

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***RHIZOPUS ORYZAE* MANTARI ÜZERİNE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Amine Dilara PİLEVNELİ

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 114S916 numaralı 2525 TÜBİTAK-BMBF projesi ve BAP'ın 20L0237003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Rhizopus oryzae* Mantarı Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Amine Dilara PİLEVNELİ

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalında Amine Dilara PİLEVNELİ tarafından hazırlanan “*Rhizopus oryzae* Mantarı Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/retedilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.02.2021

Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM
Raportör

Prof. Dr. M. Levent ALTUN
Üye

Prof. Dr. Osman ÜSTÜN
Üye

Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Doğal Etken Maddelerin Eldesi ve Değerlendirilmesi	2
1.2. Deniz ve Deniz Kaynaklı Bileşikler	10
1.3. Deniz Kaynaklı Bileşiklerin Farmakolojik Etkileri	18
1.3.1. Antioksidan Aktivite	18
1.3.2. Antikanser Aktivite	19
1.3.3. Antiviral Aktivite	21
1.3.4. Antibakteriyel Aktivite	23
1.3.5. Antikoagülan Aktivite	25
1.3.6. Analjezik Aktivite	26
1.3.7. Antilipidemik Aktivite	27
1.3.8. Nöroprotektif Aktivite	27
1.4. Deniz Kaynaklı İlaç Keşfinin Zorlukları	28
1.4.1. Tedarik Sorunu	28
1.4.2. Su ürünleri yetiştiriciliği / kültüre alma	29
1.4.3. Genetik mühendislik	29
1.4.4. Sentez / yarı sentez / modifikasyon	30
1.5. Deniz Kaynaklı Mantarlar	30
1.5.1.Mangrov Mantarları	34
1.5.2. Deniz Kaynaklı Mantarlardan İzole Edilen Bileşikler	35
	iv

1.6. <i>Rhizopus oryzae</i>	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	43
2.1. Materyal	43
2.1.1. <i>Rhizopus oryzae</i>	43
2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar	43
2.2.1. Kullanılan Kimyasallar	43
2.2.2. Çözücüler	44
2.2.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	45
2.3. Metot	46
2.3.1. Mantar İzolasyonu ve Saflaştırma	46
2.3.1.1. Kullanılan Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanışı	46
2.3.1.2. Mantar İzolasyonu	46
2.3.1.3. Mantarların Saflaştırılması	48
2.3.1.4. Uzun Süreli Saklama	48
2.3.1.5. Mantarın Tür Teşhisi	48
2.3.1.6. Küçük Ölçekte Mantar Ekimi	49
2.3.1.7. Büyük Ölçekte Mantar Ekimi	50
2.3.2. Ekstraksiyon	50
2.3.3. İzolasyon	51
2.3.3.1. Kromatografik Yöntemler	51
2.3.3.1.1. Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK)	51
2.3.3.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	53
2.3.3.1.3. Kolon Kromatografisi	54
2.3.3.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	55
2.3.3.2. Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) Spektrometrisi	57
2.3.4. Biyoaktivite Çalışmaları	57
2.3.4.1. Antioksidan aktivite	57
2.3.4.1.1. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini	57
2.3.4.1.2. Alkalın DMSO yöntemiyle Süperoksit radikal süpürücü aktivitesinin tayini (SO)	58

2.3.4.1.4. ABTS Radikali süpürücü aktivitesinin tayini	59
2.3.4.2. Antimikrobiyal Aktivite	59
2.3.4.3. Sitotoksite aktivitesi (MTT testi)	60
3. BULGULAR	62
3.1. Mantarın ham ekstresinin YPSK Analiz Sonucu	62
3.2. Biyoaktivite Sonuçları	62
3.3. <i>Rhizopus oryzae</i> mantarından elde edilen sekonder metabolitler	65
3.3.1. Penicacid K (Penik asit K-DL4)	65
3.3.2. Penicacid J (Penik asit J-D1)	74
3.3.3. Penicacid H (Penik asit H-NS2)	86
3.3.4. Penicacid I (Penik asit I-D2)	96
3.3.5. Dianhydroaurasperone C (Dianhidroaurasperon C- H:E 4:6 S8 P2)	105
3.3.6. Asperpyrone A (Asperpiron A -H:E 4:6 S8 P1)	116
3.3.7. α , β -Soforoz (Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1)	121
3.3.8. α , β - Sellobiyoz (Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2)	126
4. TARTIŞMA	131
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	135
ÖZET	138
SUMMARY	140
KAYNAKLAR	142
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖNSÖZ

“*Rhizopus oryzae* Mantarı Üzerine Farmakognozik Araştırmalar” başlıklı bu doktora tezi çalışması Türkiye’de bu deniz kaynaklı mantar üzerinde yapılan ilk farmakognozi çalışmasıdır. Yaptığımız literatür çalışmalarına göre bu mantarla yapılan çalışmalar oldukça az olup sekonder metabolit ve biyoaktivite konusunda hiçbir kayıt yoktur. Ülkemiz için çok yeni bir konu olan deniz kaynaklı metabolitlerin araştırılması konusunda doktora yapmak ve yeni bilgiler elde etme olasılığı beni çok heyecanlandırdı. Çalışmamız sonucu izole edip yapısını tayin ettiğimiz metabolitlerden dört tanesinin yeni olması da bu heyecanımın ve çalışmalarımın güzel sonucu oldu.

Bu uzun ve zorlu çalışma sürecimde beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen kişilere değinmek istiyorum.

Deniz kaynaklı mantarlarla çalışma konusunda beni yönlendiren, deneysel çalışmalarım ve tez yazım sürecinde derin bilgisini ve tecrübesini esirgemeyerek sonsuz desteğini hep hissettiğim, çalışkanlığı, özgünlüğü, hayata bakış açısı ve vizyonu ile bana çok şey katan danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL’e

Birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım, çok şey öğrendiğim, paylaştığım çalışkan doktora yoldaşlarım sevgili İbrahim Seyda URAS ve Zehra TORUN’a,

İzole edilen metabolitlerin yapı tayinleri için NMR sonuçlarının yorumlanmasına yardım eden Dr. Sherif Saeed Ebada Elsayed’e

Bize kaynak sağlayan Dr. Bülent Gözcelioğlu’na,

Yardımları için Muhiddin Çergel’e

Çalışmalarımızı yapabilmemiz için bize destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü (BAP- 20L0237003 numaralı) ve TÜBİTAK-BMBF’e (114S916 numaralı) teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Ve,

En büyük manevi destekçim olan aileme sonsuz teşekkürler.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat)
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikril-Hidrazil
DMSO	Dimetil sülfoksit
HTS	High throughput screening
IC ₅₀	%50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	[3-(4,5- dimetiltiazol-2- il)-2,5 difeniltetrazolyumbromür]
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
SDA	Sabouraud Dextrose Agar

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 1981-2010 yılları arasında New Chemical Entities olarak adlandırılan ilaçların dağılımı	6
Şekil 1.2. 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında onay alan ilaç moleküllerinin kaynaklarına göre dağılımı	7
Şekil 1.3. 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında onay alan ilaç moleküllerinin yıllara ve kaynaklarına göre dağılımı	7
Şekil 1.4. Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen bileşiklerin kaynağı	37
Şekil 1.5. Deniz kaynaklı mantarlardan izole yeni edilen bileşik türleri	37
Şekil 1.6. Deniz kaynaklı mantarlardan izole yeni edilen bileşiklerin farmakolojik etkileri	38
Şekil 2.1. İzlenen prosedürün şeması	47
Şekil 2.2. Pirinçli katı besiyerine ekilen ve büyümesi beklenen mantarlar	50
Şekil 2.3. VSK'den elde edilen fraksiyonlar	52
Şekil 2.4. Ham ekstrenin vakum sıvı kromatografisi (VSK) uygulaması	53
Şekil 2.5. Diklorometan: metanol 50:50 fraksiyonunun kolon kromatografisi uygulaması	55
Şekil 3.1. <i>Rhizopus oryzae</i> ham ekstresinin analitik YPSK kromatogramı	62
Şekil 3.2. Diklorometan:Metanol 50:50 Fraksiyon 4'ün YPSK kromatogramı	65
Şekil 3.3. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de Diklorometan:Metanol 50:50 Fraksiyon 4'ün kimyasal profili	66
Şekil 3.4. Saf olarak izole edilen DL4'ün YPSK kromatogramı	67
Şekil 3.5. DL4'ün UV spektrumu	67
Şekil 3.6. DL4 ¹³ C-NMR spektrumu	68

Şekil 3.7. DL4'ün ^1H -NMR spektrumu	69
Şekil 3.8. DL4'ün ^1H - ^1H COSY spektrumu	70
Şekil 3.9. DL4'ün kimyasal formülü	73
Şekil 3.10. DL4'ün LCMS-TOF analiz sonuçları	73
Şekil 3.11. DCM Fr1'in YPSK kromatogramı	75
Şekil 3.12. DCM Fr1'in Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK analizi	75
Şekil 3.13. Saf olarak izole edilen D1'in YPSK kromatogramı	76
Şekil 3.14. D1'in UV spektrumu	77
Şekil 3.15. D1'in ^1H -NMR spektrumu	76
Şekil 3.16. D1'in ^{13}C -NMR sonucu	79
Şekil 3.17. D1'in ^1H - ^1H COSY spektrumu	80
Şekil 3.18. D1'in gHMBC spektrumu	81
Şekil 3.19. D1'in gHMQC spektrumu	82
Şekil 3.20. D1'in kimyasal formülü	85
Şekil 3.21. D1'in LCMS-TOF analiz sonucu	85
Şekil 3.22. Saf olarak elde edilmiş NS2'nin YPSK kromatogramı	87
Şekil 3.23. NS2'nin UV spektrumu	87
Şekil 3.24. NS2'nin ^1H -NMR spektrumu	88
Şekil 3.25. NS2'nin ^{13}C -NMR spektrumu	89
Şekil 3.26. NS2'nin ^1H - ^1H COSY spektrumu	90
Şekil 3.27. NS2'nin gHMBC spektrumu	91
Şekil 3.28. NS2'nin gHMQC spektrumu	92

Şekil 3.29. NS2'nin LCMS-TOF analiz sonucu	95
Şekil 3.30. NS2'nin kimyasal formülü	95
Şekil 3.31. Saf olarak elde edilen D2'nin YPSK kromatogramı	96
Şekil 3.32. D2'nin UV spektrumu	97
Şekil 3.33. D2'nin ¹ H-NMR spektrumu	97
Şekil 3.34. D2'nin ¹³ C-NMR sonucu	98
Şekil 3.35. D2'nin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	99
Şekil 3.36. D2'nin gHMBC spektrumu	100
Şekil 3.37. D2'nin gHMQC spektrumu	101
Şekil 3.38. D2'nin LCMS-TOF analiz sonucu	104
Şekil 3.39. D2'nin kimyasal formülü	105
Şekil 3.40. Hekzan:Etilasetat 40:60 S8 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	106
Şekil 3.41. Hekzan:Etilasetat 40:60 S8 fraksiyonunun semipreparatif YPSK analizi	106
Şekil 3.42. Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P2'nin YPSK kromatogramı	107
Şekil 3.43. H:E 4:6 S8 P2'nin UV spektrumu	108
Şekil 3.44. H:E 4:6 S8 P2'nin ¹ H-NMR spektrumu	109
Şekil 3.45. H:E 4:6 S8 P2'nin ¹³ C-NMR sonucu	110
Şekil 3.46. H:E 4:6 S8 P2'nin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	111
Şekil 3.47. H:E 4:6 S8 P2'nin gHMBC spektrumu	112
Şekil 3.48. H:E 4:6 S8 P2'nin gHMQC spektrumu	113

Şekil 3.49. H:E 4:6 S8 P2'nin kimyasal formülü	115
Şekil 3.50. Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P1'in YPSK kromatogramı	116
Şekil 3.51. H:E 4:6 S8 P1'in UV spektrumu	117
Şekil 3.52. H:E 4:6 S8 P1'in ¹ H-NMR spektrumu	117
Şekil 3.53. H:E 4:6 S8 P1'in ¹³ C-NMR spektrumu	118
Şekil 3.54. H:E 4:6 S8 P1'in kimyasal formülü	120
Şekil 3.55. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin YPSK kromatogramı	121
Şekil 3.56. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin semipreparatif YPSK analizi	122
Şekil 3.57. Saf olarak izole edilen Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in YPSK kromatogramı	123
Şekil 3.58. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in UV spektrumu	123
Şekil 3.59. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ¹ H-NMR spektrumu	124
Şekil 3.60. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ¹³ C-NMR spektrumu	124
Şekil 3.61. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in kimyasal formülü	129
Şekil 3.62. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin YPSK kromatogramı	127
Şekil 3.63. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin UV spektrumu	127
Şekil 3.64. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ¹ H-NMR spektrumu	128
Şekil 3.65. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ¹³ C-NMR spektrumu	129
Şekil 3.66. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin kimyasal formülü	130

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 1981 ve 2019 yılları arasında keşfedilen antikanser ilaçlar	8
Çizelge 1.2. 2004-2015 yılları arasında onay alan deniz kaynaklı ürünler	11
Çizelge 1.3. FDA* ve Avustralya** tarafından günümüze kadar onay almış deniz kaynaklı bileşikler	12
Çizelge 1.4. Faz III çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler	14
Çizelge 1.5. Faz II çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler	14
Çizelge 1.6. Faz I çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler	16
Çizelge 1.7. Deniz kaynaklı mantarlardan elde edilen antiviral etkili bileşik örnekleri	23
Çizelge 1.8. Deniz kaynaklı antibakteriyel etki gösteren bileşikler	24
Çizelge 1.9. Alglerden elde edilen antikoagülan etkili sülfatlanmış polisakkaritler	25
Çizelge 1.10. Alzheimer tedavisinde etkili deniz kaynaklı bileşikler	28
Çizelge 1.11. Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen sekonder metabolitler	36
Çizelge 2.1. Besiyeri için kullanılan maddeler	46
Çizelge 2.2. Kullanılan katı besiyeri	49
Çizelge 2.3. Elde edilen VSK fraksiyonları ve miktarları	52
Çizelge 2.4. Analitik YPSK'de fraksiyonları ve saf olarak izole edilen maddeleri analiz etmek için kullanılan genel çözücü sistemi ve gradient sistem	56
Çizelge 3.1. <i>Rhizopus oryzae</i> ekstresinin askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırmalı antioksidan aktivite sonuçları	63
Çizelge 3.2. <i>Rhizopus oryzae</i> ekstresinin kamptotesin ile karşılaştırmalı sitotoksik aktivite sonucu	63

Çizelge 3.3. <i>Rhizopus oryzae</i> ekstresinin siprofloksasin ve mikonazol ile karşılaştırmalı antimikrobiyal aktivite sonuçları	64
Çizelge 3.4. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de kullanılan gradient sistem	66
Çizelge 3.5. DL4'ün ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	70
Çizelge 3.6. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de kullanılan gradient sistem	76
Çizelge 3.7. D1'in ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	82
Çizelge 3.8. NS2'nin ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	92
Çizelge 3.9. D2'nin ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	101
Çizelge 3.10. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de kullanılan gradient sistem	107
Çizelge 3.11. H:E 4:6 S8 P2'nin ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	113
Çizelge 3.12. H:E 4:6 S8 P1'in ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	118
Çizelge 3.13. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de kullanılan gradient sistem	122
Çizelge 3.14. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	125
Çizelge 3.15. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ¹ H ve ¹³ C NMR dataları	129

1.GİRİŞ

Yirminci yüzyılın en büyük başarılarından biri modern ilaçların geliştirilmesidir. Bu ilaçların 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkmasıyla birlikte, penisilin, streptomisin ve vinkristin gibi ilaçlarla, pek çok hastalığının tedavisinde önemli başarılar elde edilmiştir. Yeni ilaç tedavileriyle birlikte insan ömrünü uzamış ve yaşam kalitesi artmıştır. Bu nedenle, insanlar güvenli ve etkili farmasötik ürünlerin varlığına giderek daha fazla bağımlı hale gelmiştir (Health, 1999).

Özellikle etkili tedavilerin bulunmadığı çeşitli hastalıklar için yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok kanser türü, viral ve fungal enfeksiyonlar, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar başarıyla tedavi edilememektedir. Patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere ve kanser hücrelerinin antitümör ilaçlara karşı direnç geliştirmesi de yeni ilaç arayışlarına yol açmaktadır. Sıtma ve tüberküloza neden olan patojenler, mevcut ilaçların çoğuna karşı direnç geliştirmiştir. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için yoğun çalışma ve bu alana yatırım gerekmektedir (Health, 1999).

Doğa, yeni ilaçların geleneksel kaynağı olmuştur ve uzun zamandır en başarılı strateji olarak kabul edilmektedir. Keşfedilmemiş bileşikler açısından çok geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu bileşiklerin taklit edilmesi neredeyse imkansızdır. Bugün, piyasada bulunan ilaçların % 50'den fazlası doğal kaynaklardan ekstre edilir veya başlangıç materyali olarak kullanılarak yarı sentez yoluyla üretilir. İnsanlar çeşitli kaynaklardan, özellikle bitkilerden izole edilen doğal ürünleri uzun zamandır hastalıklarının tedavisinde kullanmaktadır (Gurnani ve ark., 2014). Eski çağlardan beri toplumlar enfeksiyon, iltihaplanma, ağrı ve diğer çeşitli hastalıkların tedavisinde genellikle bitkilerden elde ettikleri doğal ilaçlar olan ham ekstreleri kullanmışlardır. Bugün bile, dünyanın birçok yerinde, doğal ilaçlar mevcut olan tek tedavidir. Bu

doğal etnobotanik preparatların araştırılması, mevcut ilaç endüstrisinin temelini oluşturan bileşiklerin izolasyonuna yol açmıştır (Health, 1999).

Elde edilen ilk başarılarla, kimyasal çeşitliğe ve spesifik hedefli olmalarına rağmen birçok ilaç şirketi tarafından kombinatorial kimya ve genomik temelli yaklaşımlar öne çıkmıştır (Gurnani ve ark., 2014).

Çalışmamızın amacı deniz kaynaklı bir mantar olan *Rhizopus oryzae*'dan sekonder metabolit/metabolitler izole etmek ve yeterli miktarda elde edilen metabolitleri ve ham ekstreyi biyoaktivite açısından değerlendirmektir. Yapılan literatür taramaları sonucunda deniz kaynaklı *R. oryzae* mantarı üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, sekonder metabolit izolasyonu ve biyoaktivite üzerine hiçbir çalışma olmadığı için bu deniz mantarı tez konusu olarak seçilmiştir. Ülkemizde bu konuda çalışan ilk ve tek grup olmamız nedeniyle ülkemiz için yeni olan bu alanda yapılan ilk doktora tezidir. Tez çalışmasının sonucunda elde edilen bilgiler bilim dünyasına sunularak ülkemizin bu alanda uluslararası bilim dünyasında yer edinmesine katkı sağlayacaktır.

1.1. Doğal Etken Maddelerin Eldesi ve Değerlendirilmesi

Tıbbın ortaya çıkışından bu yana, bitkilerden elde edilen bileşikler tedavide kullanılmaktadır. En eski kayıtlar M.Ö. 2600 yılına ait kil tabletlere çivi yazısıyla yazılmış ve Mezopotamya'da bulunmaktadır. Bu kayıtlar, o zamana kadar, 1000'e yakın bitkiden elde edilen çeşitli ilaçların var olduğunu göstermektedir. Bu ilaçların birçoğu hala inflamasyon, grip, öksürük ve parazit tedavisi için kullanılmaktadır. Mısırlıların M.Ö 1500 yıllarında çeşitli bitkileri kullandıklarına dair belgeler bulunmuştur. Bu belgelerin en bilineni, çoğu bitki bazlı ilaç olan yaklaşık 1000 farklı madde ve formülasyonu belgeleyen “Ebers Papirüs”üdür. Çin kaynaklı “Materia

Medica” (MÖ 1100), “Shennong Herbal” (~ MÖ 100, 365 ilaç) ve “Tang Herbal” (MS 659, 850 ilaç) doğal kaynaklı ilaçların kullanımlarını gösteren önemli belgelerdir (Gurnani ve ark., 2014).

Bilimsel olarak bu bitkisel ilaç ham maddelerini izole etmek, saflaştırmak ve tanımlama yapabilmek on yedinci yüzyıla kadar sürmüştür. İzole edilen ilk saf ilaçlar arasında afyondan edilen güçlü ağrı kesici morfin ve söğüt ağacının kabuğundan elde edilen aspirin bulunmaktadır. Günümüzde hala özellikle Asya'da, geleneksel ilaçlar tarihi kullanımlarına benzer şekillerde reçete edilmektedir.

Binlerce bitki türü modern analitik yöntemler kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiş olmasına rağmen, hala araştırmayı bekleyen binlerce karasal canlı bulunmaktadır. Pasifik porsuk ağacının kabuğundan güçlü antikanser etkili bileşik taksol, *Podophyllum* türlerinin rizomlarından elde edilen podofilotoksin, *Catarantus roseus* bitkisinin toprak üstü kısımlarından vinka alkaloidlerinin keşfedilmesi, doğanın hala araştırılması gerektiğini göstermektedir (Sak ve Kasemaa, 2016)

Doğal ürünlerden ilaç keşfi çok uzun, zahmetli bir süreçtir ve iki yaklaşım içerir. Birincisi kimyasal (saflaştırılmış bileşiklerin biyolojik aktivitelerini bulmak) ve ikincisi biyolojik temelli (ham ekstrelerle başlayan biyo-assay güdümlü yaklaşım) veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde de olabilmektedir. Günümüzde akademik temelli araştırmaların çoğu biyolojik temellidir, yani araştırmanın amacı biyolojik aktiviteye sahip doğal ürünleri keşfetmeye yönelmiştir. Kimyasal temelli proses aşağıdaki adımların uygulanması şeklindedir:

- Doğal materyalin tanımlanması
- Ham ekstrenin ön taraması
- Çeşitli sekonder metabolitlerin izolasyonu

- Gelişmiş YPSK, yüksek çözünürlüklü 2D-NMR ve diğer spektroskopik yöntemlerle yapılarının aydınlatılması
- İzole edilen her bir molekülün biyolojik aktivitesinin (*in vitro* ve *in vivo*) değerlendirilmesi
- Farmakolojik olarak aktif moleküller için toksisite, kararlılık ve çözünürlük çalışmaları, farmakokinetik ve mekanizma çalışmaları gibi klinik öncesi çalışmalar
- Mevcut moleküllerden daha aktif olanların, ekonomik ve kolay şekilde izolasyonu için süreç geliştirilmesi
- Son aşama, aday molekülün çeşitli insan gönüllüleri üzerindeki güvenliği ve etkinliği açısından test edildiği klinik çalışmalardır (Gurnani ve ark., 2014).

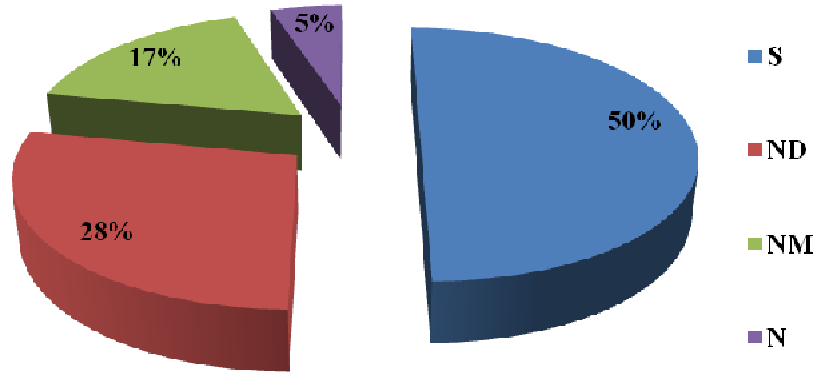
Klinik öncesi ve klinik çalışmalarla birlikte yeni ilaç adayının piyasaya çıkma süresi oldukça uzun yıllar sürmektedir. Çoğu durumda, ilaç olarak kullanılan doğal ürünler ayurveda bitkisel formülasyonlarının çoğu gibi aktif ekstrelerle (bir bileşikler karışımı içerir) sınırlı kalmaktadır. Bunun nedeni zayıf biyoyararlanım göstermeleri ve yüksek maliyetleridir (Gurnani ve ark., 2014). Doğal etken maddelerden ilaç eldesinde sarfedilen tüm çabalara rağmen henüz istenilen düzeye gelinememiştir.

1981-2010 arasında New Chemical Entities (NCE) olarak adlandırılan 1355 bileşik arasından sadece 387 (% 29) tanesi tamamen sentetiktir, diğerleri doğal, yarı sentetik, doğal ürün türevleri veya doğal ürün farmakoforlarına dayanan sentetik bileşiklerdir. Bu başarıya rağmen özellikle büyük ilaç firmaları 1990'larda ve 2000'lerin başında doğal ürün keşif araştırmalarını azaltmıştır (Gurnani ve ark., 2014). Bu düşüş için çeşitli nedenler gösterilmiştir:

- Yüksek verimli tarama (HTS- high throughput screening) programları, kütüphanelerin biyoaktivite için test edilme hızını artırdığından doğal ürün programı, başarılı HTS için artan talebi karşılayamamıştır.

- Kombinatorial kimyanın, yüksek verimli tarama ile kimyasal çeşitliliğe sahip büyük “ilaç benzeri” kimyasal bileşik verileri oluşturulması açısından daha iyi bir yaklaşım olduğu düşünülmüş ve desteklenmiştir.
- Moleküler biyoloji, hücre biyoloji ve genomikteki ilerlemeler, moleküler hedeflerin sayısını arttırmış ve ilaç keşif zamanının kısalacağı öngörülmüştür.
- Büyük ilaç şirketlerinin, doğal ürünlerin geleneksel etki alanı olan enfeksiyon hastalıklarının tedavisine olan ilginin azalması.
- 1992 biyolojik çeşitlilik hakkındaki Rio Kongresi sonucunda biyolojik materyallerin toplanmasına ilişkin olası belirsizlikler, canlı organizmaların bileşimlerine mevsimsel veya çevresel etkiler, ormanların azalması, çevre kirliliği ve küresel ısınma nedeniyle oluşan kaynak kaybı.
- Genellikle çok az miktarda biyoaktif bileşiğin biyo-genetik materyalinin ilk kompleks karışımından izolasyonu. Yetersiz izolasyon nedeniyle HTS ile tespitin gerçekleştirilememesi, hatta bazı durumlarda esas bileşiğin karışımda kararsız halde bulunması.
- İki bileşiğin ayrılmasına bağlı azalan veya kaybolan sinerjistik veya antagonistik aktivite.
- Doğal kaynakların taranmasının sıkı çalışma gerektiren, uzun bir süreç olması (Gurnani ve ark., 2014).

Doğal ürünlerden ilaçların keşfi doğal kaynaklarda bulunan bileşenlerin farmakolojik aktivitelerini verimli bir şekilde taramak ve değerlendirmek mümkün olmuştur (Gurnani ve ark., 2014).



Şekil 1.1. 1981-2010 yılları arasında New Chemical Entities olarak adlandırılan ilaçların dağılımı (Gurnani ve ark., 2014)

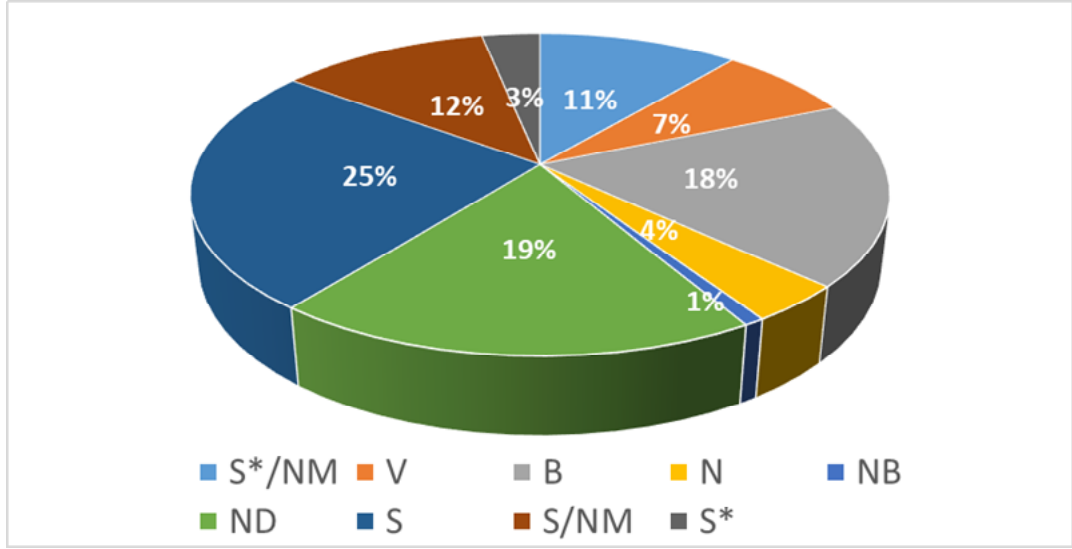
"N": Doğal ürün

"ND": Doğal ürün türevi

"S": Sentetik ilaç

"NM": Doğal ürünle aynı etkileri oluşturan sentetik bileşikler, örneğin kompetitif inhibitör etkili bileşikler

2020 yılında yayınlanan bir araştırmaya göre 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında çeşitli endikasyonlarda doğal kaynaklı 71, botanik kaynaklı 14, doğal kaynaklı bileşiklerden genellikle yarı sentetik modifikasyonla elde edilmiş 356 yeni ilaç molekülü keşfedilmiştir (David J. Newman ve Cragg, 2020).



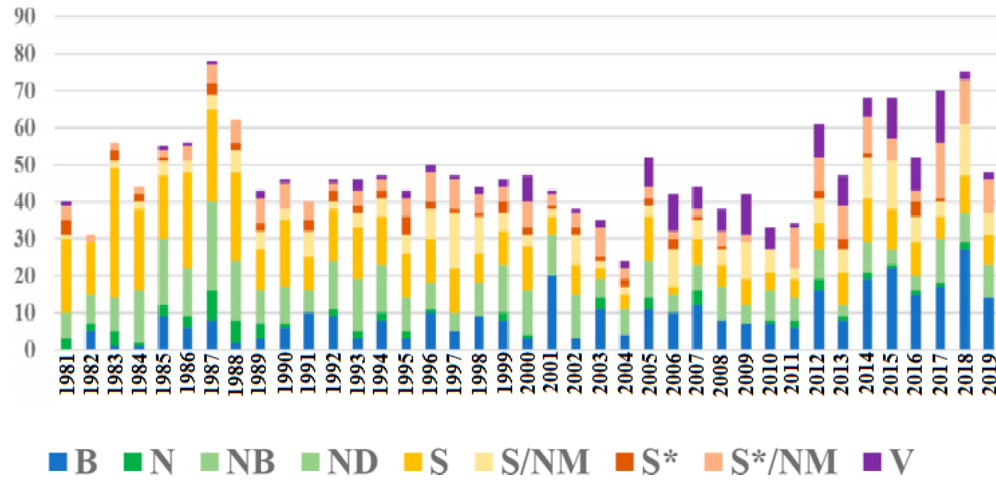
Şekil 1.2. 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında onay alan ilaç moleküllerinin kaynaklarına göre dağılımı (David J. Newman ve Cragg, 2020)

"B": Biyoteknolojik yollarla üretilmiş büyük bir peptit veya protein

"NB": Botanik doğal ürünler (genel olarak bunlar yakın zamanda onaylanmıştır)

"S*": Total sentezle yapılmıştır, farmakofor doğal kaynaklı üründür.

"V": Aşı



Şekil 1.3. 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında onay alan ilaç moleküllerinin yıllara ve kaynaklarına göre dağılımı (David J. Newman ve Cragg, 2020)

Şekil 1.1 ve Şekil 1.2 grafikleri karşılaştırılarak 9 yıl içinde oluşan fark anlaşılmaktadır. Şekil 1.3'te ise 01/1981 ve 09/2019 tarihleri arasında onay alan ilaç moleküllerinin yıllara ve kaynaklarına göre dağılımı gösterilmiştir.

En çok araştırılan ve ilaç geliştirme çalışmaları yapılan hastalıklardan olan kanser tedavisinde etkili doğal kaynaklı bileşikler Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. 1981 ve 2019 yılları arasında keşfedilen antikanser ilaçlar (David J. Newman ve Cragg, 2020).

Jenerik isim	Ticari isim	Kaynağı
aklarubisin	Aclacin	N
aminolevulinik asit	Levulan	N
anjiyotensin II	Delivert	N
aplidin	Aplidin	N
arglabin	-	N
homoharringtonin	Ceflatonin	N
ingenol mebutat	Picato	N
masoprokol	Actinex	N
paklitaksel	Taxol	N
paklitaksel lipozomal	Lipusu	N
paklitaksel nanopartikülleri	Abraxane	N
paklitaksel nanopartikülleri	Nanoxel	N
paklitaksel nanopartikülleri	Genexol-PM	N
pentostatin	Nipent	N
peplomisin	Pepleo	N
romidepsin	Istodax	N
trabektedin	Yondelis	N
solamargin	Curaderm	NB
abirateron asetat	Zytiga	ND
alitretinin	Panretin	ND
aminolevulinik Me ester	Metvix	ND
amrubicin HCl	Calsed	ND
belotekan HCL	Camtobell	ND
bf-200 ala	Ameluz	ND
brentuksimab vedotin	Adcetris	ND
kabazitaksel	Jevtana	ND
carfilzomib	Kyprolis	ND
cladribin	Leustatin	ND
sitarabin okfosfat	Starsaid	ND
dosetaksel	Taxotere	ND
elliptynyum asetat	Celiptium	ND

Çizelge 1.1. Devam

Jenerik isim	Ticari isim	Kaynağı
epirubisin HCl	Farmorubicin	ND
eribulin	Halaven	ND
etoposid fosfat	Etopophos	ND
eksemestan	Aromasin	ND
formestan	Lentaron	ND
forodesin HCl	Mundesine	ND
fulvestrant	Faslodex	ND
gemtuzumab ozogamisin	Mylotarg	ND
heksil aminolevulinat	Hexvix	ND
idarubisin HCl	Zavedos	ND
inotuzumab ozogamisin	Besponsa	ND
irinotekan HCl	Campto	ND
iksabepilon	Ixempra	ND
midostaurin	Rydapt	ND
mifamurtid	Junovan	ND
miltefosin	Miltex	ND
padeliporfin potasyum	Stakel	ND
pirarubisin	Pinorubicin	ND
polatuzumab vedotin	Polivy	ND
pralatreksat	Folotyn	ND
talaporfin sodyum	Laserphyrin	ND
temsirolimus	Toricel	ND
topotekan HCl	Hycamptin	ND
trastuzumab emtansin	Kadcyla	ND
triptorelin	Decapeptyl	ND
valrubisin	Valstar	ND
vapreotid asetat	Docrised	ND
vinflunin	Javlor	ND
vinorelbin	Navelbine	ND

Newman ve Cragg'in makalesinde sunulan verilerden, ilaç keşfetmek ve geliştirmek için doğal ürünlerin ve/veya sentetik varyasyonlarla yeni yapıların oluşturulmasının oldukça yaygın ve verimli olduğu sonucuna varılmaktadır. Örneğin, 1946'dan 1980'e kadar olan zaman içinde kanser türlerinde etkili olan 75 molekülün 40'ı yani % 53,3'ü doğal ürün veya doğal ürün türevidir. 1981'den 2019'a kadar keşfedilen 185 molekülün 62 tanesi yani % 33,5'i doğal ürün kategorisinde bileşiklerdir. Ancak hala bazı hastalık türleri örneğin, hiperfosfatemi ve üriner

inkontinans tedavisi için doğal kaynaklı hiçbir ilaç keşfedilememiştir (David J. Newman ve Cragg, 2020).

1.2. Deniz ve Deniz Kaynaklı Bileşikler

Bitkilerin biyoaktif doğal ürünler için iyi bir kaynak olduğu kanıtlanmış olsa da, denizler de yeni ve özgün kimyasal yapılar içeren aktif maddeler açısından büyük bir öneme sahiptir. Yaşam koşulları karasal ortamdakilerden farklıdır. Spesifik sekonder metabolitlerin üretimi, deniz canlılarının denizde hayatta kalabilmeleri için önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır. Denizbilimci Profesör William Fenical “1970'lere kadar kimse okyanus hakkında detaylı bilgiye sahip değildi. Bu kadar geniş bir yaşam alanının herkesin dikkatinden kaçması bana oldukça garip geliyor. Ancak bunun bazı nedenleri var. İnsanlar okyanustan korkar; yaşanmaz bir yer olarak görürler” sözüyle ilaç geliştirme çalışmalarında denizlere yönelimin neden daha geç gerçekleştiğini açıklamaktadır. Dünya yüzeyinin %70'inin okyanusla kaplı olduğu göz önüne alındığında, ilaç şirketleri okyanusun benzersiz biyolojik çeşitliliğe sahip olduğunu ve potansiyel ilaç adayları açısından büyük bir kaynak olabileceğini fark etmeye başlamışlardır (Dias ve ark., 2012).

Okyanuslardaki canlı çeşitliliği göz önüne alındığında, ilaç keşfinin okyanusların zengin ekosisteminde başlamış olması gerekirdi. Çeşitliliğin çoğu, okyanusların (kutupsal, ılıman ve tropikal) tüm bölgelerine adapte olmuş makroskopik bitkilerde ve hayvanlardadır. Tür çeşitliliği mercan resiflerinde çok yüksektir ve Hint-Pasifik Okyanusu'nda bazen metrekarede yaklaşık 1.000 tür bulunmaktadır. Bu durum tropikal deniz biyoçeşitliliğinin zirvesidir (National Research Council Committee on Marine Biotechnology: Biomedical Applications of Marine Natural, 2002).

Tarihsel açıdan, en eski deniz ürünü, Fenikeliler tarafından M.Ö. 1600 yıllarında deniz yumuşakçalarından ekstre edilen “Tyrian” isimli mor boyadır. Uzun yıllar boyunca deniz kaynaklı doğal ürünler alanında balık ve alglerden elde edilen metabolitlere odaklanılmıştır. En bilinen örnekler agar ve karagenan gibi deniz biyopolimerleri, balık karaciğer yağından elde edilen A ve D vitaminleri, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleridir. Gerçek deniz kaynaklı ilaç gelişimi, 1950'lerde bir Karayip süngeri olan *Tethya crypta*'dan spongotimidin ve spongouridin keşfi ile başlamıştır (Anjum ve ark., 2016; Bergmann ve Burke, 1955; Bergmann ve Feeney, 1951; D. J. Newman ve Cragg, 2016; Sagar ve ark., 2010). 1940'larda Sardunya yakınlarında Akdeniz'den elde edilen örneklerden izole edilen *Acremonium chrysogenum* mantarı tarafından üretilen Sefalosporin C, sefalosporin antibiyotik sınıfının gelişmesinin başlangıç noktasıdır (König, 1992). Weinheimer ve Spraggins, 1969 yılında bir gorgonian mercanı olan *Plexaura homomalla*'da yüksek prostaglandin içeriği olduğu ile ilgili bir makale yayınlamışlardır (Weinheimer ve Spraggins, 1969). Deniz kaynaklı doğal ürünlere patent alımlarına bakıldığında, 1980'lerin ortalarından bu yana hızlı bir artış görülmektedir (Bongiorni ve Pietra, 1996). Bileşiklerin çoğu deniz omurgasızlarından izole edilmiştir. Fakat deniz mikroorganizmaları zamanla daha fazla dikkat çekmiştir (Lindequist, 2016). 2004-2015 yılları arasında onay alan ürünler Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. 2004-2015 yılları arasında onay alan deniz kaynaklı ürünler (A. Martins ve ark., 2014)

Bileşik İsimleri	Doğal ürünler veya Türevi	Orijinal DÜ/Kaynak Organizma	Şirket /Kurum (Şehir, Eyalet, Ülke)	Terapötik (tedavi edici) Alan	Durum 2004	Durum 2009	Durum 2015
Cytarabin (CytosarU®; Depocyt®)	DÜ Türevi	Spongothymidine/ sünger <i>Cryptotethya crypta</i>	Bedford (Bedford, OH, ABD); Enzon (Piscataway, NJ, ABD)	Kanser	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı	Onaylı
Vidarabin (Vira-A®)	DÜ Türevi	Spongothymidine/ sünger <i>Cryptotethya crypta</i>	Kral Pharma (Tenafly, NJ, ABD)	Antiviral	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı	ABD'de durduruldu

Çizelge 1.2. Devam

Bileşik İsimleri	Doğal ürünler veya Türevi	Orijinal DÜ/Kaynak Organizma	Şirket /Kurum (Şehir, Eyalet, Ülke)	Terapötik (tedavi edici) Alan	Durum 2004	Durum 2009	Durum 2015
Zikonotit (Prialt®)	DÜ	ω-konotoksin deniz salyangozu <i>Conus magus</i>	Elan Corporation, (Dublin, İrlanda)	Nöropatik ağrı	FDA Onaylı	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı
Omega-3 asitli etil esterler (Lovaza®)	DÜ Türevi	Omega-3 yağ asitleri / Balık	GlaxoSmithKline (Brentford, UK)	Hipertrigliseridemi	FDA Onaylı	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı
Trabectedin (Yondelis®)	DÜ	Ekteinassidin 743 / tunikat <i>Ecteinascidia turbinata</i>	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	Faz II / III	EMA Onaylı	EMA Onaylı
Eribulin mesilat (Halaven®)	DÜ Türevi	Halikondrin B / Sünger <i>Halichodria okadai</i>	Eisai (Tokyo, Japonya)	Kanser	Faz I	Faz III	FDA/ EMEA Onaylı
Brentuximab vedotin (SGN-35) (Adcetris®)	DÜ Türevi	Dolastatin 10 / deniz tavaşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetik (Bothell, WA, ABD); Takeda GRDC (Osaka, Japonya)	Kanser	-	Faz II	FDA / EMEA Onaylı
İota-carrageen (Carragelos®)	DÜ	İota-carrageen / Kırmızı alg <i>Eucheuma / Chondrus</i>	Marinomed (Vienna, Austria); Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany)	Antiviral	-	-	(OTC)

Çizelge 1.3. FDA* ve Avustralya tarafından günümüze kadar onay almış deniz kaynaklı bileşikler ("Clinical Pipeline of Marine Pharmacology")**

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep TM (2020)*	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (antibody-drug conjugate)(MM AF)	BCMA (B-cell maturation antigen)	Kanser: Tekrarlayan/ refrakter multiple myelom
Lurbinectedin	Zepzelca TM (2020)*	Tunikat	Alkaloid	RNA Polimeraz II	Kanser: Metastatik Küçük hücreli Akciğer Kanseri
Enfortumab Vedotin-ejfv	PADCEVTM (2019)*	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (MMAE)	Nektin-4	Metastatik ürotelyal kanser
Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	Polivy TM (2019)*	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC (MMAE)	CD76b & mikrotübüller	Kanser:Non-Hodgkin lenfoma, Kronik lenfotik lösemi, Lenfoma, B Hücreli lenfoma, Foliküler

Çizelge 1.3. Devam

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
Plitidepsin**	Aplidin®	Tunikat	Depsipeptid	eEF1A2	Kanser: Multipl Miyelom, Lösemi, Lenfoma
Trabectedin (ET-743)	Yondelis® (2015) *	Tunikat	Alkaloid	Minör DNA oluğu	Kanser: Yumuşak Doku Sarkomu ve Yumurtalık Kanseri
Brentuximab vedotin (SGN-35)	Adcetris® (2011) *	Yumuşakça/ siyanobakteri	ADC(MMAE)	CD30 & mikrotübüller	Kanser: Anaplastik büyük T hücreli sistemik malign lenfoma, Hodgkin hastalığı
Eribulin Mesylate (E7389)	Halaven® (2010) *	Sünger	Makrolid	Mikrotübüller	Kanser: Metastatik Meme Kanseri
Omega-3-acid ethyl esters	Lovaza® (2004) *	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi
Eicosapentaenoic acid ethyl ester	Vascepa® (2012)*	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi
Omega-3-carboxylic acid	Epanova® (2014)*	Balık	Omega-3 yağ asitleri	Trigliserid sentez enzimleri	Hipertrigliseridemi
Ziconotide	Prialt® (2004) *	Koni salyangozu	Peptid	N-Tipi Ca kanalı	Ağrı: Şiddetli Kronik Ağrı
Vidarabine (Ara-A)	Vira-A® (1976)*	Sünger	Nükleozid	Viral DNA polimeraz	Antiviral: Herpes Simplex Virus
Cytarabine (Ara-C)	Cytosar-U® (1969) *	Sünger	Nükleozid	DNA polimeraz	Kanser:Lösemi

* FDA tarafından onaylanma tarihi ** Aralık 2018 Avustralya’da onaylanan

Çizelge 1.3’te belirtildiği üzere şimdiye dek onay almış 14 ilacın 9 tanesi kanser tedavisinde kullanılmaktadır ("Clinical Pipeline of Marine Pharmacology"). Viral hastalıkların tedavisi, kronik ağrı ve kandaki trigliserit seviyesini düşürmek gibi birçok farklı etki için de onay almış ilaçlar bulunmaktadır (Lindequist, 2016). Faz çalışması aşamasında olanlar ise Çizelge 1.4, Çizelge 1.5 ve Çizelge 1.6’da sunulmaktadır.

