun düşük alandaki sinyalleri incelendiğinde bileşiğin antrakinon kısmı (H-5, 1H δ_H 7.27, d, $J= 2.4$ Hz; H-5, 1H, δ_H 7.05, d, $J= 2.4$ Hz; H-4, 1H, s) tayin edilmiştir. Proton spektrumunun yüksek alandaki sinyalleri değerlendirildiğinde ise 5 karbon içeren düz bir zincir yapısı tayin edilmiştir (H-12, 2H, t, δ_H 3.25, $J= 7.3$; H-13/ H-14, 4H, m; H-16, 3H, t, δ_H 0.92, $J= 7.0$). Elde edilen spektral analiz sonuçları Watanabe vd. (1996) [74] ile değerlendirildiğinde bileşik **12**'in kimyasal yapısı norsolorinic asit olarak tayin edilmiştir.

5.3.2.9 Asteltoxin E (13, bilenen bileşik)

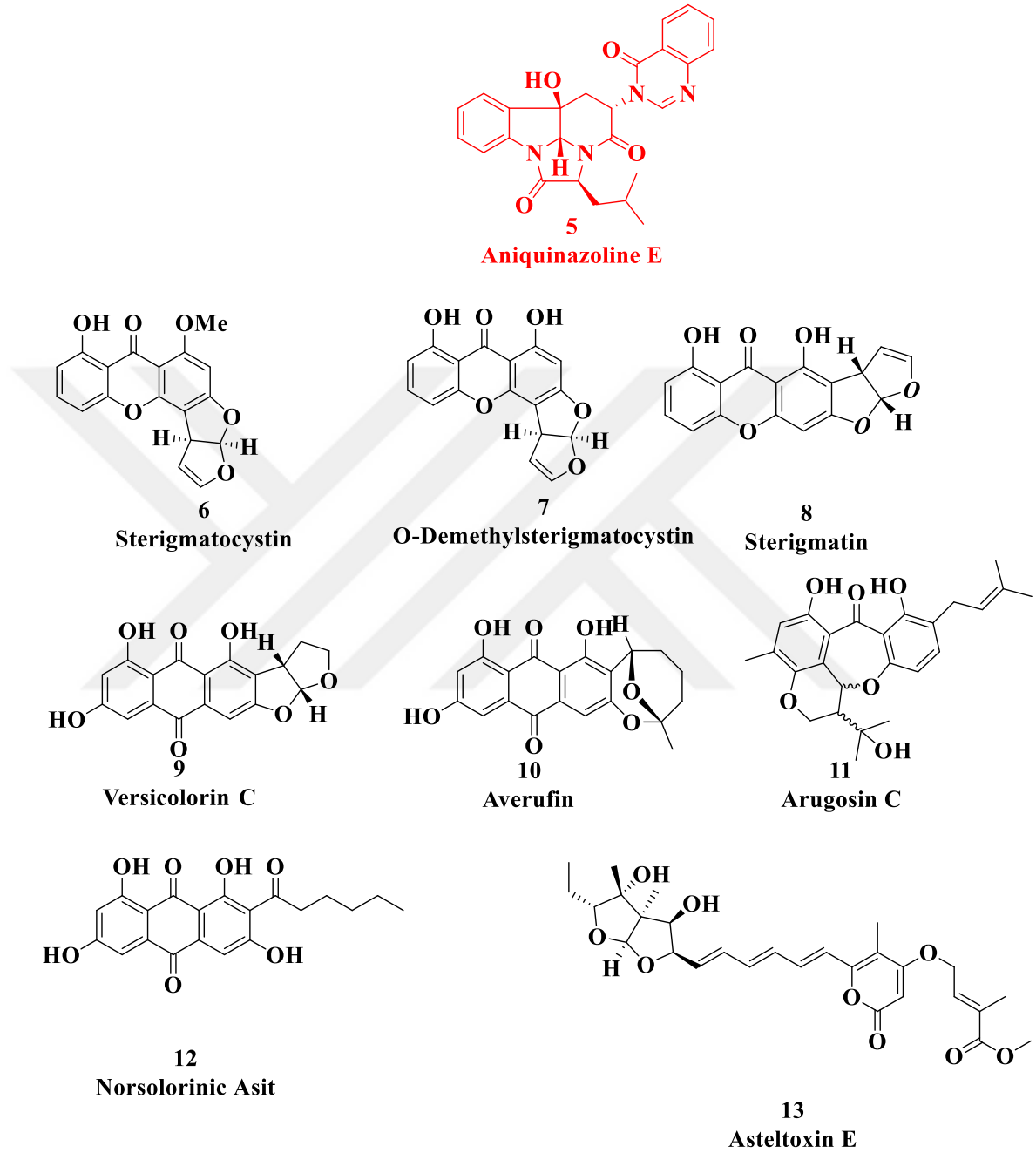
Asteltoxin E	
Örnek Kodu	A4.2.1-4
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	1.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı toz
Moleküler Formül	C ₂₈ H ₃₆ O ₉
Moleküler Ağırlık	516 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁵ = +15.5 (c 0.72, MeOH)
Alıkönme Zamanı (HPLC)	26.56 dak (Standart gradient)
	
	
	

Sarı toz halinde izole edilen **Bileşik 13** λ_{\max} (MeOH) 267 ve 356 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. Pozitif ESI-MS analizinde m/z 517.2 [M+H]⁺'de moleküler iyon piki vermiş ve moleküler ağırlığı 516 g/mol olarak belirlenmiştir. UV-vis, NMR ve ESI-MS sonuçları Tian vd. (2016) [75] ile değerlendirildiğinde bileşik **13**'ün yapısı daha önce denizel *Aspergillus* sp.'den izole edilmiş asteltoksin E olarak tayin edilmiştir [75]. Ayrıca yapılan optik rotasyon ölçümünde benzer değer $[[\alpha]_D^{25} = +15.5$ (c 0.72, MeOH)] elde edilmiştir. Bu sonuçla molekülün absolute konfigürasyonunda da Tian vd. (2016) [75] ile benzer olduğu belirlenmiştir.

Çizge 5.7: Bileşik 13'ün ¹H NMR datalarının literatür ile karşılaştırılması (CDCl₃).

Pozisyon	Asteltoksin E (lit)*	Asteltoksin E**
	δ _H , Mult., J MHz	δ _H , Mult., J MHz
1	1.03, t, 7.5	1.06, t, 7.5
2	1.56, m	1.56, m
3	4.31, dd, 5.0, 8.0	4.30, m
4		
5		
6	5.27, s	5.29, s
7	3.73, d, 2.0	3.73, d, 2.9
8	4.70, s	4.71, d, 6.0
9	5.88, dd, 5.5, 15.5	5.87, dd, 15.5, 5.1
10	6.59, dd, 11.0, 15.0	6.64, m
11	6.49, dd, 11.0, 15.0	6.45, 15.5, 5.1
12	6.37, dd, 11.0, 15.0	6.39, d
13	7.12, dd, 11.5, 15.0	7.19, dd, 15.0, 11.0
14	6.36, dd, 11.0, 15.0	6.39, d, 15.0
15		
16		
17		
18	5.45, s	5.47, s
19		
20	1.37, s	1.39, s
21	1.17, s	1.19, s
22	1.97, s	2.00, s
23	3.76, s	3.78, s
24		
25		
26	6.82, td, 1.5, 5.5	6.83, td, 1.5, 5.5
27	4.69, d, 5.5	4.71, d, 6.0
28	1.90, s	1.92, s

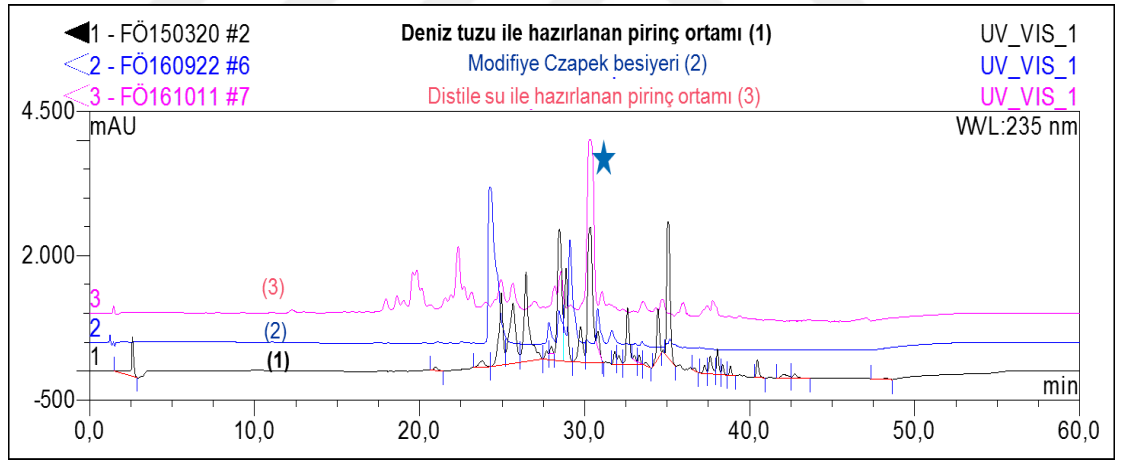
*125 MHz'de kayıt edilmiştir. ** 75 MHz'de kayıt edilmiştir.



Şekil 5.6: *Aspergillus carneus*'un yapay deniz tuzu ile hazırlanmış pirinç ortamından izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları.

5.3.3 *A. carneus* yapay modifiye Czapek besiyerinden metabolit izolasyonu çalışmaları

Tez projesi kapsamında *A. carneus* suşunun yapay deniz tuzu (Sigma) ile hazırlanmış pirinç ortamından, modifiye Czapek besiyerinden ve distile su ile hazırlanmış pirinç besiyerlerinden elde edilen özütlerin içerikleri HPLC analizleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 5.7). Yapılan analizlerde farklı besiyerinin ürün profilini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir. Başta sterigmatocystinin olmak üzere suşun sentezlediği major moleküllerin sentezinin, yapay deniz tuzu ile hazırlanmış besiyerine göre arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında yapay deniz tuzu ile hazırlanan pirinç ortamından farklı moleküller HPLC kromatogramlarında gözlenmiş ve yapılan metabolit izolasyonu çalışmaları ile desteklenmiştir.



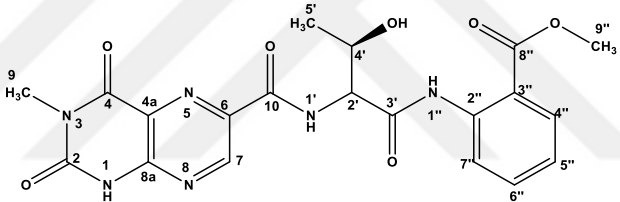
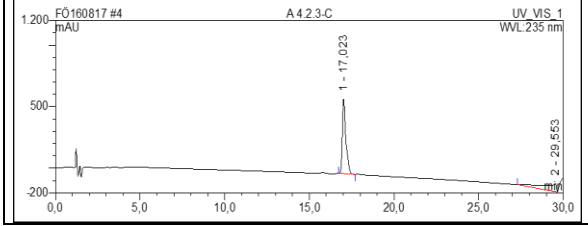
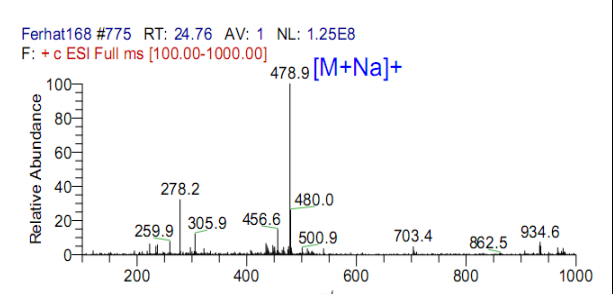
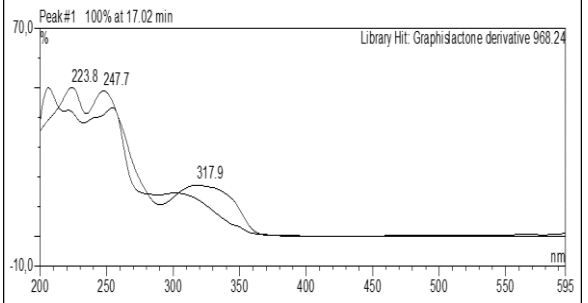
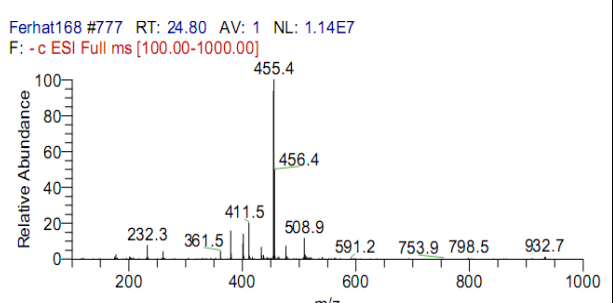
Şekil 5.7: Farklı besiyerlerinden elde edilen özütlerin profillerinin karşılaştırılması (yıldız; sterigmatocystini göstermektedir) (analizler için özütler 1 mg/ml derişiminde hazırlanmıştır)

OSMAC denemesinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda yapay deniz tuzu ile hazırlanmış pirinç ortamından sonra modifiye Czapek besiyerinden metabolit izolasyonu yapılmıştır. Metabolit izolasyonu çalışmaları aniquinazoline E (5),

sterigmatocystin (6), versicolorin C (9), averufin (10), asteltoksin E (13)
terrelumamide C (14) ve diorcinol (15) izole edilmiştir.



5.3.3.1 Terrelumamide C (14), Yeni Bileşik

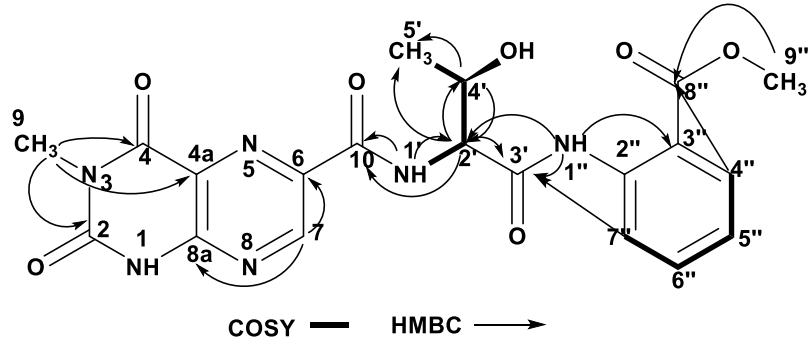
Terrelumamide C	
Örnek Kodu	C7.2.5
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kahverengi katı
Moleküler Formül	C ₂₀ H ₂₀ N ₆ O ₇
Moleküler Ağırlık	456 g/mol
Optik Rotasyon	$[\alpha]_D^{20} = + 50$ (c 0.25, MeOH)
Alıkönme Zamanı (HPLC)	17.02 dak. (Standart gradient)
	
	
	

Kahverengi katı halde saflaştırılan bileşik **14** λ_{\max} (MeOH) 223.8, 247.7 ve 317.9 nm'de maksimum UV absorbans göstermiştir. ESI-MS analizinde m/z 478.9'de $[M+Na]^+$ (+ mod) ve m/z 455.4'de $[M-H]^-$ (- mod) moleküler iyon piki vermiştir. Ardından yapılan HRESI-MS analizinde m/z 457.1468'de $[M+H]^+$ (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve moleküler formülü $C_{20}H_{20}N_6O_7$ olarak belirlenmiştir. Spektral analizlerden (NMR ve MS) elde edilen verilerle bileşiğin kimyasal yapısının terrelumamide A'ya benzediği tespit edilmiştir [76]. İki molekül arasındaki yapısal fark 1-metillumazin-6-karboksilik asit kısmında metil grubunun (C-9) bağlandığı azot atomunun pozisyonundan kaynaklanmaktadır. Bileşik 14'de C-9 metil grubu (δ_C 27.3) 3-nolu azot atomuna bağlıyken, terrelumamide A'da 1-nolu azot atomuna bağlıdır. Bu farklılık HMBC korelasyonları ile belirlenmiştir (Şekil 5.8). Ayrıca bileşik 14'ün 1-metillumazin-6-karboksilik asit kısmı ile antranilik asit kısmı arasında treonin amino asiti bulunmaktadır. Treonin (C-4', δ_C 65.5) konfigürasyonu Marfey's reaksiyon ile L-formunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.9). Bu veriler doğrultusunda bileşik **14** terrelumamide C olarak adlandırılmıştır.

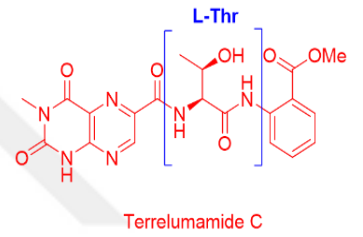
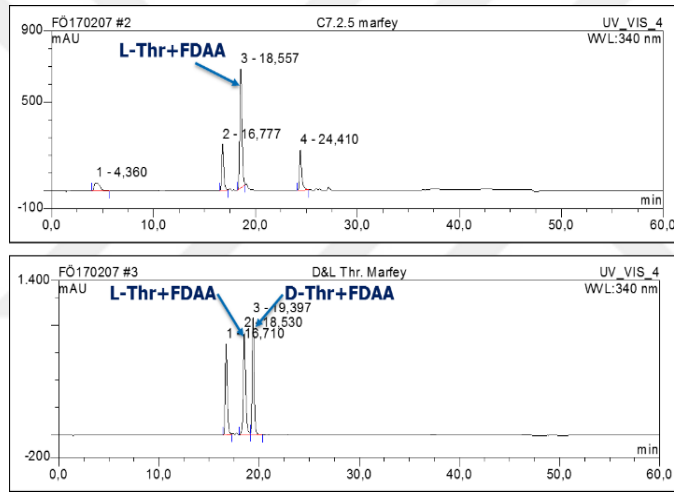
Çizelge 5.8: Terrelumamide C'nin (**14**) ¹H and ¹³C NMR dataları (DMSO-*d*₆)

Pozisyon	δ_H , Mult., J in Hz	δ_C	HMBC
1-NH		12.60, s	
2		150.4	
4		160.4	
4a		134.5	
6		138.2	
7	9.30, s	146.7	4a, 6, 8a
8a		150.1	
9	3.30, s	27.3	2, 4, 4a
10		162.5	
1'-NH	8.51, d, 8.10		2', 10
2'	4.54, dd, 8.0, 2.9	59.3	3', 4', 5', 10
3'		168.3	
4'	4.42, dd, 6.4, 2.9	65.5	2', 5'
5'	1.19, d, 6.4	20.3	
1''-NH	11.10, s		2'', 3'', 3'', 7''
2''		139.5	
3''		117.2	
4''	7.92, dd, 7.9, 1.6	130.2	2'', 6'', 8''
5''	7.20, t, 7.5	122.9	2'', 3'', 6'', 7''
6''	7.63, td, 8.5, 7.6	133.7	2'', 4''
7''	8.45, d, 8.5	121.0	3', 2'', 3'', 5'', 8''
8''		167.7	
9''	3.70, s	52.0	8''

¹³C dataları HSQC ve HMBC spektrumlarından çıkarılmıştır. Ölçümler 125 ve 500 MHz'de kayıt edilmiştir.



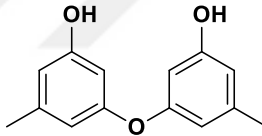
Şekil 5.8: Terrelumamide C'in (14) COSY ve anahtar HMBC korelasyonları

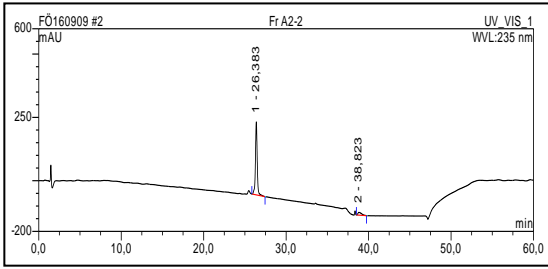


Şekil 5.9: Terrelumamide C'in (14) Marfey's reaksiyon sonucu

5.3.3.2. Diorcinol (15, Bilinen Bileşik)

Diorcinol	
Örnek Kodu	C2.2.1a
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	3.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı toz
Moleküler Formül	$C_{14}H_{14}O_3$
Moleküler Ağırlık	230 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	7.70 dak. (Standart gradient)