Çizelge 1.4. Faz III çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler ("Clinical Pipeline of Marine Pharmacology")

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
Plinabulin (NPI-2358)	-	Mantar	Diketopiperazin	Mikrotübüller	Kanser: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri, Beyin Tümörü
Tetrodotoxin	Halneuron TM	Kirpi balığı	Guanidinyum alkaloidi	Sodyum kanalları	Ağrı: Kronik Ağrı
Lurbinectedin (PM01183)	ZepzelkaTM	Tunicat	Alkaloid	RNA Polimeraz II	Kanser: Yumurtalık Kanseri, Meme Kanseri, SCLC
Marizomib (Salinosporamide A; NPI-0052)	-	Bakteri	Beta-lakton-gamma lactam	20S proteazom	Kanser: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri, Pankreas Kanseri, Melanom, Lenfoma, Multipl Miyelom

Çizelge 1.5. Faz II çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler (clinical-pipeline.xml,")

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
GTS-21 (DMXBA)	-	Solucan	Alkaloid	$\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörü	Şizofreni, Alzheimer Hastalığı, Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, Endotoksemi, Sepsis, Vagal Aktivite
AGS-16C3F	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAF)	ENPP3 & mikrotübüller	Kanser: Renal Hücreli Karsinom
Plocabulin (PM184)	-	Sünger	Poliketid	Minor DNA oluşu	Kanser: Solid Tümörler

Çizelge 1.5. Devam

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
Tisotumab Vedotin	HuMax®-TF-ADC	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAF)	Doku faktörü & mikrotübüller	Kanser: Yumurtalık Kanseri, Rahim Ağzı Kanseri, Endometriyum Kanseri, Mesane Kanseri, Prostat Kanseri (CRPC), Baş Boyun Kanseri (SCCHN), Özofagus Kanseri, Akciğer Kanseri (NSCLC)
Ladiratuzumab vedotin(SGN-LIV1A)	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAF)	LIV-1 & mikrotübüller	Kanser: Meme Kanseri
Bryostatin	-	Bryozoan	Makrolid lakton	Protein kinaz C	Alzheimer hastalığı
Telisotuzumab vedotin (ABBV-399)	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	c-Met	Kanser: Solid Tümörler
Enapotamab vedotin (HuMax-AXL)	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	Axl RTK	Kanser:Yumurtalık Kanseri, Rahim Ağzı Kanseri, Endometriyal Kanser
RC-48	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2	Kanser: Ürotelyal Karsinom, İlerlemiş Kanseri, Mide Kanseri, Aşırı HER2 pozitif Mide Kanseri, İleri evre Meme Kanseri, Solid Tümörler
CAB-ROR2 (BA-3021)	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	ROR2	Kanser: Solid Tümör, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Üçlü Negatif Meme Kanseri, Yumuşak Doku Sarkomu
CX-2029 (ABBV-2029)	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	CD71	Kanser: Solid Tümör, Baş ve Boyun Kanseri, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Pankreas Kanseri, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
W0101	-	Yumuşakça /siyanobakteri	ADC (MMAE)	IGF-R1	Kanser: İleri evre veya Metastatik Katı Tümörler

Çizelge 1.6. Faz I çalışması aşamasında olan deniz kaynaklı bileşikler ("Clinical Pipeline of Marine Pharmacology")

Bileşik İsmi	Ticari ismi	Kaynağı	Kimyasal sınıf	Moleküler Hedef	Endikasyon
ARX-788	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2 & Mikrotübüller	Kanser: Meme kanseri, Mide kanseri
XMT-1536	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Dolafleksin)	NaPi2b & Mikrotübüller	Kanser: Solid Tümörler
ALT-P7	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (MMAE)	HER2 & Mikrotübüller	Kanser: Meme kanseri, Mide kanseri
MORAb-202	-	Sünger	ADC (Makrolid)	Mikrotübüller	Kanser: Solid Tümörler
PF-06804103	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Auristatin varyantı)	HER2	Kanser: Meme Tümörleri, Mide Tümörleri, Özofagogastrik Bağlantı Tümörleri, Karsinom, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
Griffithsin	-	Kırmızı alg	Lektin	Karbonhidrat bağlayıcı	HIV önleme
ZW-49	-	Yumuşakça / siyanobakteri	ADC (Auristatin varyantı)	HER2	Kanser: HER2 pozitif Mide Kanseri

Çoğu ilaç, hala karasal kaynaklardan elde edilmesine rağmen, son yıllarda deniz organizmalarından önemli sayıda ilaç, ilaç adayı ve çeşitli metabolitler elde edilmiştir. Deniz kaynaklı yaklaşık 30.000 bileşik bilinmektedir ve 2008'den beri her yıl 1000'den fazla yeni bileşik keşfedilmektedir. Bu bileşikler genellikle yeni kimyasal yapılar içermeye, karmaşıklık ve çeşitlilik ile karakterize edilirler (Hu ve ark., 2015; Kiuru ve ark., 2014). Yeni deniz kaynaklı doğal ürünler hakkında incelemeler 2002 yılına kadar Faulkner tarafından Natural Products Report'ta ve daha sonra Blunt ve ark. tarafından yayınlanmıştır (J. W. Blunt ve ark., 2016; Lindequist, 2016).

Deniz kaynaklı doğal ürünlere ilgi, kaynak organizmaları toplamak için teknolojik alanda (çoğunlukla tüplü dalış) iyileştirmeler yapılmasını gerektiriyordu. Yine de, 1950'lerin sonlarına doğru, deniz kaynaklı ilaç kavramı ilgi çekmiştir. Werner Bergmann ABD, Florida'da toplanan deniz süngerlerinden elde edilen sıradışı arabino ve ribo-pentosil nükleosidlerle ilgili üç rapor yayınlamıştır (Bergmann ve Burke, 1956; Bergmann ve Feeney, 1951; Bergmann ve Stempien,

1957). Bu bileşikler on yıllardır klinikte kullanımda olan önemli antikanser özelliklere sahip iki nükleosid olan ara-A (vidarabin) ve ara-C (sitabin) kimyasal türevlerinin gelişmesine yol açmıştır (Molinski ve ark., 2009).

Sitabin (Ara-C, Cytosar-U® olarak da bilinir) ilk olarak bir deniz süngerinden izole edilmiştir ve DNA polimeraz etkinliğini inhibe ederek kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir (Stonik, 2009). 1969'da FDA, ilacı lösemi tedavisi için onaylamıştır. Hala lösemi tedavisinin temelini oluşturan ve şimdiye kadar muhtemelen binlerce hayatı kurtaran bu deniz kaynaklı ilaç, orijinal prototip moleküllerin, yani spongotimidin ve spongouridin 1951'de Feeney ve Bergmann tarafından rapor edilmesinden sonra, 20 yıldan kısa bir süre içinde kliniklere girmiştir. Birkaç yıl sonra, 1976'da, başka bir deniz kaynaklı ilaç olan Vidarabin (Ara-A, Vira-A®), *Herpes simplex* virüsünün tedavisi için onaylanmıştır. Fakat bundan sonra, deniz kaynaklı ilaçların klinik gelişimi pek başarılı olmamış ve neredeyse 40 yıl boyunca ilaç otoriteleri tarafından başka hiçbir bileşik onaylanmamıştır. Dahası, yüksek verimli tarama yöntemlerinin hızlı gelişimi ve özellikle rasyonel ilaç tasarımına yönelik hesaplamalı yaklaşımlar, bazı bilim insanlarını doğal kaynaklardan yeni biyoaktif moleküller arayışının geçmişte bir etkinlik olduğuna inandırmıştır. Bu nedenle, geçen yüzyılın sonuna gelindiğinde, bilim dünyasının bir kısmı yeni doğal ürünlerin ve özellikle denizdeki doğal ürünlerin hala yeni ilaçlar üretme potansiyeli barındırıp barındırmadığı konusunda oldukça şüpheliydi. Ancak bu geçiş döneminden sonra durum kesinlikle değişmiş ve 21. yüzyılın başlarında deniz kaynaklı ilaçlar adına bir rönesans dönemine girilmiştir (Dyshlovoy ve Honecker, 2020; Molinski ve ark., 2009).

Tropikal koni salyangozunda bulunan bir peptit olan Zikonotid (Prialt; Elan Pharmaceuticals), ağrı tedavisi için ABD'de Aralık 2004'te onaylanan ilk deniz türevi bileşiktir. Daha sonra, Ekim 2007'de trabektedin (Yondelis/Ecteinascidin-743/ET-743; PharmaMar) Avrupa Birliği'nde onaylanan ilk deniz kaynaklı antikanser ilaç olmuştur (yumuşak doku sarkomu için onaylanmıştır) (Molinski ve ark., 2009).

1.3. Deniz Kaynaklı Bileşiklerin Farmakolojik Etkileri

1.3.1. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar, membran lipitleri, proteinler ve DNA gibi makromoleküllerine saldıran ve kanser, diabetes mellitus, nörodejeneratif ve enflamatuvar hastalıklar gibi birçok sağlık sorununa yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlarına karşı vücudu koruyan, insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip moleküllerdir. Deniz kaynaklı aktif bileşikler umut verici antioksidan etkiler göstermektedir (Kim, 2013).

Deniz canlıları arasında algler ve süngerler, doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin en zengin kaynaklarıdır (Ngo ve ark., 2012). Deniz ortamında üretilen antioksidanlar arasında genellikle flavonoidler, sinamik asit, benzoik asit, gallik asit, florotanninler, kersetin gibi polifenolik bileşikler, karotenoidler ve tokoferoller bulunmaktadır (Al-Saif ve ark., 2014; Balakrishnan ve ark., 2014).

Son yıllarda, denizden elde edilen protein kaynakları arasında antioksidan polipeptidler gibi çok sayıda biyoaktif peptit tanımlanmıştır. Birçok çalışmada, deniz kaynaklı antioksidan peptitlerin insan sağlığı ve gıda endüstrisinde olumlu etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Peptitlerin antioksidan aktivitesi; serbest radikallerin atılması, lipit peroksidasyonunun inhibisyonu ve metal iyon şelatlaması şeklinde olmaktadır. Ayrıca, peptit yapısı ve amino asit sekansı antioksidan özellikleri etkilemektedir (Wu ve ark., 2015).

Son birkaç yılda birçok çalışma, deniz canlılarından türetilmiş polisakkaritlerin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), hidroksil radikali, peroksil radikali, alkil radikali, H₂O₂, süperoksit radikali ve ABTS radikalini uzaklaştırdığı ve güçlerini azalttığını göstermektedir. Polisakkaritler esas olarak alglerden elde edilir,

sıralamayı deniz mikroorganizmaları ve deniz hayvanları izlemektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler deniz kaynaklı antioksidan polisakkaritlerin karaciğer hasarı, diyabet, obezite, nörodejeneratif hastalıklar, kolit ve meme kanseri gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıklarda olumlu etkili olabileceğini göstermektedir (Zhong ve ark., 2019).

1.3.2. Antikanser Aktivite

Kanser, dünya çapında en önde gelen ölüm nedenlerindendir. Her yıl, 7 milyondan fazla insan kanser nedeniyle ölmekte, bu durum dünya çapında toplam ölümlerin yaklaşık %12,5'ini oluşturmaktadır. Tüm kanser ölümlerinin % 70'inden fazlası, önlem, teşhis ve sağlık yönetimi için sağlık kaynaklarının çok sınırlı olduğu düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Kanserlerin % 40'ından fazlası sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz ve sigarayı bırakmak ile önlenabilir (Kim, 2013). Yüksek aktivite gösteren ve az yan etkilere sahip yeni antikanser ilaçlara oldukça ihtiyaç duyulmaktadır. Deniz kaynaklı doğal bileşikler, bu talebi karşılamaya katkıda bulunabilir. Deniz kaynaklı sitostatik maddelerin gelişimi, Karayip süngeri *Tethya crypta*'dan (Bergmann ve Burke, 1955; Bergmann ve Feeney, 1951; D. J. Newman ve Cragg, 2016) nükleosid yapısında spongotimidin ve spongouridinin keşfi ile başlamıştır. Sünger günümüzde *Tectytethya crypta* olarak adlandırılmaktadır ancak daha önce *Cryptotethya crypta* olarak da bilinmekteydi. Bu keşif sonrası sentetik analog sitozin arabinozid (sitarabin) (örn., Cytosar-U, Pfizer, Kirkland, Quebec, Kanada), güçlü bir antilösemik ajan olarak geliştirilmiş ve Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA, MD, ABD) tarafından 1969 yılında onaylanmıştır. Bu pirimidin nükleosid yapısındaki ilaç, bir ön ilaçtır ve hücre içinde fizyolojik substrat deoksisitidin ile rekabet eden sitozin arabinosid trifosfata dönüştürülmekte ve bu şekilde DNA polimeraz ve dolayısıyla DNA sentezi engellenmektedir (Lindequist, 2016).

Trabektedin (Ecteinascidin, ET-743, Yondelis, PharmaMar, Colmenar Viejo, İspanya) ilk olarak bir tulumlu olan *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilmiştir. Bu canlılar Akdeniz mercanlarında yaşar ve mikroorganizmalara karşı kendilerini korumak için bu bileşiği üretirler. Yeni incelemeler ve genetik analizler, trabektedinin tunikatlarla ilişkili henüz kültüre edilmemiş mikroorganizmalar tarafından üretildiğini düşündürmektedir (Giddings ve Newman, 2013; Schofield ve ark., 2015). Trabektedin kimyasal olarak tetrahidroizokinolin alkaloid grubuna aittir. Hem kanser hücrelerine hem de tümörün mikro çevresine etki eden yeni bir antineoplastik bileşik sınıfını temsil etmektedir. Sitostatik aktivitesi, DNA'nın minör oluşuna bağlanma ve transkripsiyon regülasyonu üzerindeki doğrudan etkileriyle ilişkilidir. Transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını önleyerek transkripsiyonu engellemektedir (Lindequist, 2016).

Eribulin mesilat (Halaven, Eisai Europe Ltd., Hatfield, Hertfordshire, İngiltere), deniz süngerlerinden izole edilen (örn. *Halichondria okadai* ve *Lyssodendoryx* sp.) sentetik bir analogon olan halikondrin B'dir. Biyokimyasal olarak poliketidlerin taksan olmayan türevleri sınıfındadır. Halikondrin B, tedarik problemi olan bir maddedir. Yalnızca 300 mg halikondrin B için, nadir bir derin su süngeri türü olan *Lissodendoryx* n.sp.1'den 1 ton toplanması gerekmektedir. Bu çok düşük verim, halikondrin B'nin izolasyon yoluyla elde edilmesine izin vermemektedir (Hart ve ark., 2000; Radjasa ve ark., 2011). Günümüzde, halikondrin B'nin süngerler tarafından değil, süngerlerde simbiyotik yaşayan dinoflagellatlar (ateşrengi algler) tarafından üretildiği düşünülmektedir. Halikondrinin tedarik problemi kimyasal sentezle çözümlenmiştir. İlaç, 2010 yılında FDA tarafından ve 2011 yılında EMA tarafından, lokal ilerlemiş veya metastatik meme kanseri tedavisi için onay almıştır. Mekanizması, karmaşık yapıdaki mikrotübülün dinamiklerini etkileyerek, mikrotübüllerin büyüme fazını inhibe etmek ve tübülünü verimsiz agregatlara ayırmak şeklindedir (Lindequist, 2016).

Brentuximab vedotin (Adcetris, Takeda Pharma A / S, Taastrup, Danimarka), sitotoksitesi yüksek bir bileşik ile tümör spesifik bir antikorun birleştirilmesi ile üretilmiştir. Hodgkin lenfoma veya sistemik anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL) gibi tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD30'a yönelik bir antikor ve sitotoksik bileşik monometil auristatinden oluşur. Auristatin, deniz kaynaklı bileşik dolastatin 10'un sentetik bir analogudur. Dolastatinler, ilk olarak Hint Okyanusunda bulunan *Dolabella auricularia*'dan çok düşük miktarlarda izole edilmiş bir dizi sitotoksik peptiddir. Araştırmalar sonucu dolastatinlerin gerçek üreticisinin *Caldora penisillata* türü olarak adlandırılan siyanobakteriler olduğu keşfedilmiştir (Lindequist, 2016).

1.3.3. Antiviral Aktivite

Virüsler, çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olan geniş bir mikroorganizma grubunu kapsamaktadır. Son yıllarda antiviral ilaçlardaki belirgin gelişmeye rağmen, viral enfeksiyon geçiren hastaların tedavisi, çoğunlukla rekombinant virüslerin, ilaç direncinin ve hücre toksisitesinin ortaya çıkması nedeniyle sıkça başarısızlığa uğramaktadır (Gilbert ve Boivin, 2005; Morfin ve Thouvenot, 2003; Tantillo ve ark., 1994). Ayrıca, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve viral hepatit dâhil olmak üzere kronik viral bulaşıcı hastalıkların yaygın şekilde görülmesi, daha etkili ve azaltılmış yan etkilere sahip yeni ilaçların araştırılmasını neden olmaktadır. 1981'den 2010'a kadar, keşfedilen 110 antiviral ilaçtan yalnızca 18'i (laninamivir, oseltamivir ve zanamivir dâhil olmak üzere) doğal kaynaklı ilaçların türevleridir. Fakat modifiye edilmiş nükleosid ve peptidomimetiklerden vb.'den elde edilmiş veya doğal ilaçları taklit eden sentetik ilaçların oranı çok daha yüksektir. Bu durum yeni antiviral ilaçların keşfedilmesinde doğal ürünlerin potansiyel rolünü vurgulamaktadır (David J. Newman ve Cragg, 2012). Yapılan bilimsel çalışmalarda, önemli konak hücre faktörlerini etkileyerek virüs replikasyon döngüsünü ve/veya viral elementleri inhibe eden yeni antiviral bileşikler bildirilmiştir (Lou ve ark., 2014).

Bu alanda deniz kaynaklı canlıların analizi, deniz algleri ile başlamış ve birçok alg türü, *flavivirüs*, *togavirüs*, *arenavirüs*, *rabdovirüs*, *ortopoksvirüs* ve *herpes virüs* familyaları dâhil zarflı virüslerin çoğalmasını engellediği gösterilen önemli miktarlarda sülfatlı polisakkaritler içermektedir (Witvrouw ve De Clercq, 1997). *Gelidium cartilagenium*'dan (Rhodophyceae) ekstre edilen polisakkaritlerin, embriyonik tavuk yumurtalarını influenza B veya kabakulak virüsüne karşı koruduğu tespit edilmiştir. Antiviral aktiviteye sahip polisakkaritlerin yüksek miktarda sülfatlanmış olduğu görülmüştür (Huheihel ve ark., 2002).

Sülfatlanma derecesi, moleküler ağırlık, bileşimdeki şekerler, konformasyon ve algal sülfatlanmış polisakkaritlerin dinamik stereokimyasını içeren kimyasal yapı, antiviral aktiviteyi belirlemek için kullanılır. Ek olarak, hem sülfatlama derecesi hem de sülfat gruplarının polisakkaritler üzerindeki dağılımı, bunların antiviral aktivitesinde önemli bir rol oynar. Düşük sülfatlanma derecesine sahip alg polisakkaritleri genellikle virüslere karşı etkisizdir (Kim, 2013).

Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen bileşiklerin antiviral potansiyellerini araştırma, 1998 yılında *Stachybotrys* sp. RF-7260'tan *stachyflin* izole edildikten sonra ortaya çıkmıştır. Taishi ve arkadaşları bu bileşiğin influenza A virüsüne (H1N1) karşı ümit verici antiviral aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Taishi ve ark., 1998). 2006 yılına kadar, Bhadury ve arkadaşları tarafından antiviral aktiviteye sahip sınırlı sayıda bileşik rapor edilmiştir (Bhadury ve ark., 2006). Son on yılda, deniz kaynaklı mantarlarından çeşitli virüslere karşı ümit verici antiviral aktivitelere sahip çok sayıda bileşik izole edilmiştir bunlara örnek olan bazı bileşikler Çizelge 1.7'de verilmiştir (Moghadamtousi ve ark., 2015).

Çizelge 1.7. Deniz kaynaklı mantarlardan elde edilen antiviral etkili bileşik örnekleri (Moghadamtousi ve ark., 2015)

Virüs	Antiviral Bileşik	Kaynak	Kimyasal sınıf
<i>Herpes Simplex Virus</i>	Halovirs A-E	<i>Scytalidium</i> sp.	Peptid
	11a-dehidroksi isoterreulakton A	<i>Aspergillus terreus</i> SCSGAF0162	Lakton
	Arisugasin A	<i>Aspergillus terreus</i> SCSGAF0162	Lakton
	Baltikolid	<i>Ascomycetous</i> strain 222	Makrolid
<i>HIV</i>	Ekuisetin	<i>Fusarium heterosporum</i>	Tetramik asit
	Fomasetin	<i>Phoma</i> sp.	Tetramik asit
	Integrik asit	<i>Xylaria</i> sp	Asile eremofilan seskiterpenoid

Cryptotethya crypta süngerinden vidarabinin keşfi (arabinofuranosiladenin, adenin arabinosid, Ara-A), 1950'lerde ilk çalışmalar olarak bilinen sünger nükleosidlerinin araştırılmasıyla gerçekleşmiştir. Hücre içinde, vidarabin hızla adenin arabinosid trifosfata dönüştürülür. Bu aktif form, *Herpes*, *Vaccinia* ve *Varicella zoster* virüslerinin DNA polimeraz enzimini ve DNA sentezini inhibe eder. AB'de akut keratokonjonktivit, *Herpes simplex* tip 1 ve 2'nin neden olduğu tekrarlayan epitelyal keratit tedavisi için göz damlası şeklinde kullanılır. ABD'de sınırlı terapötik etkisi nedeniyle onaylanması Haziran 2001'e kadar sürmüştür (Anjum ve ark., 2016; Lindequist, 2016; A. Martins ve ark., 2014; Mayer ve ark., 2010; Sagar ve ark., 2010).

1.3.4. Antibakteriyel Aktivite

Deniz canlıları sürekli olarak, bakteriler de dâhil olmak üzere birçok patojenik mikroorganizma tarafından enfeksiyon tehdidi altındadır ve buna bağlı olarak, çeşitli

biyolojik prekürsörlerden antibakteriyel aktiviteye sahip karmaşık organik bileşikler üretirler. Okyanusun dilüe edici etkisi, zorlu, tuzlu koşullara dayanıklı olan güçlü moleküllerin üretilmesini sağlamıştır. Her bir metabolit sınıfından bileşiğin (ribozomal ve ribozomal olmayan peptidler, alkaloidler, poliketidler ve terpenler) antibakteriyel aktivite sergilediği gösterilmiştir. Karadaki benzerleri ile karşılaştırıldığında, deniz kaynaklı antibakteriyel bileşikler çok daha az ilgi görmüştür (Hughes ve Fenical, 2010).

Birçok çalışma, deniz mikroorganizmalarının patojenik invazyonu önlemek için bir direnç mekanizması olarak yeni sekonder metabolitler ürettiğini kanıtlamıştır (Tan ve Zou, 2001). Şimdiye kadar, farklı mikrobiyal türlerde çok sayıda antimikrobiyal bileşik bulunmuştur (Petrini, 1991) Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen doğal bileşiklerin araştırılması, yaygın olarak kullanılan bazı ilaçlara karşı gelişen direnç problemini çözmek için umut verici bir yol olarak görülmekte ve yüksek etkili, düşük toksisiteli, dirençli mikrobiyal türlere karşı savaşmak için yeni antibakteriyellerin keşfine katkıda bulunacaktır (Habbe ve ark., 2016). Çizelge 1.8’de antibakteriyel etkili bileşik örnekleri verilmiştir.

Çizelge 1.8. Deniz kaynaklı antibakteriyel etki gösteren bileşikler

Kaynak	Antibakteriyel Bileşik	Referans
Mercan ve süngerlerden izole edilen bakteri <i>Streptomyces</i> spp.	aktinomisin	(Nofiani ve ark., 2020)
<i>Xestospongia estudinaria</i> süngerinden izole edilen bakteriler	alkaloid, steroid / triterpenoid	(Cita ve ark., 2017)
Mantar- <i>Cephalosporium</i> sp.	sefalosporin C	(Jin ve ark., 2016).
<i>Alg-Phaeodactylum tricornutum</i>	eikosapentaenoik asit	(Desbois ve ark., 2009) (Malve, 2015)
Sünger- <i>Spongosorites</i> sp.	indol alkaloidleri	(Mayer ve ark., 2009).

1.3.5. Antikoagülan Aktivite

Antikoagülanlar, trombotik hastalıklar için önemli terapötik ajanlardır. İlk doğal antikoagülan glukozamin ve galaktoz sülfat ester olup, hayvanların karaciğer ve kalbinden izole edilmiştir (Howell ve Holt, 1918; McLean, 1916). En bilinen antikoagülan heparin, karbonhidrat iskeletinde O-sülfat ve N-sülfat grupları içerirken, sülfat içeren algal polisakkaritler, N-sülfat grupları içermeyen çeşitli karbonhidrat bileşenlerine sahiptir (Güven ve ark., 2019).

Deniz kaynaklı antikoagülan etkili etken maddelerin araştırılması hemen hemen aynı yıllarda başlamış olup kahverengi alglerinin antikoagülan özelliklerinin araştırılmasından sonra (Killing, 1913), deniz yosunlarından türetilen sülfatlanmış polisakkaritlerin yeni antikoagülan ilaçların üretimi için alternatif kaynaklar olabileceği bildirilmiştir (Church ve ark., 1989; Matsubara, 2004). Antikoagülan aktivite, sülfatlanmış polisakkaritlerin en çok incelenen özellikleri arasındadır ve alglerden elde edilen antikoagülanlar uzun zamandır bilinmektedir (Kim, 2013). Çizelge 1.9’da alglerden izole edilmiş sülfatlanmış polisakkarit örnekleri verilmiştir.

Çizelge 1.9. Alglerden elde edilen antikoagülan etkili sülfatlanmış polisakkaritler

Kaynak	Sülfatlanmış polisakkarit	Referans
<i>Laminaria saccharina</i>	Fukoidan	(Cumashi ve ark., 2007)
<i>Ecklonia cava</i>	Arabinogalaktan	(Patel, 2012)
<i>Dictyota cervicornis</i>	Rhamnan	(Patel, 2012)
<i>Caulerpa cupresoides</i>	Galaktan	(Patel, 2012)
<i>Sargassum fulvellum</i>	Fukoidan	(Liu ve ark., 2020)
<i>Gelidiella acerosa</i>	Galaktan	(Chagas ve ark., 2020)

1.3.6. Analjezik Aktivite

Şiddetli kronik ağrı dünya çapında milyonlarca insanı etkilemektedir. Standart ilaçlar, morfin gibi opioidler bulunmakla birlikte, opioidlerin bağımlılık, tolerans gelişimi, kötüye kullanım olasılığı ve solunumu baskılaması gibi ciddi yan etkileri nedeniyle dezavantajları vardır. Bu nedenle, alternatif ve güçlü analjeziklere hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır. Zehirli deniz koni salyangozu *Conus magus*'un toksini baz alınarak sentezlenen sentetik bir peptid (omega-konotoksinin sentetik analogu) olan Zikonotid (Prialt, Jazz Pharmaceuticals plc, Dublin, İrlanda) böyle bir alternatif olabilir. Morfinden 1000 kez daha kuvvetlidir ve morfinin aksine, zikonotid bağımlılığa veya solunum depresyonuna yol açmamaktadır (Klotz, 2006; Lindequist, 2016).

Balon balığının karaciğerinden, kırmızı alg, yumuşakça, deniz sedimenti ve bakterilerden elde edilen ve bir alkaloid olan tetrodotoksin (Tectin), periferik sinir sisteminde impulsların başlamasını ve iletilmesini engelleyerek bu etkiyi göstermektedir. Birçok ağrıyı tedavi etmesi için kullanılan bu bileşiğin klinik çalışmaları faz III aşamasındadır (Jiménez, 2018; Lago ve ark., 2015).

Contulakin-G, yaklaşık 20 yıl önce deniz salyangozu *Conus geographus*'un zehrinden elde edilmiştir. Contulakin-G, sıçanlarla gerçekleştirilen deneylerde güçlü analjezik aktivite sergilemiştir (Lee ve ark., 2015). Contulakin-G, CGX-1160 ismiyle omurilik yaralanmasına bağlı nöropatik ağrı veya post-operatif ağrı için klinik çalışmalara alınmış ve 2005 yılında yetim ilaç statüsü verilmiştir. Ancak çalışmalar tamamlanmamıştır. Daha sonra insanlarda Faz 1a klinik çalışmalarına başlanmış fakat FDA tarafından hayvanlarda yapılan toksisite test sonuçları nedeniyle daha ileri klinik aşamalara geçememiştir (Pennington ve ark., 2018).

Psödopterosin A (PsA), *Pseudopterogorgia elisabethae* mercanından elde edilen nöromodölatör etkili bir diterpen fenolik glikozittir. Psödopterosinler, antiinflamatuvar ve analjezik biyoaktiviteye sahiptir (Ghareeb ve ark., 2020).

1.3.7. Antilipidemik Aktivite

Eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA), önemli çoklu doymamış yağ asitleridir (PUFA'lar) ve insan sağlığı için sayısız yararlı özelliğe sahiptirler. Örneğin; tromboz ve arteriyoskleroz gibi kan dolaşımı hastalıklarının önlenmesi, yaşlanmada bilişsel işlevlerin korunması (Witte ve ark., 2014) ve bebek gelişimi gibi (Lindequist, 2016).

Eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit etil esterleri, doğal yağ asitlerinin esterleştirilmesiyle üretilen onay almış ilaçlardır (örn. Lovaza, Glaxo Smith Kline, Brentford, Middlesex, İngiltere). Diyet ve/veya statinlerle, trombosit agregasyon inhibitörleri ve antihipertansif ilaçlarla kombinasyon halinde, kalp enfarktüsünden sonra insan kanındaki trigliserit seviyesini kontrol etmek için ve endojen hipertrigliseridemi de kullanılır. Olası yan etkileri, gastrointestinal bozukluklar ve transaminazların artmasıdır (Koski, 2008; A. Martins ve ark., 2014; Mutschler ve ark., 2016).

1.3.8. Nöroprotektif Aktivite

Alzheimer hastalığı, amiloid plakların, nörofibriler düğümlerin oluşumu ve sinir hücrelerinin ölümüyle karakterize edilen birçok faktöre bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Yıllarca süren araştırmalara rağmen, Alzheimer hastalığında etkili tedavi arayışı halen devam etmektedir (M. Martins ve ark., 2020). Bu arayış deniz kaynaklı

ürünlerde nöroprotektif etkili bileşiklerin keşfine yol açmıştır. Çizelge 1.10'da Alzheimer hastalığında etkili bulunan bazı bileşik örnekleri verilmiştir.

Çizelge 1.10. Alzheimer tedavisinde etkili deniz kaynaklı bileşikler (M. Martins ve ark., 2020)

Bileşik	Bileşik türü	Kaynak	Son durumu
Homotaurin	Amino sülfonat	Kırmızı alg türleri	Faz III çalışması başarısız olmuştur
GTS-21 (DMXBA)	Benziliden	Hortumlu solucan türleri <i>Paranemertes peregrine</i> ve <i>Amphiporus lactifloreus</i>	Faz III
DHA	Omega-3 yağ asidi		Faz III
Bryostatin 1	Makrolid lakton	Yosun hayvancıkları <i>Bugula neritina</i>	Faz II
Fascaplysin	Bis-indol alkaloidi	Sünger <i>Fascaplysinopsis bergquist</i> sp.	-
GV-971	Asidik oligosakkarid	Kahverengi alg <i>Echlonia Kurome Okam</i>	Faz III çalışmaları tamamlanmıştır

1.4. Deniz Kaynaklı İlaç Keşfinin Zorlukları

1.4.1. Tedarik Sorunu

Deniz kaynaklı canlılardan ilaç geliştirmede kritik nokta ve sıklıkla karşılaşılan sorun, deniz ortamına zarar vermeden yeterli miktarda organizma ve bileşiğin sürekli olarak elde edilebilirliğidir. Deniz kaynaklı ilaçlar yalnızca ekonomik ve ekolojik olarak uygun şekilde sağlanabilirse piyasada bir şans elde edecektir. Doğal kaynakların deniz ortamından temini sürekli olarak sağlanamazsa, tedarik problemi deniz biyoteknolojisi (su ürünleri yetiştiriciliği/deniz ürünleri yetiştiriciliği/fermentör

yetiştirme; genetik mühendisliği; enzimatik sentez veya modifikasyon) veya kimyasal sentez/yarı sentez/modifikasyon ile çözülebilir (Lindequist, 2016).

1.4.2. Su rnleri yetiştiriciliği / kültüre alma

Su rnleri yetiştiriciliği; balıklar, bazı midyeler gibi yiyecekler ve makroalgler gibi deniz canlılarının üretimi için yapılmaktadır. Biyoreaktörlerde yetiştirme makro ve mikro algler, bazı omurgasızlar, deniz mantarları ve çeşitli deniz bakteri türleri ile yapılmaktadır. Bununla birlikte, farmasötik açıdan ilginç deniz organizmalarının, özellikle mikroorganizmaların çoğu, yapay koşullar altında kltrlenemez. Alternatif yetiştirme yöntemleri geliştirmek ve metabolit üretimini uzun süre devam ettirmek için doğal ortamda yaşam koşullarının daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Umut verici bir yol olarak ko-kültürleme veya diğer adıyla karışık fermentasyon düşünülmektedir. Bu yöntem doğadaki karmaşık toplulukları taklit etmeye çalışan iki veya daha fazla farklı organizmanın, özellikle mikroorganizmaların, birlikte yetiştirilmesidir. Birlikte yetiştirmenin, yetiştirilen organizmalar tarafından üretilen metabolitlerin kimyasal çeşitliliğini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca aktif bileşiklerin üretiminin önemli lde artmasına ve/veya üretici türün saf kültürlerinde tespit edilmeyen özel bileşiklerin birikimini sağlamıştır. (Lindequist, 2016).

1.4.3. Genetik mühendislik

Bu yöntemin prensibi, istenen bileşiğin genetik bilgisinin, daha kolay yetiştirilebilen konaki hücrelere aktarılması ve bileşiğin konaki hücrelerde sürekli üretilmesidir. n koşul, genetik bilginin kesinliğidir. Bu teknikler, yetiştirilemeyen organizmaların genlerinin izolasyonunu ve ekspresyonunu sağlayacaktır. şimdiye kadar, bu yaklaşım deniz kaynaklı ilaçlar için endüstriyel düzeyde

gerçekleştirilmemiş olup araştırma düzeyinde gerçekleştirilmektedir (Lindequist, 2016).

1.4.4. Sentez / yarı sentez / modifikasyon

Total sentez, bilinen deniz kaynaklı bileşiklerinin birçoğu için mümkün olmasına rağmen, ekonomik olarak sadece basit kimyasal yapıdaki bileşikler için gerçekleştirilebilir. Örnek olarak analjezik etkisi olan peptit zikonotid verilebilir. Başka bir yol, kolay temin edilebilen bileşiklerin kimyasal veya biyokimyasal işlemlerle istenen bileşiğe dönüştüğü yarı sentetik üretim olabilir. Bu yöntemle bir örnek, bakteriyel bir madde olan siyanozafrazin B'nin transformasyonu ile trabehtin üretimidir. Çoğu durumda, orijinal doğal bileşik rehber bir yapıdır ve tüm yapıyı üretmek gerekli değildir. Farmakolojik etki için gerekli olan yapısal unsurlar ne kadar çok bilinirse, gerekli yapısal bileşenlere o kadar fazla odaklanılabilir. Rehber bileşik yapısındaki kimyasal ve/veya enzimatik modifikasyonlar ile yapısal çeşitlilik artırılabilir ve bileşiğin özellikleri geliştirilebilir. Örneğin; Halikondrin türevi eribulin, doğal orijinal bileşikten çok daha küçük sentetik bir moleküldür (Lindequist, 2016)

1.5. Deniz Kaynaklı Mantarlar

Okyanuslar, büyük bir biyolojik çeşitlilik rezervuarı olarak kabul edilir. Deniz ortamındaki mikrobiyal canlılar ekolojik açıdan önemlidir. Ölü ve çürüyen organik maddelerin ayrıştırıcıları olarak besin rejenerasyon döngülerinde önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle deniz kaynaklı mantarlar, endüstriyel ve/veya çevresel açıdan bir enzim kaynağı olarak düşünülebilir. Omurgasızlar, çürüyen odun, deniz suyu, sedimentler ve mangrov detritus gibi farklı substratlardan izole edilen bazı mantar suşları hidrolitik ve/veya oksidatif enzimler ile aljinat liyaz, amilaz, selüloz, kitinaz,

glukozidaz, inulinaz, keratinaz, ligninaz, lipaz, nükleaz, fitaz, proteaz ve ksilanaz gibi enzimler üretmektedir. Bu enzimler, sırasıyla 35 ila 70°C ve 3.0 ila 11.0 arasında değişen sıcaklık ve pH'ta optimum aktivite gösterir. Bazı deniz kaynaklı mantar suşları, alkali soğuk ortamlarda aktivite gösteren enzimler üretir. Deniz kaynaklı mantarların okyanus koşullarına adaptasyonu, mantar deniz biyoteknolojisi alanında ilgi çekici bir konudur (Bonugli-Santos ve ark., 2015).

Deniz kaynaklı mikrobiyal topluluklar (bakteriler, mantarlar, algler, planktonlar ve virüsler) biyojeokimyasal süreçlerdeki performanslarından dolayı deniz ortamının önemli ekolojik bileşenleri olarak kabul edilir (Sowell ve ark., 2008). Deniz kaynaklı mantarlar zorunlu veya fakültatif olarak sınıflandırılmıştır. Zorunlu deniz mantarları, yalnızca bir deniz veya nehir ağzı habitatında gelişen ve sporlanan mantarlardır. Fakültatif deniz mantarları ise tatlı su veya karasal kökenli olup deniz ortamında da sporlanıp yetişebilmektedir. Mangrov, kum, sahil, nehir ve nehir ağzı habitatları gibi kıyı bölgelerde çok çeşitli mantarların bulunması, sel ve rüzgar gibi çevresel etkilerle karasal mantarların deniz ortamlarına taşındığını düşündürmektedir. Bu nedenle, deniz kaynaklı mantarlar genellikle karadaki türdeşlerine benzer morfolojik özellikler sergilemektedir (Bonugli-Santos ve ark., 2015; Méjanelle ve ark., 2000; Morrison-Gardiner, 2002).