Cc1ccc(O)c(O)c1-c2ccc(O)c(O)c2

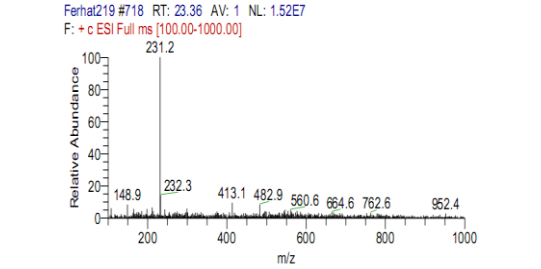


UV-VIS 1
WVL: 235 nm

Fr A2-2

1 - 26.383

2 - 36.823

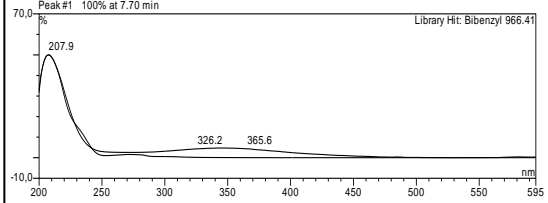


Ferhat219 #718 RT: 23.36 AV: 1 NL: 1.52E7

F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

231.2

148.9 232.3 413.1 482.9 560.6 664.6 762.6 952.4

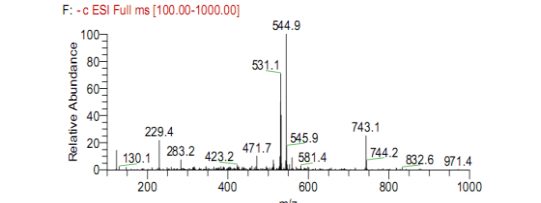


Peak #1 100% at 7.70 min

Library Hit: Bibenzyl 966.41

207.9

326.2 365.6

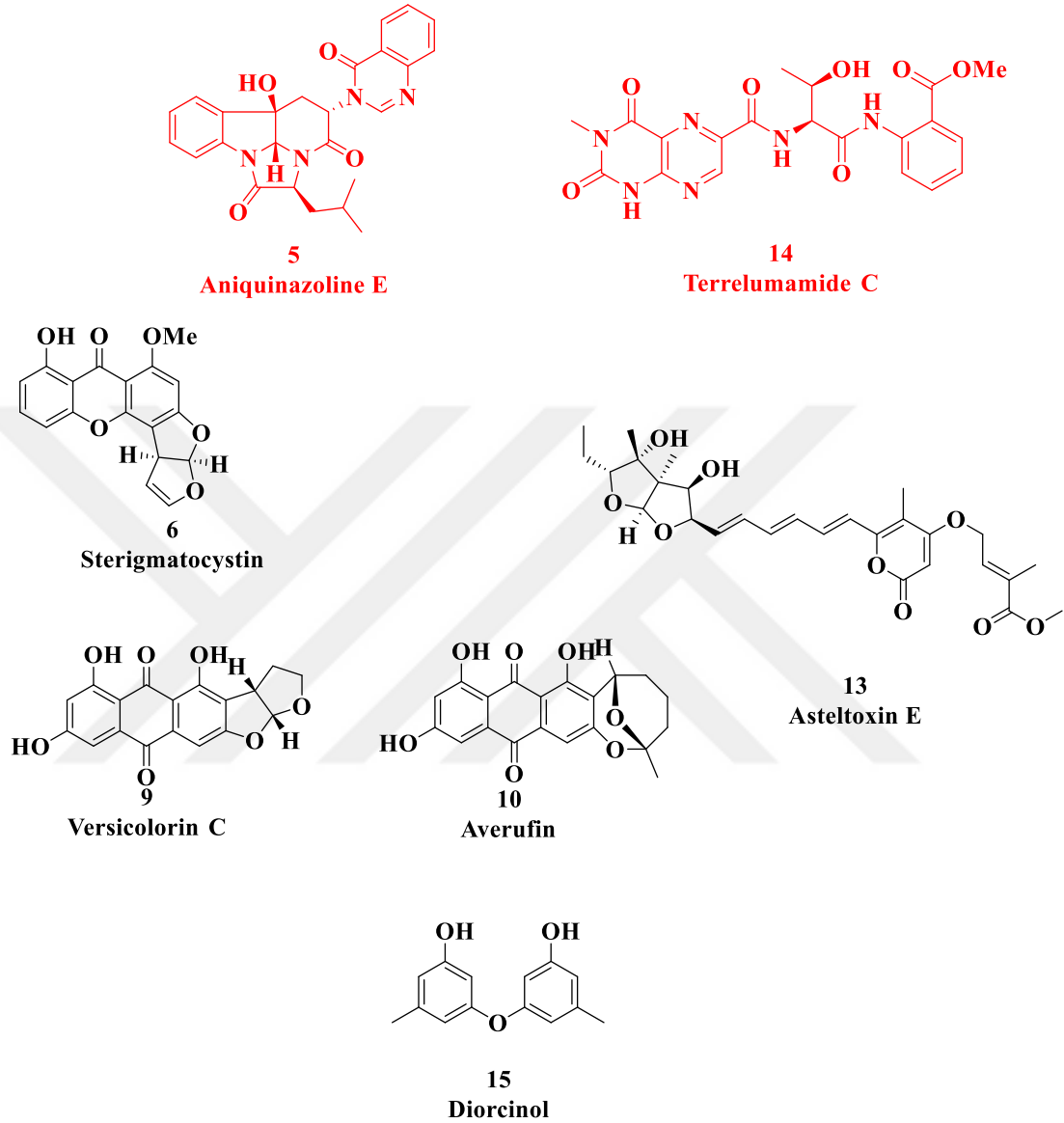


Ferhat219 #720 RT: 23.40 AV: 1 NL: 2.33E6

F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

544.9

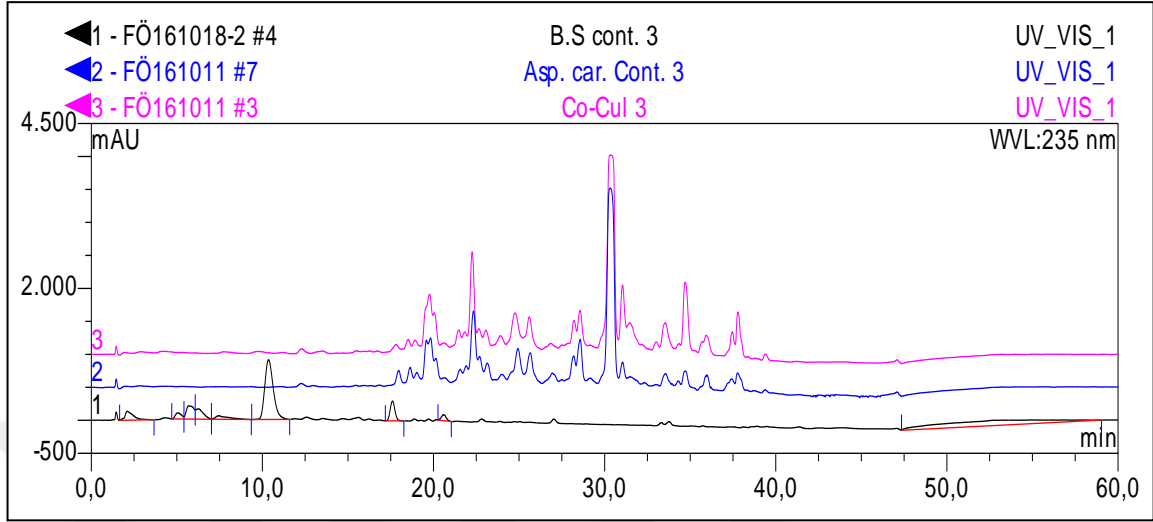
130.1 229.4 283.2 423.2 471.7 545.9 581.4 743.1 744.2 832.6 971.4



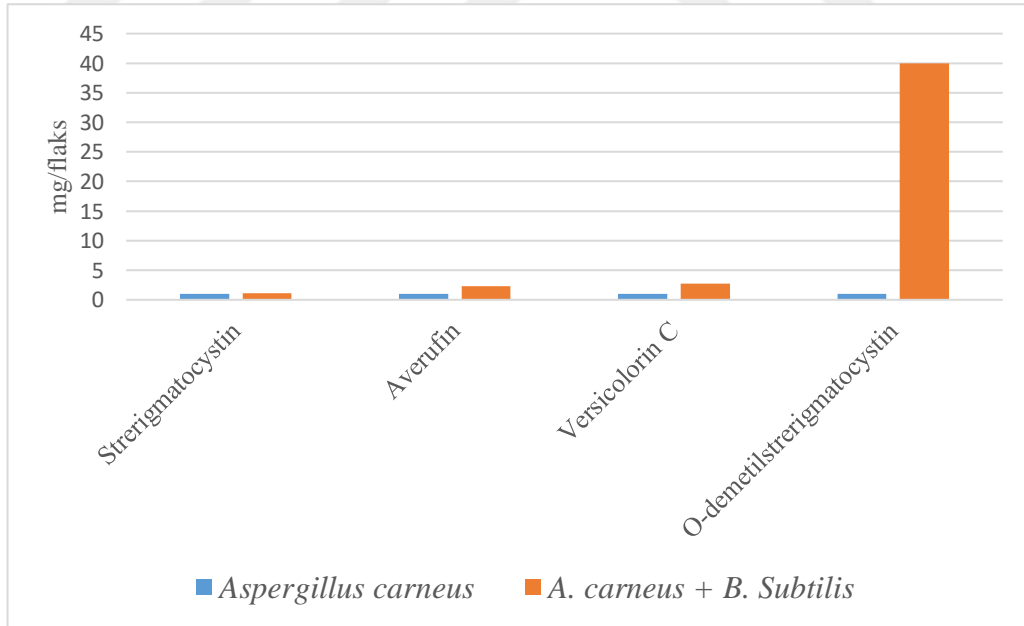
Şekil 5.10: *Aspergillus carneus*'un modifiye Czapek besiyerinden izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları

5.3.4 *A. carneus* ve *B. subtilis* fungus bakteri ko-kültür ortamından metabolit izolasyonu çalışmaları

Tez projesi kapsamında tek olarak *A. carneus* suşu, tek olarak Gram-pozitif *B. Subtilis* ve *A. carneus* ile *B. subtilis* birlikte distile sulu pirinç ortamında kültüre edilmişlerdir. Bu ortamlardan elde edilen ham özütlerin içeriği HPLC ile analiz edilmiştir. Elde HPLC kromatogramları karşılaştırıldığında ko-kültür ortamında *A. carneus* suşunun ürettiği moleküllerin sentezinin arttığı kromatogramlardan görülmüştür (Şekil 5.11). Yapılan metabolit izolasyonu çalışmalarında daha önce izole edilen moleküllerin yanında farklı antrakinin ve sterigmatocystin türevleri elde edilmiştir (Şekil 5.13). Metabolit izolasyonu sonrasında yapılan değerlendirmelerde sterigmatocystinin sentezi 1.1 kat, averufinin sentezi 2.25 kat, versicolorin c'nin sentezi 2.7 kat ve O-demetilsterigmatocystinin sentezinin 40 kat arttığı tespit edilmiştir. Ancak yeterli zamanın olmayışı ve moleküllerin stabil olmamasından dolayı artışı gözlenen diğer moleküllerin izolasyonu tamamlanamamıştır.



Şekil 5.11: *B. subtilis* (1), *A. carneus* (2) ve *B.subtilis* ile *A. carneus*'un (3) ko-kültür özütlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.12: Ko-kültürde artışı belirlenen moleküllerin üretimlerinin karşılaştırması.

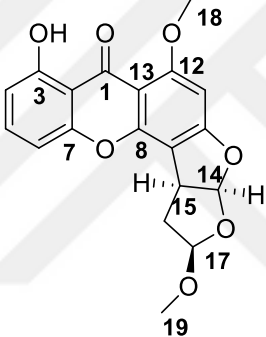
Ko-kültür ortamında elde edilen özütü ile yapılan metabolit izolasyonu çalışmalarında aniquinazoline E (5), sterigmatocystin (6), demetil-sterigmatocystin (7), averufin (10),

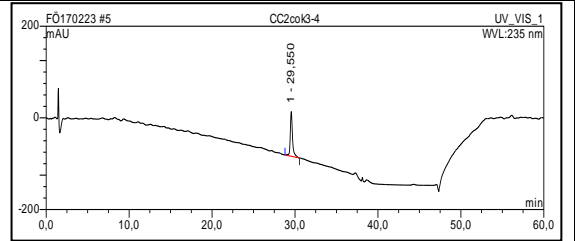
arugosin C (11), diorcinol (15), oksisterigmatocystin-C (16), dihkrosisterigmatocystin (17), 25-O-metilarugosin A (18) ve nidurufin (19) izole edilmiştir.