Son yıllarda deniz kaynaklı organizmalardan, antikanser, antitümör, antiproliferatif, antimikrotübül, sitotoksik, fotoprotektif de dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyen poliketidler, alkaloidler, peptidler, proteinler, lipidler, şikimatlar, glikozitler, izoprenoidler ve hibritler gibi önemli sayıda yeni metabolit keşfedilmiştir (Rateb ve Ebel, 2011). Bu maddelerin çoğunu bakteriler, aktinomisetler, mantarlar ve siyanobakteriler ürettikleri için daha fazla dikkat çekmektedir. Deniz mikroorganizmaları kültürlenebilir ve yenilenebilir bir kaynak olmaları nedeniyle deniz omurgasızları ile karşılaştırıldığında, doğal kaynaklı bileşikler açısından çok daha verimli bulunmaktadır (John W. Blunt ve ark., 2015; Jin ve ark., 2016).

Deniz mantarları, 1846'da Durieu ve Montagne tarafından bir deniz çayırı *Posidonia oceanica*'nın rizomu üzerindeki *Sphaeria posidoniae* (*Halotthia posidoniae*) türünün ilk kayıtlarından beri incelenmiş fakat büyük ölçüde ihmal edilmiştir (Shin, 2020). 1949 yılında, Sardunya kıyılarından elde edilmiş olan deniz kaynaklı bir mantar olan *Cephalosporium* sp.'den izole edilen ilk sekonder metabolit sefalosporin C'dir. Ancak bu tesadüfî bir keşifti. Deniz kaynaklı bir mantardan bu kadar önemli bir bileşiğin keşfedilmiş olmasına rağmen, deniz kaynaklı mantarlardan elde edilen biyoaktif doğal ürünlerin sayısı son derece yavaş şekilde artmıştır. Araştırmacılar 1980'li yılların sonlarından itibaren deniz kaynaklı mantarlara daha çok odaklanmışlardır(Jin ve ark., 2016).

Yaklaşık 22.000 biyoaktif mikrobiyal metabolitin %38'inin mantar kökenli olduğu ve dünyadaki mantar taksonlarının yalnızca %5'inin tanımlandığı düşünüldüğünde, mantarlar yeni biyoaktif sekonder metabolitlerin keşfi için muazzam bir potansiyele sahiptir (Shin, 2020).

Deniz mantarlarının 10.000'den fazla türü olduğu tahmin edilmektedir (Jones, 2011). Mantarlar, incelenen hemen hemen her deniz habitatında (sedimentlerde, su kolonlarında, dalgaların karaya attığı odunlar, sapsız ve mobil omurgasızlar, algler ve deniz memelileri de dâhil olmak üzere birçok yerde) bulunmaktadır (Jones, 2011; Orsi ve ark., 2013; Pollock ve ark., 2000; Rāmā ve ark., 2014; Taylor ve Cunliffe, 2016; Wainwright ve ark., 2017; Yarden, 2014).

Bugüne kadar, deniz ortamlarından tanımlanan mantarların büyük çoğunluğu, kültür, mikroskopi veya DNA bazlı yöntemlerin kullanılmasından bağımsız olarak Ascomycota ve Basidiomycota şubelerine aittir. Denizden elde edilen ve sucul mantarlar nispeten yüksek taksonomik seviyelerde çok sayıda yeni ve tanımlanmamış türe sahiptir (Picard, 2017; Richards ve ark., 2012).

Karasal türevlerine göre daha az araştırılmış olsa da, doğal ürün keşfindeki önemleri artmıştır (Butler ve ark., 2014; Molinski ve ark., 2009). Antibakteriyel, antiviral ve antikanser etkilere sahip çok çeşitli kimyasal maddeler elde edilmiştir. Bugüne kadar mantarlardan; paklitaksel, kamptotesin, vinkristin, torreyanik asit ve sitarabin gibi birçok ilaç etkin maddesinin izole edilmesi de onların iyi bir ilaç kaynağı olduklarının kanıtı niteliğindedir. Deniz sadece yeni ilaç molekülü açısından değil, aynı zamanda istenen etkiyi elde etmek için modifiye edilebilecek yeni bileşiklerin yapı kaynağı olarak da önemlidir. Bazı önemli hastalıklar, küçük enfeksiyonlar ve salgınların tedavisi için ilaç keşfinde yol katedilmiş olsa da mevcut tedavilere direnç gösteren ve son zamanlarda bildirilen yeni enfeksiyonların (SARS, dang ve Zika virüsleri gibi) tedavisi için yeni ilaç moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır. Tüberküloz ve sıtma gibi hastalıklarda gelişen ilaç direnci, kanser ve HIV-AIDS tedavisi için yetersiz başarılar ilaç araştırmalarını deniz kaynaklarına yönlendirmiştir (Deshmukh ve ark., 2017).

Deniz kaynaklı mantarlarının neden karmaşık ve çok çeşitli metabolitler ürettiği tam olarak anlaşılmamış olsa da, kimyasal savunma ve iletişimde rol oynadıkları düşünülmektedir. Ekolojik, fiziksel ve biyolojik faktörlere bağlı olarak bu metabolitlerin biyosentezi değişebilir yani bu koşullardaki küçük değişikliklerle tamamen yeni bir dizi metabolit oluşabilir (Pejin ve Karaman, 2017). Deniz kaynaklı terapötiklerin önemi, 1981-2002 döneminde FDA tarafından onaylanan ilaçların yarısından fazlasının deniz kaynaklarından elde edildiği gerçeğinden anlaşılabilir. Deniz kaynaklı ilaçların çoğu omurgasızlardan (süngerler, tunikler, yumuşakçalar ve bryozoanlar) elde edilmiş; bunların üçte ikisi ribozomal olmayan peptit sınıfına ait bileşiklerdir. Bunlardan bazıları zaten antibiyotik ve antikanser ajanları olarak piyasada bulunmaktadır (Polimiksin B, pristinamisin, gramisidin, vankomisin, bleomisin, aktinomisin D), bazıları ise klinik çalışma aşamasındadır (Deshmukh ve ark., 2017).

Sadece deniz kaynaklı mantarlardan, bazıları antikanser etkili olmak üzere ilaç olma potansiyeli gösteren binlerce metabolit bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2015). Fakat bunların hiçbirisi şu ana kadar piyasada bulunmamaktadır (Deshmukh ve ark., 2017). Mantar çalışmaları, 2017'de rapor edilen 448 yeni bileşik ile 2015'te 369 ve 2016'da 328'e kıyasla önemli ölçüde artmaya devam etmektedir. Yeni bileşikler üreten mantarların çoğu sedimentlerden, süngerlerden, sölenterlerden ve diğer omurgasızlardan veya algler ve deniz çayırından izole edilmiştir (Carroll ve ark., 2019).

Aspergillus cinsi üzerinde yapılan yeni çalışmalarda birçok yeni metabolit elde edilmiştir. Bir balıktan izole edilen *Aspergillus fumigatus* suşundan, spiroheterosiklik g-laktam çekirdekli bir dizi bileşik elde edilmiştir (altı kiral merkez içeren sefalimisin E–L). Bu bileşiklerin asidik metanol ile muamelesi sonucu enansiyomerleri oluşmuştur. Moleküler orbital hesaplamalar, moleküller arası olası bir annülasyon yoluyla sefalimisinlere biyosentetik bir yol tasarlamak için kullanılmıştır (Yamada ve ark., 2017). İki karasal bakteri suşu ayrı ayrı *A. fumigatus* ile kültürlenmiş ve bu durum her iki organizmada çift taraflı metabolit indüksiyonuna yol açmıştır (Carroll ve ark., 2019).

1.5.1. Mangrov Mantarları

Mangrov, gelgit sonucu oluşan haliçlerde, tuzlu bataklıklarda ve çamurlu kıyılarda sık ormanlar oluşturan bazı ağaç ve çalı türlerine ve oluşturdıkları ormanlara verilen isimdir. Mangrov ile ilişkili mantarlardan özgün yapıda ve geniş bir biyoaktif yelpazeye sahip alkaloidler, flavonoidler, kinonlar, benzopiranonlar, fenolik asitler, streoidler, ksantonlar gibi sekonder metabolitler izole edilmiştir (Joel ve Valentin Bhimba, 2013). Bugüne kadar mangrovlardan 200'ün üzerinde endofitik mantar izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bunlar arasında *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*,

Phoma, *Phomopsis*, *Phyllosticta* ve *Trichoderma* cinsleri bulunmaktadır (Z. Xu ve ark., 2019). Son yıllarda mangrov ile ilişkili mantarlardan elde edilen yeni metabolit sayısında (2014'te 103, 2015'te 133 ve 2016'da 149) sürekli bir artış olmuştur. Ancak 2017 yılında sadece 101 yeni bileşik keşfedilmiş (çoğunlukla endofitik türlerden) yani önemli bir düşüş gözlenmiştir. Yakın zamanda önerilen konsensüs tanımına göre, mangrov ile ilişkili mantarların deniz kaynaklı olarak kabul edilebilmesi için rizosfer, kök ve mangrov sedimentlerinden elde edilmesi gerekmektedir. Mevcut çalışmaların sadece % 30'u bu kategoriye girmektedir (Pang ve ark., 2016). İlginç bir şekilde, yaprak ve dallarda bulunan fungal endofitler, doğal ortamları olmamasına rağmen tuzlu ortamda da gelişmektedir (Carroll ve ark., 2019).

1.5.2. Deniz Kaynaklı Mantarlardan İzole Edilen Bileşikler

Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen tüm yeni bileşiklerin yaklaşık dörtte üçü canlılarla beraber bulunanlardan, diğer bileşiklerin çoğu ise sedimentlerde yaşayanlardan elde edilmiştir. Şekil 1.4'te belirtildiği üzere mangrov habitatları (%25,5), algler (%14,4) ve süngerler (%9,2) mantar çeşitliliğinin yüksek olduğu kaynaklardır. Okyanusların derinlikleri ise yeni bir kaynaktır. Düşük sıcaklık, yüksek hidrostatik basınç, ışığın olmaması, hidrotermal menfezlerdeki yüksek metal konsantrasyonları ve hipoksik koşullardaki zorlu ortam, yapısal olarak benzersiz metabolitler üretilmesini sağlamaktadır. Kaynakların azlığı nedeniyle okyanus derinliklerindeki habitat ile ilgili çok az sayıda rapor bulunmaktadır. Fakat çoğunlukla Güney Çin Denizi çevresindeki mangrov alanlarına odaklanan Çinli bilim insanlarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Jin ve ark., 2016).

Deniz kaynaklı mantarlardan 1000'den fazla sekonder metabolit elde edilen olmasına rağmen, siklosporin A dışında hiçbirisi henüz piyasada bulunmamaktadır. Bu durum kapsamlı olmayan tarama yaklaşımları ve rehber optimizasyonlardaki eksiklikle açıklanabilir. Deniz kaynaklı mantarlar; poliketidler, alkaloidler, terpenler,

peptidler ve karışık biyosentezle üretilen sekonder metabolitlerin en önemli üreticilerindendir (Shin, 2020).

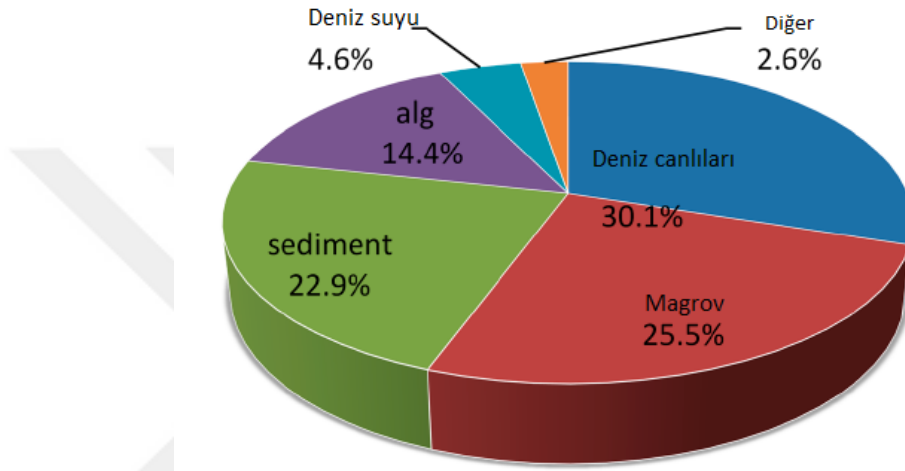
Süngerlerle birlikte yaşayan mantarlar, deniz kaynakları arasında yapısal olarak benzersiz ve biyolojik olarak aktif birçok ikincil metabolitin en zengin kaynaklarından. Deniz kaynaklı mantarlar ile ilgili çalışmaların çoğu, sığ veya derin denizlerden ve mangrov alanlarından toplananlarla yapılmıştır (Shin, 2020).

Çizelge 1.11. Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen sekonder metabolitler (Jin ve ark., 2016; Shin, 2020)

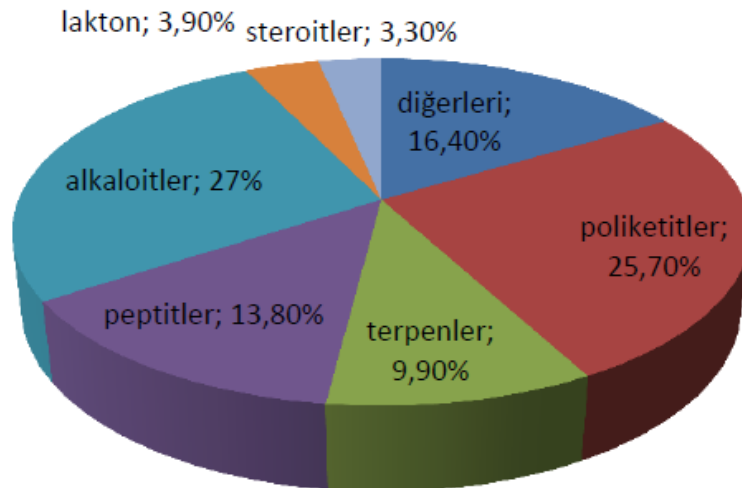
Kaynak	Sekonder metabolit	Aktivite
<i>Alternaria</i> sp. SCSIO41014	Altetoxin VII	Sitotoksik
<i>Sporendonema casei</i>	5 yeni antrakinon türevi, auksarthroler D–H, altersolanol B	Auksarthrol D ve F sitotoksik etkili Altersolanol B Antitüberküloz etkili
<i>Penicillium</i> sp.	4-Hidroksisklerodin ve asetonlanmış triketon	Anti-anjiogenetik Anti-inflamatuvar
<i>Fusarium solani</i> H915	Hymeglusin	Antifungal
<i>Phomopsis lithocarpus</i>	5 yeni benzofenon türevi tenellon H	Sitotoksik
<i>Phialocephala</i> sp.	2 yeni nitrojen içeren sorbisillinoidler, sorbisillasins A ve B, 3,4,6-trisubstitüe α -piron türevi, Scirpyrone K	Scirpyrone K antioksidan aktivite göstermiştir
<i>Simplicillium obclavatum</i> EIODSF 020e	simplicilliumtidler A, E, G, ve H	Sitotoksik
<i>Aspergillus wentii</i> SD-310	asperolid E	Sitotoksik
<i>Aspergillus</i> sp. 16-02-1	Aspiketolaktanol aspilaktanol A, aspiroon, epiaspinondiol hidroksietil)-4-metill- γ -butirolakton, dihidroaspiroon, aspinotriol A, aspinotriol B ve chaetokuadrin F	Sitotoksik

Çizelge 1.11. Devam

Kaynak	Sekonder metabolit	Aktivite
<i>Aspergillus dimorphicus</i> SD317	Wentilakton A and B	Sitotoksik
<i>Phakellia fusca</i> Süngerinden elde edilen <i>Arthrinium arundinis</i> ZSDS1-F3	sitokhalasin K	Sitotoksik

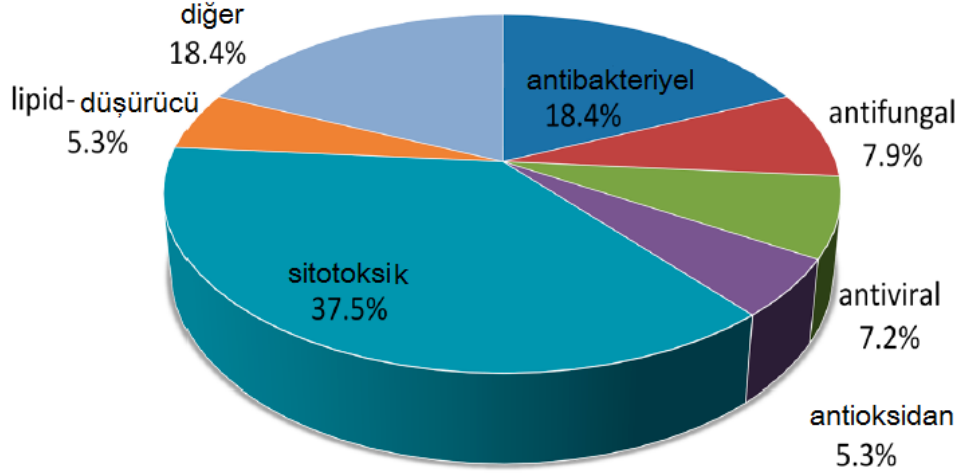


Şekil 1.4. Deniz kaynaklı mantarlardan izole edilen bileşiklerin kaynağı (Jin ve ark., 2016)



Şekil 1.5. Deniz kaynaklı mantarlardan izole yeni edilen bileşik türleri (Jin ve ark., 2016)

Şekil 1.5'ten alkaloid ve poliketit yapısındaki maddelerin diğerlerinden daha büyük paya sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 1.6. Deniz kaynaklı mantarlardan izole yeni edilen bileşiklerin farmakolojik etkileri (Jin ve ark., 2016)

Şekil 1.6'dan da anlaşılacağı gibi deniz kaynaklı mantarlardan elde edilen bileşiklerin büyük bir kısmı sitotoksik ve antibakteriyel etkilidir. Bu durum gelecekte oluşabilecek ilaç dirençleri ve kanser tedavisi için umut vaat eden bir tablodur.

1.6. *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae Went & Prins.Geerl., toprakta, gübrede ve çürüyen bitki örtüsünde yaygın olarak bulunan, kozmopolit, saprotroflar olan, yakından ilişkili heterotalik türlerin bir kompleksidir (Zheng ve ark., 2007). *Rhizopus oryzae* uzun zamandır enzim üretimi (örn. glukoamilaz ve lipaz), organik asit sentezi ve Endonezya, Çin ve Japonya'da çeşitli fermente gıda uygulamaları için kullanılmaktadır (Ghosh ve Ray, 2011; Mertens ve ark., 2006).

Rhizopus oryzae, Zygomycetes mantar grubunun ekonomik olarak en önemli üyelerinden biridir ve mantar filogenetik ağacının sıralı soylarında ilk mantarı temsil eder ve bu nedenle genom sekansı tüm mantar krallığının evrimine ışık tutar (Ghosh ve Ray, 2011).

ALEM: Fungi

ŞUBE: Zygomycota

SINIF: Zygomycetes

TAKIM: Mucorales

AİLE: Mucoraceae

CİNS: *Rhizopus*

TÜR: *R. oryzae*

Rhizopus cinsi ilk olarak 1820 yılında *Rhizopus nigricans*'ın (Ehrenberg 1820) tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır ve etanol, L - (+) – laktik asit, fumarik ve az miktarda L - (+) - malik asit gibi fermantasyon ürünlerini üretmesi ile bilinmektedir. Fumarik asit üretme yeteneği, bu cinsi *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türlerinden ayrı kılan özelliktir (Meussen ve ark., 2012). Enzimlerin, daha hafif koşullarda aktif olmaları, yüksek seçicilik ve özgülük göstermeleri, daha düşük çevresel ve fizyolojik toksisiteleri gibi avantajları nedeniyle endüstriyel ölçekte yapılacak katalizlerde oldukça verimli biyokatalizörlerdir. Günümüzde hidrolitik enzimler, endüstriyel enzim pazarındaki tüm satışların %70'inden fazlasını oluşturmaktadır (López-Fernández ve ark., 2020).

R. oryzae'nin bitkilere karşı patojenitesi, çok sayıda karbonhidrat sindirici enzimi üretmesi nedeniyledir. Selülozlar ve hemiselülozların yanı sıra, başka birçok enzimin de *R. oryzae* tarafından salgılandığı tespit edilmiştir. Thompson ve Eribo (1984), *Rhizopus oryzae*'nin kültürel ortamında değişen seviyelerinde proteaz, üreaz, ribonükleaz, pektat liyaz ve poligalakturonaz enzimlerini de keşfetmiştir. Bununla birlikte, enzimler dışında, *R. oryzae*'nin organik asit, alkol ve ester ürettiği de

bulunmuştur. *R. oryzae* suşlarının benzersiz yetenekleri, bu suşun gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılması için yeni yollar açabilir ve biyo-dizel üretimini iyileştirebilir (Ghosh ve Ray, 2011).

R. oryzae tarafından üretilen enzimler:

- Selüloz
- Ksilanaz
- Pektinaz
- Amilaz
- Karbonhidrat aktif enzimler
- Tannaz
- Fitaz
- Proteaz
- Lipaz
- Diğer enzimler: Steroid 11 α -hidroksilaz, ribonükleaz, tirozinaz, peroksidaz, üreaz, piruvat dekarboksilaz

Polimerler:

- Kitozan
- Kitin
- Biyopolimer

Organik asitler:

- Fumarik asit
- Laktik asit

Bunların yanı sıra; esterler, etanol, uçucu bileşikler de üretmektedir (Ghosh ve Ray, 2011).

Bir çalışmada, *Holarrhena pubescens* ağacından izole edilen endofitik mantar *Rhizopus oryzae* tarafından uçucu bileşik metil öjenol elde edilmiştir (Peeran, 2016)

Bir başka araştırmada *R. oryzae* tarafından üretilen makrosiklik poliketid metabolit rizoksinin, pirinç fidesi üzerindeki toksik etkisi gösterilmiştir. Bu fitotoksin, güçlü antimitotik aktivitesi nedeniyle, mitozun inhibisyonu ile sonuçlanan pirinç β -tübülinine bağlanarak yıkıcı etki göstermektedir (Partida Martinez ve Hertweck, 2005).

Rhizopus cinsine ait çok sayıda bitki patojenik mantar, pirinç fidesinin yanmasına neden olmaktadır. Bu bitki hastalığı tipik olarak, fide köklerinin patojen tarafından herhangi bir enfeksiyon belirtisi olmadan anormal bir şekilde şişmesiyle başlar. Bu karakteristik semptom aslında *Rhizopus* sp. kültürlerinden izole edilen makrosiklik poliketid metabolit rizoksininden kaynaklanır. Fitotoksin, mitozun ve hücre döngüsünün durmasıyla sonuçlanan yıkıcı etkisini pirinç β -tubulinine bağlanarak gösterir. Rizoksin, çeşitli insan kanserleri de dâhil olmak üzere çoğu ökaryotik hücrelerde güçlü antimitotik aktivitesi nedeniyle, potansiyel bir antitümör ajan olarak büyük ilgi çekmiştir. Rizoksinin mantarın kendisi tarafından değil endosimbiyozla *Burkholderia* cinsi bakteriler ile birlikte sentezlendiği görölmüştür. Bu bulgular, mantar-bitki etkileşimini üçlü şekilde genişleten ve haşere kontrolü için yeni bakış açısı açan, oldukça karmaşık bir simbiyotik patojenik ilişkiyi ortaya koymaktadır (Partida Martinez ve Hertweck, 2005).

Bir başka çalışmada, üç farklı *R. oryzae* izolatının sekonder metabolitleri dört bitki patojenine karşı taranmıştır. Bu izolatlarda *R. oryzae* (15), *Rhizoctonia solani* patojenine karşı maksimum aktivite (% 81.53) göstermiştir. *R. oryzae* hücre kültürünün etil asetat ekstresi, *R. solani*'ye karşı önemli bir antifungal aktivite sergilemiştir, bu da metabolitlerin, mitoz yoluyla çoğalan mantarlara karşı etkili olduğunu göstermektedir (Peeran ve ark., 2018).

Eşsiz özellikleri nedeniyle, altın ve gümüş nanopartiküller (sırasıyla GNP'ler ve AgNP'ler) biyomedikal, kataliz, görüntüleme ve fotonik, güneş enerjisi ve

nanoelektronik gibi çeşitli alanlarda geniş uygulamalara sahiptir ve bu nedenle büyük talep görmektedir. Mevcut fizikokimyasal sentez protokollerinin genellikle yüksek maliyet, çevreyi kirlletme gibi dezavantajları olduğundan klinik uygulamaları sınırlıdır. Bu nedenlerden nanopartiküllerin biyosentezi umut verici bir alternatif olabilir. Birkaç araştırma raporu, deniz kaynaklı mantarların böyle bir amaç için umut verici adaylar olduğunu öne sürmektedir. Yapılan bir çalışmada deniz kaynaklı *Rhizopus oryzae*'nin suşunun, AgNP'leri intrasellüler biyosentezlediği gözlenmiştir. GNP'leri ise hem ekstrasellüler hem de intrasellüler biyosentezlediği bildirilmiştir (Vala ve ark., 2016).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae mantarı Çanakkale Kömür Limanı'ndan toplanan *Dendrectilla tremitensis* süngerinden elde edilmiştir. Materyal Biyolog Bülent Gözcelioğlu tarafından toplanmış ve deniz suyu içerisinde laboratuvara aktarımı gerçekleştirilmiştir. Süngerin dış kısmından alınan kesitin uygun besiyeri ortamına ekilmesiyle mantar oluşumu sağlanmış, daha sonra mantarın tür teşhisi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mantarın küçük ölçekli ekimi yapılmıştır. Tüm izlenen prosedür için Prof. Peter Proksch'un Nature Protocols'de yayınlanan makalesindeki protokol takip edilmiştir (Kjer ve ark., 2010).

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar

2.2.1. Kullanılan Kimyasallar

- Sabouraud %2 Dekstrozu Agar
- Deniz tuzu
- Distile Su
- Ultra Saf Su
- Anisaldehit Reaktif
- Silika jel 60 Kolon dolgu materyali

- Sefadeks LH- 20 Kolon dolgu materyali
- Silika jel 60 F254 İnce Tabaka Kromatografisi plağı
- 2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasit(Trolox)
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonikasit) diamonyum) (ABTS),
- Askorbik asit
- 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoliumbromid (MTT)
- Mueller Hinton Besiyeri (MHB, Difco)
- Sabouraud Dekstroz Agar
- Mueller Hinton Agar (MHA,Oxoid)
- Kersetin
- McCoy's 5A medium
- Streptomisin ve glutamin

2.2.2. Çözücüler

- Hekzan
- Etil asetat
- Metanol
- Petrol eteri
- Diklorometan
- Aseton

- Kloroform
- Asetonitril

2.2.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

- Laminar flow kabin
- Rotavapor
- Isıtıcı
- Ultrasonik su banyosu
- Spektrofotometre
- UV lambası
- NMR
- YPSK (Agilent 1100 Serisi)
- Mikroplate okuyucu
- Kuyucuklu mikropipler
- Fungal Çeşitlilik Kit

2.3. Metot

2.3.1. Mantar İzolasyonu ve Saflaştırma

2.3.1.1. Kullanılan Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanışı

Besiyeri için Çizelge 2.1’de belirtilen maddeler karıştırılmış ve daha sonra otoklav cihazında 121°C’de 20 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri soğutulmuş, steril laminar kabin içerisinde petri kaplarına aktarılmıştır. Petri kaplarındaki besiyerinin donmasının ardından kullanıma hazır hale gelmiştir.

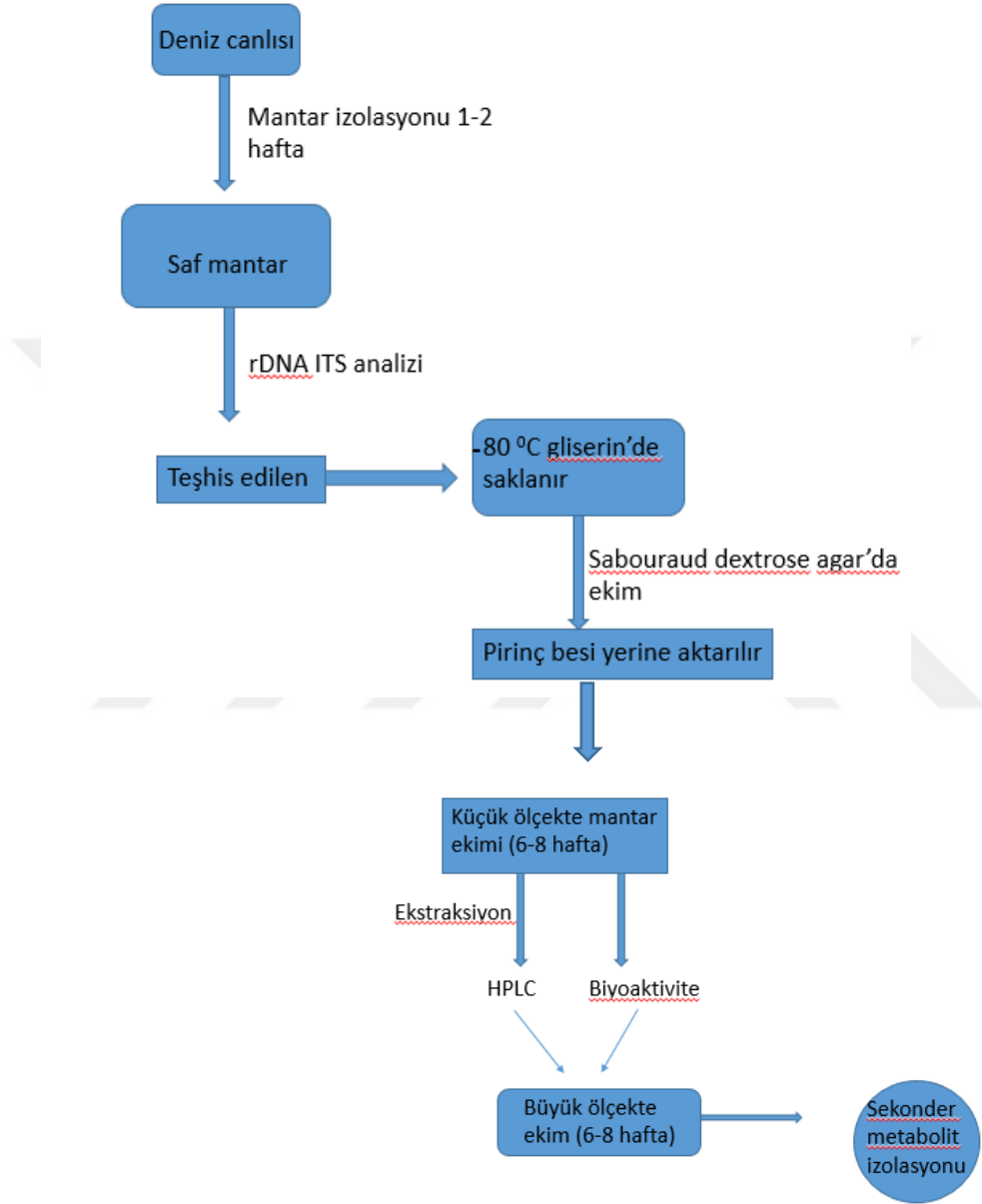
Çizelge 2.1. Besiyeri için kullanılan maddeler

Sabouraud Dextrose Agar	65 g
Deniz Tuzu	35 g
Distile Su	1000 ml' ye tamamlanır.

2.3.1.2. Mantar İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan mantar *Rhizopus oryzae*, denizden toplanan süngerin dış yüzeyinden yaklaşık 1x1 cm küçük parçalar kesilerek alınmıştır. Steril su ile 3 kez yıkanarak numuneler yüzeyindeki kirliliklerden arındırılmış ardından %70’lik etanol içerisinde 60-120 saniye bekletilerek sterilize edilmiştir. Sonrasında etanol ile sterilizasyonu durdurmak için kesilmiş olan parçalar steril pamuk ile kurutulmuştur. Sterilizasyonu tamamlanmış numune parçaları içinde besiyeri bulunan petri kapları üzerine steril pens ile yerleştirilmiştir. Numune parçalarının iç kısımlarının da

besiyeri ile direkt etkileşimi sağlanmıştır. Petri kaplarının ağız kısmı parafilm ile kaplanıp etiketlenmiş üzerine ismi yazılarak 25°C’de mantar üremesi için 2 hafta inkübatörde bekletilmiştir. İzlenen prosedürün şeması Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. İzlenen prosedürün şeması

2.3.1.3. Mantarların Saflaştırılması

Petri üzerine yerleştirilen bir numuneden birden fazla mantar türü üreyebilmektedir. Bu nedenle petri üzerine yayılmış olan mantarlar, uçları sterilize edilmiş yuvarlak uçlu öze ile taze besiyeri ile hazırlanmış petrilere aktarılmış ve mantarların büyümesi için yaklaşık 7 gün beklenmiştir.

2.3.1.4. Uzun Süreli Saklama

Saf olarak elde edilen mantar daha sonra gerektiğinde tekrar aktive edilmek üzere derin doldurucuda (-80 °C) muhafaza edilmektedir.

2.3.1.5. Mantarın Tür Teşhisi

Mantar kültüründen Biospeedy® Fungal DNA İzolasyon kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların spektrofotometrik kalite kontrolleri yapıldıktan sonra fungal çeşitliliği belirlemek için PCR tabanlı Biospeedy® Fungal Çeşitlilik Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit, fungi genomik DNA'sında ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine özgü olan ileri primer (TCCTCCGCTTATTGATATGC) ve geri primer (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) çiftini ve optimize qPCR (Gerçek Zamanlı PCR) kimyasallarını içermektedir. Bütün reaksiyonlar Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) qPCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış ısı döngüsü programı ve qPCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C-95°C arasında erime eğrisi analizi uygulanmıştır. Sonuçlar q-PCR Biorad CFX Connect Software 3.0'da analiz edilmiştir.

Elde edilen fungal ampikonların sekans dizileri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ile ABI Prism 377 DNA Sequencer’da (Applied Biosystems, USA) belirlenmiştir. Fungal örnek için elde edilen sekans dizileri Chromas software package version 1.45’de analiz edilmiştir. Elde edilen sekansların, NCBI DNA data bankasında ITS bölgesi belirlenmiş bilinen fungal türler ile karşılaştırılmış (BLAST- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve en çok benzeyen türler ile eşleştirilmiştir. Benzerlik oranı $\geq 98\%$ olan türlerin aynı olduğu kabul edilmektedir.

2.3.1.6. Küçük Ölçekte Mantar Ekimi

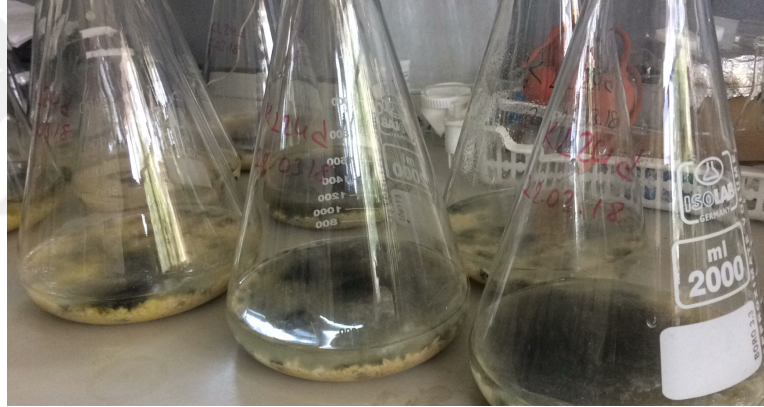
Küçük ölçekte mantar ekimi için Çizelge 2.2’de belirtilen maddeler kullanılarak katı bir besiyeri oluşturulmuştur. Besiyeri 3 adet 1 litrelik erlende hazırlanmış, hazırlanan besiyerleri ağızları kauçuk tıpa ile kapatıldıktan sonra otoklovda 121°C’de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. SDA besiyeri ile hazırlanmış petrilere -80°C’de saklanan mantar örneğinden ekim yapılmış, büyümeleri için 1 hafta süreyle beklenmiştir. Büyüyen mantarlar katı besiyeri içeren erlenlere aktarılmış ve mantarların yeterli büyüklüğe erişip metabolit üretimini gerçekleştirebilmeleri için, erlenler ışıktan uzak serin bir ortamda 4 hafta süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda erlenlerin içinde bulunan mantarlar etil asetat ile ekstre edilmiştir. Küçük ölçekli ekimden elde edilen bu ekstrelerin İnce Tabaka Kromatografisi ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile analizleri gerçekleştirilmiştir

Çizelge 2.2. Kullanılan katı besiyeri

Pirinç	100 g
Deniz tuzu	3,5 g
Distile Su	110 ml

2.3.1.7. Büyük Ölçekte Mantar Ekimi

Bunun için ilk olarak SDA besiyeri ile hazırlanmış petrilere derin dondurucuda muhafaza ettiğimiz mantardan ekim yapılmış ve büyümesi için yaklaşık olarak 1 hafta beklenmiştir. Büyük ölçekte ekim için, 2 lt'lik 60 erlene pirinçli katı besiyeri hazırlanıp aktarılmış ve 121°C ' de 20 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri soğuduktan sonra, petrideki mantarlar besiyeriyle birlikte steril bir çubuk yardımıyla kesilip pirinç besiyerine aktarılmıştır. Ağzı kauçuk tıpayla kapatılıp oda sıcaklığında ayrı bir odada büyümeye bırakılmıştır. Büyümeleri kontrol edilerek 4 hafta sonunda ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Şekil 2.2'de büyümekte olan mantarların görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.2. Pirinçli katı besiyerine ekilen ve büyümesi beklenen mantarlar

2.3.2. Ekstraksiyon

Mantar miselyumlarını içeren kültür ortamı küçük parçalara ayrılmış ve mantarların üzerini geçecek şekilde etil asetat eklenmiştir. Optimum ekstraksiyon için, miselyumlar etil asetat içerisinde 1 gün bekletilmiştir. 24 saat sonunda her bir erlen 20-30 dakika çalkalayıcı cihazda ekstre edilmiştir. Daha sonra her bir erlen içerisindeki etil asetat büyük bir kaba boşaltılıp süzölmüştür. Mantarların optimal

ekstraksiyonu için bu işlemi 4 kez tekrarlamak yeterli olmuştur. Toplanan etil asetatlı ekstre rotavaporda 38°C'de yoğunlaştırılmıştır.

2.3.3. İzolasyon

Elde edilen 78 gram ekstre vakum sıvı kromatografi yöntemiyle fraksiyonlarına ayrılmış olup daha sonra ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi ve YPSK gibi kromatografik yöntemlerle izolasyon işlemine geçilmiştir.

2.3.3.1. Kromatografik Yöntemler

2.3.3.1.1. Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK)

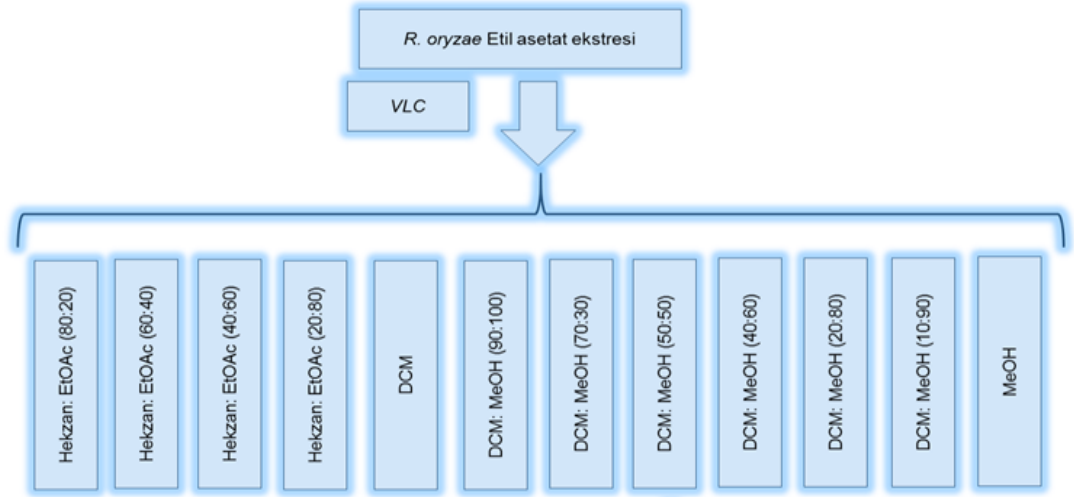
VSK büyük miktardaki ekstrelerin ilk izolasyon adımı olarak kullanılan yararlı bir yöntemdir. Aparatın alt kısmında özel filtresi bulunmaktadır. Kolona silika jel (70-230 mesh) kuru halde doldurulup başlangıç gradient sistemi ile kolona oturtulmuştur. Daha sonra üzerinden büyük ölçekli ekim sonucu elde edilen ham ekstre 1:1 oranında silikayla karıştırılarak kolonun üst kısmına tatbik edilmiştir. Hekzan-etil asetat ve diklorometan-metanol çözücülerini sırasıyla ve farklı oranlarda uygulanmış ve fraksiyonlama işleme gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.4'te ham ekstrenin vakum sıvı VSK uygulaması gösterilmiştir.

VSK kolonun özellikleri: Kolon çapı: 10 cm

Dolgu uzunluğu:30 cm

Dolgu maddesi: Silika jel 60

78 gram ekstre vakum sıvı kromatografi yöntemiyle 13 fraksiyona ayrılmıştır. Bu fraksiyonlar rotavapor ve çeker ocak altında kurutulmuştur. Çizelge 2.3'te her bir fraksiyonun miktarı ve elde edildiği çözücü karışımı verilmiştir.