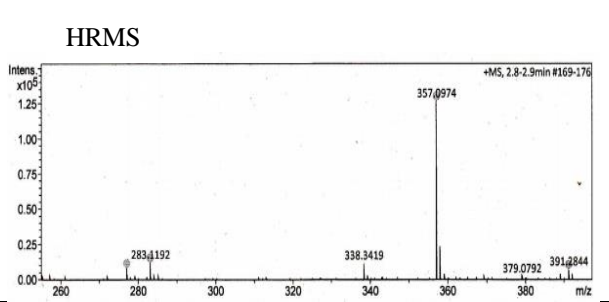


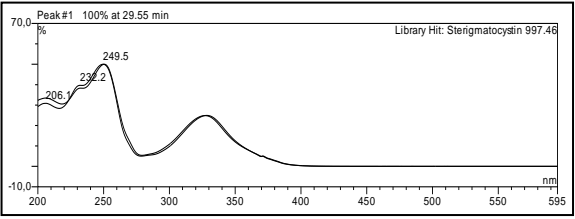
5.3.4.1 Oksisterigmatocystin-C (16, bilinen bileşik)

Oksisterigmatocystin-C	
Örnek Kodu	CC2cok3-4
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	1.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı doz
Moleküler Formül	C ₁₉ H ₁₆ O ₇
Moleküler Ağırlık	356 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	29.55 dak. (Standart gradient)

COC1OC[C@H](C2=CC(=C(C=C2)OC(=O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O1

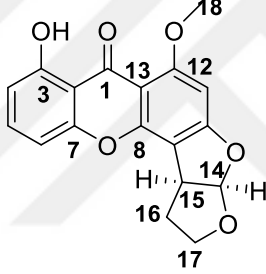


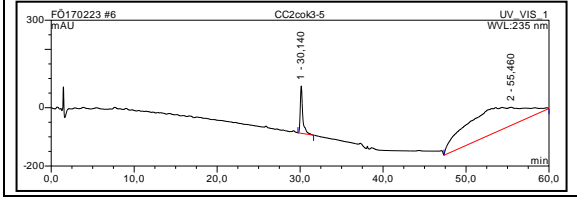


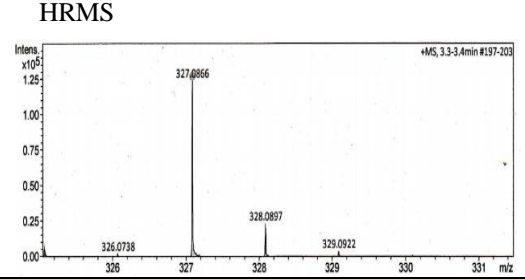


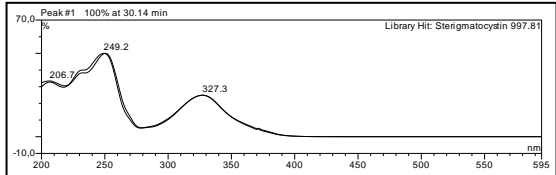
5.3.4.2 Dihidroksisterigmatocystin (17, bilinen bileşik)

Dihidroksisterigmatocystin	
Örnek Kodu	CC2cok3-5
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	1.5 mg
Fiziksel Özellikleri	Sarı doz
Moleküler Formül	$C_{18}H_{14}O_6$
Moleküler Ağırlık	326 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	30.14 dak. (Standart gradient)









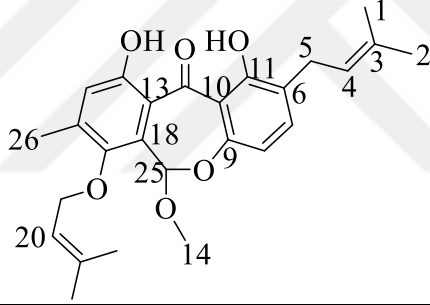
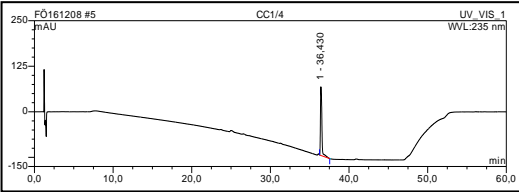
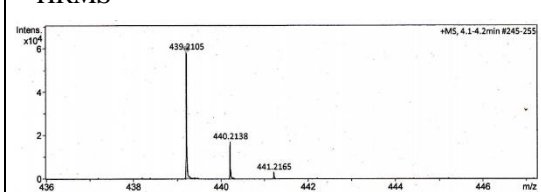
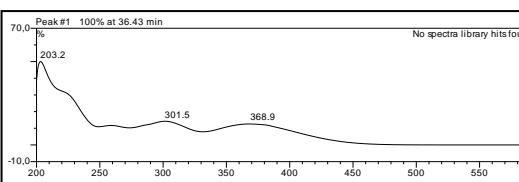
Sarı toz formda izole edilen bileşik **16** ve **17** daha önce izole edilen sterigmatocystin türevleri ile benzer UV pattern (λ_{\max} (MeOH) 202.9, 247.8 ve 326.8 nm) göstermiştir. HRESI-MS analizlerinde bileşik **16**'nin moleküler ağırlığı 356 g/mol ve moleküler formülü $C_{19}H_{16}O_7$, bileşik **17**'nin moleküler ağırlığı 326 g/mol ve $C_{18}H_{14}O_6$ olarak bulunmuştur. Son olarak yapılan proton spektrumu analizlerinde sterigmatocystin'de bulunan ksanton halkasının bu iki bileşikte de bulunduğu, ancak molekül yapısında ve moleküler ağırlıktaki farklanmanın molekülün furan halkasında olduğu görülmüştür. Bileşik **16**'da sterigmatocystin yapısına ek olarak 17 nolu karbon atomuna (C-17) bir O-CH₃ grubu bağlanmıştır (H-19, 3H, δ_H 3.15, s). Bileşik **17**'de ise sterigmatocystin'in furan halkasındaki çift bağın yerine tek bağın olduğu tayin edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda bileşik **16** için elde edilen veriler Cai vd. (2011) [77] ile karşılaştırıldığında yapının oksisterigmatocystin C olduğu, bileşik **17** için elde edilen veriler Zhu vd. (2007) [78] ile karşılaştırıldığında yapının dihidroksisterigmatocystin olduğu tayin edilmiştir.

Çizelge 5.9: Bileşik 16 ve 17'nin ¹H dataları.

Oksisterigmatocystin C (Acetone- <i>d</i> ₆)		Dihidroksisterigmatocystin (Acetone- <i>d</i> ₆)	
Pozisyon	δ _H , Mult, J Hz	Pozisyon	δ _H , Mult, J Hz
1		1	
2		2	
3		3	
3-OH	13.52, s	3-OH	13.50, s
4	6.91, dd, 8.3, 1.0	4	6.92, dd, 8.3, 1.0
5	7.58, t, 8.5	5	7.59, t, 8.3
6	6.71, dd, 8.3, 1.0	6	6.71, dd, 8.3, 1.0
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	
11	6.50, s	11	6.50, s
12		12	
13		13	
14	5.62, s	14	6.53, d, 5.5
15	4.27, ddd, 9.4, 6.2, 1.2	15	4.3, m
16	α, 2.45, ddd, 13.3, 9.3, 4.9 β, 2.38, dd, 13.3, 2.1	16	2.33, m
17	5.272, d, 5.0	17	α, 4.13, ddd, 8.6, 7.2, 1.3 β, 3.63, ddd, 11.7, 8.9, 5.4
18	3.95, s	18	3.96, s
19	3.15, s		

Ölçümler 150 MHz'de kayıt edilmiştir.

5.3.4.3 25-O-metilarugosin A (18, bilinen bileşik)

25-O-metilarugosin A	
Örnek Kodu	CC1-4
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	2.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	C ₂₆ H ₃₀ O ₆
Moleküler Ağırlık	438 g/mol
Optik Rotasyon	[α] _D ²⁵ = - 0.3 (c 0.1, CHCl ₃)
Alıkonma Zamanı	36.43 dak. (Standart gradient)
	
	
	

Kırımızı toz halinde izole edilen bileşik **18** λ_{\max} (MeOH) 203.2, 301.5 ve 368.9 nm'de maksimum UV absorbansı göstermiştir. HRESI-MS analizinde m/z 439.2105 $[M+H]^+$ (+ mod) de güçlü moleküler iyon piki vermiş ve buradan hareketle moleküler formülü $C_{26}H_{30}O_6$ olarak belirlenmiştir. Proton spektrumu incelendiğinde bileşiğin bir tane 4 sübstitüentli benzil (H-7, 1H δ_H 7.40, d, $J= 8.3$ Hz; H-6, 1H, δ_H 6.59, d, $J= 8.3$ Hz), bir tane 5 sübstitüentli benzil (H-15, 1H, δ_H 6.44, s), bir tane benzile bağlı metil (H-26, 3H, δ_H 2.6, s), 4 tane çift bağa bağlı metil (H-1, 3H, s, δ_H 1.62; H-2/23, 6H, δ_H 1.72, s; H-22, 3H, δ_H 1.80, s), iki tane metilen (H-5, 2H, δ_H 3.31, d, $J= 7.3$ Hz; H-20, 2H, δ_H 4.41), iki tane metin (H-19, 1H, δ_H 2.41, ddd, $J= 7.9, 5.0, 4.1$ Hz; H-4, 1H, δ_H 3.31, d, $J= 7.3$ Hz), bir tane oksijene bağlı kiral proton (H-20, 1H, δ_H 5.33, dd, $J= 9.0, 6.0$ Hz), iki oksijen atomuna bağlı bir metin (H-25, 1H, δ_H 6.93, s) ve bir tane metoksi (H-24, 3H, δ_H 3.35, s) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen spektral analiz sonuçları Sun vd. (2016) [79] ile karşılaştırıldığında bileşik **18**'in kimyasal yapısının 25-O-metilarugosin A olduğu tayin edilmiştir.

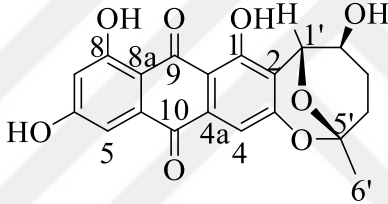
Çizelge 5.10: Bileşik 18'in ^1H dataları (Asetone- d_6)

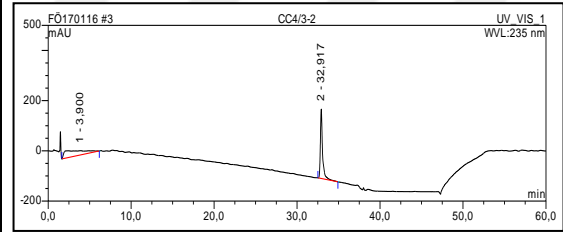
25-O-Metilarugosin (Aseton- d_6)	
Pozisyon	δ_{H} , Mult, J Hz
1	1.62, s
2	1.72, s
3	
4	5.59, t, 7.3
5	3.31, d, 7.3
6	
7	7.40, d, 8.3
8	6.59, d, 8.3
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	6.44, s
16	
17	
18	
19	4.41, dd, 16.6, 7.3
20	5.33, dd, 9.0, 6.0
21	
22	1.80, s
23	1.72, s
24	3.35, s
25	6.93, s
26	2.36, s
11-OH	10.00, s
14-OH	13.30, s

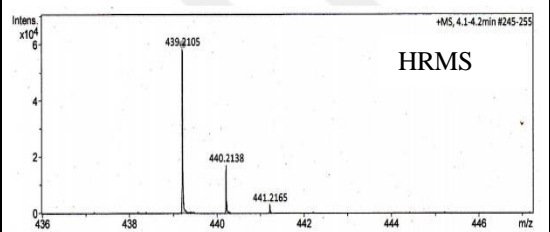
Ölçümler 75 MHz'de kayıt edilmiştir.