Şekil 2.3. VSK'den elde edilen fraksiyonlar

Çizelge 2.3. Elde edilen VSK fraksiyonları ve miktarları

Fraksiyon	Hekzan mL	Etil asetat mL	Fraksiyon miktarı g
1	100	0	7,215
2	80	20	0,7333
3	60	40	2,5607
4	40	60	3,1544
5	20	80	9,378
	Diklorometan mL	Metanol mL	
6	100	0	3,9096
7	90	10	0,2861
8	70	30	0,0102
9	50	50	12,3647
10	40	60	18,0345
11	20	80	3,2368
12	10	90	1,7127
13	0	100	2,4222



Şekil 2.4. Ham ekstrenin vakum sıvı kromatografisi (VSK) uygulaması

2.3.3.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK analizi için, analizi yapılacak ekstreden çok az miktarda alınarak uygun bir çözücü ile ultrasonik banyo yardımıyla çözülmüştür. Ekstrelerin çözülmesi sağlandıktan sonra İTK plaklarına kılcal boru yardımıyla uygulama yapılmıştır. Plaklar, uygun solvan sistemiyle doyurulmuş olan tankın içerisine yerleştirilmiş ve solvan sistemi plak üzerinde yürütülmüştür. Solvan sistemi plağın uç kısmından birkaç cm aşağıya geldiğinde plak tanktan çıkarılmış, 254 ve 366 nm UV ışık altında incelenmiştir.

Kullanılan plak: Hazır kaplanmış alüminyum plak (Merck 5715)

Adsorban: Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

Lekelerin gözlenmesi: UV_{254, 366}; anisaldehit reaktif çözeltisi (100-110°C'de 1-2 dakika ısıtılmıştır.)

Kullanılan solvan sistemleri: Genel olarak kullanılanlar aşağıda verilmiştir;

- Polar bileşikler için: EtOAc:MeOH:H₂O (30:5:4, 30:6:5 ve 30:7:6)

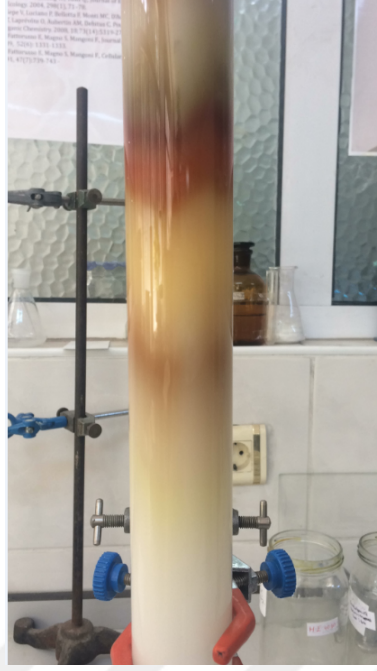
- Semi-polar bileşikler için: DCM:MeOH (95:5, 90:10, 85:15, 80:20 ve 70:30)
DCM:MeOH:EtOAc (90:10:5, and 80:20:10)
- Non-polar bileşikler için: n-Hekzan:EtOAc (95:5, 90:10, 85:15, 80:20 ve 70:30)
- n-Hekzan:MeOH (95:5 ve 90:10)

Sefadeks kolona uygulanmış her fraksiyonun İTK solvan sistemi bulgular kısmında belirtilmiştir.

2.3.3.1.3. Kolon Kromatografisi

Elde edilen fraksiyonlar YPSK analiz sonuçlarına göre incelenmiş ve kolon kromatografisine uygulanacak olanlar seçilmiştir. Fraksiyon seçimleri miktara ve YPSK profiline göre yapılmıştır. Bir miktar sefadeks alınıp bir beher içerisinde metanol ile karıştırılmıştır. Ardından kolona yerleştirilmiş ve üzerinden metanol akışı sağlanarak sefadeksin hazırlanma işlemi tamamlanmıştır. Bu ekstratlar sefadeks dolgu maddesi ile doldurulmuş olan kolona uygulanmıştır. Solvan sistemi olarak metanol kullanılmıştır. Buradaki temel prensip, molekül büyüklüğüne göre ayırmadır. Buna göre molekül büyüklüğü büyük olanlar ilk önce daha küçük molekül büyüklüğüne sahip olanlar daha sonra çıkacaktır. Şekil 2.5'te diklorometan:metanol 50:50 fraksiyonunun kolon kromatografisi uygulaması gösterilmiştir.

- Dolgu malzemesi: Sefadeks LH- 20 (Sigma Aldrich)



Şekil 2.5. Diklorometan: metanol 50:50 fraksiyonunun kolon kromatografisi uygulaması

2.3.3.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

YPSK, bileşikleri karmaşık karışımlardan ayırmak için kullanılan güvenilir, çok yönlü ve hızlı bir tekniktir. Çalışmamızda gradient yöntem, analitik ve semipreperatif C-18 kolonları (sabit faz) kullanılmıştır. Tüm fraksiyonlara uygulanan genel gradient çözücü sistemi Çizelge 2.4’te verilmiştir (Her metabolit izolasyonunda bu sistem modifiye edilmiş ve ilgili bölümde belirtilmiştir.)

Analiz şartları;

YPSK sistemi: Agilent 1200 Series

Pompa: Agilent quadpump

Dedektör: UVD 340 S – Photo DiodeArrayDedector, Dione

Programın adı: Chem Station

Analitik kolon: Eclipse XDB-C18 (150 x4,6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü)

Semipreperatif kolon: Eclipse XDB-C18 (250 x 9,4 mm, 5 µm partikül büyüklüğü)

Mobil faz: Metanol-su

Enjektör: Otosampler

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Akış hızı: Analitik kolon için: 1 ml/dak

Semipreparatif kolon için her maddenin ilgili bulgular kısmında ayrı ayrı verilmiştir.

Analitik YPSK sistemi diyot array dedektörü (UV-Vis) ile kombine bir sistemdir. Rutin deteksiyon 235, 254, 280, 320 nm dalga boylarında yapılmış olup, örnekler metanolde (likit kromatografiye uygun) çözülmüştür. YPSK kolonuna partiküllerin zarar vermemesi için karışım önce süzülüp sonra YPSK analizi yapılmıştır. Çözücü olarak fosforik asit (%0,02) içeren su ve metanol gradient olarak kullanılmıştır.

VSK sonucunda elde edilen fraksiyonlar YPSK ile analiz edilmiş ve izolasyon için uygun olanlar belirlenmiştir. Sekonder metabolit izolasyonu için semi-preperatif kolon kullanılmıştır. İzolasyon işleminde kullanılacak çözücü sistemleri denemeler sonucu bulunmuştur ve gradient çözücü sistemi kullanılmıştır. Organik çözücü olarak metanol, asetonitril ve ultra saf su kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Analitik YPSK’de fraksiyonları ve saf olarak izole edilen maddeleri analiz etmek için kullanılan genel çözücü sistemi ve gradient sistem (Akış hızı: 1 ml/min)

Zaman (Dakika)	Su+ 0.02% Fosforikasit, pH 2	Metanol (%)
0	90	10
5	90	10
35	10	90
45	10	90
50	90	10
60	90	10

2.3.3.2. Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) Spektrometrisi

Örneklerin tek boyutlu (^1H - and ^{13}C -NMR), iki boyutlu (^1H , H COSY, ^1H , C- bağlantılı HMBC ve HMQC gibi) spektroskopik analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar, literatür verileri ile karşılaştırılarak izole edilen maddenin yapısının aydınlatılması sağlanmıştır.

2.3.4. Biyoaktivite Çalışmaları

Biyoaktive çalışmaları için küçük ölçekli ekim sonucu elde edilen ekstreden antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite testleri yapılmıştır.

2.3.4.1. Antioksidan aktivite

2.3.4.1.1. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini

DPPH üzerinden radikal süpürücü aktivite tayini, doğal ekstrelerin antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir metottur. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir.

Serbest radikal süpürücü aktivite tayini 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) kullanılarak yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5; 156,25; 78,125 $\mu\text{g/ml}$ hazırlanan örnekler) (50 μl) mikropate kuyucuklarına konulmuş ve her örneğin üzerine 150 μl DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. 30 dakika 37°C ve karanlıkta inkübe edildikten sonra Dimetil sülfoksit (DMSO) ile oluşan köre karşı 517 nm’de absorbansları ölçülmüştür. DMSO iyi bir çözücü olduğu için örnekleri çözmede kullanılmıştır. Örnekler DMSO’da çözüldüğü için kör çözelti olarak DMSO kullanılmıştır. Ekstrelerde kullanıldığı orandaki DMSO üzerine de DPPH eklenmiş ve absorbansı ölçülmüştür. Azalan absorbans geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal süpürücü

aktivitesini vermiştir. Tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır (Shirwaikar ve ark., 2006). Sonuçlar standart olarak kullanılan askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans kontrol} - \text{Absorbans örnek}) / \text{Absorbans kontrol}] \times 100$$

Değerler IC₅₀ olarak değerlendirilmiştir.

2.3.4.1.2. Alkalın DMSO yöntemiyle Süperoksit radikal süpürücü aktivitesinin tayini (SO)

Alkalın DMSO yöntemi deney ortamında, DMSO (Dimetil sülfoksit) tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitroblue tetrazolium) ile renkli diformazan bileşiği oluşturmaya dayanmaktadır. Bu yöntem de 1 mL alkalın DMSO (0,9 ml DMSO + 0,1 ml 5 mM NaOH) üzerine 0,1 mL NBT (1mg/ml) ve 0,3 mL farklı konsantrasyonlarda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5; 156,25; 78,125 µg/ml) ekstre ilave edilip ve son hacimin 1,4 mL olmasına dikkat edilerek 560 nm’de absorbans ölçülmüştür (Harput ve ark., 2011). Sonuçlar standart olarak kullanılan askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans kontrol} - \text{Absorbans örnek}) / \text{Absorbans kontrol}] \times 100$$

Değerler IC₅₀ olarak değerlendirilmiştir.

2.3.4.1.3. Nitrik oksit radikal süpürücü aktivitesinin tayini (NO)

Ekstreden farklı konsantrasyonda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625,312,5, 156,25, 78,125 µg/mL) 60 µl 96'lık plaklara konulmuştur. Ekstrelerin üzerine 60 µl sodyum nitroprusit (10 mM) ilave edilip ve 25 °C de 150 dakika

bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 120 µl Griess reaktifi (%1 sülfanilamit, %0,1 naptiletilen diamin dihidroklorit, %2,5 H₃PO₄) eklenmiş ve 577 nm’de absorbansları ölçülmüştür (Harput ve ark., 2011). Sonuçlar IC₅₀ şeklinde hesaplanmış ve standart olarak kullanılan askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırılmıştır.

2.3.4.1.4. ABTS Radikali süpürücü aktivitesinin tayini

ABTS radikali, 7mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturulmuştur. 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Kullanmadan önce metanol ile (pH=7,4), absorbans 734 nm’de 0,7±0,025 olacak şekilde seyreltilmiştir. 25 µL farklı konsantrasyonlarda (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625; 312,5; 156,25; 78,125 µg/ml) örneklerden kuyucuklarda (96’lık-eliza plate) hazırlanmış ve her örneğin üzerine ABTS*+ çözeltisinden (275 µL) ilave edilmiştir. Örneklerin absorbansları 734 nm’de 1-6 dakika süresinde okunmuştur. Elde edilen sonuçlar hem IC₅₀ olarak hem de Troloks eşdeğerine karşı elde edilmiştir. Troloks eğrisini elde etmek için 8 farklı konsantrasyon (2,45; 1,22; 0,612; 0,306; 0,153; 0,076; 0,03; 0,01 mM) Troloks çözeltisi hazırlanmış ve 25 µl her konsantrasyon üzerine 275 µL ABTS çözeltisi eklenmiş, absorbans 734 nm’de okunmuştur. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde standart olarak Trolox kullanılmıştır. Deneyler üç tekrarda yapılmıştır (Huang ve ark., 2011). Sonuçlar standart olarak kullanılan askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırılmıştır.

2.3.4.2. Antimikrobiyal Aktivite

Antibakteriyel ve antifungal aktivite araştırmaları, bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853 *Klebsiella pneumoniae*

RSKK 574, maya olarak *Candida albicans* 10231 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 standart kökenlerinde elde edilen ekstrelerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) tespit edilerek yapılmıştır. Ekstreler dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde uygun konsantrasyonda çözüldü ve DMSO uyumlu membran filtrelerden süzülerek steril hale getirilmiştir. MİK tayini, EUSCAST standartlarına göre, 96-kuyucuklu U-tabanlı mikropalakalarda, mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Buna göre deneylerde bakteriler için Mueller-Hinton Broth (MHB), mantarlar içinse Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri kullanılmıştır. Mikropalakalarda, uygun besiyeriyle, 50'şer µL hacimlerde ekstrelerin seri dilüsyonları yapılmıştır. Sonrasında, serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland yoğunlukta elde edilen bakteri süspansiyonları MHB içerisinde 100 kat, mantar süspansiyonları ise RPMI 1640 içerisinde 10 kat dilüe edilerek inokulumlar hazırlandı. Hazırlanan inokulumlar, seri dilüsyonların yapıldığı mikropalaka kuyucuklarına eşit hacimde (50'şer µL) eklendi. 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyonun ardından mikropalakalar görsel olarak değerlendirilerek, her bir ekstre için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir (ISO 20776-1:2006 ve EUCAST E.DEF 7.32015).

2.3.4.3. Sitotoksite aktivitesi (MTT testi)

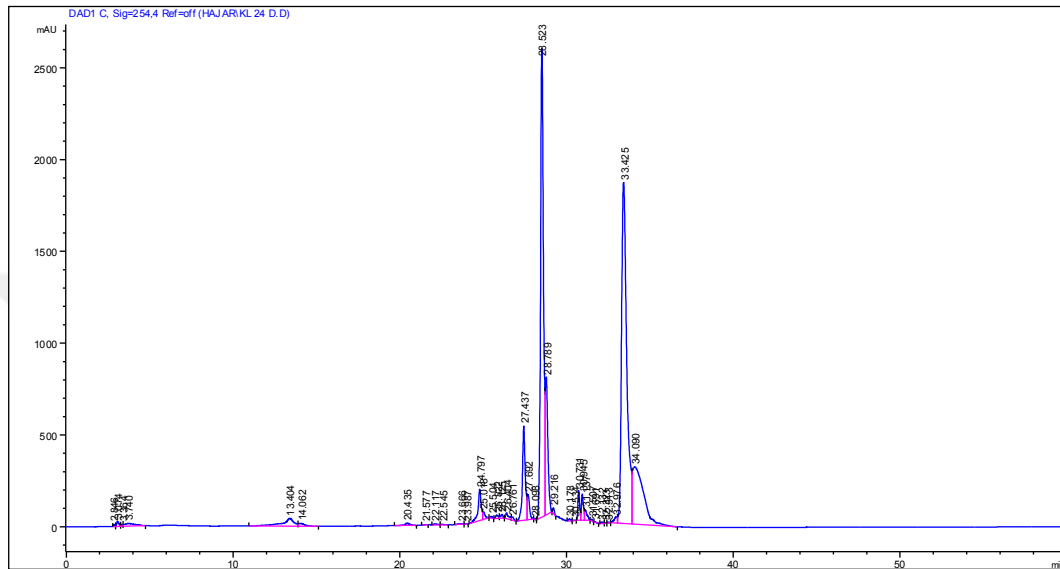
Mantar ekstrelerinin sitotoksik etkinliklerinin ölçülmesinde Mossman tarafından geliştirmiş olan ölçüm metodu kullanılmıştır. HCT-116 kolon kanseri hücreleri (2×10^4 hücre / kuyucuk) 96'luk ve 39'luk plaklara ekilmiştir. %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra, kuyucuklardaki besiyeri değişik konsantrasyonlardaki (1-2000 µg/mL) ekstre çözeltilerini içeren taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler, ekstreler ile 24 saat inkübe edildikten sonra, her bir kuyucuktaki besiyeri aspire edilmiştir. Stok MTT solüsyonu 5 mg/mL konsantrasyonda fosfat tampon çözeltisinde (PBS) hazırlanmıştır ve kuyucuklara eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi MTT'yi mor renkli

formazan yapısına indirgemıştır. Süre sonunda kuyucuklara, oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak amacıyla 100'er µL DMSO ilave edilmiş ve 550 nm'de absorbanslar okunmuştur. Sonuçlar IC50 şeklinde değerlendirilmiştir (Mosmann, 1983).



3. BULGULAR

3.1. Mantarın ham ekstresinin YPSK Analiz Sonucu



Şekil 3.1. *Rhizopus oryzae* ham ekstresinin analitik YPSK kromatogramı

Şekil 3.1’de ham ekstresnin genel gradient sistemi kullanılarak gerçekleştirilen YPSK analiz sonucu verilmiştir.

3.2. Biyoaktivite Sonuçları

Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te *Rhizopus oryzae* ham ekstresinin biyoaktivite sonuçları sunulmuştur.

Çizelge 3.1. *Rhizopus oryzae* ekstresinin askorbik asit ve kersetin ile karşılaştırmalı antioksidan aktivite sonuçları

KOD	IC ₅₀ (µg/mL) ±SD				
	DPPH	SO	NO	ABTS	TEAC (mMTrolox/mg Extract)
KL24 d <i>Rhizopus oryzae</i>	7413,1± 1,64	7585.77 ± 0,72	7861,05 ± 0,99	5984,11 ± 1.87	0.0118 ± 1.87
Askorbik asit	5,72 ± 0,89	8,52 ± 0,78	10,12±0,19	8,21± 0,91	-
Kersetin	7,04 ± 0,94	10,11 ± 0,28	13,18±0,15	11,1±0,23	-

Yapılan antioksidan aktivite testlerinde DPPH, SO, NO ve ABTS metotları kullanılmış olup hiçbir metotta antioksidan aktivite gözlenmemiştir. Tüm hesaplamalar ED50plus v1.0 software kullanılarak yapılmıştır. Doğal kaynaklı bir ürünün ekstresi ile çalıştığımızdan yine doğal antioksidanlarla karşılaştırma yapılmıştır.

Çizelge 3.2. *Rhizopus oryzae* ekstresinin kamptotesin ile karşılaştırmalı sitotoksik aktivite sonucu (HCT116 hücre serisi)

Mantar (EtOAC ekstresi)	IC ₅₀ (µg/ml) ±SD
<i>Rhizopus oryzae</i> KL24 d	16,7 ± 1,5
Kamptotesin	0,305± 0,078

Kamptotesin ile karşılaştırmalı olarak yapılan HCT-116 hücre hattında sitotoksik aktivite tayini sonucunda 16,7 µg/ml IC₅₀ değeriyle orta düzeyde sitotoksik aktivite tespit edilmiştir. Kamptotesin seçilmesinin nedeni kolon kanseri tedavisinde standart olarak kullanılmasıdır. IC₅₀ değerlerinin hesaplanması için GraphPad Prism 7.0 software programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. *Rhizopus oryzae* ekstresinin siprofloksasin ve mikonazol ile karşılaştırmalı antimikrobiyal aktivite sonuçları

MİK sonuçları (8 seri dilüsyon ile) µg/µL

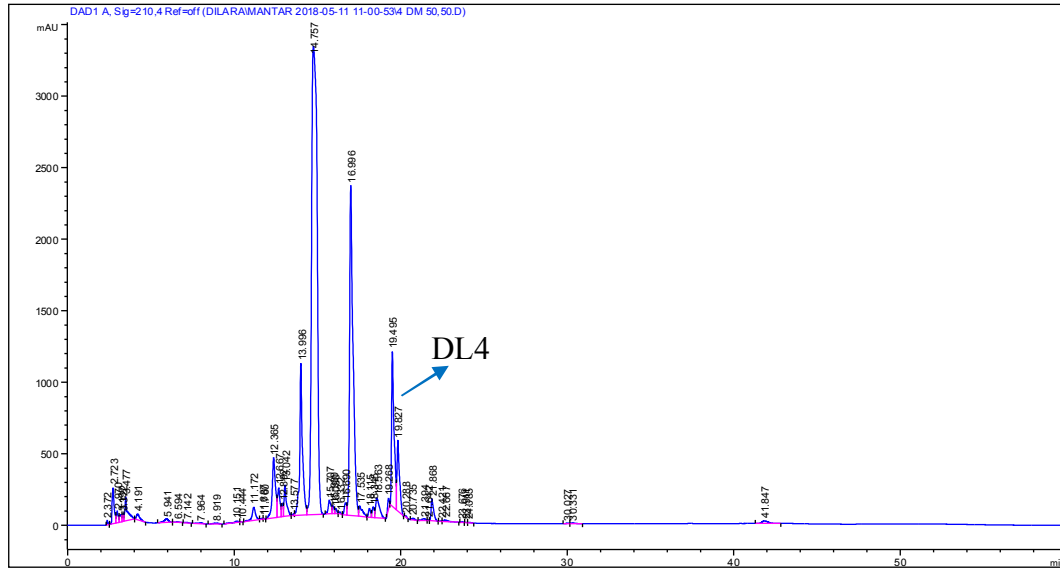
Mantarlar ve kodu	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RSKK 574	<i>Candida albicans</i> 10231	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
KL24d <i>Rhizopus oryza</i>	31,25	125	500	500	500	1000	1000	1000	1000
Siprofloksasin	1,25	0,625	0,078	0,078	0,009	0,625	0,039	*	
Mikonazol	*	*	*	*	*	*	*	1,56	0,78

Yapılan antimikrobiyal aktivite testinin sonucuna göre *Rhizopus oryzae* ekstresinin *Staphylococcus aureus*'a (ATCC 25923) karşı 31,25 µg/µL değeriyle kayda değer antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Sonuçların karşılaştırmasında kullanılan siprofloksasin tüm bakterilere etki ettiğinden ve klinikte kullanılan standartlardan arasında olduğu için tercih edilmiştir. Aynı şekilde mikonazol de antifungal olarak klinikte sıkça kullanılan bir imidazol türevidir.

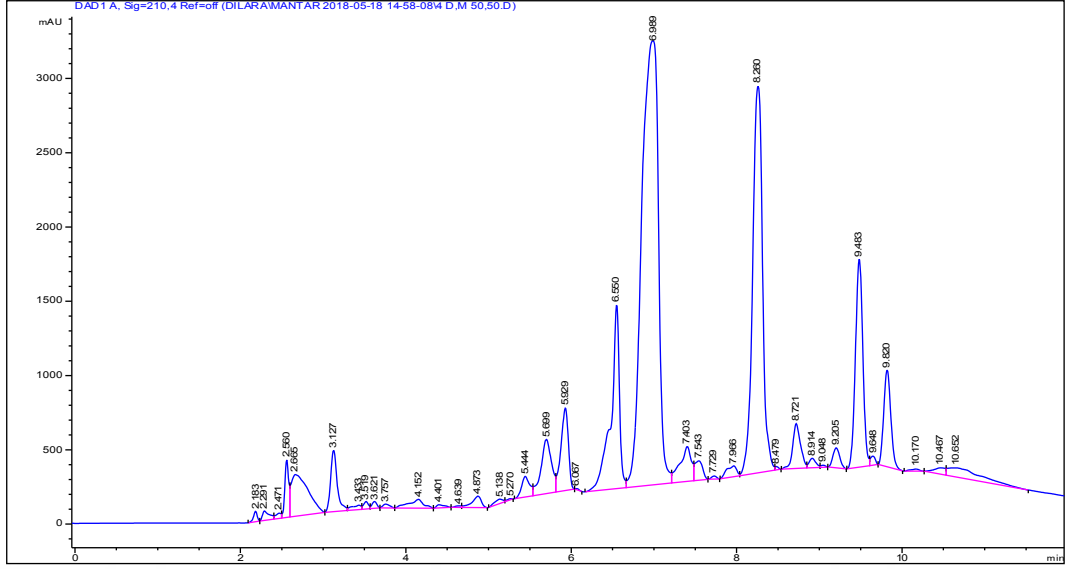
3.3. *Rhizopus oryzae* mantarından elde edilen sekonder metabolitler

3.3.1. Penicacid K (Penik asit K-DL4)

VSK sonrası elde edilen fraksiyonlar YPSK ile analiz edilmiştir. YPSK'dan elde edilen kimyasal profiline ve miktarına göre ilk olarak Diklorometan:Metanol 50:50 fraksiyonu ile çalışılmaya karar verilmiş ve bu fraksiyon sefadeks kolona uygulanmıştır. Kolon kromatografisi (sabit faz: sefadeks, hareketli faz: metanol) sonucu elde edilen fraksiyonların İTK analizleri yapılarak [çözücü sistemi kloroform:metanol (9:2)] bazı fraksiyonlar birleştirilmiş ve 13 alt fraksiyon elde edilmiştir. Sekonder metabolit izolasyonu için sadece Fr4 seçilmiştir. Bu fraksiyonun YPSK'deki pik ayrımı, pik sayısı ve miktarı göz önüne alınarak çalışılmaya karar verilmiştir. Diğer fraksiyonların miktarları az olduğu için çalışılmamıştır. Şekil 3.2'de Fraksiyon 4'ün analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK analiz sonucu verilmiştir.



Şekil 3.2. Diklorometan:Metanol 50:50 Fraksiyon 4'ün YPSK kromatogramı



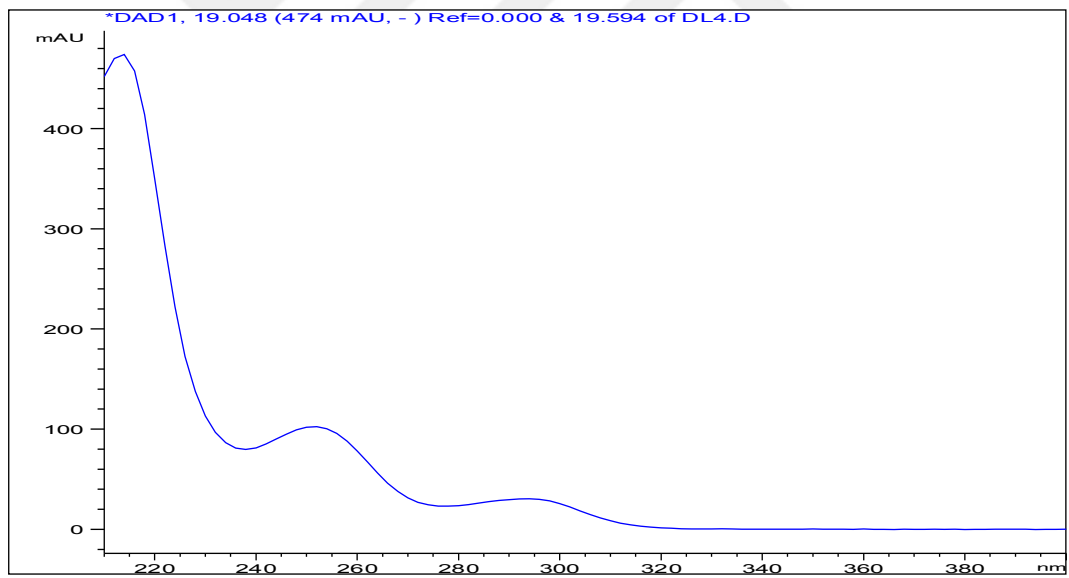
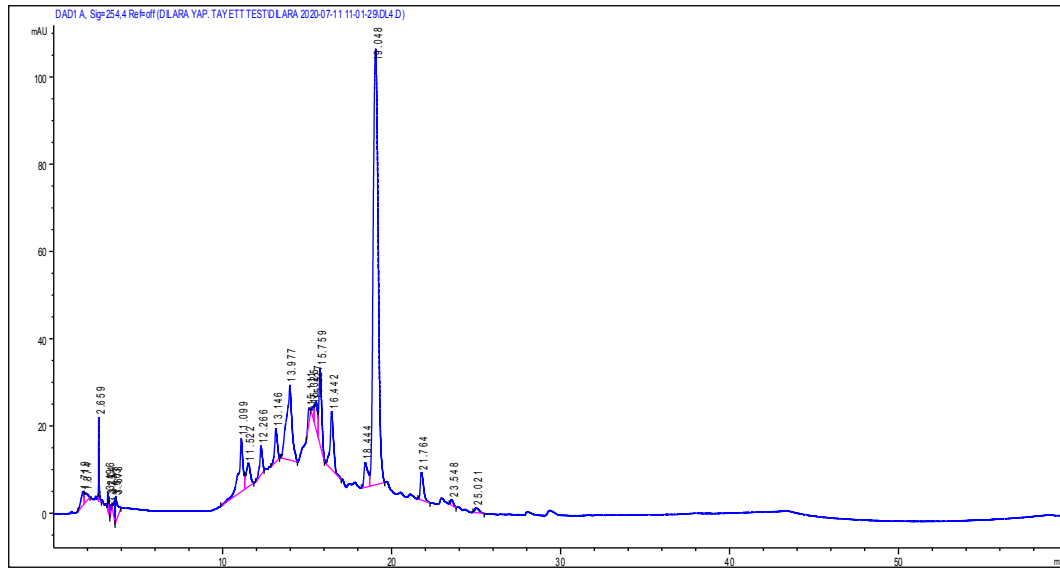
Şekil 3.3. Semipreparatif YPSK’de Diklorometan:Metanol 50:50 Fraksiyon 4’ün kimyasal profili

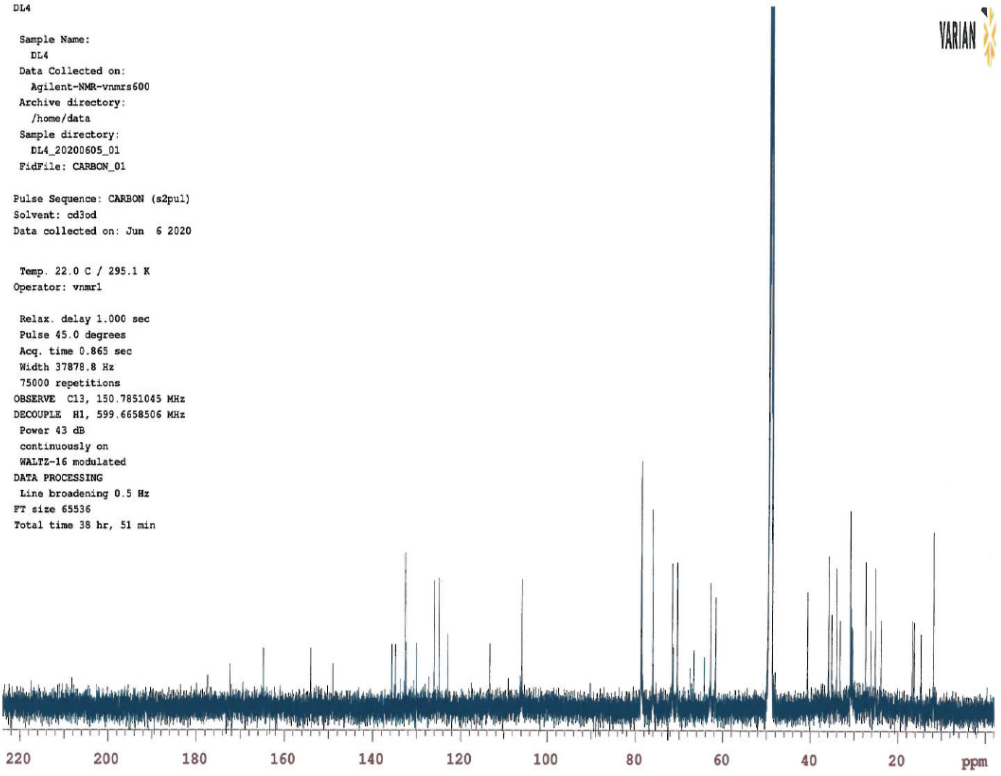
Çizelge 3.4. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK’de kullanılan gradient sistem

Zaman (dk)	Ultra Saf Su (%)	Metanol (%)	Akış Hızı (ml/dk)	Enjeksiyon hacmi
0	90	10	4.000	40 µl
3	70	30	4.000	
8	50	50	4.000	
12	90	10	4.000	

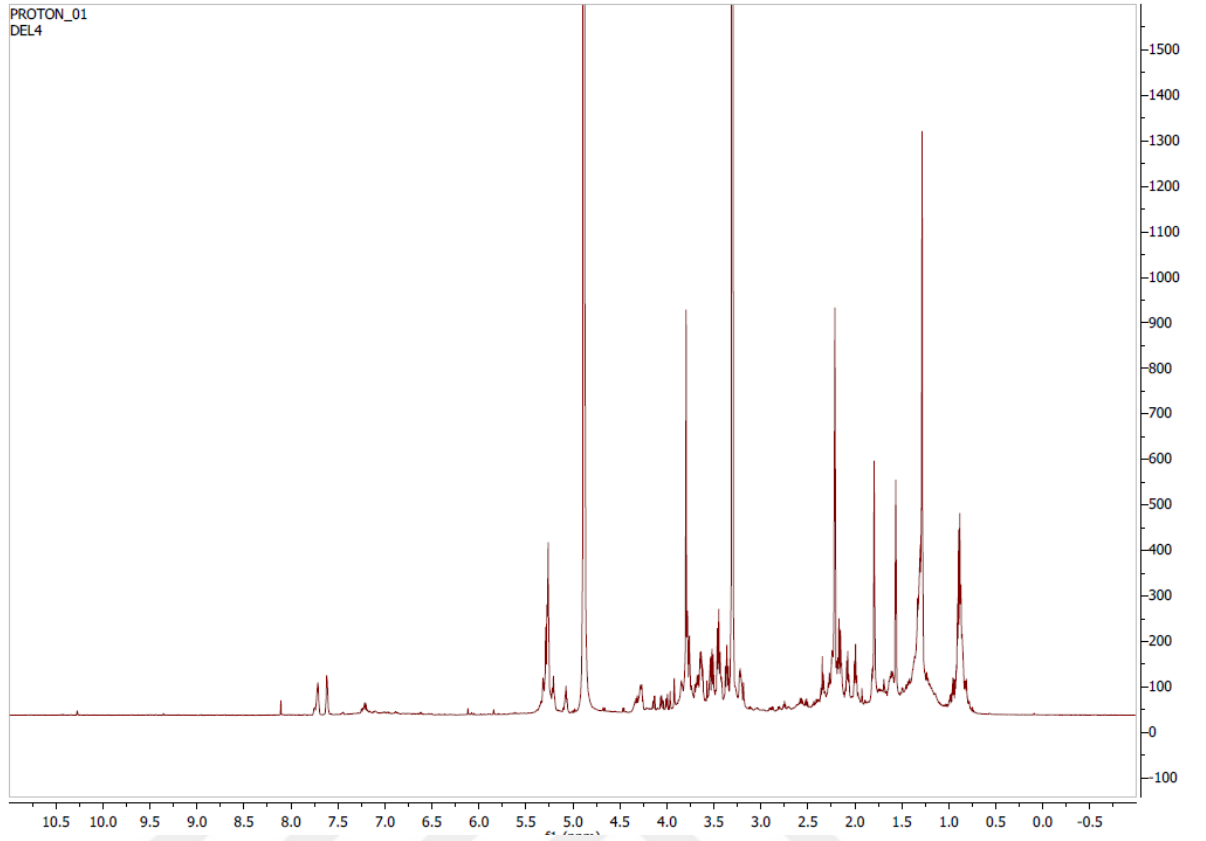
Semipreparatif kolon ve Çizelge 3.4’te belirtilen gradient sistem kullanılarak gerçekleştirilen YPSK analiz sonucu Şekil 3.3’te verilmiştir. Fr4’te beş farklı pik gözlemlendi ve bunlardan 1 tanesi saf olarak toplandı. Dakika 9.483’de gözlenen pik DL4 olarak isimlendirildi ve yapı tayini için NMR yapıldı.

Saf olarak izole edilen DL4’ün analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK analiz kromatogramı ve UV spekturumu sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’te sunulmaktadır.

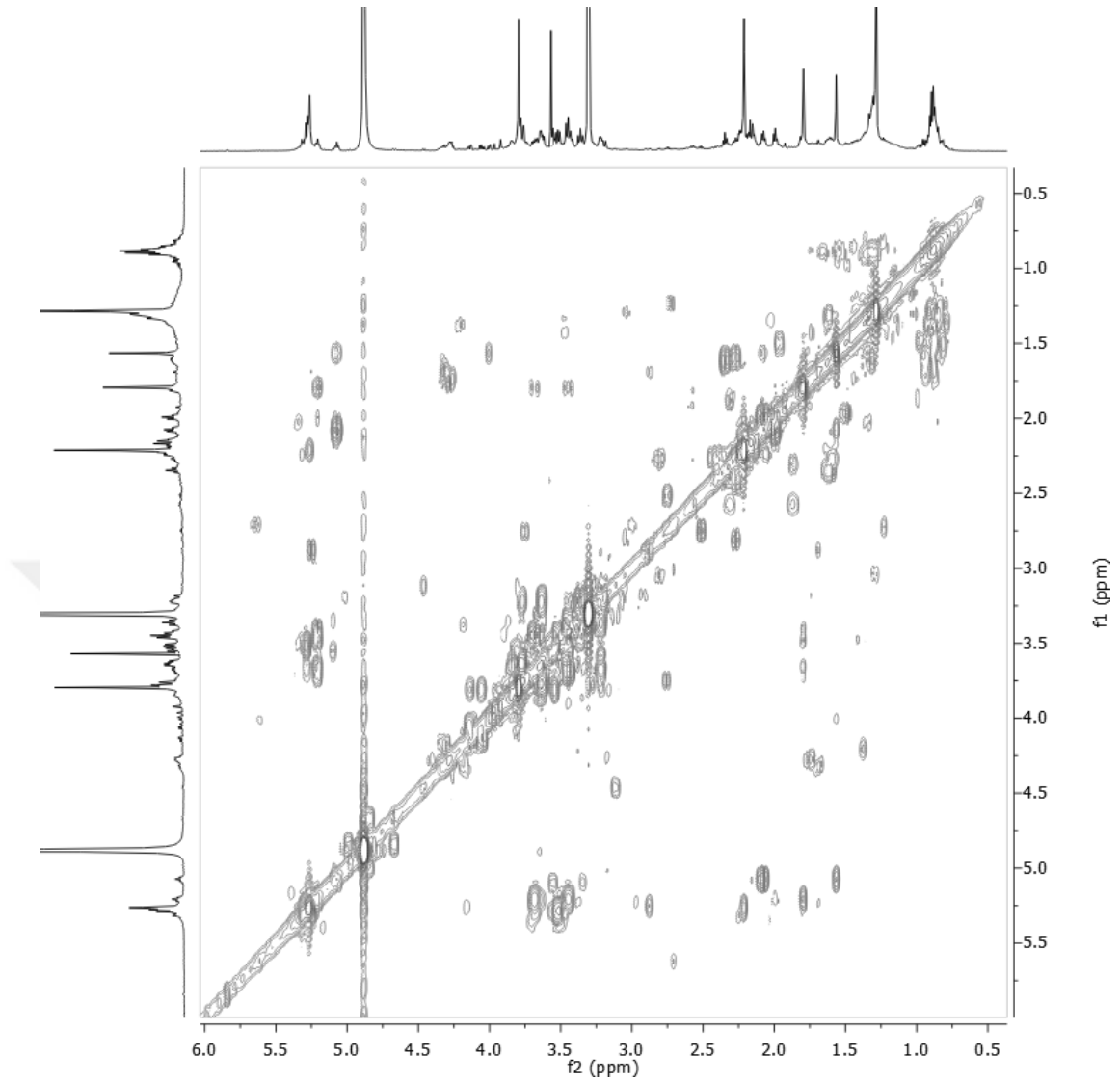




Şekil 3.6. DL4 ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 3.7. DL4'ün ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.8. DL4'ün ^1H - ^1H COSY spektrumu

Şekil 3.6, 3.7 ve 3.8'de NMR spektrumları verilen DL4'ün NMR dataları Çizelge 3.5'te sunulmaktadır.