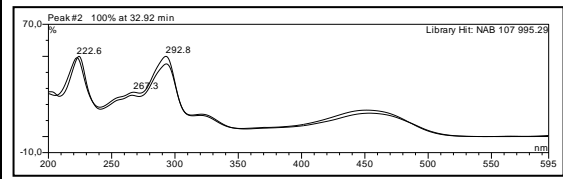
5.3.4.4 Nidurufin (19, bilinen bileşik)

Nidurufin	
Örnek Kodu	CC4-3-2
Biyolojik Kaynak	<i>Aspergillus carneus</i>
Örnek Miktarı	2.0 mg
Fiziksel Özellikleri	Kırmızı toz
Moleküler Formül	C ₂₀ H ₁₆ O ₈
Moleküler Ağırlık	384 g/mol
Alıkonma Zamanı (HPLC)	32.92 dak. (Standart gradient)









Kırmızı toz halinde izole edilen bileşik **19**, HRESI-MS analizinde de m/z 385.0965'de $[M+H]^+$ (+ mod) güçlü moleküler iyon piki vermiş ve buradan moleküler formülünün $C_{20}H_{16}O_8$ olduğu bulunmuştur. Bileşiğin UV spektrumu bileşik **10** ile benzer UV-vis patterne [λ_{max} (MeOH) 222.6, 267.3 ve 292.8 nm] sahip olduğu belirlenmiştir. Ardından yapılan 1H spektrumu analizinde bileşik **10** ile benzer antrakinon iskeletine sahip olduğu (H-5, δ_H 7.26, 1H, d, 2.4; H-7, δ_H 6.68, 1H, d, 2.4; H-4, δ_H 7.13, 1H, s) ve bileşiğin yan zinciri bileşik **10**'a göre bir tane fazladan bir hidroksil grubu içermektedir. Ancak yan zincirdeki hidroksil grubunu proton spektrumunda rezonans olmamıştır. Eksik olan hidroksil grubu yapılan spektral analizlerin (NMR ve MS) Ren ve Liu (2011) [80] ile karşılaştırıldığında yeri belirlenmiştir. Sonuç olarak bileşik **19**'un kimyasal yapısının nidurufin olarak tayin edilmiştir.

Çizelge 5.11: Bileşik **19**'un 1H dataları

Nidurufin (DMSO- d_6)	
Pozisyon	δ_H , Mult, J Hz
1	
2	
3	
4	7.13, s
5	7.26, d, 2.4
5a	
6	
7	6.68, d, 2.4
8	
8a	
9	
10	
11	
1'	5.17, d, 2.0
2'	3.96, q, 2.8
3'	1.73, m
4'	α , 1.91, m β , 2.31, m
5'	
6'	1.59, s

Ölçümler 75 MHz'de kayıt edilmiştir.

5.4 Biyoaktivite Taramalarının Sonuçları

Fare lenfoma hücre hattı L5178Y'ye karşı yapılan sitotoksiste taramasının sonuçlarına göre aktivite gösteren bileşikler Çizelge 5.12'de gösterilmiştir. *P. chrysogenum*'dan izole edilen moleküllerin miktarlarının çok düşük olmasından dolayı biyoaktivite taramalarına alınmamıştır.

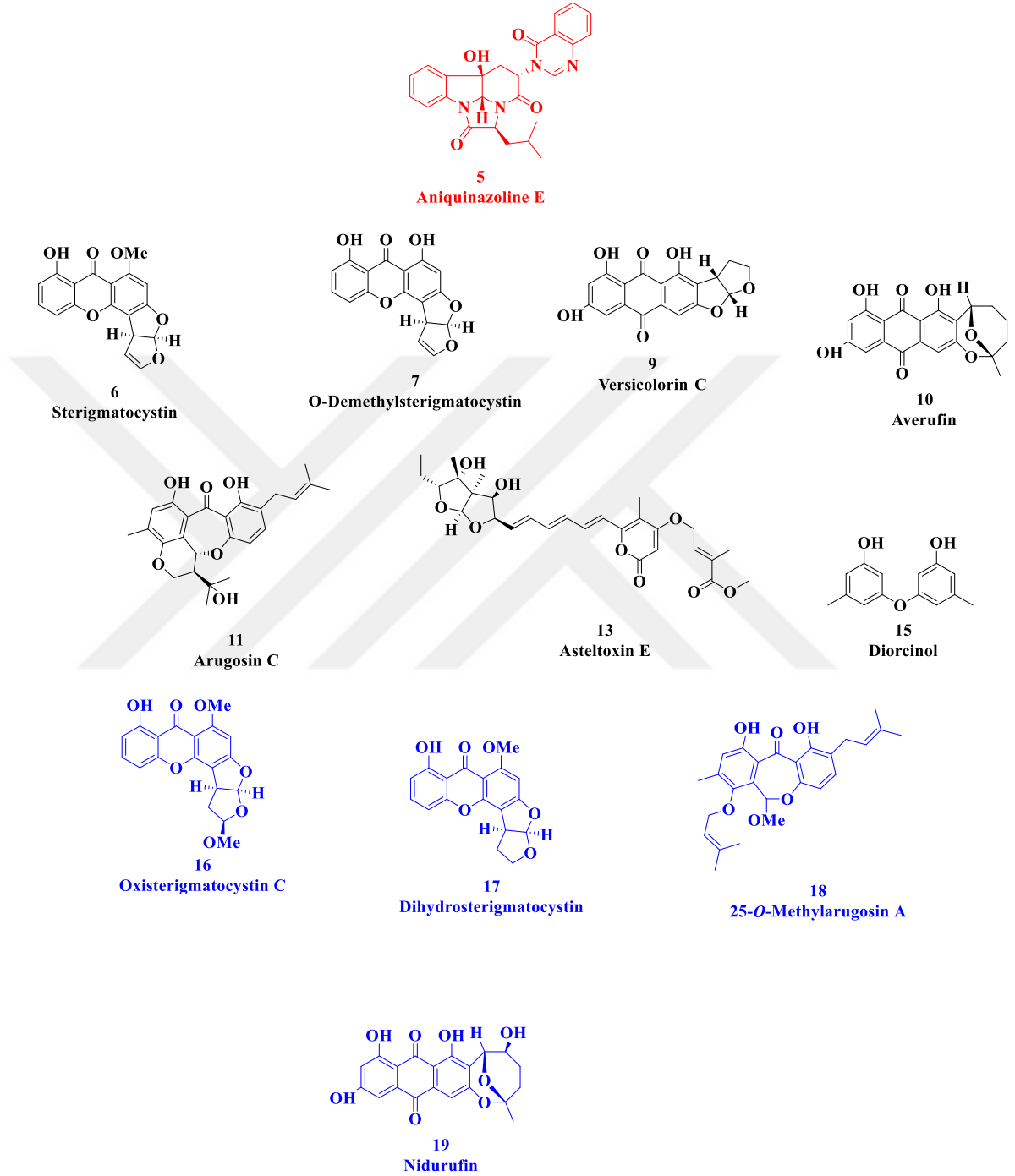
Çizelge 5.12: Fare lenfoma hücre hattı L5178Y'ye karşı biyoaktivite sonuçları

	Bileşik Adı	IC ₅₀
1	Sterigmatocystin	~0.3 µM
2	Asteltoxin E	<0,19 µM
3	Versicolorin C	18.2 µM
4	O-Demethylsterigmatocystin	9.7 µM
5	Averufin	13 µM
6	Norsolorinic acid	25 µM
7	Aniquinazoline E	0,43 µM

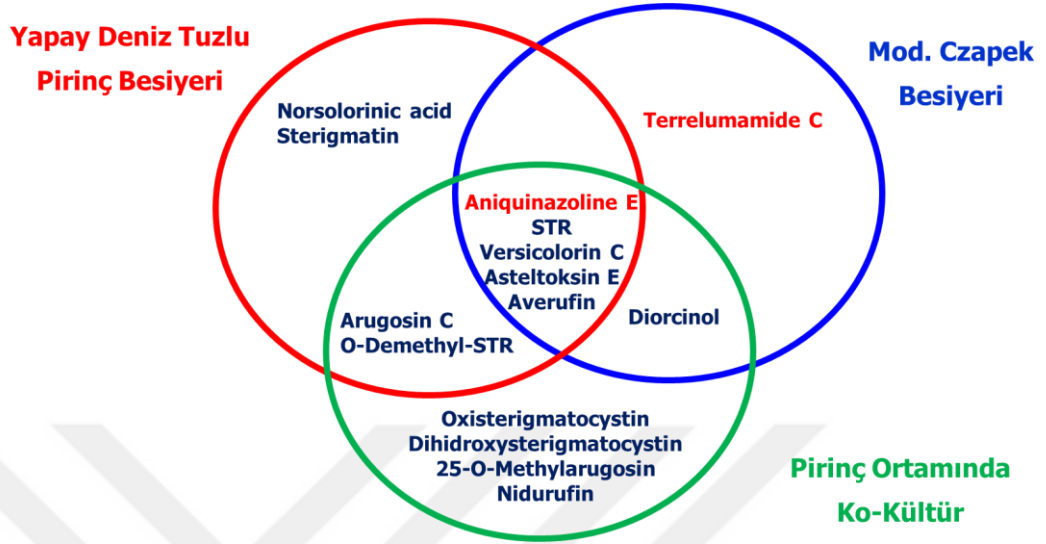
Bölüm 4.4.1'de belirtilen test patojenlerine karşı yapılan taramalar sonucunda biyoaktive gösteren moleküller ve MİK değerleri Çizelge 5.13'de belirtilmiştir.

Çizelge 5.13: Antimikrobiyal aktivitesi taraması sonucunda aktivite gösteren moleküller ve MİK değerleri

Bileşik Adı	<i>S.aureus</i> ATCC 700699	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	<i>E.faecium</i> ATCC 35667	<i>E.faecium</i> ATCC 700221
Versicolorin C	12,5 µM	100 µM	100 µM	100 µM	>100 µM
Averufin	12,5 µM	100 µM	50 µM	6,25 µM	25 µM



Şekil 5.13: *Aspergillus carneus* 'un ko-kültür ortamından izole edilen moleküllerin kimyasal yapıları



Şekil 5.14: *A. Carneus*'un farklı besiyerlerinden izole edilen moleküllerin elde edildiği besiyerlerine göre dağılımı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal ürün araştırmalarında son yıllarda denizel habitatlarda makroorganizmalarla birlikte yaşayan mikrobiyal suşlara olan ilgi hızla artmaktadır [6, 37]. Denizel habitatlarda mikroorganizmaların maruz kaldığı uç yaşam koşulları yeni metabolitlerin sentezi için biyokimyasal süreçleri tetikleyebilmektedir. Ayrıca makroorganizmaların bünyelerinde barındırdığı yoğun mikrobiyal yaşam formu var olan stres koşullarının yanında ilave yaşamsal rekabeti de beraberinde getirmektedir [81]. Geliştirilen omik teknolojilerle yapılan çalışmalarda günümüze kadar denizlerdeki mikrobiyal çeşitliliğin yaklaşık % 0.01 kadarının aydınlatılabildiği bilinmektedir. Bu da günümüzde denizel ortamlardan izole edilecek mikroorganizmaların yeni doğal ürün potansiyelini göstermektedir [82]. Özellikle kütlelerinin % 50 – 60'nı mikroorganizmaların oluşturduğu süngerler denizel mikroorganizmalar için en çok araştırılan kaynaklardır [39, 45].