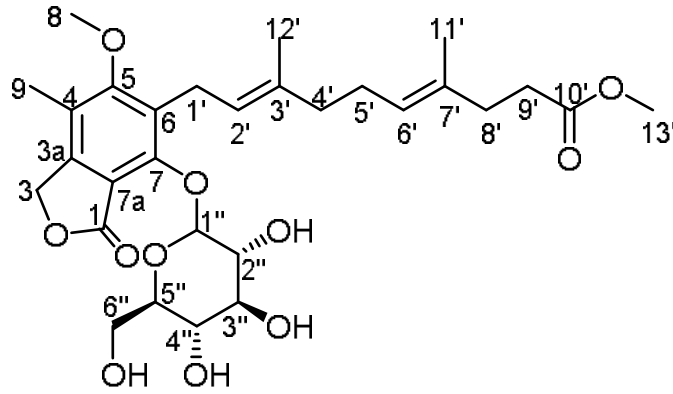
Çizelge 3.5. DL4'ün ^1H ve ^{13}C NMR dataları

Penicacid K in $\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
1		172.2, C
3	5.27, <i>br s</i> (2H)	70.2, CH_2

Çizelge 3.5. Devam

#	δ_H (multi, J[Hz])	δ_C , type
3a		148.8, C
4		122.8, C
5		164.6, C
6		130.9, C
7		153.9, C
7a		113.2, C
8	3.79, s (3H)	61.5, CH ₃
9	2.21, s (3H)	11.6, CH ₃
1'	3.45, dd (9.2, 9.2)	25.0, CH ₂
	3.69, m	
2'	5.22, t (7.1)	124.3, CH
3'		136.6, C
4'	2.00, t (7.4, 2H)	40.6, CH ₂
5'	2.08, t (7.4, 2H)	35.9, CH ₂
6'	5.09, dd (8.8, 7.4)	125.5, CH
7'		134.8, C
8'	2.18, m (2H)	34.0, CH ₂
9'	2.16, m (2H)	35.6, CH ₂
10'		179.0, C
11'	1.56, br s (3H)	16.1, CH ₃
12'	1.79, br s (3H)	16.5, CH ₃
13'	3.57, s (3H)	52.2, CH ₃
1''	5.28, d (7.7)	106.7, CH
2''	3.53, m	75.9, CH
3''	3.22, ddd (9.8, 5.4, 2.2)	78.5, CH
4''	3.37, t (9.0)	71.4, CH
5''	3.45, t (9.0)	78.4, CH
6''	3.64, m	62.7, CH ₂
	3.78, m	

DL4 beyaz renkte amorf bir katı şeklinde izole edilmiştir. DL'4 e ait YPSK kromatogramı 221, 253 ve 299 nm değerlerinde maksimum UV absorpsiyon göstermiştir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi sonuçları incelendiğinde m/z 587.31798'de $[M+Na]^+$ ($C_{29}H_{40}O_{11}Na$ için hesaplanan, 587.31648) ve m/z 563.35525'de $[M-H]^-$ ($C_{29}H_{39}O_{11}$ için hesaplanan, 563.35386) değerlerinde iki tane psödomoleküler iyon piki gözlenmiştir. Bu verilerden hareketle molekül formülü $C_{29}H_{40}O_{11}$ olarak tayin edilmiş ve doymamışlık derecesi 10 olarak tespit edilmiştir. 1H ve ^{13}C nmr spektrumları D2'ye ait verilerle oldukça benzerlik göstermektedir. DL4, D2'den 14 atomik kütle birimi daha fazla kütleyle sahiptir. Bu durum DL4 Bileşiğin δ_C 52.2 ppm'deki karbon rezonansı ile doğrudan korele olan 3.57 konumundaki fazladan bir metoksi grubuyla açıklanmaktadır. İlave metoksi grubunun konumu, δ_C 179.0 ppm'deki (C-10') uç karboksil grubuyla uzun mesafe korelasyon bulunduğunu gösteren HMBC spektrumu aracılığıyla tespit edilmiştir. Yine bu spektrumda bu karboksil grubunun δ_H 2.18 ppm'deki ve δ_H 2.16 ppm'deki iki metilen grubu ile de korele olduğu gözlenmiştir (sırasıyla C-8' ve C-9'). Bu bulgular, ilave metoksi grubunun D2 bileşiğindeki terminal karboksilik asit grubunun metil esteri olduğunu reddedilemez şekilde doğrulamaktadır. Bu sebeple DL4 bileşiği 3-metoksimikofenolik asit 7-O glukopiranozid metil ester türevi olarak adlandırılmış, trivial adıyla penicacid K olarak belirlenmiştir. Şekil 3.9'da bileşiğin kimyasal formülü verilmiştir.



Şekil 3.9. DL4'ün kimyasal formülü

Penicacid K

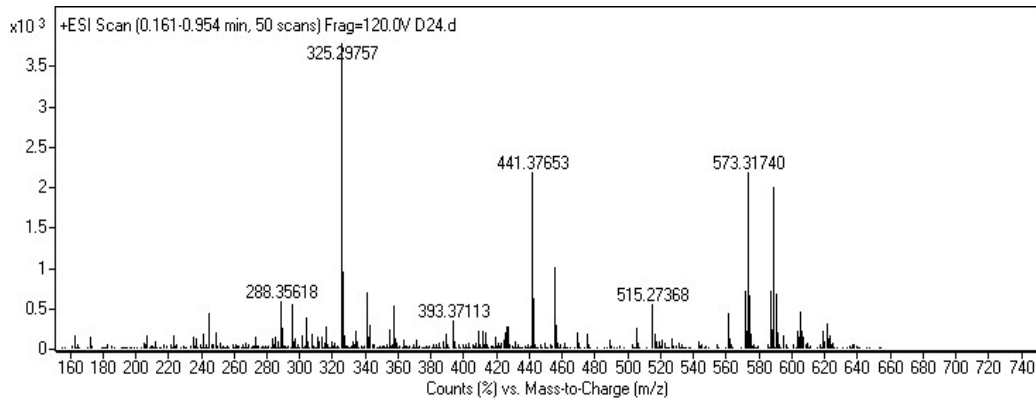
metil (4E, 8E) -10- (6-metoksi-7-metil-3-okso-4 - (((3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) tetrahidro -2H-piran-2-il) oksi) -1,3-dihidroizobenzofuran-5-il) -4,8-dimetildeka-4,8-dienoat

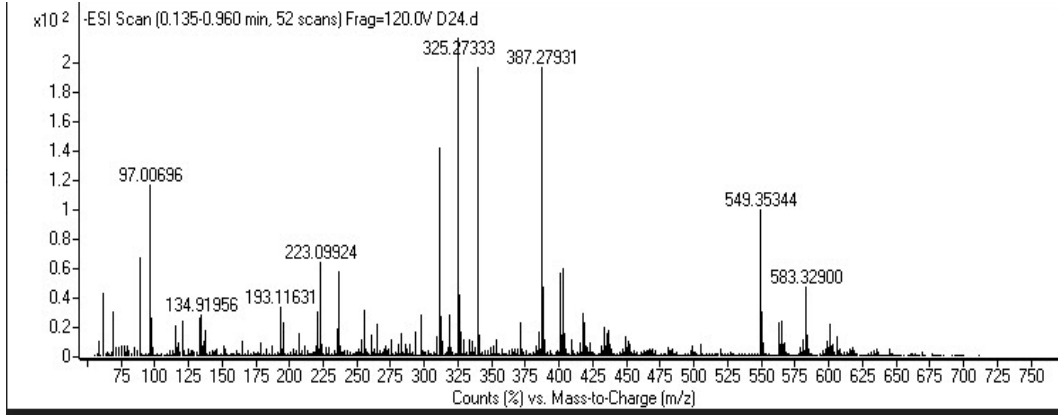
Kimyasal formül: $C_{29}H_{40}O_{11}$

Gerçek ağırlık: 564.25706

Molekül ağırlığı: 564.62800

Semi preparatif kolondan toplanan DL4 pikinin yapısı NMR sonuçları yorumlanarak 3-metoksi mikofenolik asit-7-O-glukopiranosid metil ester türevi (penicacid K) olarak tanımlanmıştır. Sonucun doğruluğunu teyit etmek için DL4, LCMS-TOF ile analiz edildi. Sonuçlar Şekil 3.10'da sunulmaktadır.

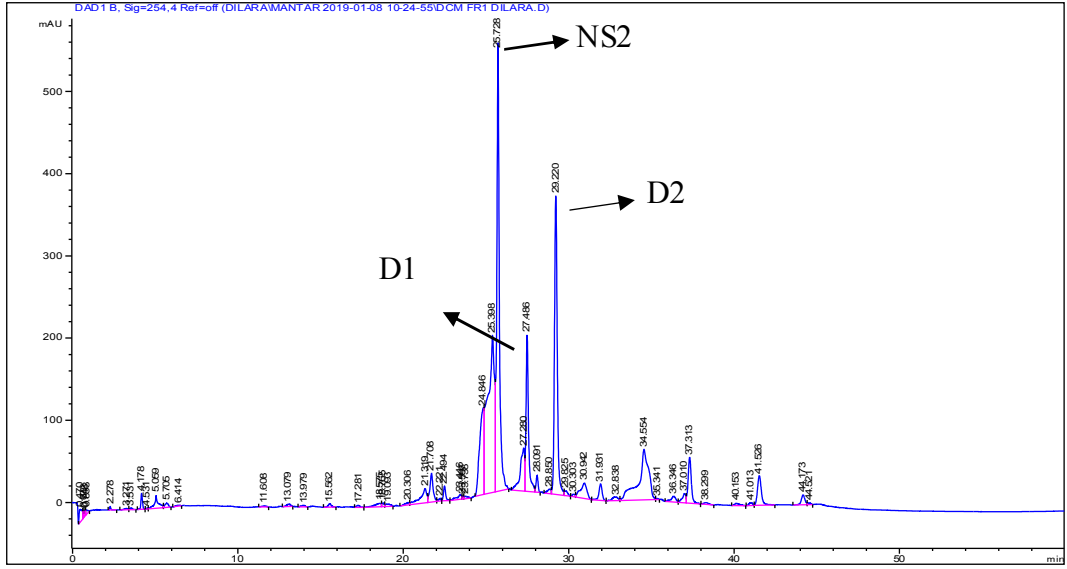




Şekil 3.10. DL4'ün LCMS-TOF analiz sonuçları

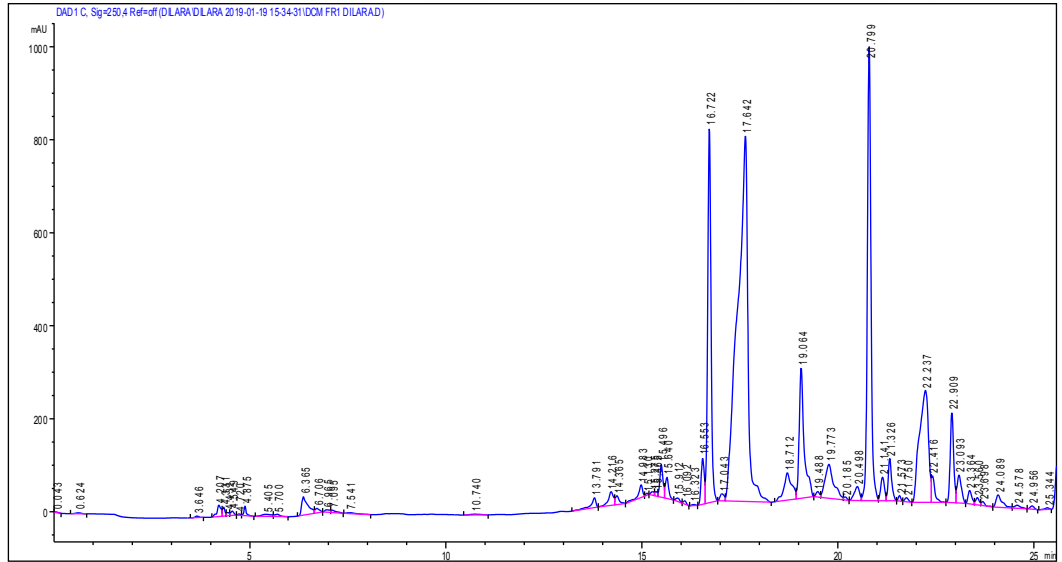
3.3.2. Penicacid J (Penik asit J-D1)

Analitik kolonla genel gradient sistemi kullanılarak yapılan Şekil 3.11'de verilen YPSK analizi sonucu gözlenen kimyasal profiline ve miktarına göre ikinci olarak diklorometan fraksiyonu seçilmiş ve sefadeks kolona uygulanmıştır. Kolon kromatografisi (sabit faz: sefadeks, hareketli faz: metanol) sonucu elde edilen fraksiyonların İTK analizleri yapılarak [çözücü sistemi diklorometan: metanol:etilasetat (8:2:1)] bazı fraksiyonlar birleştirilmiş ve 11 alt fraksiyon elde edilmiştir. Sekonder metabolit izolasyonu için sadece Fr1 yeterli miktarda olduğundan bu fraksiyonla çalışılmaya karar verilmiştir. Diğer fraksiyonların miktarları az olduğu için çalışılmamıştır. DCM Fr1'in analitik YPSK analizi sonucu 7 pik gözlenmiştir. Bunlardan 3 tanesi saf olarak izole edilmiştir.



Şekil 3.11. DCM Fr1'in YPSK kromatogramı

Dakika 27.486'da gözlenen pik, saf bir şekilde izole edildi ve D1 olarak isimlendirildi. Toplanan D1 miktarı 5,5 mg'dır.

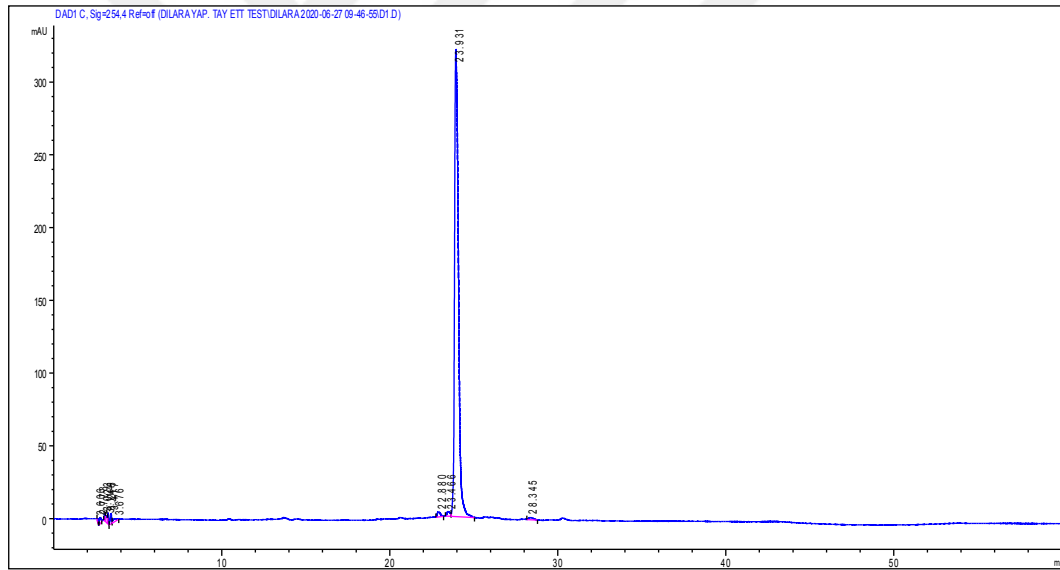


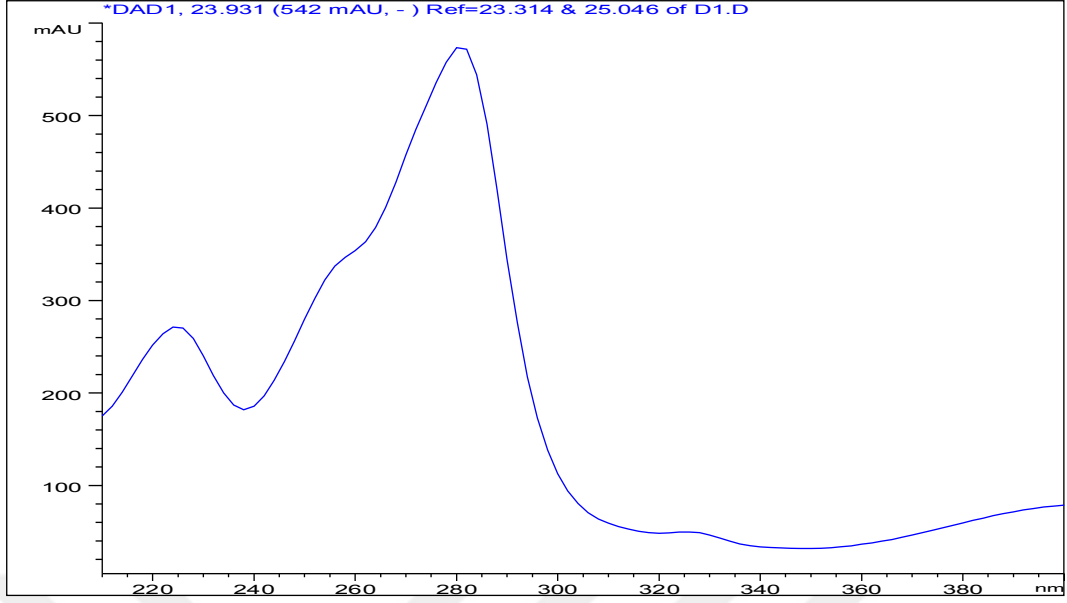
Şekil 3.12. DCM Fr1'in Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK analizi

Çizelge 3.6. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK’de kullanılan gradient sistem

Zaman (dk)	Ultra Saf Su (%)	Asetonitril (%)	Akış Hızı (ml/dk)	Enjeksiyon hacmi
0	90	10	2.000	45 µl
5	90	10	2.000	
10	70	30	2.000	
15	60	40	2.000	
20	40	60	2.000	
30	30	70	2.000	

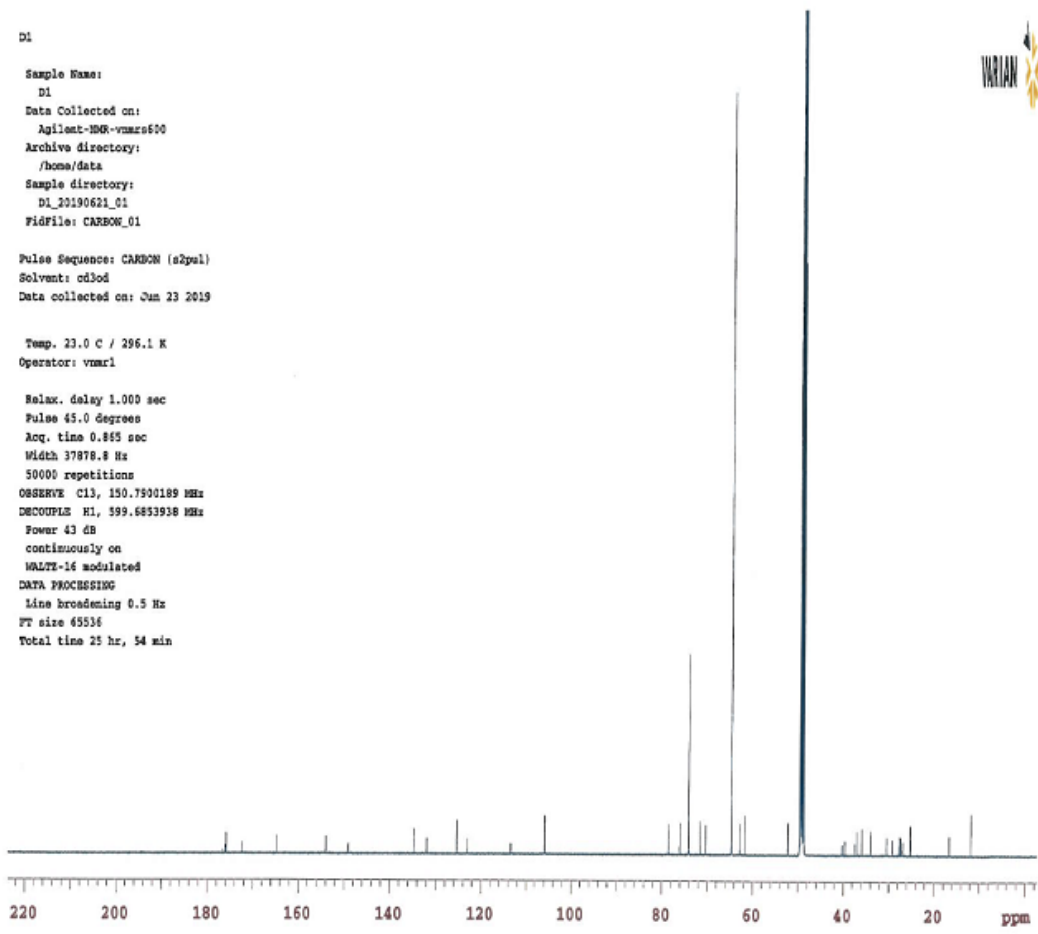
Semipreparatif kolon ve Çizelge 3.6’da verilen gradient sistem kullanılarak gerçekleştirilen YPSK analizi Şekil 3.12’de sunulmuştur.



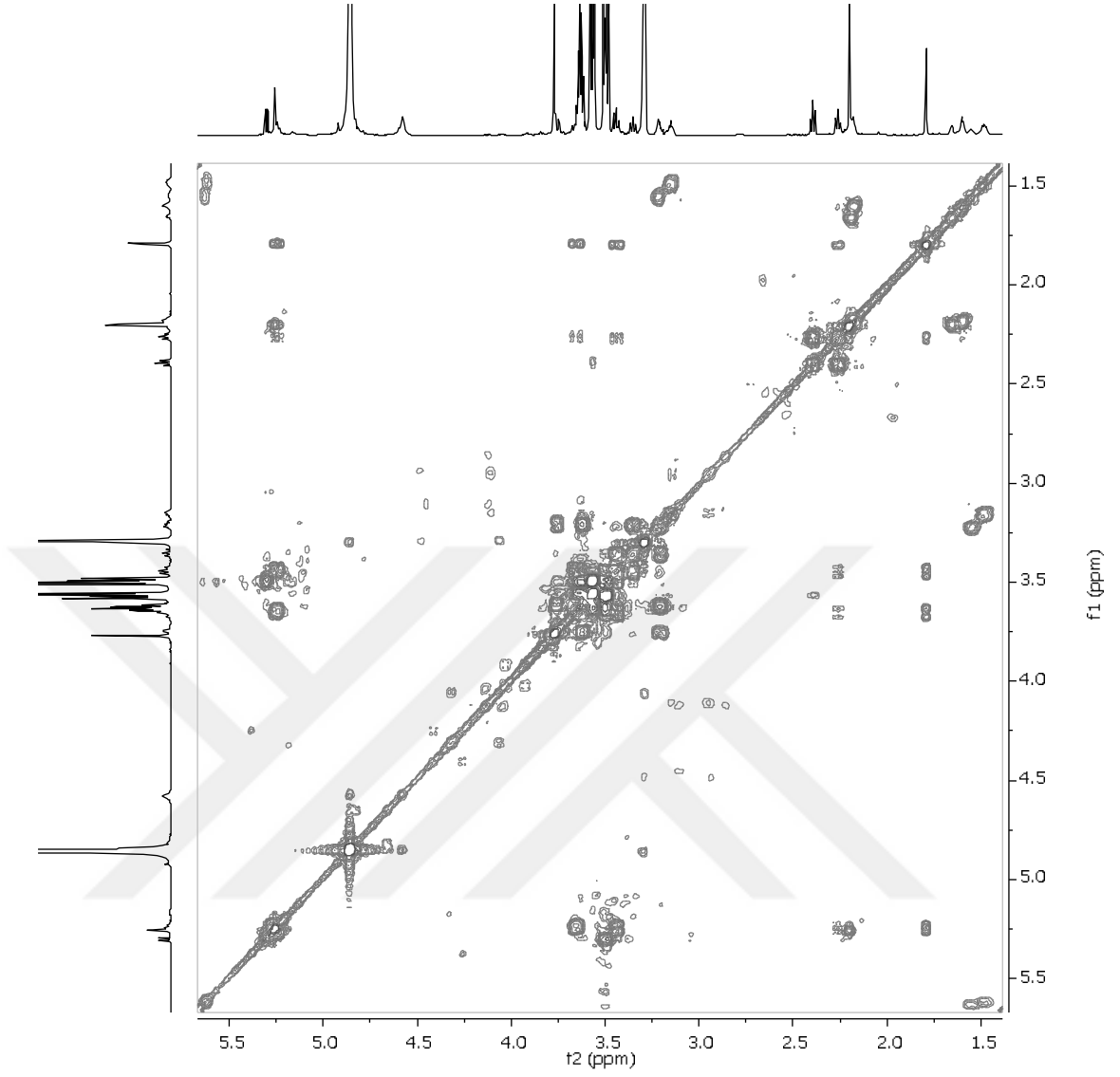


Şekil 3.14. D1'in UV spektrumu

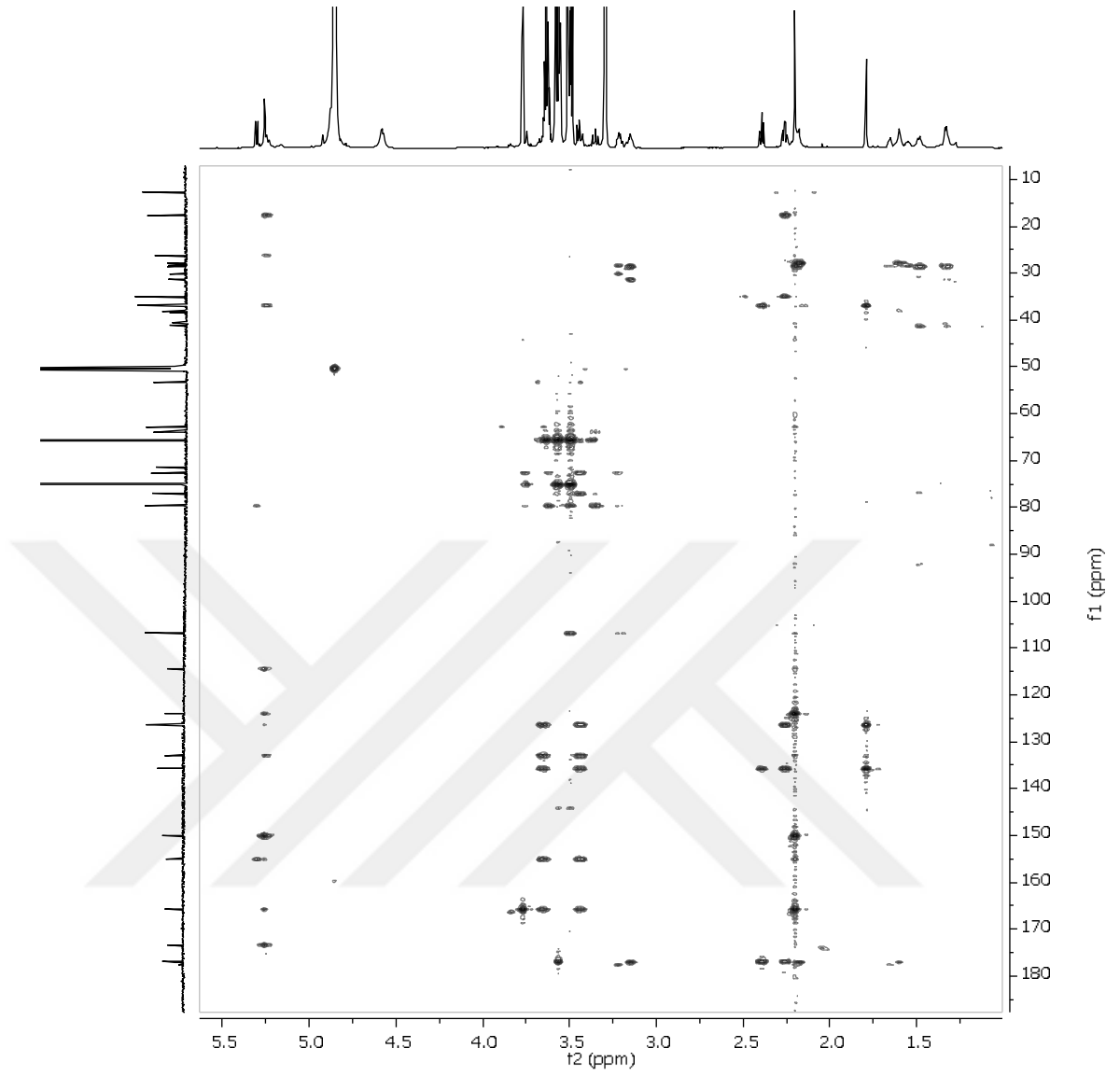
Saf olarak izole edilen D1'in analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK sonucu ve UV spekturumu sırasıyla Şekil 3.13 ve 3.14'te sunulmuştur. Yapı tayini için tek ve iki boyutlu NMR yapılmış ve sonuçları Şekil 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 ve 3.19'da ve NMR dataları Çizelge 3.7'de sunulmuştur.



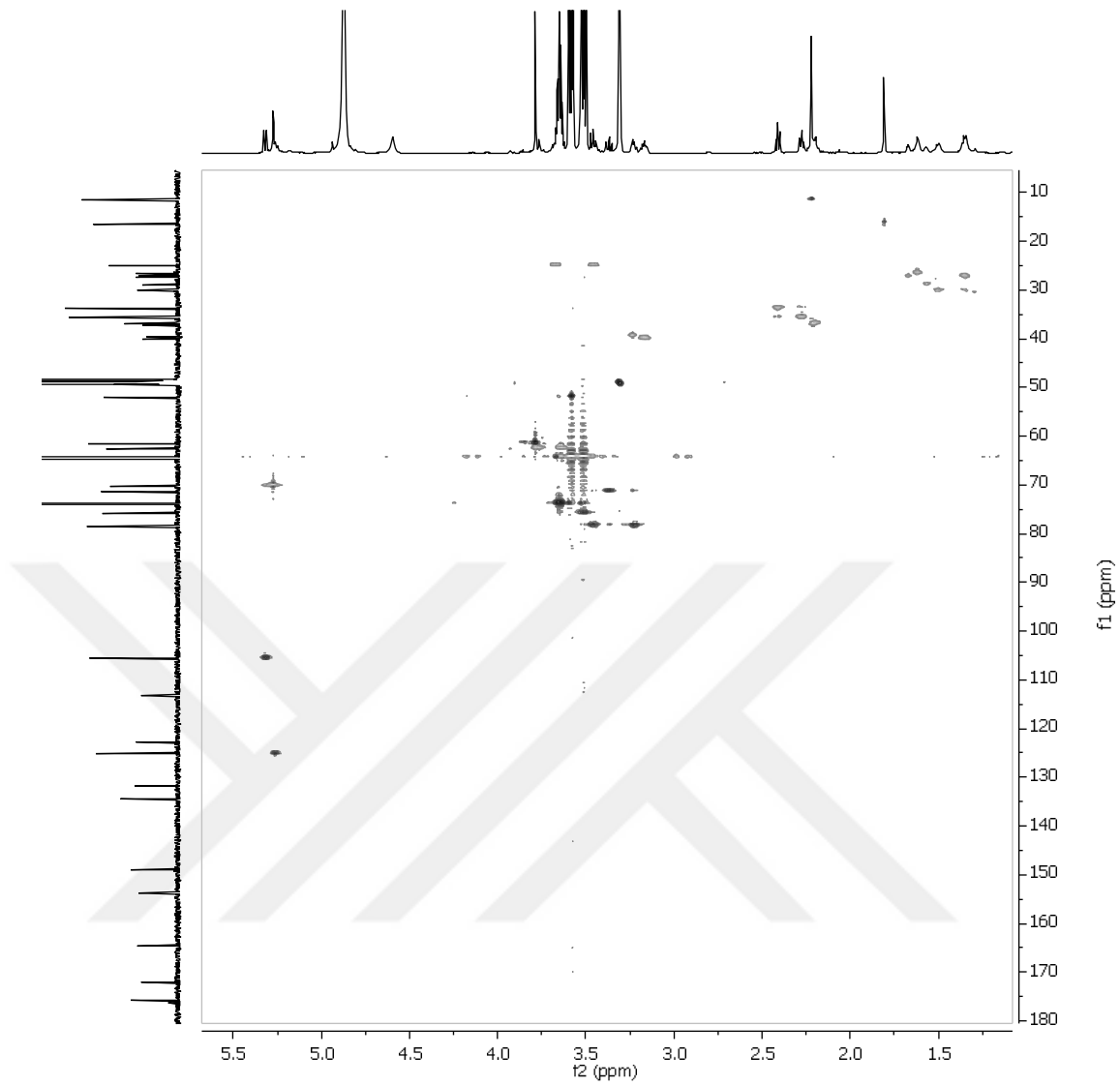
Şekil 3.16. D1'in ^{13}C -NMR sonucu



Şekil 3.17. D1'in ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.18. D1'in gHMBC spekturumu



Şekil 3.19. D1'in gHMBC spektrumu

Çizelge 3.7. D1'in ^1H ve ^{13}C NMR dataları

Penicacid J in methanol- d_4 , 400 MHz		
#	δ_{H} (J[Hz])	δ_{C} , type
1		172.1, C
3	5.27, d (2.4, 2H)	70.2, CH ₂
3a		148.8, C
4		122.7, C

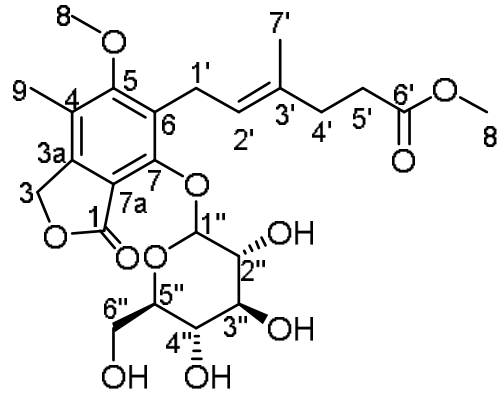
Çizelge 3.7. Devam

#	δ_H (J[Hz])	δ_C , type
5		164.6, C
6		130.9, C
7		153.8, C
7a		113.2, C
8	3.79, s (3H)	61.6, CH ₃
9	2.21, s (3H)	11.6, CH ₃
1'	3.45, dd (9.0, 9.0)	25.0, CH ₂
	3.65, m	
2'	5.28, dd (7.6, 6.8)	124.9, CH
3'		134.9, C
4'	2.28, t (8.0, 2H)	36.0, CH ₂
5'	2.34, t (8.0, 2H)	35.5, CH ₂
6'		176.9, C
7'	1.82, d (1.2, 3H)	16.5, CH ₃
8'	3.57, s (3H)	52.0, CH ₃
1''	5.33, d (7.7)	106.5, CH
2''	3.50, m	75.8, CH
3''	3.23, ddd (9.7, 5.5, 2.3)	78.4, CH
4''	3.37, dd (9.8, 8.8)	71.4, CH
5''	3.46, t (9.0)	78.4, CH
6''	3.65, m	62.6, CH ₂
	3.76, m	

D1 bileşiği sarımsı amorf bir katı şeklinde izole edilmiştir. D1 maddesine ait YPSK kromatogramı bileşiğin 223, 251 ve 297 nm değerlerinde maksimum

absorbsiyon ($\lambda_{\max}$) pikleri verdiğini göstermiştir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi sonuçları incelendiğinde m/z 505.25462’de $[M+Na]^+$ ($C_{24}H_{32}O_{11}Na$ için hesaplanan, 505.25442) ve m/z 496.28388’de $[M-H]^-$ ($C_{24}H_{31}O_{11}$ için hesaplanan, 486.28404) değerlerinde iki tane psödomoleküler iyon piki gözlenmiştir. Bu verilerden hareketle moleköl formölü $C_{24}H_{32}O_{11}$ olarak tayin edilmiş ve doymamışlık derecesi 9 olarak tespit edilmiştir.

Bileşiğe ait 1H ve ^{13}C NMR verileri NS2 ile karşılaştırılmış ve yakın benzerlik gösterdiği görölmüştür. D1 bileşiğinin NS2 bileşiğinden 14 atomik kütle birimi daha fazla moleküler kütleyle sahip olduğu görölmüştür. Bu durum D1 bileşiğin δ_C 52.0 ppm’deki karbon rezonansıyla doğrudan korele olan δ_H 3.57 konumundaki fazladan bir metoksi grubuyla açıklanmaktadır. İlave metoksi grubunun konumu, δ_C 176.9 ppm deki uç karboksil grubuyla uzun mesafe korelasyon bulunduğunu gösteren HMBC spektrumu aracılığıyla tespit edilmiştir. Yine bu spektrumda bu karboksil grubunun δ_H 2.28 ppm’deki ve δ_H 2.34 ppm’deki iki metilen grubu ile de korele olduğu gözlenmiştir (sirasıyla C-4’ ve C-5’). Bu bulgular, ilave metoksi grubunun NS2’deki terminal karboksilik asit grubunun metil esteri olduğunu açıkça doğrulamaktadır. Bu sebeple D1, 3-metoksi mikofenolik asit 7-*O* glukopiranozid metil ester türevi olarak adlandırılmış, trivial adıyla penicacid J olarak belirlenmiştir. Bileşiğin kimyasal formölü şekil 3.20’de sunulmuştur.



Şekil 3.20. D1'in kimyasal formülü

Penicacid J

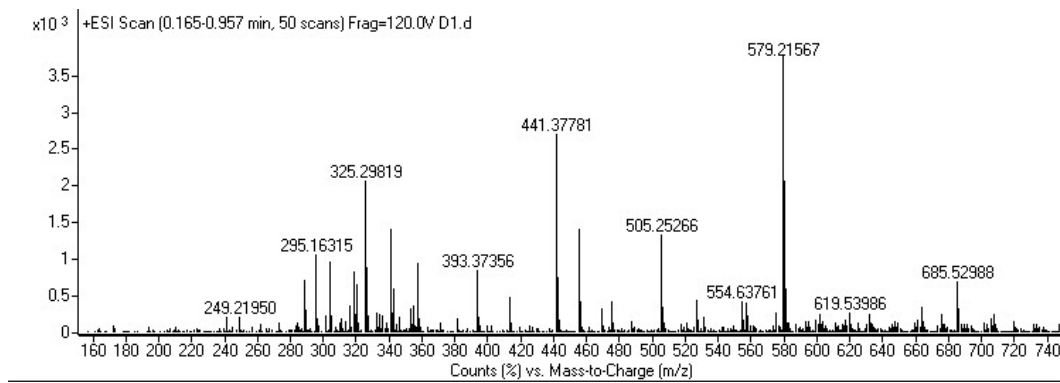
metil (E) -6- (6-metoksi-7-metil-3-okso-4 - (((3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H -piran-2-il) oksi) -1,3-dihidroizobenzofuran-5-il) -4-metilheks-4-enoat

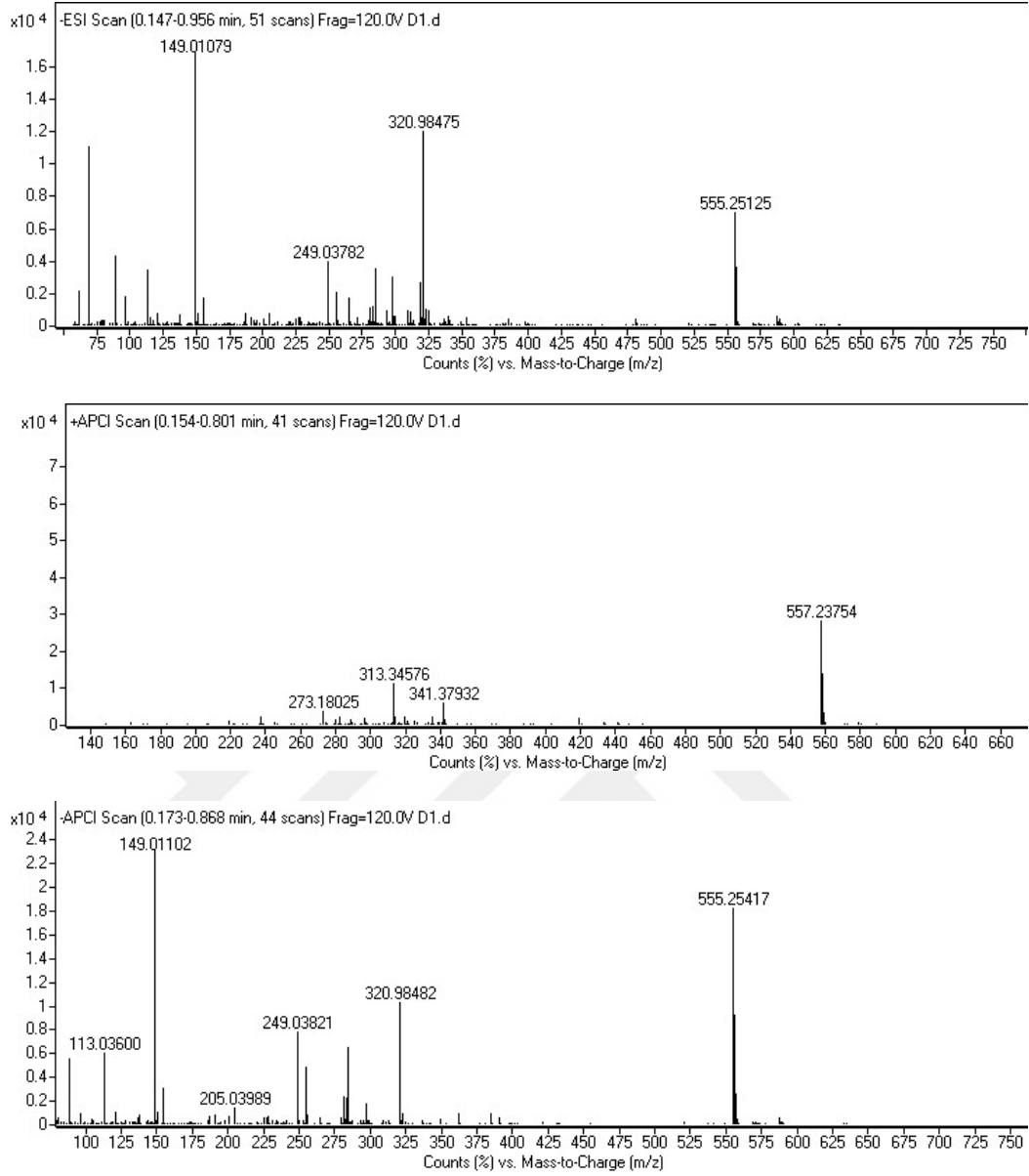
Kimyasal formül: $C_{24}H_{32}O_{11}$

Tam ağırlık: 496.1945

Molekül ağırlığı: 496.5043

Sonucun doğruluğunu arttırabilmek için D1, LCMS-TOF ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.21'de sunulmaktadır.