Türkiye açısından denizel doğal ürün araştırmalarını değerlendirdiğimizde ise sahip olduğumuz potansiyel yeteri kadar değerlendirilmemiştir. Son yıllarda ülkemizin denizlerinden toplanan süngerlerden ve sedimentlerden izole edilen mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalar rapor edilmeye başlanmıştır [14-17]. Ancak var olan potansiyeli tam olarak yansıtamamamıştır.

Çeşitli mikrobiyal suşların tüm genomlarının sekanslanması ile sahip oldukları metabolit üretim potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır. Ancak laboratuvar koşullarında biyoaktif metabolit sentezinden sorumlu genlerin büyük bir kısmı sessiz kalmaktadır [18]. Bunun için araştırmacılar farklı yöntemler geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden en sık kullanılanlar OSMAC ve ko-kültürdür [18, 19]. Tez projesi kapsamında metabolit izolasyonu için seçilen *A. carneus* suşu ile bu iki yöntem denenmiştir. İlk olarak OSMAC denemesi yapılan suşun ürün profilindeki değişim HPLC analizleri ile belirlenmiş (Şekil 5.7) ve yapılan karşılaştırmada benzer ürünlerin yanında farklı ürünlerinde sentezleyebildiği görülmüştür. İlk olarak deniz tuzu ile hazırlanan pirinç ortamından yapılan metabolit izolasyonunda yeni doğal ürün olan kinazolin türevi aniquinazoline E'nin (bileşik 5) yanında antrakinon (bileşik 9-12), terpen (bileşik 13),

furan ve ksanton (bileşik **6-8**) türevi bileşikler elde edilmiştir. Bu da metabolit izolasyonu için seçilen suşun farklı kimyasal yapılarıdaki metabolitleri sentezleyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Bunun üzerine *A. carneus* suşu pirinç ve modifiye Czapek besiyerlerinde üretimi yapılmıştır. Ardından modifiye Czapek besiyerinden metabolit izolasyonu sonunda deniz tuzu içeren pirinç ortamı ile benzer moleküllerin (bileşik **5-7, 10, 11, 13**) yanında 1-metillumazin-6-karboksilik asit, antranilik asit ve *L*-treonin içeren yeni terrulamamide C (**14**) ve di-fenil eter yapısında olan diorcinol (**15**) izole edilmesi suşun laboratuvar koşullarında sessiz kalan genlerinin üretim ortamının farklanması ile uyarılabildiğini göstermiştir. Distile su ile hazırlanan pirinç ortamı ko-kültür denemesinde değerlendirilmiştir.

A. Carneus ile yapılan ko-kültür denemesinde, uygulama güvenliği açısından *B. subtilis* kullanılmıştır. Çünkü *B. Subtilis*, insan gastrointestinal sisteminden toğrağa kadar çok farklı habitatlarda yaşayabilen en yaygın ve güvenilir Gram-pozitif bakteridir [83]. Çeşitli bilimsel denemelerde kullanılan model organizmalardan biridir ve tüm genom sekansı belirlenmiştir [84]. Literatür incelendiğinde bakteri-fungus ko-kültür denemelerinde *B. subtilis*'in metabolit üretimi açısından iyi bir indükleyici ajan olduğu rapor edilmiştir [61, 85]. Yapılan kültürasyon çalışmalarının ardından üretim ortamlarının profilleri değerlendirildiğinde ko-kültür ortamından elde edilen özütün, fungusun tek başına kültür edildiği ortama göre metabolit çeşitliliği açısından çok değişmediği gözlenmiştir. Ancak hücreler arası etkileşimin metabolitlerin biyosentezinin arttığı görülmüş (Şekil 5.11) ve kantitatif analizlerle de sonucunda da biyosentezdeki artış belirlenmiştir (Şekil 5.12). Ayrıca metabolit izolasyonu çalışmaları sonucunda diğer iki ortamla aynı (bileşik **5-7, 10, 11, 13, 15**) kimyasal yapıya sahip bileşiklerin türevleri izole edilmiştir. Bu durum kültürasyon sırasında hücreler arası etkileşimin veya deniz tuzunun olmadığı ortamda fungal suşun barındırdığı metabolik yolları olumlu yönde indüklenbildiği ile açıklanabilir.

Araştırma sonunda *A. carneus*'dan izole edilen moleküllerin elde edildiği ortamlara göre dağılımı Şekil 5.14'de belirtilmiştir ve 2 yeni molekülün yanında 13 bilinen molekül izole edilmiştir. Kinazolin türevi olan aniquinazoline E, daha önce belirtildiği gibi (-)-chaetominine ve analoglarının sentezinde kullanılan bir ara metabolittir [68].

Yapılan çalışmada bileşiğin tüm NMR dataları ve absolute konfigürasyonu ilk kez bildirilmiştir. Ayrıca funguslardan metabolit eldesi ile doğal ürünlerin organik sentezi karşılaştırıldığında maliyet, iş yükü ve zaman açısından funguslardan üretimin daha sürdürülebilirdir. Bu durum aniquinazoline E'nin sentezlenmesinde de görülmektedir [68]. Yapılan sitotoksikite taramaları sonucunda benzer kimyasal yapıya sahip aniquinazoline A – D (*Artemia salina*'ya karşı LD₅₀ değerleri 1.27, 2.11, 4.95 ve 3.42 µM) ve pozitif kontrol olarak kullanılan Kahalalide F (L5178Y hücre hattına karşı EC₅₀ değeri 4.3 µM) göre daha güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir ve bu sonuçlar değerlendirildiğinde aniquinazoline E'nin ilerleyen zamanlar için kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin olduğu yapılan sitotoksikite taramalarında gözlenmiştir. Bir diğer yeni molekül olan terrelumamide C'nin içerdiği 1-metillumazin-6-karboksilik asit yapısının doğal kaynaklardan elde edilen moleküllerde rapor edilmediği bilinmektedir [76]. Bu da fungusların yeni doğal ürün ve kimyasal yapıları açısından önemli birer kaynak olduğunun göstermiştir. Ayrıca bileşiğin besiyerinin değişimi ile fungus tarafından sentezlenmesi OSMAC denemelerinin etkinliğini kanıtlamıştır. Lumazin monomeri ve *N*-alkil türevlerinin sırası ile metanojenin büyümesini, metan oluşumunu [86] ve tümör nekrosis faktör- α 'nin üretimini [87], inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ancak lumazin içeren moleküllerin yapısal olarak karmaşıklığı arttıkça biyoaktivite kaybolmaktadır [76]. Benzer durum terrelumamide C içinde geçerli olduğu söylenebilir. Çünkü yapılan biyoaktivite testlerinde herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Ancak sitotoksikite ve antimikrobiyal aktivitelerin dışında farklı biyokimyasal süreçlere etkileri araştırılabilir.

A.carneus suşundan izole edilen moleküllerin biyoaktiviteleri değerlendirildiğinde sterigmatocystin ve asteltoksin E'nin fare lenfoma hücre hattı L5178Y'ye karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sterigmatocystin C-12 pozisyonuna O-CH₃ yerine -OH grubunun gelmesi ile oluşan O-demetilsterigmatocystin sitotoksik aktivitesini olumsuz yönde etkilemiştir. Antrakınon türevi olan versicolorin C ve norsolorinic asit bileşiklerinin sahip olefinik yan zincirler sitotoksik aktivitelerini etkilemiştir. İki molekül değerlendirildiğinde versicolorin C'nin siklik olefenik yan zinciri, norsolorinic asitin düz olefenik zincirine göre sitotoksitenin artmasını

sağlamıştır. Moleküllerin antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde versicolorin C'nin ve averufinin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Burada da antrakinin iskeletine bağlanan yan zincirin antimikrobiyal aktiviteyi etkilediği ve yan zincirinde oksijen köprüsü olan averufinin *S. aureus* ATCC 700699 , *E. faecalis* ATCC 51299, *E. faecium* ATCC 35667 ve *E. faecium* ATCC 700221'e karşı daha güçlü aktivite göstermiştir.

Son olarak ko-kültür ortamında tek fungal kültüre göre biyosentezde artış olan sterigmatocystin ve O-demetilsterigmatocystin antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bu moleküller doğada hücreler arası etkileşimde veya bakteriyel üremeyi baskılamak amacıyla fungus tarafından sentezlenmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Özellikle 40 kat kadar sentezi artan O-demetilsterigmatocystinin karşılıklı etkileşimde rol alabileceği düşünülebilir. Yine biyosentezi artan averufin ve versicolorin C ise doğada fungusun yaşadığı ortamdaki rekabette kendisine üstünlük sağlamak ve rakiplerini inhibe etmek için sentezlediği sahip oldukları antimikrobiyal aktiviteden dolayı varsayılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Firn, R.D. ve C.G. Jones.** (2003). Natural products- a simple model to explain chemical diversity, *Nat Prod Rep*, 20(4), 382-391.
- [2] **Fleming, A.** (1929). On the antibacterial action of cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Br J Exp Pathol*, 10, 226-236.
- [3] **Holker, U., Hofer, M., Lenz, J.** (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(2), 175-186.
- [4] **Lee, K.H.** (2010). Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach, *J Nat Prod*, 73(3), 500-516.
- [5] **Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J.** (2005). Exploring novel bioactive compounds from marine microbes, *Curr Opin Microbiol*, 8(3), 276-281.
- [6] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., Prinsep, M. R.** (2012). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 29(2), 144-222.
- [7] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., Prinsep, M. R.** (2011). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 28(2), 196-268.
- [8] **Gulder, T.A. ve Moore, B.S.** (2009). Chasing the treasures of the sea - bacterial marine natural products. *Curr Opin Microbiol*, 12(3), 252-260.
- [9] **Imhoff, J.F., Labes, A., Wiese, J.** (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products, *Biotechnol Adv*, 29(5), 468-482.
- [10] **Ronsberg, D., Debbab, A., Mandi, A., Vasylyeva, V., Bohler, P., Stork, B., Engelke, L., Hamacher, A., Sawadogo, R., Diederich, M., Wray, V., Lin, W., Kassack, M. U., Janiak, C., Scheu, S., Wesselborg, S., Kurtan, T., Aly, A. H., Proksch, P.** (2013). Pro-apoptotic and immunostimulatory tetrahydroxanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla*, *J Org Chem*, 78(24), 12409-12425.
- [11] **Engel, S., Jensen, P.R., Fenical, W.** (2002). Chemical ecology of marine microbial defense, *J Chem Ecol*, 28(10), 1971-1985.
- [12] **Mohanta, T.K. and Bae, H.** (2015). The diversity of fungal genome. *Biol Proced Online*, 17(8), 1-10.
- [13] **Aksoy, S.C., Uzel, A., Bedir, E.** (2016). Cytosine-type nucleosides from marine-derived *Streptomyces rochei* 06CM016, *J Antibiot (Tokyo)*, 69(1), 51-56.
- [14] **Chen, H., Aktaş, N., Konuklugil, B., Mandi, A., Daletos, G., Lin, W., Dai, H., Kurtan, T., Proksch, P.** (2015). A new fusarielin analogue from *Penicillium* sp. isolated from the Mediterranean sponge *Ircinia oros*, *Tetrahedron Lett*, 56(39), 5317-5320.