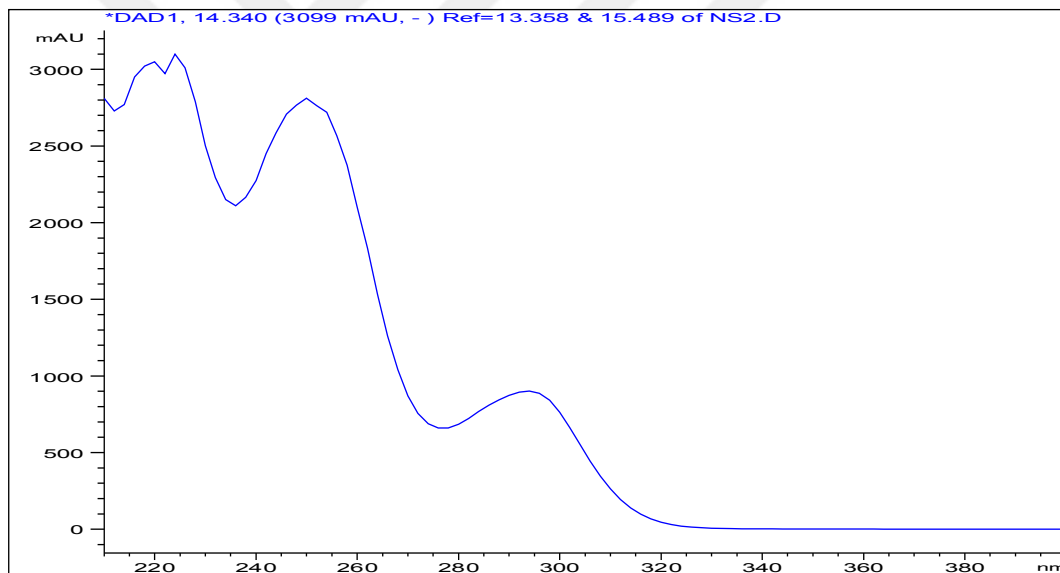
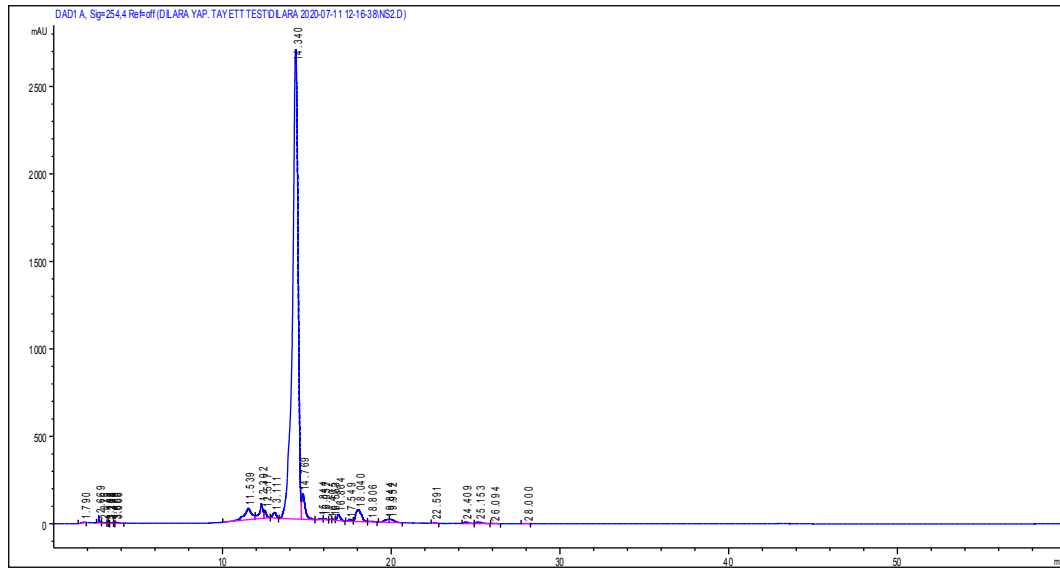




Şekil 3.21. D1'in LCMS-TOF analiz sonucu

3.3.3. Penicacid H (Penik asit H-NS2)

DCM Fr1'den saf olarak elde edilen diğer bir madde dakika 25.728'de gözlenen NS2 olmuştur. Toplamda 3 mg elde edilmiştir.



Saf olarak izole edilen NS2'nin analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK kromatogramı ve UV spektrumu sırasıyla Şekil 3.22 ve 3.23'te verilmiştir.

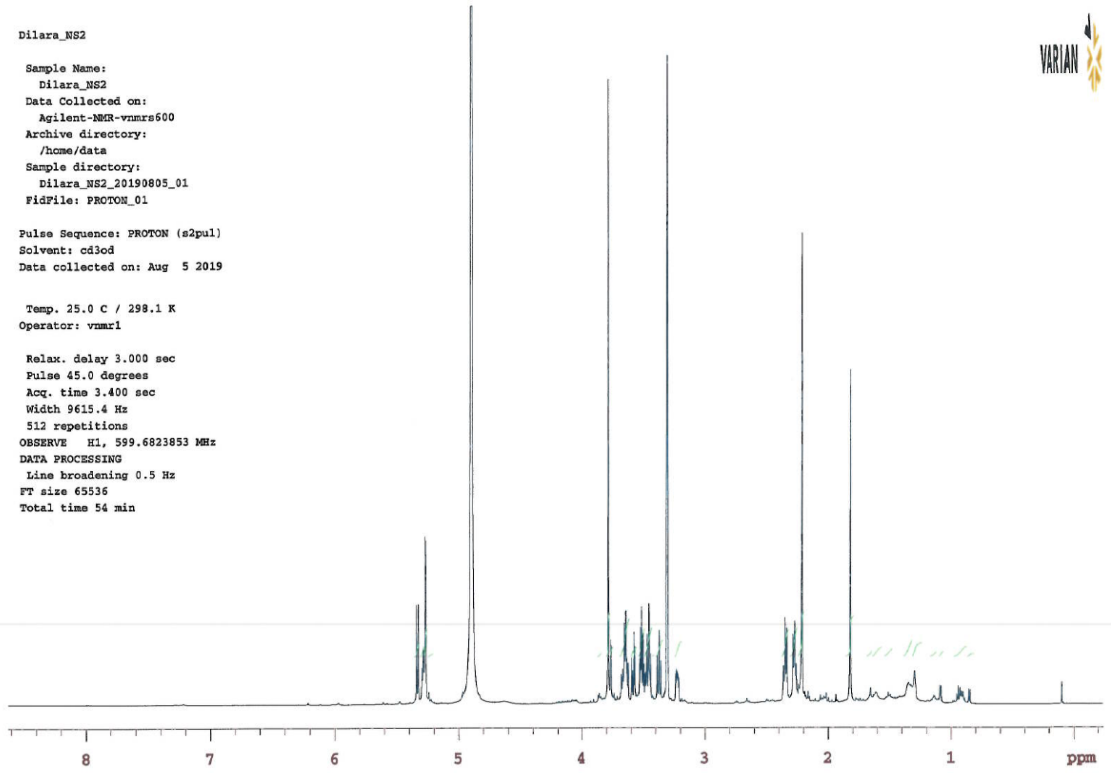
Dilara_NS2

Sample Name:
Dilara_NS2
Data Collected on:
Agilent-NMR-vnmrs600
Archive directory:
/home/data
Sample directory:
Dilara_NS2_20190805_01
FidFile: PROTON_01

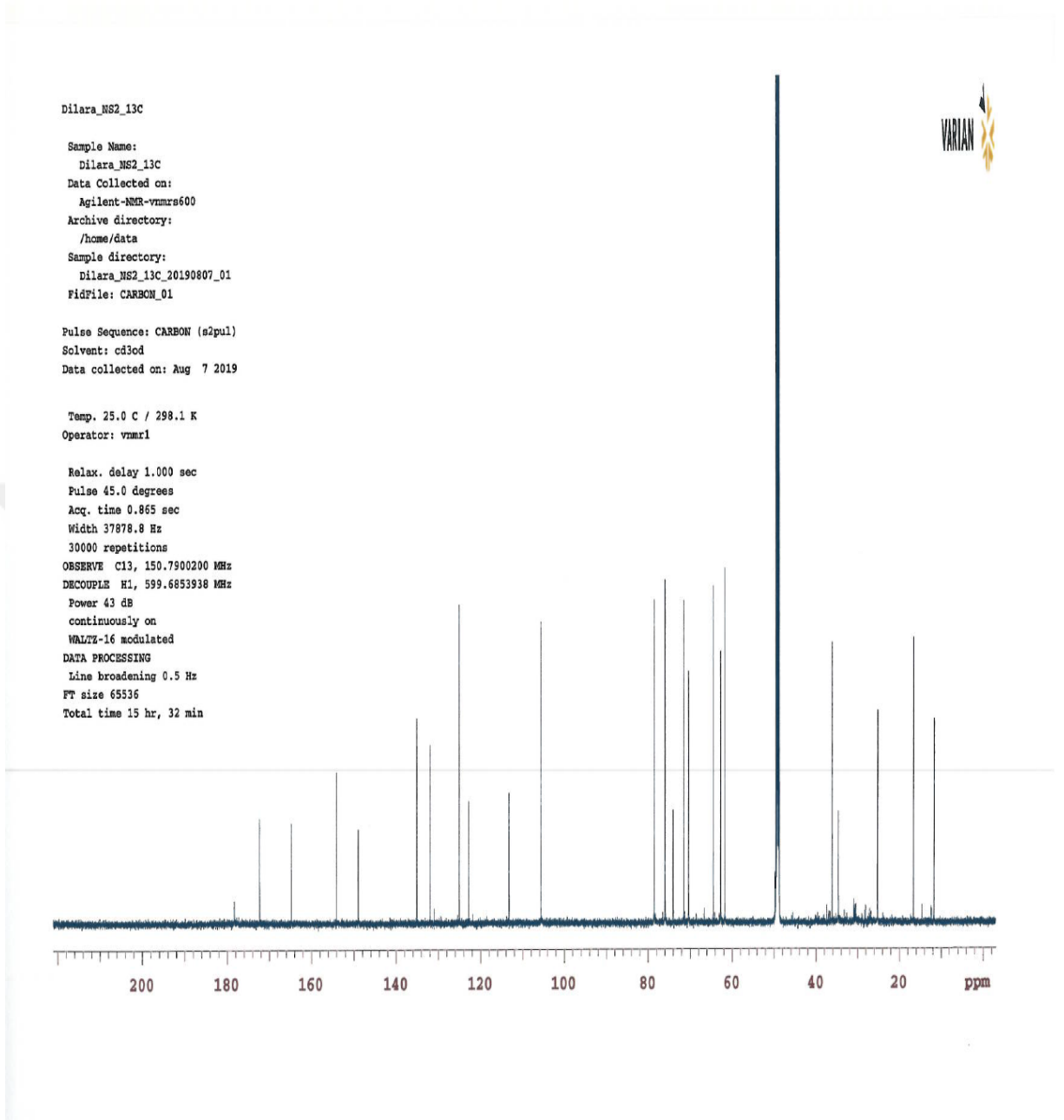
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Aug 5 2019

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

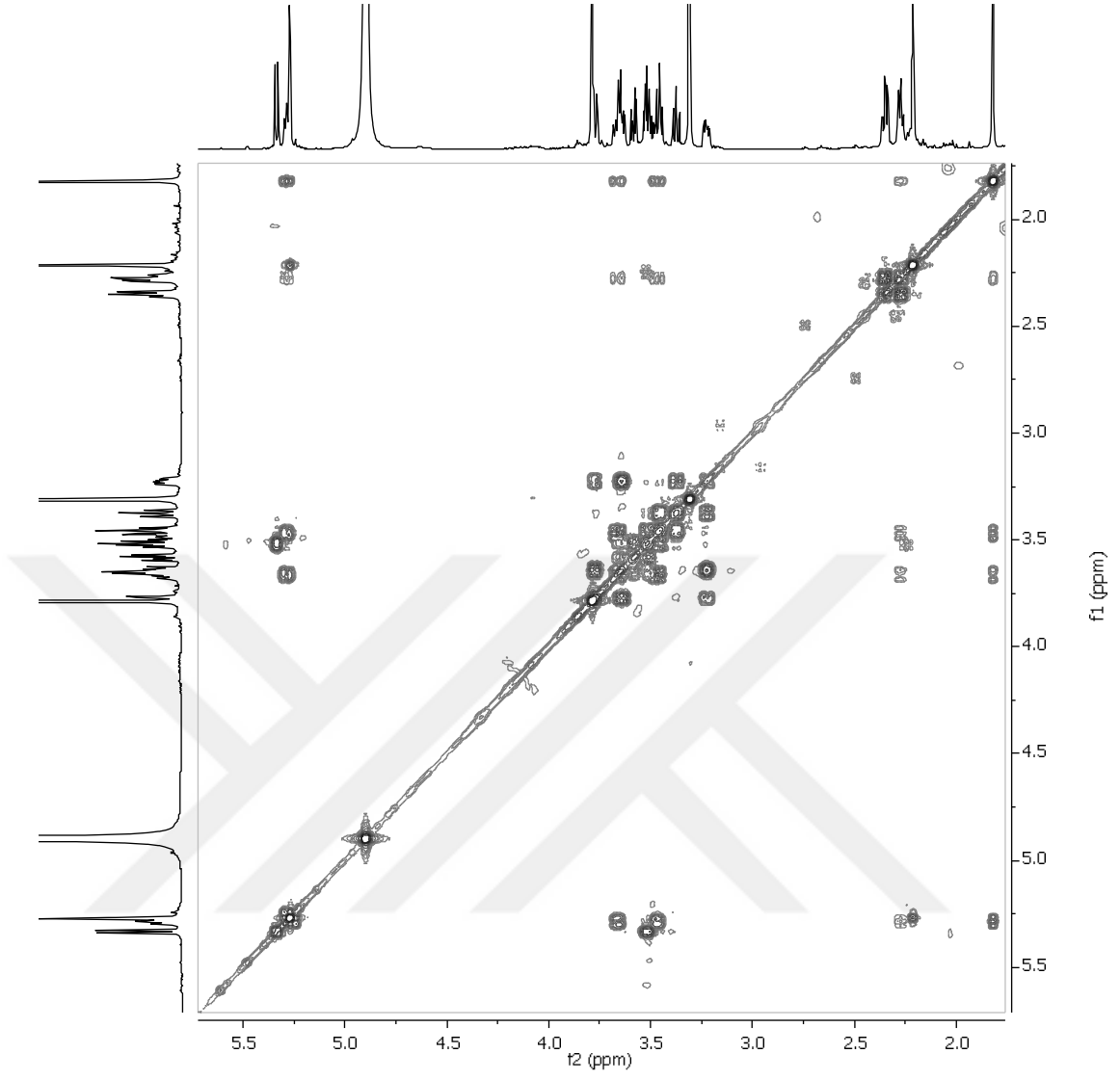
Relax. delay 3.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.400 sec
Width 9615.4 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 599.6823853 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 54 min



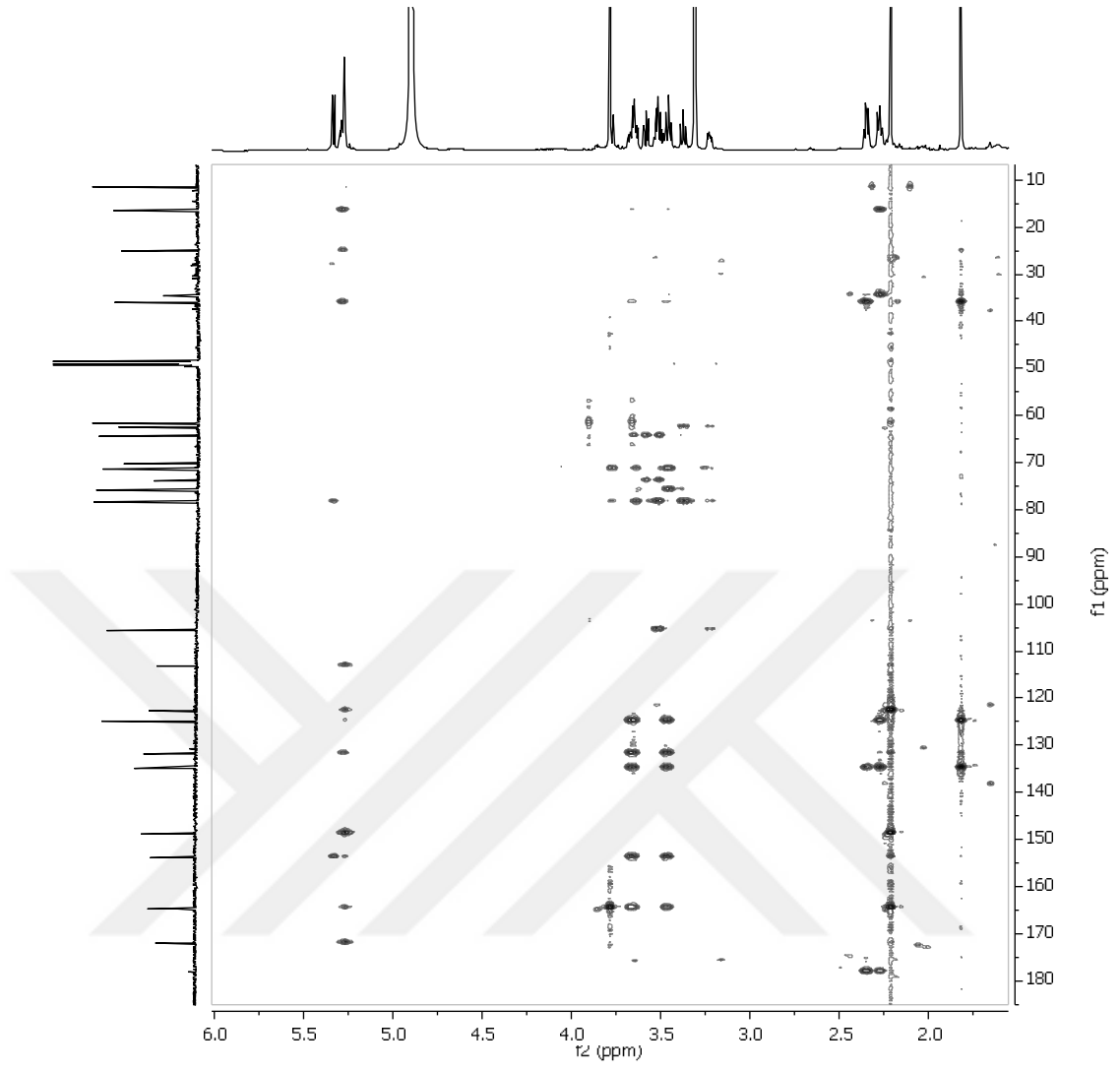
Şekil 3.24. NS2'nin ¹H-NMR spektrumu



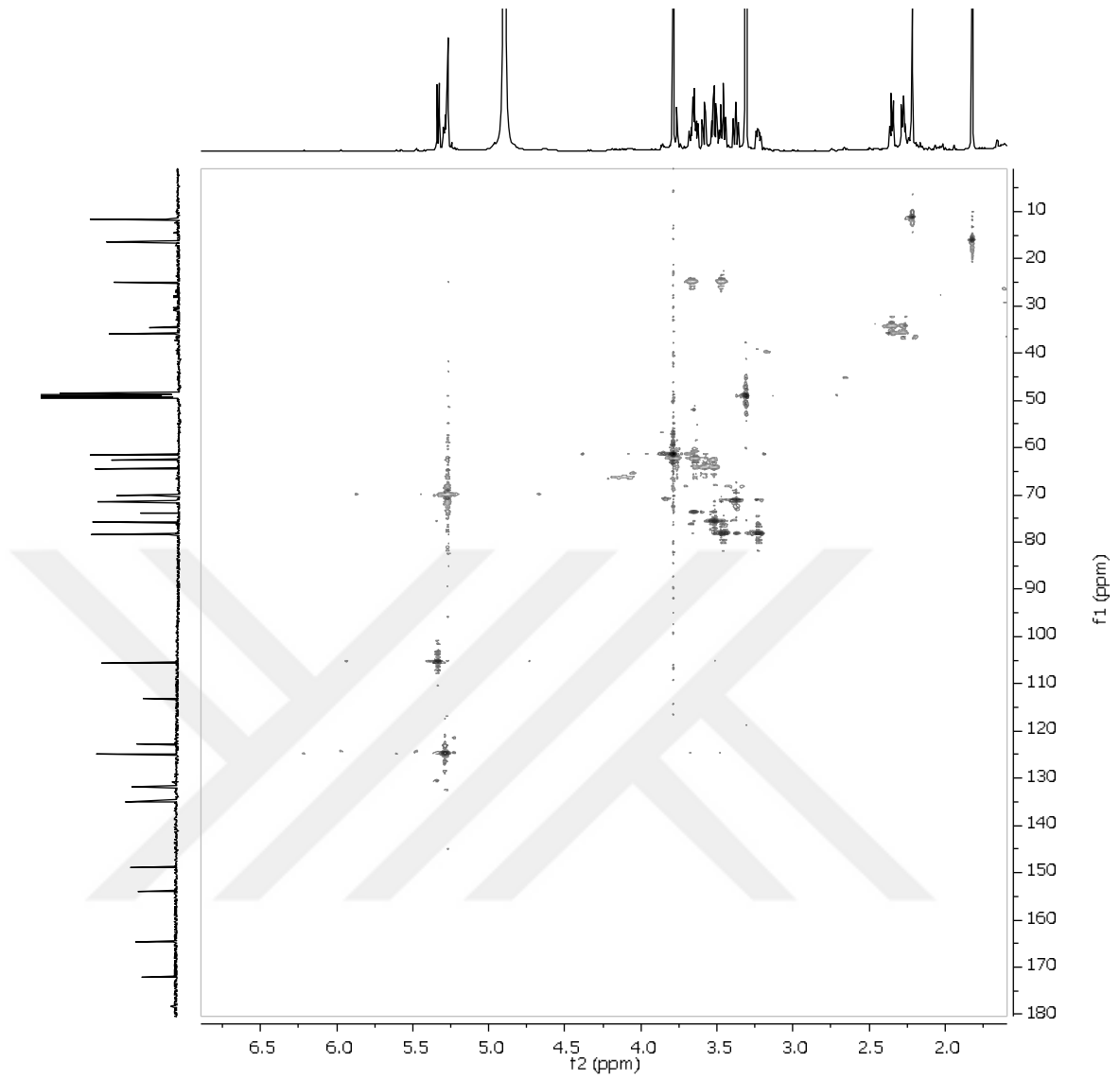
Şekil 3.25. NS2'nin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.26. NS2'nin ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.27. NS2'nin gHMBC spektrumu



Şekil 3.28. NS2'nin gHMPC spektrumu

Çizelge 3.8. NS2'nin ^1H ve ^{13}C NMR dataları

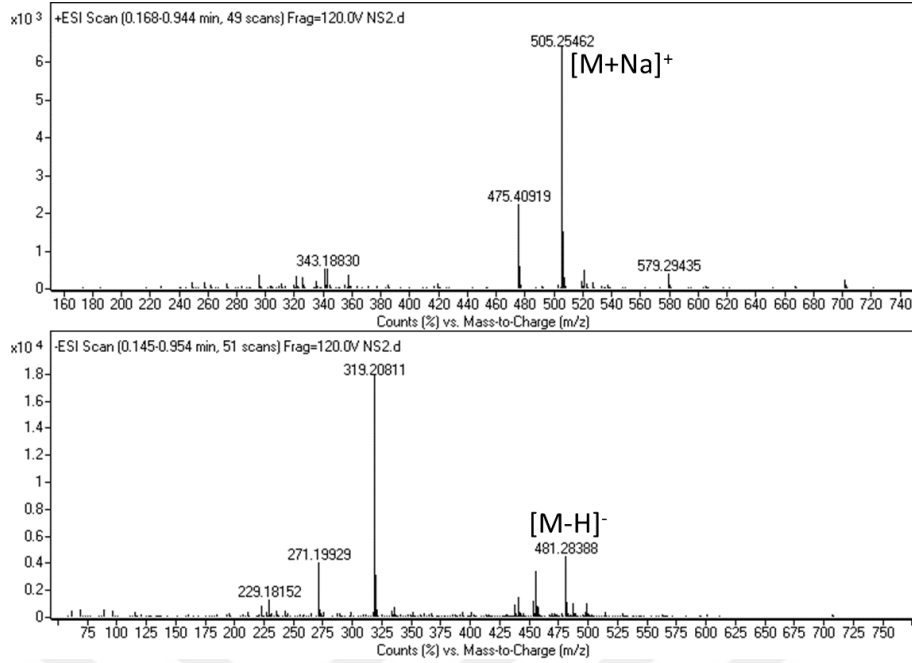
Penicacid H in MeOH- d_4 , 600 MHz		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
1		172.1, C
3	5.27, d (2.4, 2H)	70.2, CH ₂
3a		148.8, C
4		122.7, C
5		164.6, C

Çizelge 3.8. Devam

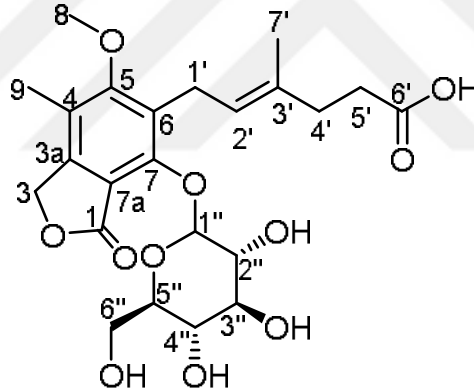
#	δ_H (multi, J[Hz])	δ_C , type
6		130.9, C
7		153.8, C
7a		113.2, C
8	3.79, s (3H)	61.6, CH ₃
9	2.21, s (3H)	11.6, CH ₃
1'	3.45, dd (9.0, 9.0)	25.0, CH ₂
	3.65, m	
2'	5.28, dd (7.6, 6.8)	124.9, CH
3'		134.9, C
4'	2.28, t (8.0, 2H)	36.0, CH ₂
5'	2.34, t (8.0, 2H)	35.5, CH ₂
6'		178.2, C
7'	1.82, d (1.2, 3H)	16.5, CH ₃
1''	5.33, d (7.7)	106.5, CH
2''	3.50, m	75.8, CH
3''	3.23, ddd (9.7, 5.5, 2.3)	78.5, CH
4''	3.37, dd (9.8, 8.8)	71.4, CH
5''	3.46, t (9.0)	78.4, CH
6''	3.65, m	62.6, CH ₂
	3.76, m	

NS2'te ait NMR sonuçları Şekil 3.24, 3.25, 3.26, 3.27 ve 3.28'de ve NMR dataları Çizelge 3.8'de sunulmuştur. NS2 sarı renkte amorf yapıda bir katı olarak izole edilmiştir. YPSK kromatogramına bakıldığında maddenin 220 250 ve 295 nm değerlerinde maksimum UV absorbands (λ_{max}) değerlerine ulaştığı görülmüştür. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi sonuçları incelendiğinde m/z 505.25462'de $[M+Na]^+$ ($C_{23}H_{30}O_{11}Na$ için hesaplanan, 505.25442) ve m/z 481.28388'de $[M-H]^-$ ($C_{23}H_{29}O_{11}$ için hesaplanan, 481.28404) değerlerinde iki tane psödomoleküler iyon piki gözlenmiştir. Bu verilerden hareketle molekül formülü $C_{23}H_{30}O_{11}$ olarak tayin edilmiş ve doymamışlık derecesi 9 olarak tespit edilmiştir.

Bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu 23 farklı karbon rezonansının varlığını ortaya koymuştur. HMBC ve HMQC spektrumları aracılığıyla 9 kuaterner karbon, 2 karbonil karbonu (δ_{C} 178.2 ve δ_{C} 172.1 ppm), 6 metin grubu karbonu (δ_{C} 124.9, δ_{C} 106.5, δ_{C} 78.5, δ_{C} 78.4, δ_{C} 75.8 ve δ_{C} 71.4 ppm), 5 metilen grubu karbonu (δ_{C} 70.2, δ_{C} 62.6, δ_{C} 36.0, δ_{C} 35.5 ve δ_{C} 25.0 ppm) ve biri metoksi (δ_{C} 61.6 ppm) biri aromatik metil (δ_{C} 11.6 ppm) biri olefinik metil karbonu (δ_{C} 16.5 ppm) olmak üzere 3 metil karbonu belirlenmiştir. Bileşiğin ^1H -NMR verileri ve ^1H - ^1H COSY spektrumları birlikte değerlendirildiğinde 3 spin sisteminin varlığı gözlenmiştir. Bunlardan biri metan protonu (δ_{H} 5.28) ve metilen grubu protonu (δ_{H} 3.45/ δ_{H} 3.65) arasında, ikinci spin sistemi iki metilen grubu (δ_{H} 2.28 ve δ_{H} 2.34) arasındadır. Üçüncü spin sisteminin δ_{H} 5.33'teki anomerik protondan başlayıp önce δ_{H} 3.50, δ_{H} 3.23, δ_{H} 3.37 ve δ_{H} 3.46 daki 4 metin protonuyla olduğu ve δ_{H} 3.65/ δ_{H} 3.76 daki hidroksimetilen protonlarıyla sona erdiği açık bir şekilde görülmektedir. HMQC spektrumu verilerine bakılarak son spin sistemi karbon rezonansı ile ilişkilendirildiğinde bileşikte glukopiranozil yapısının var olduğu anlaşılmıştır. HMBC spektrumu incelendiğinde bir metoksi grubunun (δ_{H} 3.79 / δ_{C} 61.6) bir aromatik karbonla δ_{C} 164.6'da (C-5) korele olduğunu açıkça göstermektedir. Ayrıca δ_{C} 153.8'de (C -7) bir glikopiranozil varlığı δ_{H} 5.33 konumundaki anomerik proton korelasyonu ile doğrulanmaktadır. HMBC spektrumundan daha fazla anahtar korelasyon bilgisi edinilmiştir. δ_{H} 2.28 ve δ_{H} 2.34 konumundaki iki metilen grubu ile δ_{C} 178.2 ppm (C-6') konumundaki serbest karboksilik asit grubu arasındaki net korelasyon bu karboksilik asit grubunun varlığı ve uzun yan zincire sahip olduğunu göstermektedir. Mevcut literatür araştırılıp bu bileşik için elde edilen NMR verileri kıyaslandığında maddenin, "penicacids" olarak bilinen fungal mikofenolik asit türevlerinden 5-metoksi mikofenolik asit-7-O-glukopiranozid olarak isimlendirilen penicacid H olduğu sonucuna varılmıştır (X. H. Chen ve ark., 2020; Z. Chen ve ark., 2012; Roviroso ve ark., 2006; Song ve ark., 2020). Bileşiğin kimyasal formülü Şekil 3.30'da verilmiştir. Yapı tayini çalışmalarının doğruluğunu teyit etmek için NS2, LCMS-TOF ile analiz edildi ve sonuçları Şekil 3.29'da sunulmaktadır.



Şekil 3.29. NS2'nin LCMS-TOF analiz sonucu



Şekil 3.30. NS2'nin kimyasal formülü

Penicacid H

(E) -6- (6-metoksi-7-metil-3-okso-4 - (((3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H- piran-2-il) oksi) -1,3-dihidroizobenzofuran-5-il) -4-metilheks-4-enoik asit

Kimyasal formül: $C_{23}H_{30}O_{11}$

Gerçek ağırlık: 482.1788

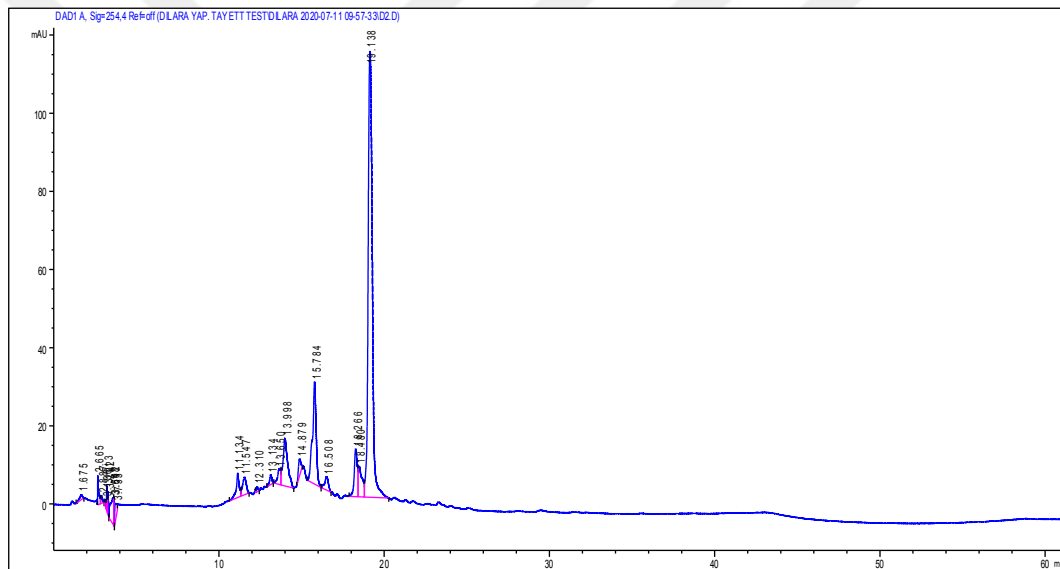
Molekül ağırlığı: 482.4777

NMR ve LCMS-TOF sonuçları yorumlanarak NS2'nin 5-metoksi

mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid (penicacid H) olduğu tanımlanmıştır ve bu metabolit daha önce izole edilmemiş yeni bir bileşiktir.

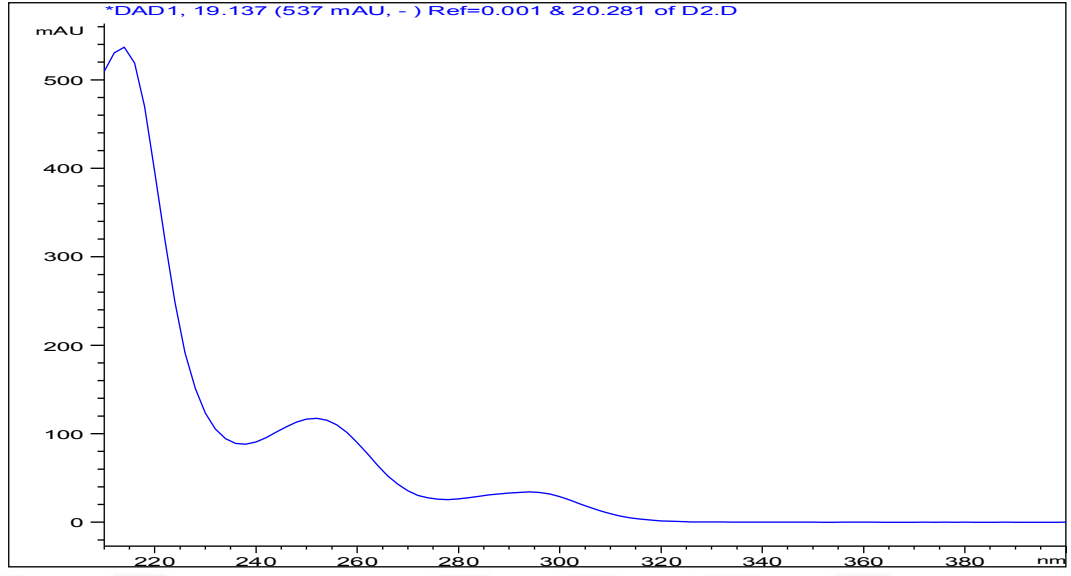
3.3.4. Penicacid I (Penik asit I-D2)

DCM Fr1'den saf olarak elde edilen diğer bir madde D2 isimli metabolittir. Şekil 3.31'de verilen kromatogramda dakika 29.220'de gözlenen pikin saflaştırılmasıyla toplamda 7 mg elde edilmiştir.

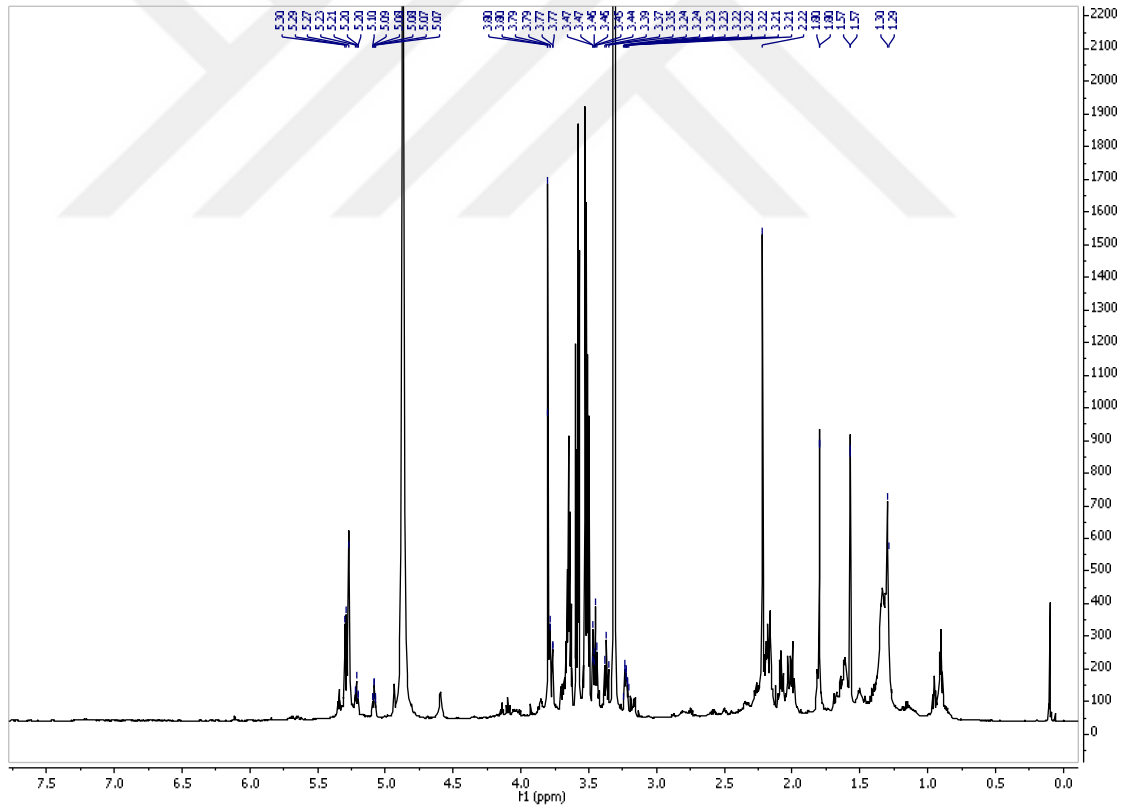


Şekil 3.31. Saf olarak elde edilen D2'nin YPSK kromatogramı

Saf olarak elde edilen D2'nin genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK sonucu ve UV kromatogramı sırasıyla Şekil 3.31 ve 3.32'de sunulmaktadır.