- [15] Liu, S., Dai, H., Konuklugil, B., Orfali, R.S., Lin, W., Kalscheuer, R., Liu, Z., Proksch, P. (2016). Phenolic bisabolanes from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp., *Phytochem Lett*, 18, 187-191.
- [16] Öner, Ö., Ekiz, G., Hameş, E.E., Demir, V., Gübe, Ö., Özkaya, F.C., Yokeş, M.B., Uzel, A., Bedir, E. (2014). Cultivable sponge-associated actinobacteria: Phylogenetic diversity and antimicrobial activities. *New Biotechnology*, 4, 306-316.
- [17] Özkaya, F.C., Bedir, E., Hameş, E.E. (2015). A new siderophore from sponge associated *Pseudomonas fluorescens* 4.9.3., *Rec.Nat. Prod.*, 9(4), 509-517.
- [18] Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R., Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity, *Chembiochem*, 3(7), 619-627.
- [19] Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W. H., Wang, B. G., Proksch, P. (2014). Co-Cultivation-A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms, *Mar Drugs*, 12(2), 1043-1065.
- [20] Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading, *J Antibiot (Tokyo)*, 65(8), 385-395.
- [21] Blunt, J.W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 22(1), 15-61.
- [22] Newman, D.J. ve Hill, R.T. (2006). New drugs from marine microbes: the tide is turning, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33(7), 539-544.
- [23] Proksch, P., Edrada, R.A. and Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59(2-3), 125-134.
- [24] Hu, G.P., Yuan, J., Sun, L., She, Z. G., Wu, J. H., Lan, X. J., Zhu, X., Lin, Y. C., Chen, S. P. (2011). Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008, *Mar Drugs*, 9(4), 514-525.
- [25] Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B. S. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans, *Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4431-4440.
- [26] Fieseler, L., Horn, M. Wagner, M., Hentschel, U. (2004). Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges, *Appl Environ Microbiol*, 70(6), 3724-3732.
- [27] Fuerst, J.A., (2014). Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(17), 7331-47.

- [28] **Kennedy, J., Marchesi, J.R. and Dobson, A.D.** (2007). Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges, *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(1), 11-20.
- [29] **Paul, V.J. and Puglisi, M.P.** (2004). Chemical mediation of interactions among marine organisms, *Nat Prod Rep*, 21(1), 189-209.
- [30] **Paul, V.J. and Ritson-Williams, R.** (2008). Marine chemical ecology, *Nat Prod Rep*, 25(4), 662-695.
- [31] **Proksch, P.** (1994). Defensive Roles for Secondary Metabolites from Marine Sponges and Sponge-Feeding Nudibranchs, *Toxicon*, 32(6), 639-655.
- [32] **Pawlik, J.R., McFall, G., and Zea, S.** (2002). Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators?, *J Chem Ecol*, 28(6), 1103-1115.
- [33] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R.** (2010). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 27(2), 165-237.
- [34] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R.** (2011). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 28(2), 196-268.
- [35] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., Prinsep, M. R.** (2012). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 29(2), 144-222.
- [36] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R.** (2013). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 30(2), 237-323.
- [37] **Blunt, J.W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R.** (2014). Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 31(2): p. 160-258.
- [38] **Mayer, A.M.S., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., McIntosh, J. M., Newman, D. J., Potts, B. C., Shuster, D. E.** (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective, *Trends Pharmacol Sci*, 31(6), 255-265.
- [39] **Wang, G.Y.** (2006). Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33(7), 545-551.
- [40] **Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B. S.** (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans, *Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4431-4440.
- [41] **Bewley, C.A., Holland, N.D. and Faulkner D.J.** (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts, *Experientia*, 52(7), 716-722.
- [42] **Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., Matsunaga, S.** (2004). Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(46), 16222-16227.

- [43] Piel, J., Butzke, D., Fusetani, N., Hui, D., Platzer, M., Wen, G., Matsunaga, S. (2005). Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the pederin family, *J Nat Prod*, **68**(3), 472-479.
- [44] Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J Nat Prod*, **70**(3), 461-477.
- [45] Rateb, M.E. and Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats, *Nat Prod Rep*, **28**(2), 290-344.
- [46] Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **41**(2), 185-201.
- [47] DeLong, E.F. (2007). Modern microbial seascapes, *Forward. Nat Rev Microbiol*, **5**(10), 755-757.
- [48] Lopes, F.C., Tichota, D. M., Pereira, J. Q., Segalin, J., Rios Ade, O., Brandelli, A. (2013). Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative, *Appl Biochem Biotechnol*, **171**(3), 616-625.
- [49] Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B., Miele, M. (2006). In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *BMC Biotechnology*, **6**(45), 1-11.
- [50] Almeida, C., El Maddah, F., Kehraus, S., Schnakenburg, G., Konig, G. M. (2016). Endolides A and B, Vasopressin and Serotonin-Receptor Interacting N-Methylated Peptides from the Sponge-Derived Fungus *Stachylidium* sp. *Org Lett*, **18**(3), 528-531.
- [51] Zhou, Y.M., Debbab, A., Mandi, A., Wray, V., Schulz, B., Muller, W. E. G., Kassack, M., Lin, W. H., Kurtan, T., Proksch, P., Aly, A. H. (2013). Alkaloids from the Sponge-Associated Fungus *Aspergillus* sp., *European J Org Chem*, **5**, 894-906.
- [52] Cohen, E., Koch, L., Thu, K. M., Rahamim, Y., Aluma, Y., Ilan, M., Yarden, O., Carmeli, S. (2011). Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp collected along the coast of Israel, *Bioorg Med Chem*, **19**(22), 6587-6593.
- [53] Androulidakis, Y.S., Kombiadou, K. D., Makris, C. V., Baltikas, V. N., Krestenitis, Y.N. (2015). Storm surges in the Mediterranean Sea: Variability and trends under future climatic conditions, *Dynam. Atmos. Ocean*, **71**, 56-82.
- [54] Kalkan, S. ve Altug, G. (2015). Bio-indicator bacteria & environmental variables of the coastal zones: The example of the Gulluk Bay, Aegean Sea, Turkey, *Mar. Pollut. Bull.*, **95**(1), 380-384.
- [55] Koukousioura, O., Dimiza, M. D., Triantaphyllou, M. V., Hallock, P. (2011). Living benthic foraminifera as an environmental proxy in coastal

ecosystems: A case study from the Aegean Sea (Greece, NE Mediterranean), *J. Mar. Syst.*, 88(4), 489-501.

- [56] Wiese, J., Ohlendorf, B., Blumel, M., Schmaljohann, R., Imhoff, J. F. (2011). Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites, *Mar. Drugs*, 9(4), 561-585.
- [57] Deepika, V.B., Murali, T.S. and Satyamoorthy, K. (2016). Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review, *Microbiol Res*, 182, 125-140.
- [58] Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., Proksch, P. (2010). Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products, *Nat. Prot.*, 5(3), 479-490.
- [59] Abildgren, M.P., Lund, F., Thrane, U., Elmholt, S. (1987). Czapek-Dox Agar Containing Iprodione and Dicloran as a Selective Medium for the Isolation of *Fusarium* Species, *Lett Appl Microbiol*, 5(4), 83-86.
- [60] Gao, S.S., Li, X. M., Williams, K., Proksch, P., Ji, N. Y., Wang, B. G. (2016). Rhizovarins A-F, Indole-Diterpenes from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Mucor irregularis* QEN-189, *J Nat Prod*, 2016. 79(8), 2066-2074.
- [61] Ola, A.R.B., Thomy, D., Lai, D., Brotz-Oesterhelt, H., Proksch, P. (2013). Inducing Secondary Metabolite Production by the Endophytic Fungus *Fusarium tricinctum* through Coculture with *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod*, 76(11), 2094-2099.
- [62] Koeth, L.M., DiFranco-Fisher, J.M. and McCurdy, S. (2015). A Reference Broth Microdilution Method for Dalbavancin In Vitro Susceptibility Testing of Bacteria that Grow Aerobically, *J Vis Exp*, 9(103).
- [63] Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res*, 1987. 47(4), 936-942.
- [64] Zeng, Y.B., Wang, H., Kamdem, R. S. T., Orfali, R. S., Dai, H. F., Makhloufi, G., Janiak, C., Liu, Z., Proksch, P. (2016). A new cyclohexapeptide, penitropeptide and a new polyketide, penitropone from the endophytic fungus *Penicillium tropicum*, *Tetrahedron Lett*, 57(27-28), 2998-3001.
- [65] Du, L., Li, D. H., Zhu, T. J., Cai, S. X., Wang, F. P., Xiao, X., Gu, Q. Q. (2009). New alkaloids and diterpenes from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp., *Tetrahedron*, 65(5), 1033-1039.
- [66] Li, J., Wang, J., Jiang, C. S., Li, G., Guo, Y. W. (2014). 1)- Cyclophenol, a new naturally occurring 7-membered 2,5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum* endogenous with the Chinese

mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*, J Asian Nat Prod Res, 16(5), 542-548.