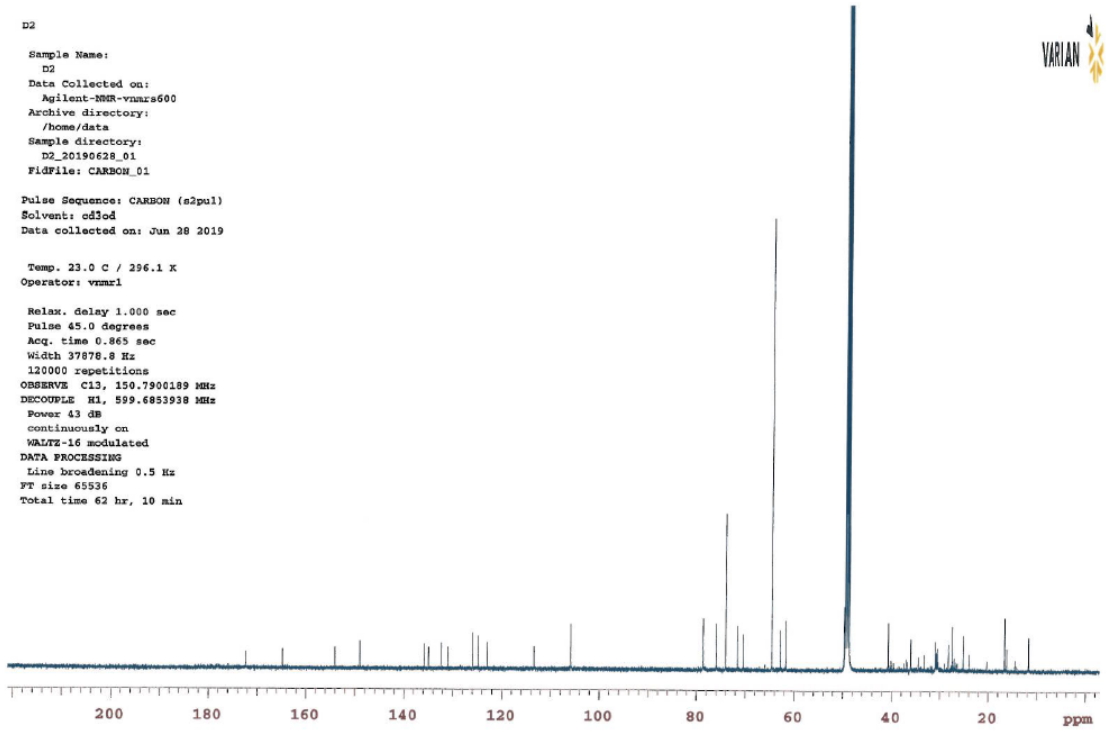


Şekil 3.32. D2'nin UV spektrumu

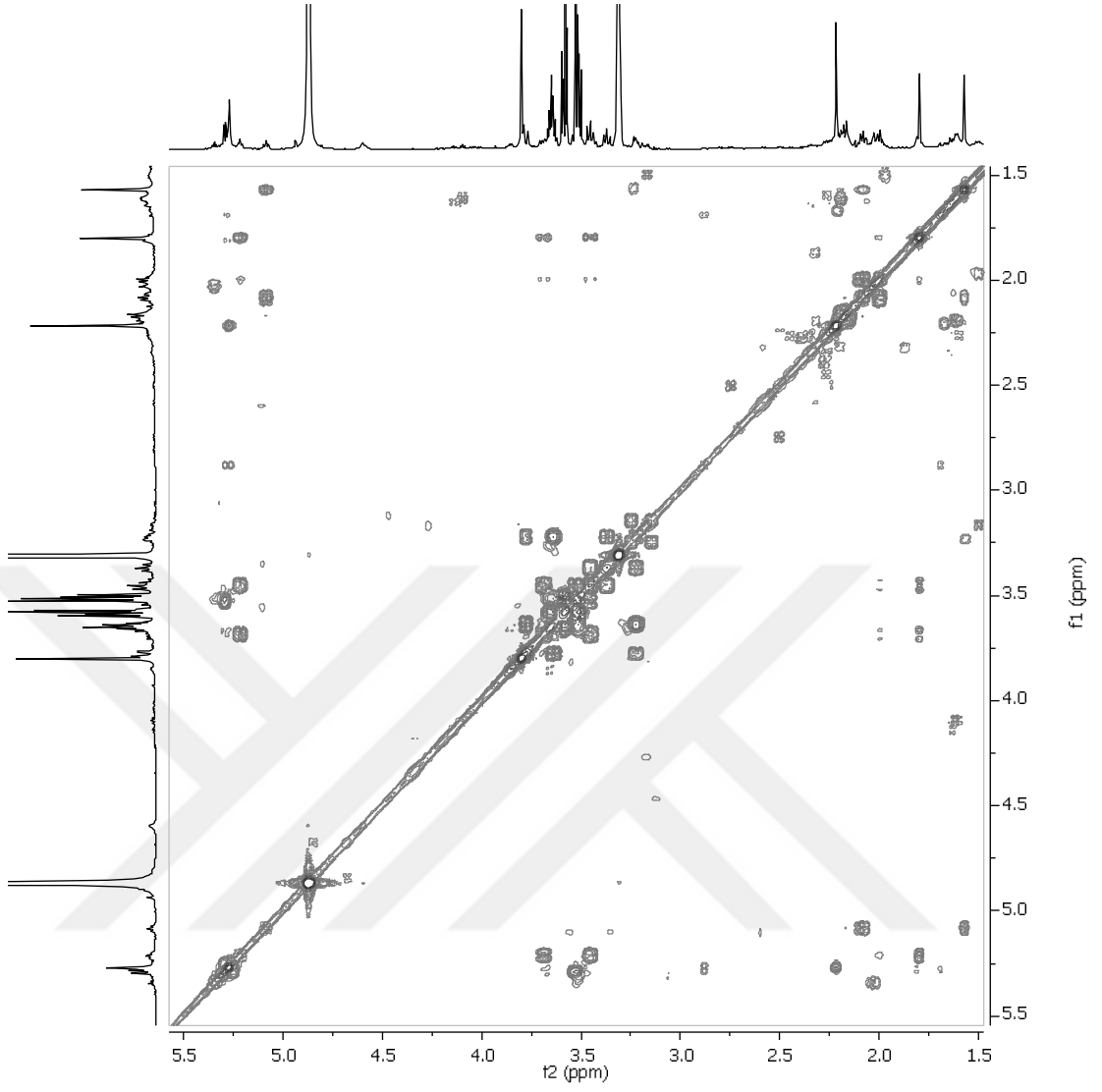


Şekil 3.33. D2'nin ¹H-NMR spektrumu

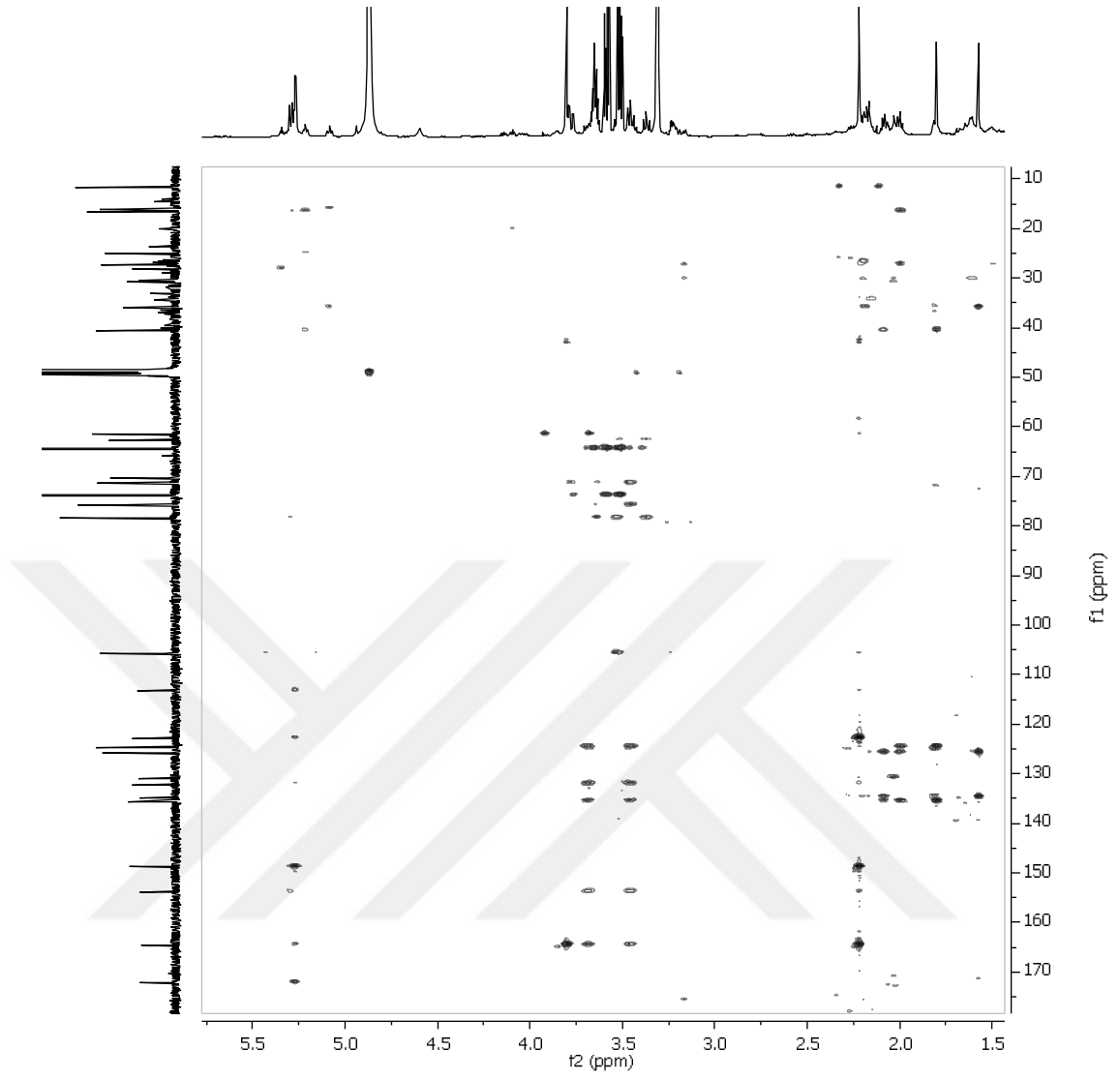
D2
Sample Name:
D2
Data Collected on:
Agilent-MMR-vnmr5600
Archive directory:
/home/data
Sample directory:
D2_20190628_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Jun 28 2019
Temp. 23.0 C / 296.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.869 sec
Width 37870.8 Hz
120000 repetitions
OBSERVE C13, 150.7906189 MHz
DECOUPLE H1, 599.6853938 MHz
Power 43 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 62 hr, 10 min



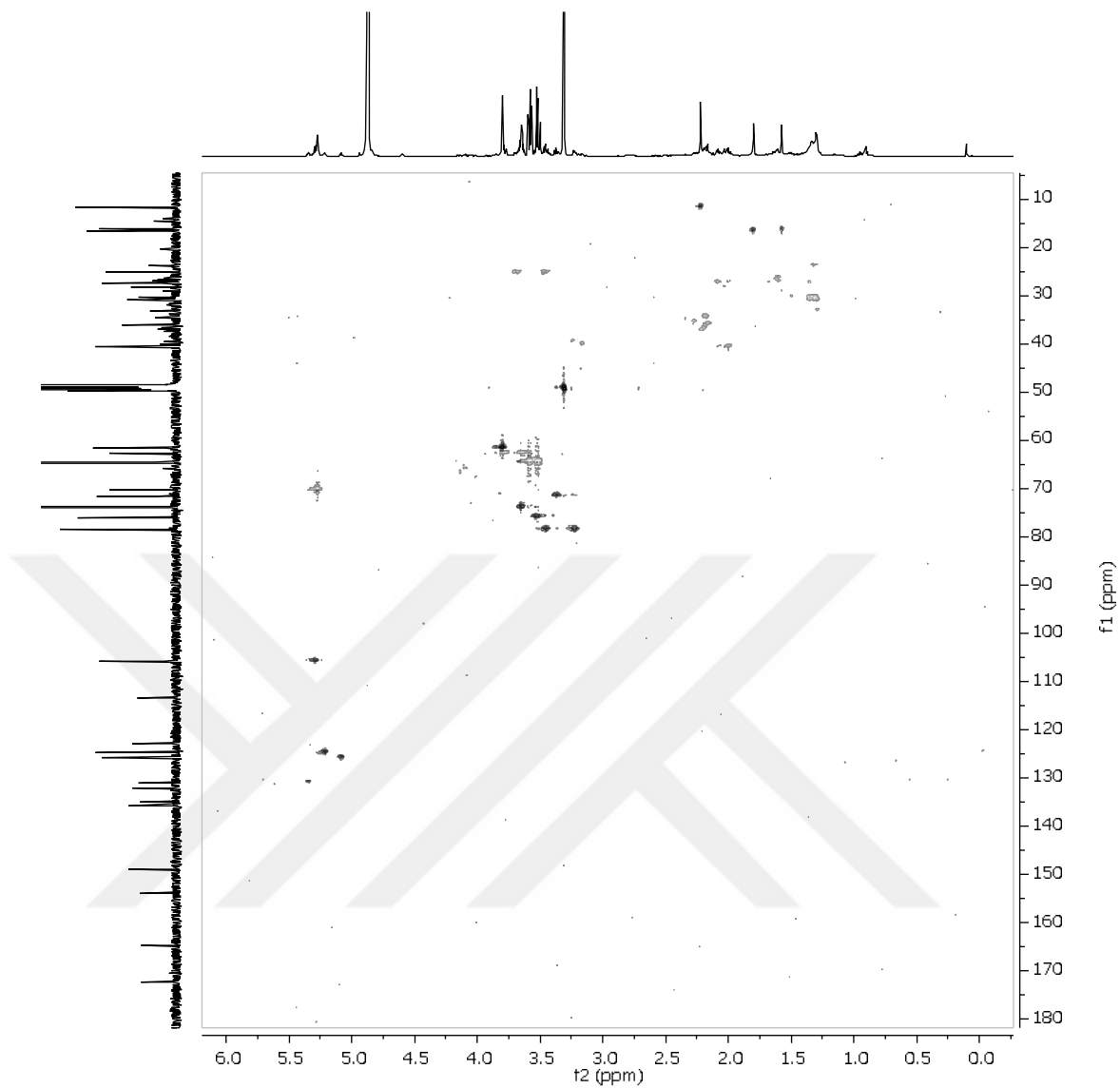
Şekil 3.34. D2'nin ^{13}C -NMR sonucu



Şekil 3.35. D2'nin ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 3.36. D2'nin gHMBC spektrumu



Şekil 3.37. D2'nin gHMBC spektrumu

Çizelge 3.9. D2'nin ^1H ve ^{13}C NMR dataları

Penicacid I in MeOH- d_4 , 600 MHz		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
1		172.2, C
3	5.27, <i>br s</i> (2H)	70.2, CH ₂
3a		148.8, C
4		122.8, C
5		164.6, C

Çizelge 3.9. Devam

#	δ_H (multi, J [Hz])	δ_C , type
6		130.9, C
7		153.9, C
7a		113.2, C
8	3.80, s (3H)	61.5, CH ₃
9	2.22, s (3H)	11.6, CH ₃
1'	3.45, dd (9.2, 9.2)	25.0, CH ₂
	3.69, m	
2'	5.22, t (7.1)	124.3, CH
3'		136.6, C
4'	2.00, t (7.4, 2H)	40.6, CH ₂
5'	2.08, t (7.4, 2H)	35.9, CH ₂
6'	5.09, dd (8.8, 7.4)	125.5, CH
7'		134.8, C
8'	2.18, m (2H)	34.0, CH ₂
9'	2.16, m (2H)	35.6, CH ₂
10'		179.0, C
11'	1.57, d (1.3, 3H)	16.1, CH ₃
12'	1.80, d (1.3, 3H)	16.5, CH ₃
1''	5.29, d (7.7)	106.7, CH
2''	3.53, m	75.9, CH
3''	3.22, ddd (9.8, 5.4, 2.2)	78.5, CH
4''	3.37, t (9.0)	71.4, CH
5''	3.45, t (9.0)	78.4, CH
6''	3.64, m	62.7, CH ₂
	3.78, m	

D2'ye ait NMR spektrumları Şekil 3.33, 3.34, 3.35, 3.36 ve 3.37'de, NMR dataları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

D2 bileşiği, açık sarı amorf yapıda bir katı olarak izole edilmiştir. YPSK kromatogramına bakıldığında maddenin 222 253 ve 298 nm değerlerinde maksimum UV absorbans değerlerine ulaştığı görülmüştür. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi sonuçları incelendiğinde m/z 573.31798’de $[M+Na]^+$ ($C_{28}H_{38}O_{11}Na$ için hesaplanan, 573.31648) ve m/z 549.35525’de $[M-H]^-$ ($C_{28}H_{37}O_{11}$ için hesaplanan, 549.35386) değerlerinde iki tane psödomoleküler iyon piki gözlenmiştir. Bu verilerden hareketle moleköl formülü $C_{28}H_{38}O_{11}$ olarak tayin edilmiş ve doymamışlık derecesi 10 olarak tespit edilmiştir. D2, NS2’den 68 atomik kütle birimi daha ağırdır. Bunun sebebi çifte bağ içeren C_5H_8 yapısıdır.

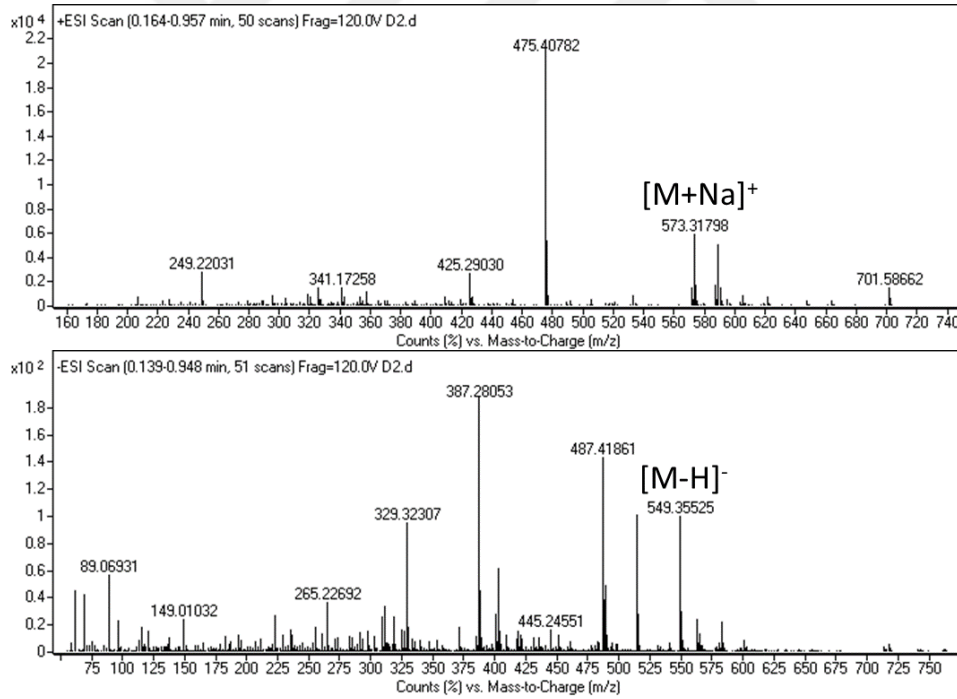
Bileşiğe ait 1H -NMR verileri ve 1H - 1H COSY spektrumlarından 4 tane spin sistemi varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan biri metan protonu δ_H 5.22 ile metilen grubu δ_H 3.45/ δ_H 3.69 arasındadır. İki farklı spin sistemi de δ_H 2.00 ppm ve δ_H 2.08 ile δ_H 2.16 ppm ve δ_H 2.18 ppm konumlarında buluna 2 çift metilen grubu arasındadır. Dördüncü spin sisteminin δ_H 5.29 ppm (d, $J = 7.7$, 1H, δ_C 106.7)’deki anomerik protondan başlayarak δ_H 3.53, δ_H 3.22, δ_H 3.37 ve δ_H 3.45 ppm’deki metin protonlarına ve sonrasında δ_H 3.64/ δ_H 3.78’deki hidroksi metilen protonlarına bağlanan bir sistem olduğu açık bir şekilde görölmektedir. HMQC spektrumu verilerine bakılarak son spin sistemi karbon rezonansı ile ilişkilendirildiğinde bileşikte “Penicacid H” de bulunan tarzda bir glukopiranozil yapısının var olduğu anlaşılmıştır. NS2 ve D2’nin NMR verileri kıyaslanmış ve ilgili literatürler taranmıştır (X. H. Chen ve ark., 2020; Z. Chen ve ark., 2012; Rovirosa ve ark., 2006; Song ve ark., 2020). D2’nin penik asitler olarak bilinen fungal mikofenolik asit türevlerinin bir türevi olduğu ortaya konulmuş olup NS2’den farklı olarak serbest zincirde izoprenil grubu (5C) içermektedir.

D2’nin HMBC spektrumu incelenerek δ_H 5.29 (d, $J = 7.7$, 1H) konumundaki anomerik proton ile korele olan glukopiranozil yapısının pozisyonu δ_C 153.9 (C-7) olarak tayin edilmiştir. Yine HMBC spektrumundan hareketle δ_C 164.6 (C-5) konumundaki aromatik karbona bağlı olan metoksi grubunun konumu (δ_H 3.80/ δ_C

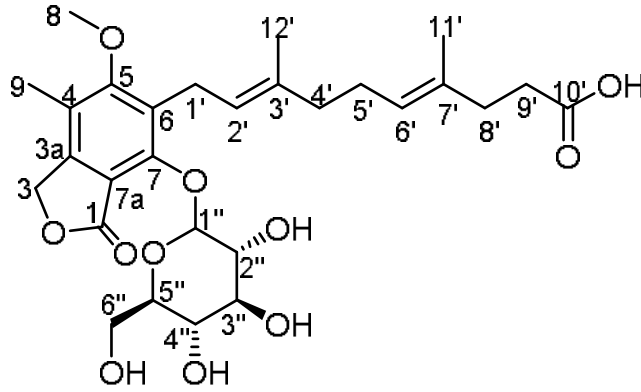
61.5) olarak net bir şekilde tayin edilmiştir. D2'nin HMBC spektrumu δC 179.0 (C-10') pozisyonunda bulunan bir serbest karboksilik asit grubuyla biten yan zincirin, varlığını ve uzunluğunu ortaya koyan δH 2.18 (m, 2H) ve δH 2.16 (m, 2H) konumlarındaki iki metilen grubuyla olan korelasyonunu ortaya çıkarmıştır.

Yukarıda açıklanan verilere dayanarak D2'nin 5-metoksi mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid türevi olduğu tayin edilmiştir ve bu bileşik trivial olarak penicacid I olarak adlandırılmaktadır. Bileşiğin kimyasal formülü Şekil 3.39'da sunulmaktadır.

Aydınlatılan kimyasal formülü teyit etmek amacıyla D2 metaboliti LCMS-TOF ile analiz edildi. Sonuçlar Şekil 3.38'de sunulmaktadır.



Şekil 3.38. D2'nin LCMS-TOF analiz sonucu



Şekil 3.39. D2'nin kimyasal formülü

(4E, 8E) -10- (6-metoksi-7-metil-3-okso-4 - (((3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) tetrahidro- 2H-piran-2-il) oks) -1,3-dihidroizobenzofuran-5-il) -4,8-dimetildeka-4,8-dienoik asit

Penikacid I

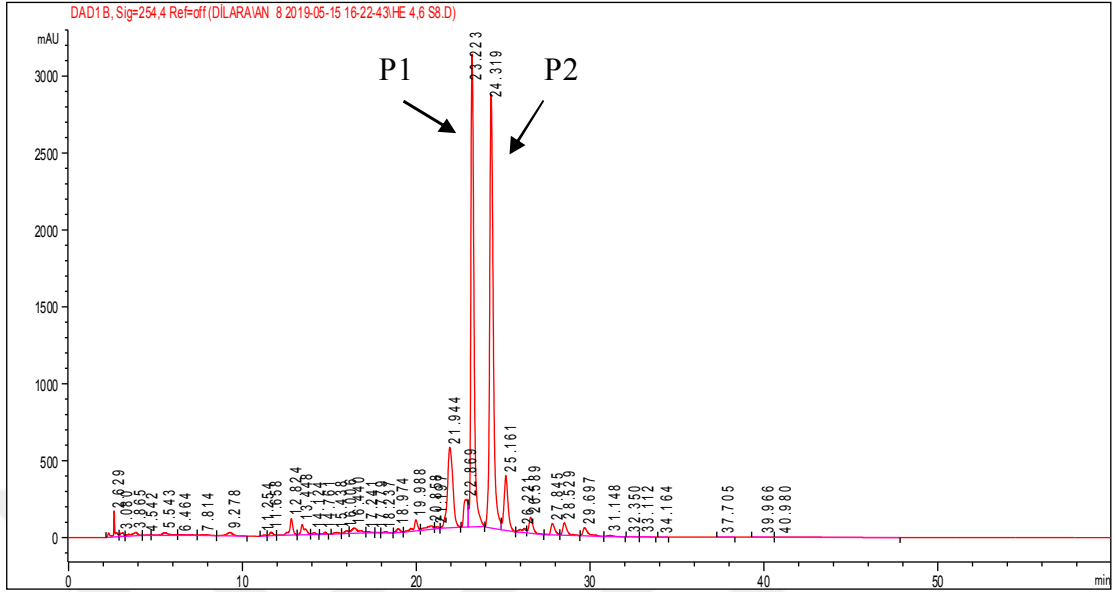
Kimyasal formül: $C_{28}H_{38}O_{11}$

Gerçek ağırlık: 550.24141

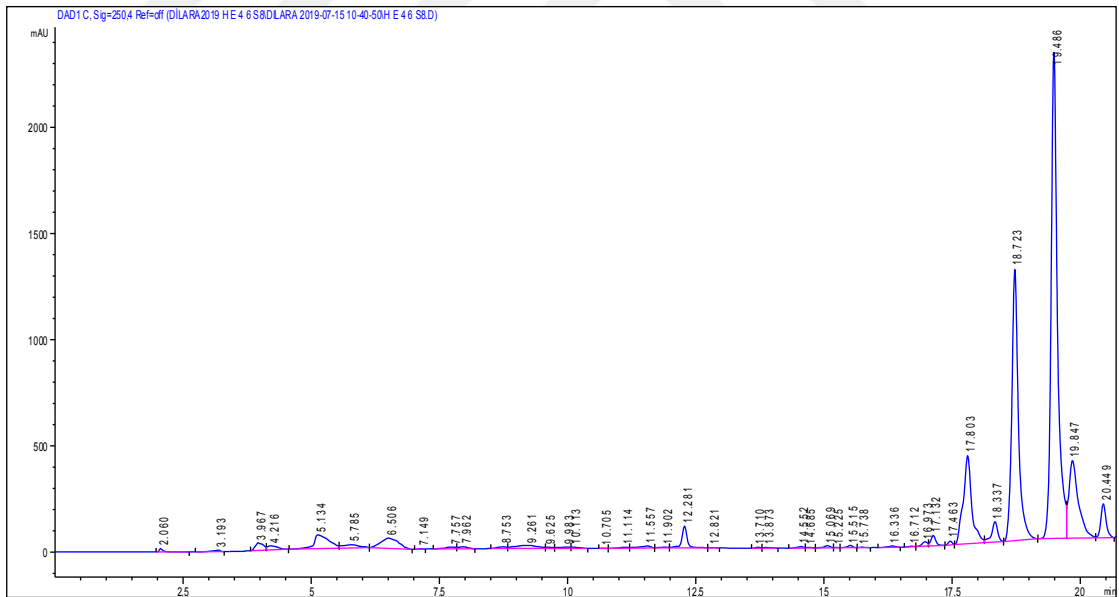
Molekül ağırlığı: 550.60100

3.3.5. Dianhydroaurasperone C (Dianhidroaurasperon C- H:E 4:6 S8 P2)

YPSK'dan elde edilen kimyasal profiline ve miktarına göre üçüncü olarak VSK sonrası elde edilen fraksiyonlardan elimizde yeterli miktarda bulunan Hekzan: Etilasetat 40:60 ile çalışılmıştır. Bu fraksiyon sefadeks kolona uygulandı ve kolon kromatografisi (sabit faz: sefadeks, hareketli faz: metanol) sonucu elde edilen fraksiyonların İTK analizleri yapılarak [çözücü sistemi hekzan:etilasetat (1:1)] bazı fraksiyonlar birleştirilmiş ve 10 adet alt fraksiyona ayrılmıştır. Bu alt fraksiyonlardan öncelikle S8 ile çalışılmıştır. Elimizde bulunan S8 fraksiyonu 78.9 mg'dır. Bu fraksiyon analitik kolon ve genel gradient sistemiyle YPSK'da analiz edilmiş ve kromatogram Şekil 3.40'ta sunulmaktadır.



Şekil 3.40. Hekzan:Etilasetat 40:60 S8 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



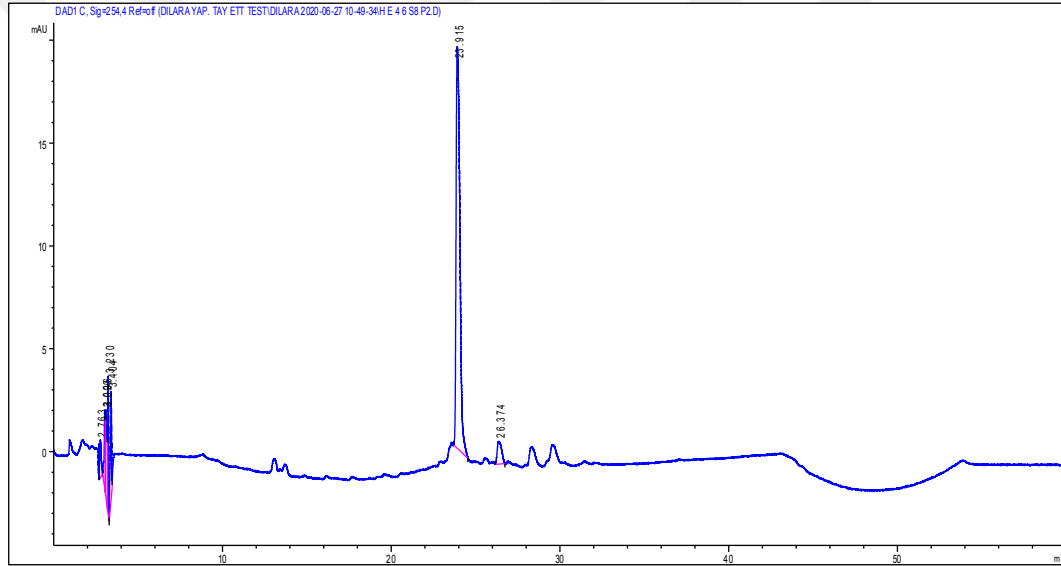
Şekil 3.41. Hekzan:Etilasetat 40:60 S8 fraksiyonunun semipreparatif YPSK analizi

Şekil 3.41’de Hekzan:Etilasetat 40:60 S8 fraksiyonunun semipreparatif kolon ve Çizelge 3.10’da verilen gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK kromatogramı sunulmaktadır.

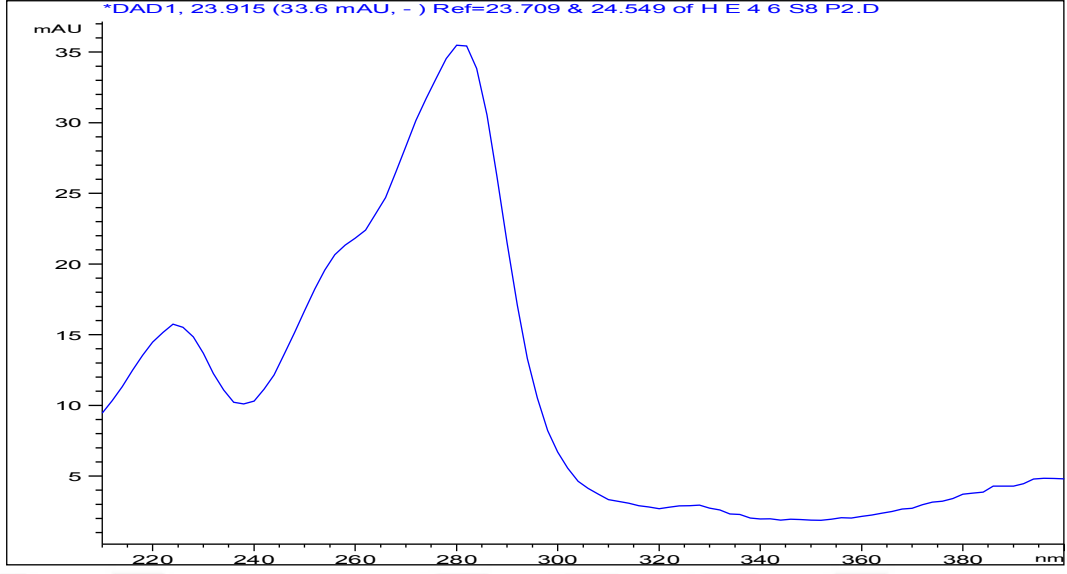
Çizelge 3.10. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK’de kullanılan gradient sistem

Zaman (dk)	Ultra Saf Su (%)	Metanol (%)	Akış Hızı (ml/dk)	Enjeksiyon hacmi
0	90	10	2.000	40 µl
5	50	50	2.000	
10	30	70	2.000	
15	10	90	2.000	
20	0	100	2.000	
30	90	10	2.000	

Bu fraksiyonda gözlenen 2 pik toplandı. Bunlardan P2 (29.165 dakikada gözlenen) yeterli miktarda (3.2 mg) toplanmıştır.



Şekil 3.42. Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P2’nin YPSK kromatogramı

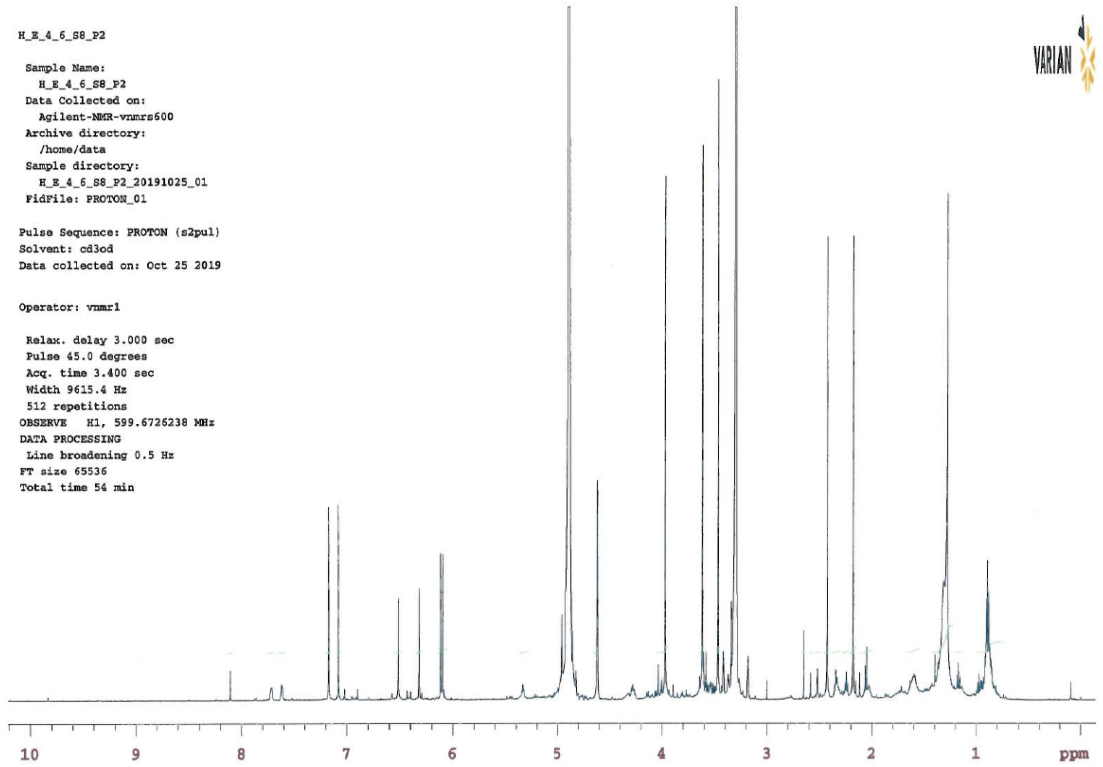


Şekil 3.43. H:E 4:6 S8 P2'nin UV spektrumu

Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P2'nin analitik kolon ve genel gradient sistemi kullanılarak gerçekleştirilen YPSK analizi ve UV spektrumu sırasıyla Şekil 3.42 ve 3.43'te verilmiştir.

Yapı tayinini gerçekleştirmek için NMR yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.44, 3.45, 3.46, 3.47 ve 3.48'de ve NMR dataları ise Çizelge 3.11'de verilmiştir.

H_E_4_6_S8_P2
Sample Name:
H_E_4_6_S8_P2
Data Collected on:
Agilent-NMR-vnmrs600
Archive directory:
/home/data
Sample directory:
H_E_4_6_S8_P2_20191025_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Oct 25 2019
Operator: vnmr1
Relax. delay 3.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.400 sec
Width 9615.4 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 599.6726238 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 54 min



Şekil 3.44. H:E 4:6 S8 P2'nin ¹H-NMR spektrumu

H_E_4_6_S8_P2

Sample Name:

H_E_4_6_S8_P2

Data Collected on:

Agilent-MMR-vnmr5600

Archive directory:

/home/data

Sample directory:

H_E_4_6_S8_P2_20191025_01

FidFile: APT_01

Pulse Sequence: APT

Solvent: cd3od

Data collected on: Oct 25 2019

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degrees

2nd pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.865 sec

Width 37878.8 Hz

100000 repetitions

OBSERVE C13, 150.7673994 MHz

DECOUPLE H1, 599.6756222 MHz

Power 43 dB

on during acquisition

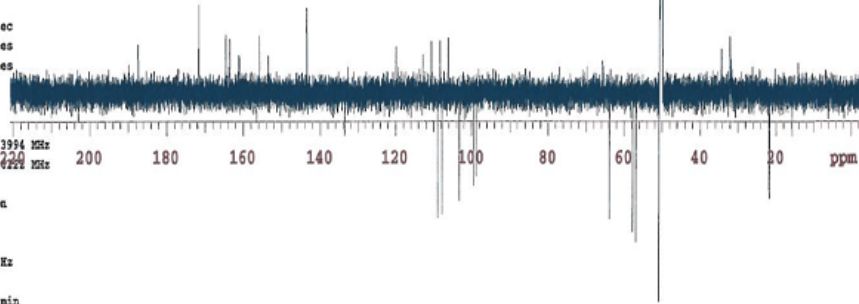
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

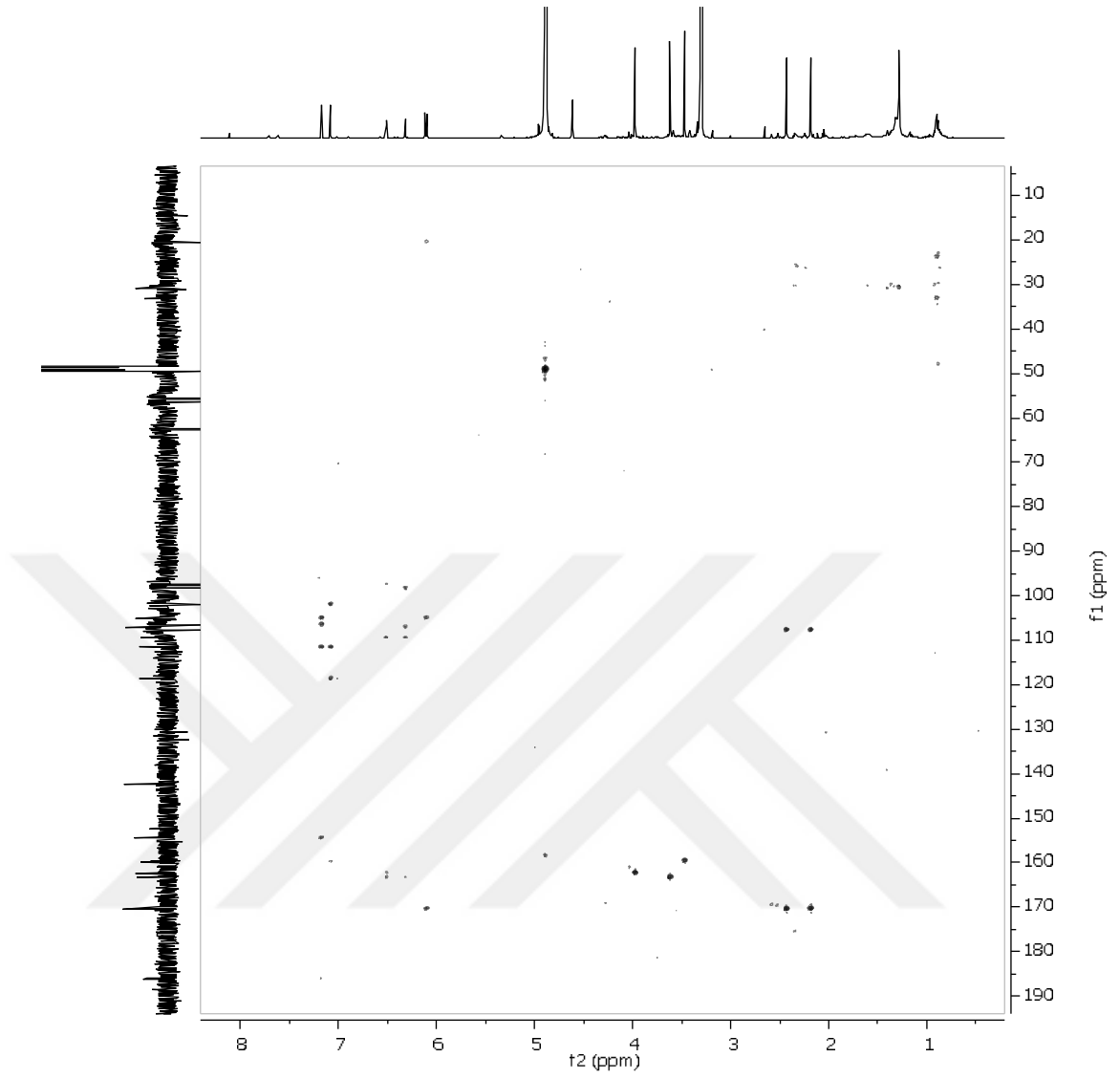
Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

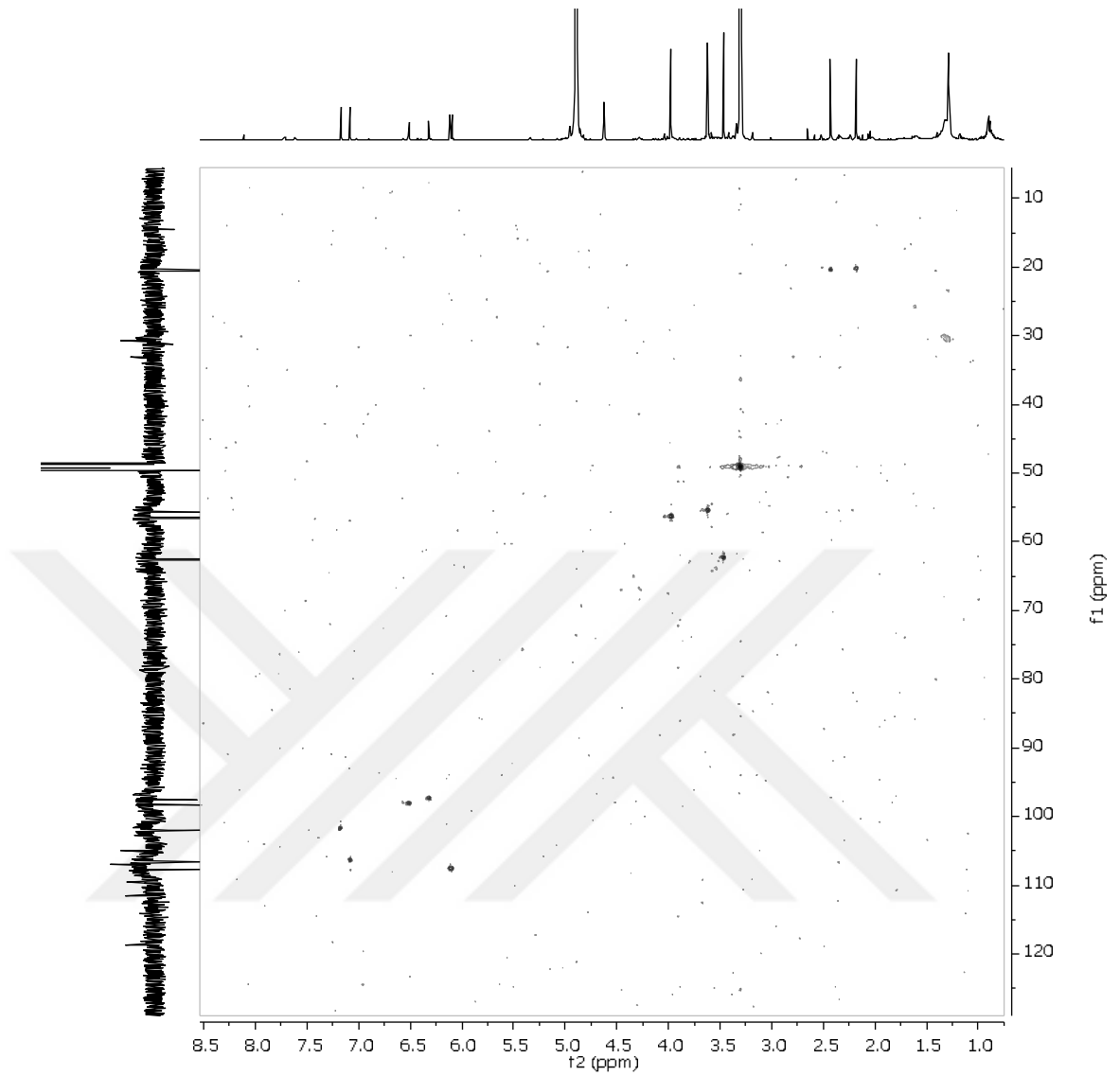
Total time 52 hr, 14 min



Şekil 3.45. H:E 4:6 S8 P2'nin ^{13}C -NMR sonucu



Şekil 3.47. H:E 4:6 S8 P2'nin gHMBC spektrumu



Şekil 3.48. H:E 4:6 S8 P2'nin gHMQC spektrumu

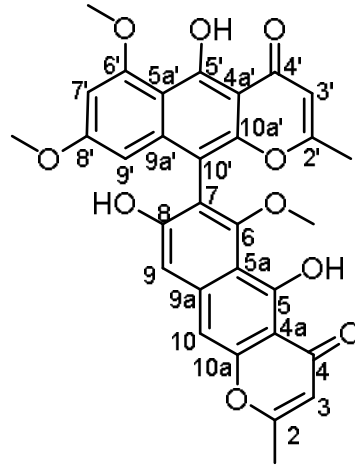
Çizelge 3.11. H:E 4:6 S8 P2'nin ^1H ve ^{13}C NMR dataları

Dianhydroaurasperone C in methanol- d_4 , 400 MHz		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
2		171.1, C
3	6.10, s (1H)	107.5, CH
4		186.1, C
4a		106.2, C

Çizelge 3.11. Devam

#	δ_H (multi, J [Hz])	δ_C , type
5		163.3, C
5a		112.8, C
6		160.9, C
7		119.9, C
8		162.6, C
9	7.09, s (1H)	106.3, CH
9a		140.2, C
10	7.18, s (1H)	101.7, CH
10a		155.7, C
2-Me	2.44, s (3H)	20.4, CH ₃
2-OMe	3.47, s (3H)	62.3, CH ₃
2'		171.6, C
3'	6.12, s (1H)	107.6, CH
4'		186.2, C
4a'		106.2, C
5'		163.4, C
6'		110.5, C
6a'		163.5, C
7'	6.52, d (1H, 2.3)	98.1, CH
8'		164.5, C
9'	6.32, d (1H, 2.3)	97.3, CH
9a'		140.3, C
10'		108.2, C
10a'		152.3, C
2'-Me	2.19, s (3H)	20.2, CH ₃
6'-OMe	3.95, s (3H)	56.3, CH ₃
8'-OMe	3.63, s (3H)	55.4, CH ₃

H:E 4:6 S8 P2'ye ait YPSK kromatogramı 225 ve 282 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir. APT-NMR spektrumu 31 farklı karbon rezonansı olduğunu göstermiş olup bunların 20 tanesi kuaterner karbondur ve içlerinden 2 tanesi karbonil karbonu (δ_C 186.2 and δ_C 186.1 ppm), 6 tanesi metin karbonu (δ_C 107.6, δ_C 107.5, δ_C 106.3, δ_C 101.7, δ_C 98.1 ve δ_C 97.3 ppm) ve ikisi aromatik metil (δ_C 20.4 ve δ_C 20.2) üçü metoksi karbonu (δ_C 62.3, δ_C 56.3 ve δ_C 55.4) olmak üzere 5'i metil karbondur. 1H , 1H - 1H COSY ve HMQC spektrumları, δ_H 6.52 ve δ_H 6.32'deki iki meta bağlı aromatik proton arasında bir spin sisteminin bulunduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak, δ_H 7.18 (δ_C 101.7), δ_H 7.09 (δ_C 106.3), δ_H 6.12 (δ_C 107.6) ve δ_H 6.10 (δ_C 107.5) ppm'de 4 singlet aromatik protonun varlığı da bu spektrumlarla ortaya konulmuştur. δ_H 2.44 (δ_C 20.4) ve δ_H 2.19 (δ_C 20.2) ppm'deki iki singlet olefinik metil grubu da δ_H 3.95 (δ_C 56.3), δ_H 3.63 (δ_C 55.4) ve δ_H 3.47 (δ_C 62.3) ppm'deki 3 aromatik metoksi grubuyla birlikte gözlenmiştir. Elde edilen tüm bu veriler rapor edilmiş literatürlerle karşılaştırıldığında bileşiğin naftopiron fungal metabolitlerle benzerlik gösterdiği görülmüş ve dianhidroaurasperon C olduğu anlaşılmıştır (Akiyama ve ark., 2003; Fang ve ark., 2016; Ikeda ve ark., 1990; Li ve ark., 2013; Shaaban ve ark., 2012; Xiao ve ark., 2014). Bileşiğin kimyasal formülü Şekil 3.49'da verilmiştir.