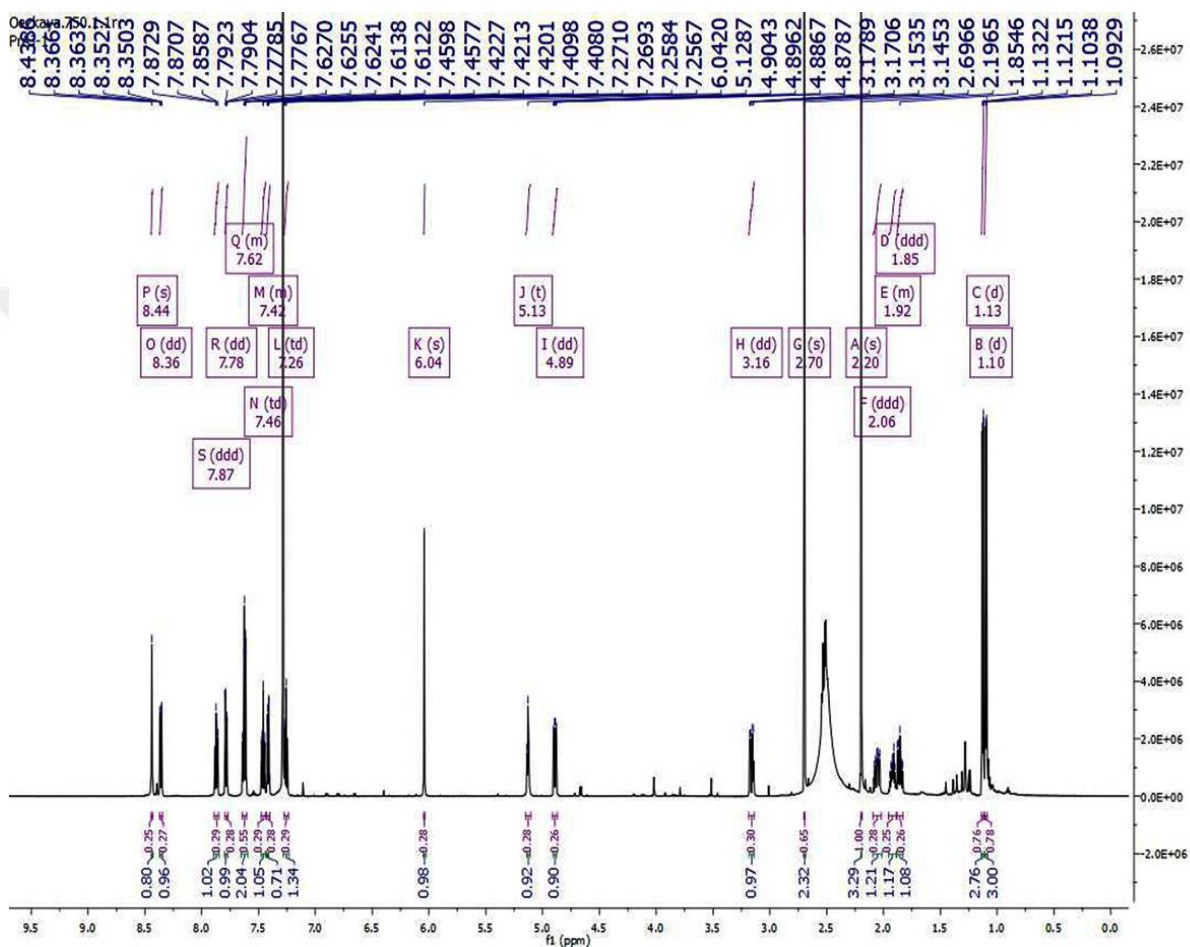
- [67] Kobayashi, Y. ve Harayama, T. (2009). A Concise and Versatile Synthesis of Viridicatin Alkaloids from Cyanoacetanilides, Org. Lett., 11(7), 1603-1606.
- [68] Luo, S.P., Peng, Q. L., Xu, C. P., Wang, A. E., Huang, P. Q. (2014). Bio-inspired Step-Economical, Redox-Economical and Protecting-Group-Free Enantioselective Total Syntheses of (-)-Chaetominine and Analogues, Chin. J. Chem., 32(8), 757-770.
- [69] An, C.Y., Li, X. M., Li, C. S., Wang, M. H., Xu, G. M., Wang, B. G. (2013). Aniquinazolines A-D, Four New Quinazolinone Alkaloids from Marine-Derived Endophytic Fungus *Aspergillus nidulans*, Mar. Drugs, 11(7), 2682-2694.
- [70] Hamasaki, T., Hatsuda, Y., Terashima, N., Renbutsu, M. (1965). The Structure of a New Metabolite of *Aspergillus versicolor*. Agricultural and Biological Chemistry, 29(7), 696 - 697.
- [71] Zhu, F., Un, Y.C. and Zhou, S.N. (2004). Anthraquinone Derivates Isolated From Marine Fungus #2526 From The South China Sea, Chinese Journal of Organic Chemistry, 24(9), 1114-1117.
- [72] Shao, C.L., Wang, C. Y., Wei, M. Y., Li, S. D., She, Z. G., Gu, Y. C., Lin, Y. C. (2008). Structural and spectral assignments of six anthraquinone derivatives from the mangrove fungus (ZSUH-36), Magn. Reson. Chem., 46(9), 886-889.
- [73] Liu, K., Zheng, Y. K., Miao, C. P., Xiong, Z. J., Xu, L. H., Guan, H. L., Yang, Y. B., Zhao, L. X. (2014). The antifungal metabolites obtained from the rhizospheric *Aspergillus* sp YIM PH30001 against pathogenic fungi of *Panax notoginseng*, Nat Prod Res, 28(24), 2334-2337.
- [74] Watanabe, C.M.H., Wilson, D., Linz, J. E., Townsend, C. A. (1996), Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type I fatty acid synthases and a polyketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin B-1, Chem. Biol, 3(6), 463-469.
- [75] Tian, Y.-Q., Lin, X.-P., Wang, Z., Zhou, X.-F. , Qin, X.-C., Kaliyaperumal, K., Zhang, T.-Y., Tu, Z.-C., Liu, Y. (2016). Asteltoxins with Antiviral Activities from the Marine Sponge-Derived Fungus *Aspergillus* sp. SCSIO XWS02F4, Mar Drugs, 21(34), 1 - 10.
- [76] You, M., Liao, L., Hong, S. H., Park, W., Kwon, D. I., Lee, J., Noh, M., Oh, D. C., Oh, K. B., Shin, J. (2015). Lumazine peptides from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus*, Mar Drugs, 13(3), 1290-1303.

- [77] Cai, S., Zhu, T., Du, L., Zhao, B., Li, D., Gu, Q. (2011). Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor*, *J Antibiot (Tokyo)*, 64(2), 193-196.
- [78] Zhu, F. ve Lin, Y.C. (2007). Three xanthenes from a marine-derived mangrove endophytic fungus, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2), 132-135.
- [79] Sun, T.Y., Kuang, R. Q., Chen, G. D., Qin, S. Y., Wang, C. X., Hu, D., Wu, B., Liu, X. Z., Yao, X. S., Gao, H. (2016). Three Pairs of New Isopentenyl Dibenzo[b,e]oxepinone Enantiomers from *Talaromyces flavus*, a Wetland Soil-Derived Fungus, *Molecules*, 21(9).
- [80] Ren, H. ve Liu, W.W. (2011). Nidurufin as a new cell cycle inhibitor from marine-derived fungus *Penicillium flavidorsum* SHK1-27, *Arch Pharm Res*, 34(6), 901-905.
- [81] Cragg, G.M. ve Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochim Biophys Acta*, 1830(6), 3670-3695.
- [82] Simon, C. ve Daniel, R. (2011). Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Appl Environ Microbiol*, 77(4), 1153-1161.
- [83] Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I. B., Verneuil, B., Urdaci, M. C. (2002). Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res Microbiol*, 153(5), 269-276.
- [84] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Cordani, J. J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R. A., Denzot, F., Devine, K. M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S. Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M. F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S. M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S. H., Parro, V., Pohl, T. M., Portelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Serror, P.,

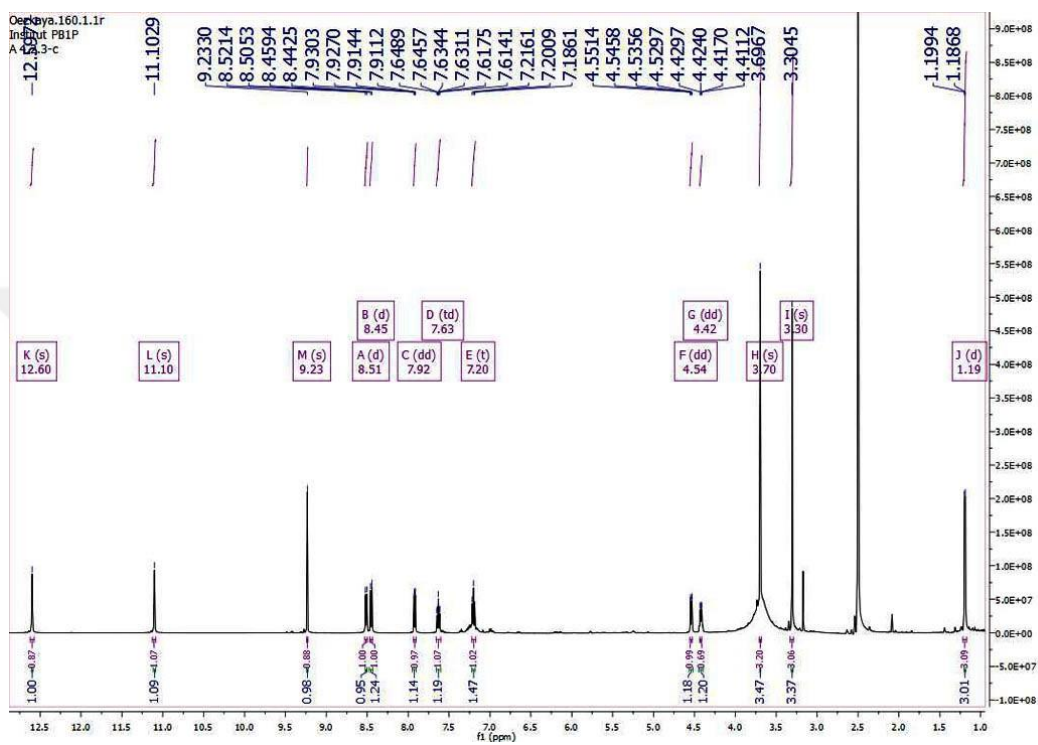
Shin, B. S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Togoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandebol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H. F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, 390(6657), 249-256.

- [85] **Ebrahim, W., El-Neketi, M., Lewald, L. I., Orfali, R. S., Lin, W., Rehberg, N., Kalscheuer, R., Daletos, G., Proksch, P. (2016).** Metabolites from the Fungal Endophyte *Aspergillus austroafricanus* in Axenic Culture and in Fungal-Bacterial Mixed Cultures, *J Nat Prod*, 79(4), 914-22.
- [86] **NagarAnthal, K.R., Worrell, V. E., Teal, R., Nagle, D. P. (1996).** The pterin lumazine inhibits growth of methanogens and methane formation, *Arch. Microbiol.*, 166(2), 136-140.
- [87] **Cottam, H.B., Shih, H. C., Tehrani, L. R., Wasson, D. B., Carson, D. A. (1996).** Substituted xanthines, pteridinediones, and related compounds as potential antiinflammatory agents. Synthesis and biological evaluation of inhibitors of tumor necrosis factor alpha, *J. Med. Chem.*, 39(1), 2-9.

EK A: Aniquinazoline E ¹H Spektrumu (600 MHz, CDCl₃)



EK B: Terrelumamide C ¹H Spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



EK C: CD



ÖZGEÇMİŞ

FERHAT CAN ÖZKAYA

Yüksek Biyokimyager

Su Ürünleri Ana Bilim Dalı Doktora Öğrencisi

İLETİŞİM

Arap Hasan Mah. 263. Sok. No.5 Da.9

Hatay/İzmir

Tel: +90 (232) 243 08 07

GSM: +90 (543) 222 37 46

E-mail: fcanozkaya@gmail.com

EĞİTİM

2009 – 2012 Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi İzmir-Türkiye

2003 – 2008 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyoteknoloji Opsiyonu Lisans

Ege Üniversitesi İzmir-Türkiye

1996 – 2003 Safranbolu Anadolu Lisesi

Karabük-Türkiye