Şekil 3.49. H:E 4:6 S8 P2'nin kimyasal formülü

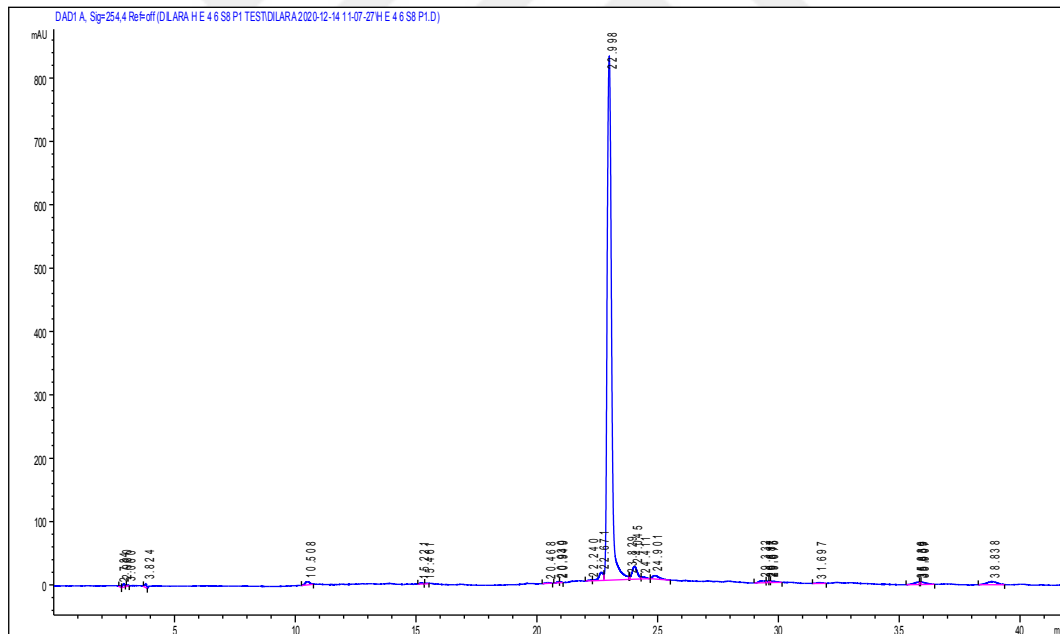
Dianhidroaurasperon C

5,5', 8-trihidroksi-6,6', 8'-trimetoksi-2,2'-dimetil-4H, 4'H- [7,10'-bibenzo [g] kromen] -4,4'- dion

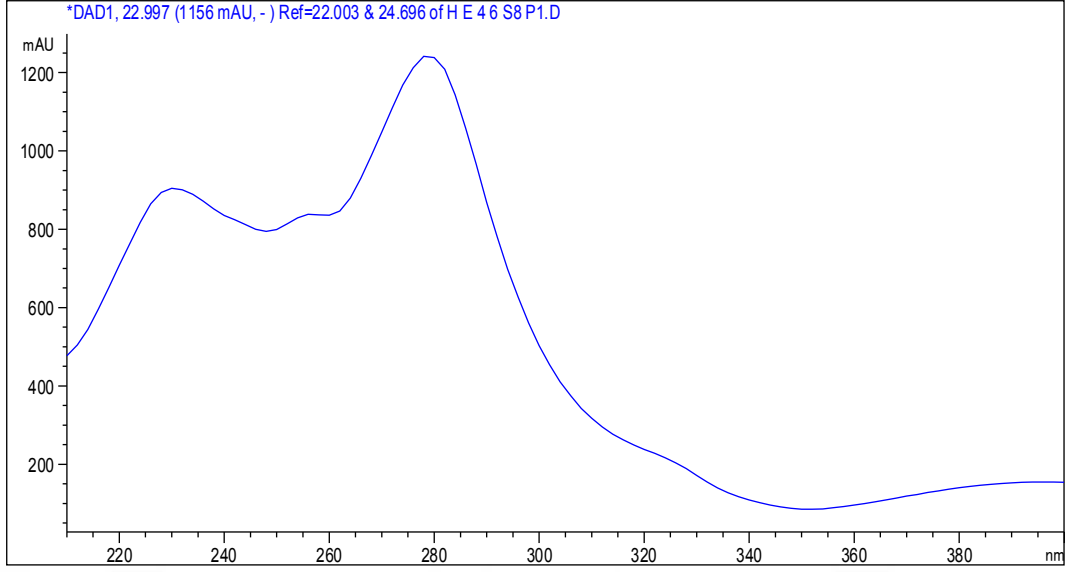
Kimyasal formül: $C_{31}H_{24}O_{10}$

Molekül ağırlığı: 556.52300

H:E 4:6 S8 fraksiyonundan izole edilen diğer sekonder bileşik YPSK kromatogramında 21.596 dakikada gözlenen P1'dir. Bu maddeden 2.3 mg toplanmıştır. Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P1'in analitik kolon ve genel gradient sistemi kullanılarak yapılan YPSK analizi ve UV spektrumu sırasıyla Şekil 3.50 ve 3.51'de verilmiştir.

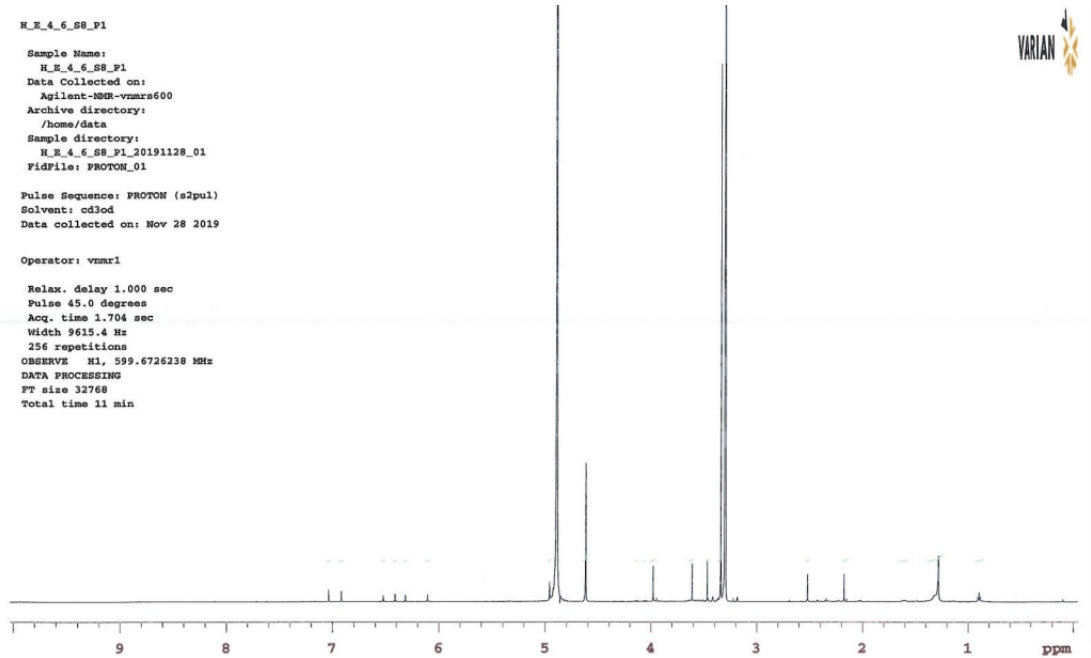


Şekil 3.50. Saf olarak izole edilen H:E 4:6 S8 P1'in YPSK kromatogramı

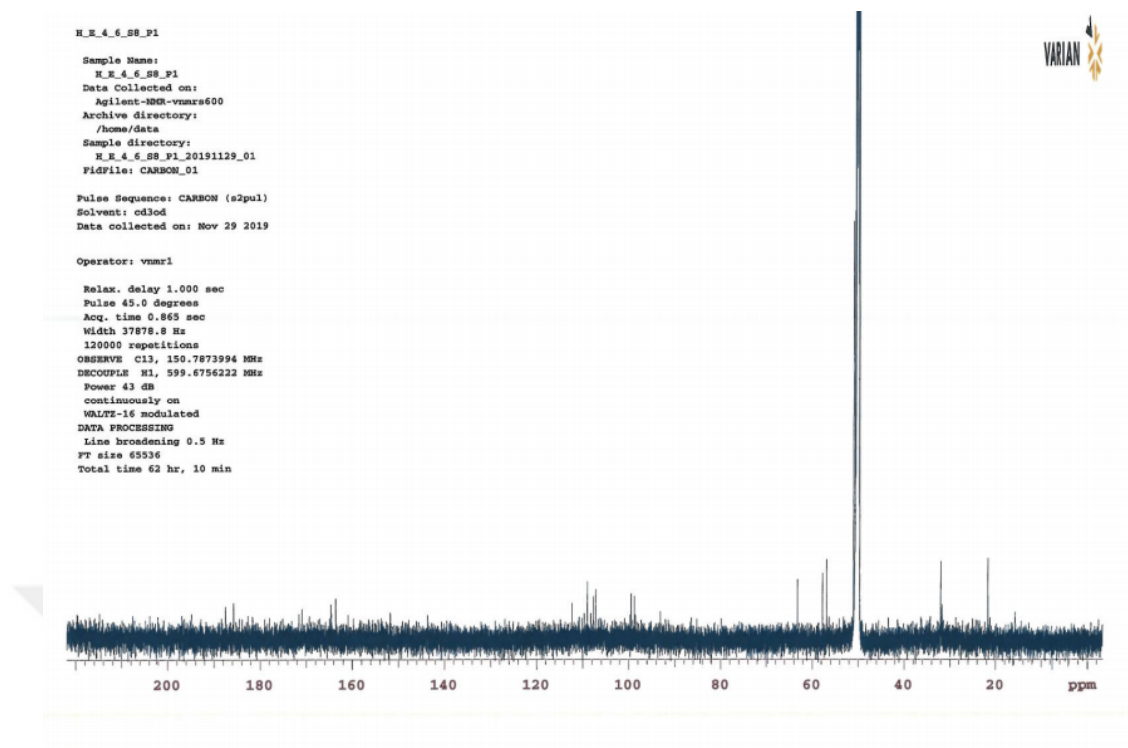


Şekil 3.51. H:E 4:6 S8 P1'in UV spektrumu

Yapı tayinini gerçekleştirmek için NMR yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.52 ve 3.53'te, NMR dataları Çizelge 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.52. H:E 4:6 S8 P1'in ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.53. H:E 4:6 S8 P1'in ^{13}C -NMR spektrumu

Çizelge 3.12. H:E 4:6 S8 P1'in ^1H ve ^{13}C NMR dataları

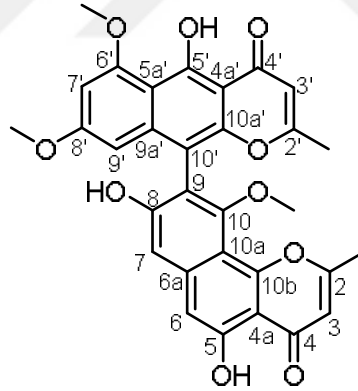
Asperpyrone A in methanol-d ₄ , 400 MHz		
#	δ_{H} (multi, J[Hz])	δ_{C} , type
2		170.8, C
3	6.42, s (1H)	112.3, CH
4		184.5, CO
4a		111.0, C
5		155.5, C
6	6.92, s (1H)	107.0, CH
6a		140.1, C
7	7.04, s (1H)	107.6, CH
8		158.4, C
9		118.4, C
10		159.6, C
10a		109.6, C

Çizelge 3.12. Devam

#	δ_H (multi, J [Hz])	δ_C , type
10b		154.7, C
2-Me	2.53, s (3H)	20.5, CH ₃
10-OMe	3.48, s (3H)	62.0, CH ₃
2'		171.4, C
3'	6.11, s (1H)	108.9, CH
4'		186.2, C
4a'		103.3, C
5'		162.0, C
5a'		110.8, C
6'		162.3, C
7'	6.53, d (2.2, 1H)	98.3, CH
8'		163.4, C
9'	6.32, d (2.2, 1H)	97.6, CH
9a'		140.0, C
10'		108.2, C
10a'		150.2, C
2'-Me	2.18, s (3H)	20.6, CH ₃
6'-OMe	3.99, s (3H)	56.5, CH ₃
8'-OMe	3.62, s (3H)	55.7, CH ₃

Bileşik sarı renkte amorf katı şeklinde izole edilmiştir. H:E 4:6 S8 P1'e ait YPSK kromatogramı değerlendirildiğinde 225 ve 282 nm'lerde maksimum absorpsiyon görülmüştür. ¹³C ve HMQC NMR verileri bileşikte 31 adet karbon rezonansı bulunduğunu ortaya koymuş olup bunlardan 20'si kuaterner karbon, ikisi δ_C 186.2 ve δ_C 184.5 ppm'de karbonil karbonu, δ_C 112.3, δ_C 108.9, δ_C 107.6, δ_C

107.0, δ_C 98.3 ve δ_C 97.6 ppm'de 6 metin karbonu ile δ_C 20.6 ve δ_C 20.5 ppm'de iki aromatik metil karbonuyla δ_C 62.0, δ_C 56.5 ve δ_C 55.7 ppm'de 3 metoksi karbonu şeklinde kendini gösteren 5 metil karbonunun varlığı anlaşılmıştır. Bileşiğe ait 1H NMR ve HMQC spektrumları δ_H 6.53 ve δ_H 6.32 konumlarındaki iki meta bağlı aromatik proton arasında bir spin sistemi bulunduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak δ_H 7.04 (δ_C 107.6), δ_H 6.92 (δ_C 107.0), δ_H 6.42 (δ_C 112.3) ve δ_H 6.11 (δ_C 108.9) ppm'de 4 singlet aromatik proton, δ_H 2.53 (δ_C 20.5) ve δ_H 2.18 (δ_C 20.6) ppm'de tespit edilmiştir. İki singlet olefinik metil grubu ile δ_H 3.99 (δ_C 56.5), δ_H 3.62 (δ_C 55.7) ve δ_H 3.48 (δ_C 62.0) ppm'de 3 aromatik metoksi grubu ile beraber gözlenmiştir. H:E 4:6 S8 P1 için elde edilen bu veriler, NMR tablolarını karşılaştırmak için benzer veriler içeren literatürlerle karşılaştırıldığında naftopiron fungal metabolitlerde görülene benzer bir yapı olduğu tespit edilmiş bileşiğin asperpiron A olduğu anlaşılmıştır (Akiyama ve ark., 2003; Fang ve ark., 2016; Ikeda ve ark., 1990; Li ve ark., 2013; Shaaban ve ark., 2012; Xiao ve ark., 2014). Kimyasal formülü Şekil 3.54'te gösterilmektedir.



Şekil 3.54. H:E 4:6 S8 P1'in kimyasal formülü

Asperpiron A

10- (5,8-dihidroksi-10-metoksi-2-metil-4-okso-4H-benzo [h] kromen-9-il) -5-hidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil-4H- benzo [g] kromen-4-on

Kimyasal formül: $C_{31}H_{24}O_{10}$

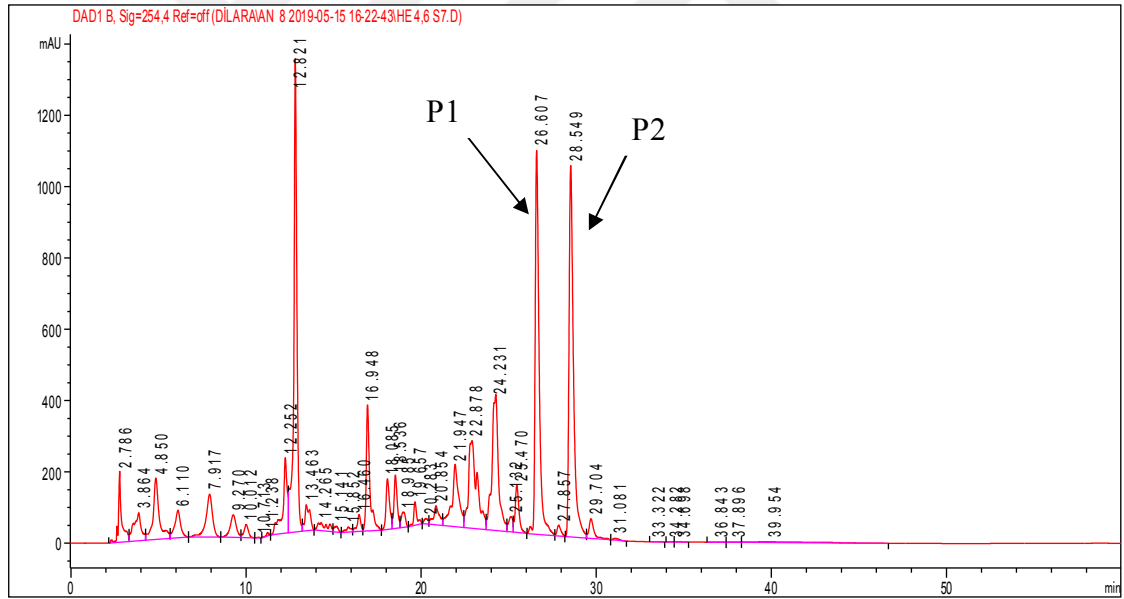
Gerçek ağırlık: 556,13695

Molekül ağırlığı: 556,52300

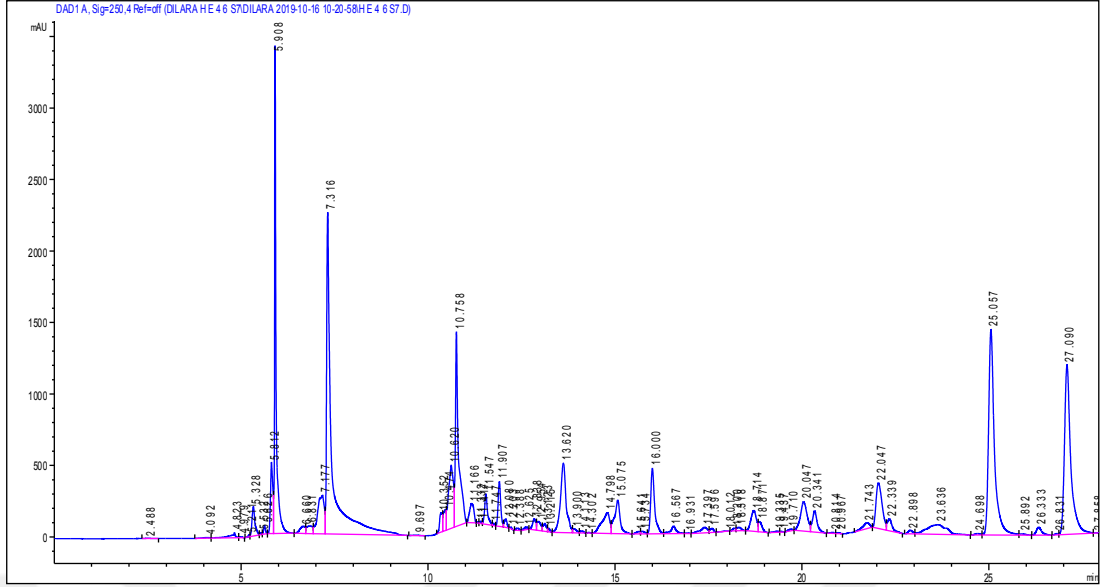
Bu bileşik güçlü antifungal etki göstermektedir. Ayrıca *S. aureus* ve *B. subtilis*'in büyümesini inhibe etmektedir (Xiao ve ark., 2014).

3.3.7. α , β -Soforoz (Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1)

Diğer bir alt fraksiyon Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 ile çalışılmıştır. Analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen ve Şekil 3.55'te sunulan kromatogramda gösterildiği üzere iki pik toplanmıştır. Bunlardan P1 dakika 26.607'de, P2 ise dakika 28.549'da gözlenmiştir. Her iki maddeden de sırasıyla 11,34 mg ve 13,19 gram toplanmıştır.



Şekil 3.55. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin YPSK kromatogramı

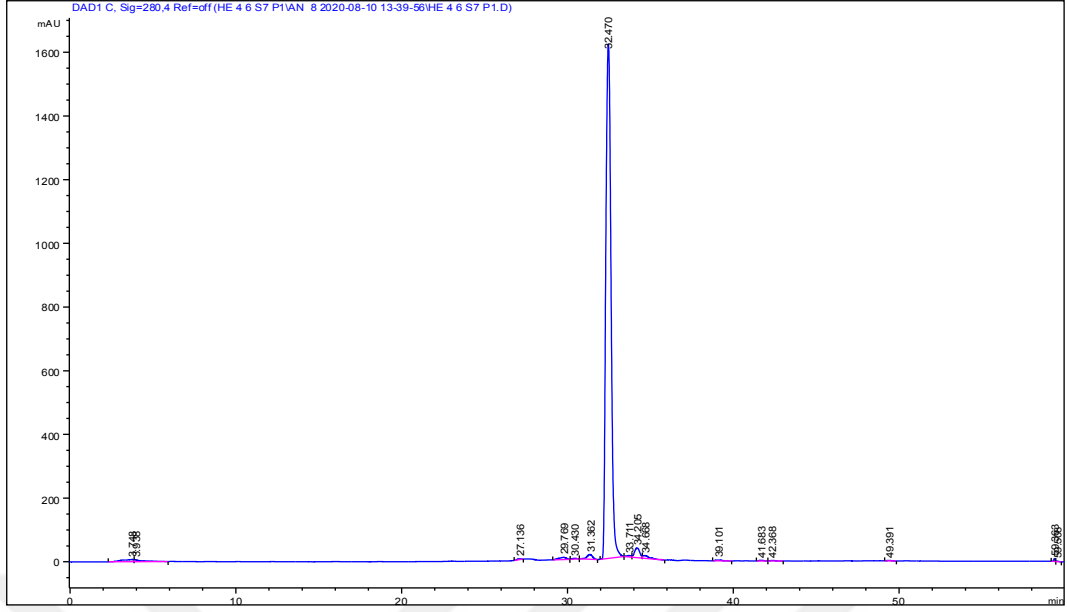


Şekil 3.56. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin semipreparatif YPSK analizi

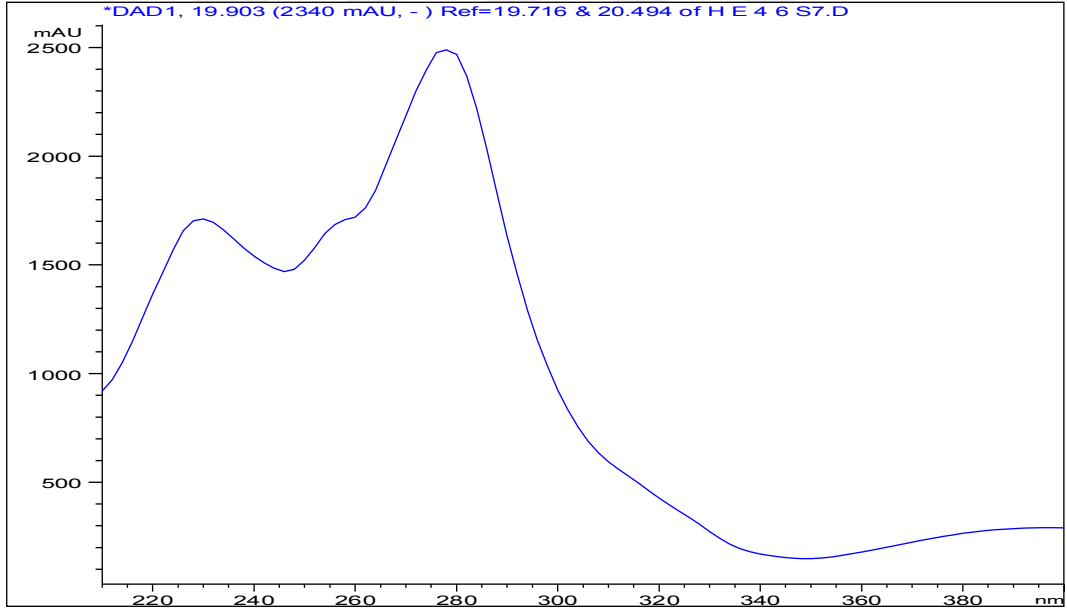
Çizelge 3.13. Semipreparatif kolonla gerçekleştirilen YPSK'de kullanılan gradient sistem

Zaman (dk)	Ultra Saf Su (%)	Asetonitril (%)	Akış Hızı (ml/dk)	Enjeksiyon hacmi
0	90	10	2.000	35 µl
3	65	35	2.000	
5	50	50	2.000	
6	48	52	2.000	
10	38	62	2.000	
15	20	80	2.000	
20	15	85	2.000	
25	20	80	2.000	
30	30	70	2.000	

Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin semipreparatif kolon ve Çizelge 3.13'te verilen gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK analiz sonucu Şekil 3.56'da verilmiştir.

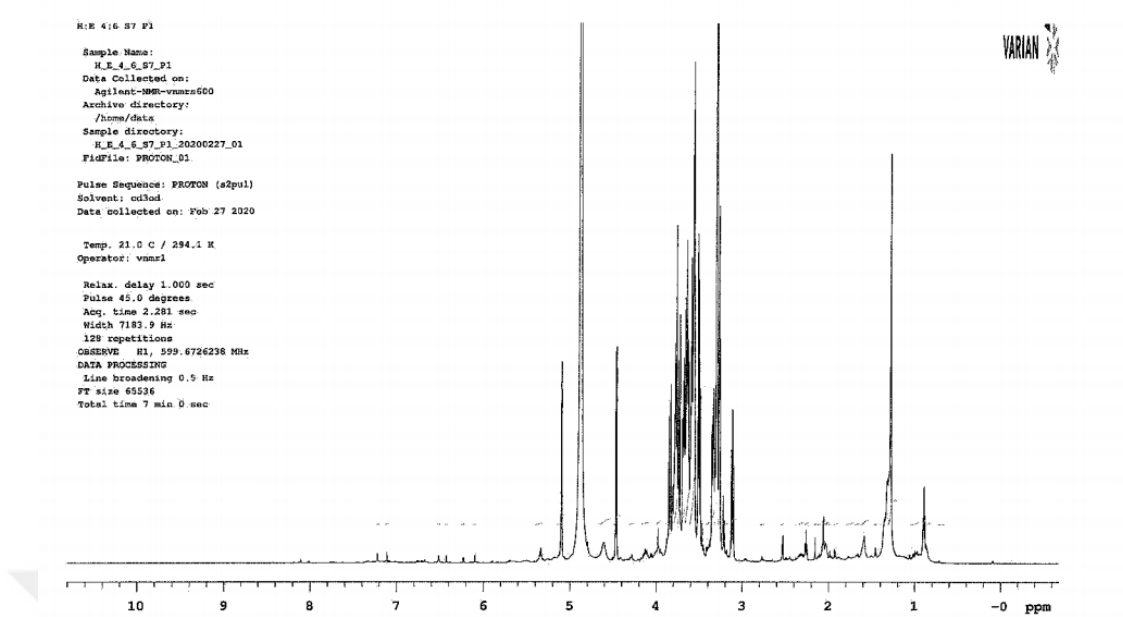


Şekil 3.57. Saf olarak izole edilen Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in YPSK kromatogramı

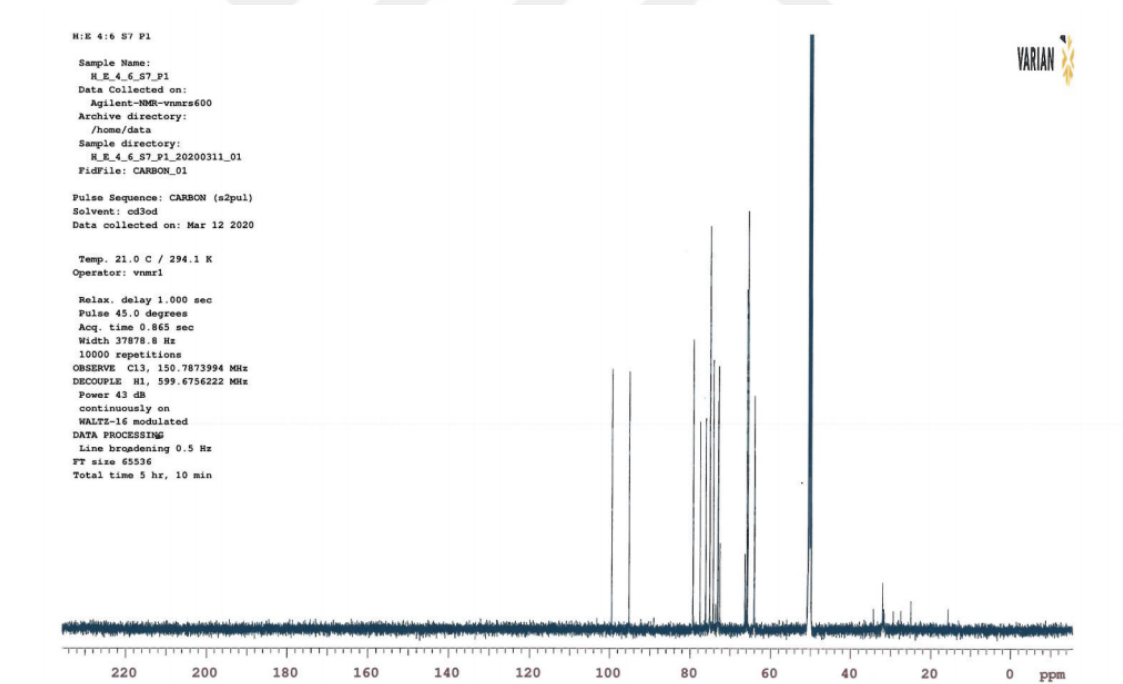


Şekil 3.58. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in UV spektrumu

Saf olarak izole edilen Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1 isimli sekonder metabolitin analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK analizi ve UV spekturumu sırasıyla Şekil 3.57 ve 3.58'de verilmiştir.



Şekil 3.59. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.60. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ^{13}C -NMR spektrumu

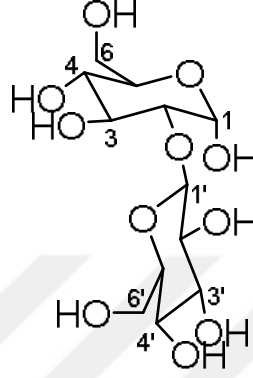
Bileşiğe ait NMR spektrumları Şekil 3.59 ve 3.60'ta, NMR dataları ise Çizelge 3.14'te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'in ^1H ve ^{13}C NMR dataları

^1H and ^{13}C NMR Data of sophorose		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
1	5.21 (1H, d, 3.7)	93.95
2	3.46 (1H, dd, 9.7, 3.7)	72.37
3	3.57-3.88 (m)	78.07
4	3.61 (1H, dd, 11.2, 6.0)	70.69
5	3.57-3.88 (m)	71.87
6	3.57-3.88 (m)	61.06
1'	4.60 (1H, d, 7.8)	98.20
2'	3.22 (1H, dd, 9.2, 7.8)	70.78
3'	3.57-3.88 (m)	73.56
4'	3.57-3.88 (m)	70.11
5'	3.57-3.88 (m)	72.44
6'	3.57-3.88 (m)	61.05

Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1 beyazımsı sarı katı bir toz olarak izole edilmiştir. Yapısında herhangi bir kromofor bulunmadığından UV ışığı absorblamamıştır. ^1H -NMR spektrumu ve NMR verilerindeki karakteristik bilgilerden, δ_{H} 4.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) ve δ_{H} 5.21 ppm'de (1H, d, $J = 3.7$ Hz) iki anomerik karbon içeren disakkarit yapısı gözlenmiş olup HMQC spektrumu yardımıyla bu karbonların sırasıyla δ_{C} 98.20 and δ_{C} 93.95 ppm konumlarında olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, iki monosakkaridin sırasıyla α ve β monomer olmak üzere zıt konfigürasyonlara sahip olduğunu göstermektedir. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1'nin ^{13}C spektrumu, disakkaridin iki heksozdan oluştuğunu gösteren 12 farklı

karbon pikinin varlığını göstermektedir. Soforozun elde edilen ^1H ve ^{13}C NMR verilerinin ve fungal kökenli farklı disakkaritler hakkında bildirilen Roslund ve arkadaşlarının literatürlerinin detaylı bir şekilde araştırılması ve karşılaştırılmasıyla, açık bir şekilde α , β -soforoz olduğu bulunmuştur (Roslund ve ark., 2008). Bileşiğin kimyasal formülü Şekil 3.61’te verilmiştir.



Şekil 3.61. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P1’in kimyasal formülü

α , β -Soforoz

(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -6- (hidroksimetil) -3 - (((2R, 3S, 4R, 5R, 6S) -3,4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) tetrahidro-2H -piran-2-il) oksi) tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol

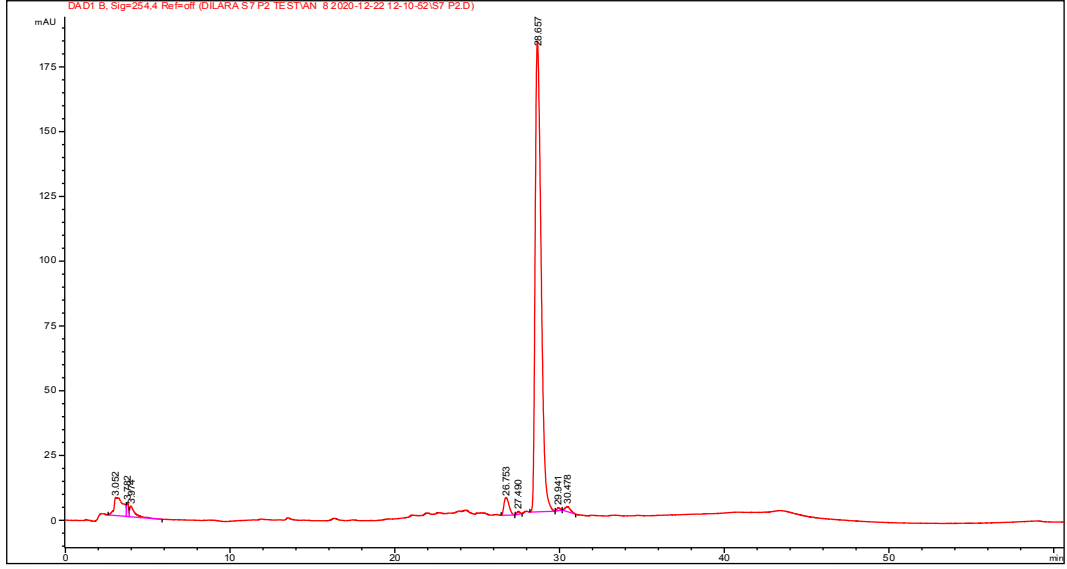
Kimyasal formül: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

Gerçek ağırlık: 342,12

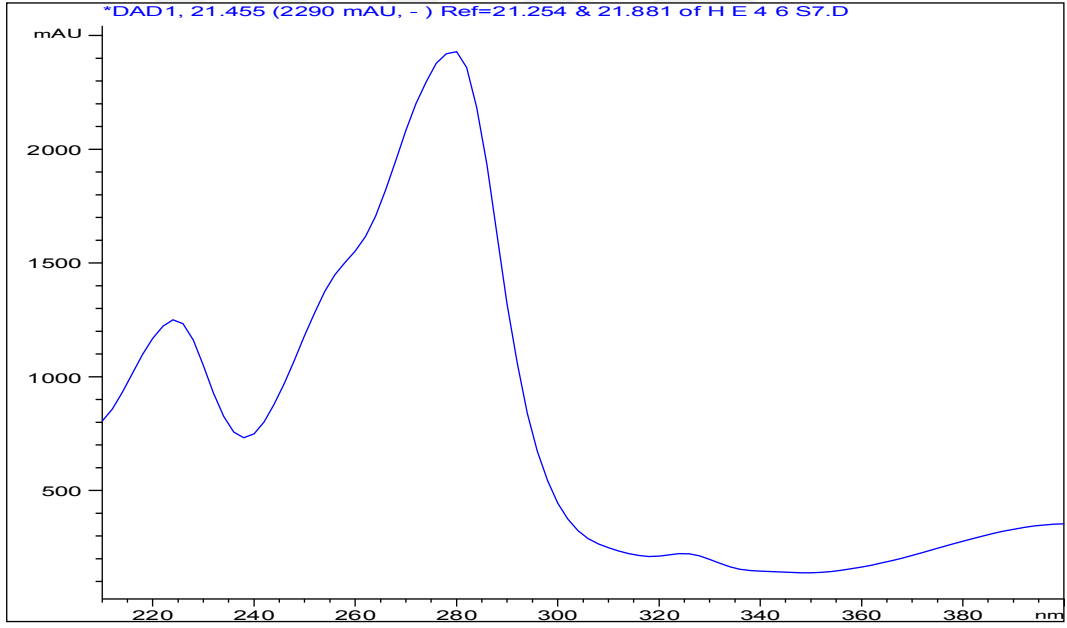
Molekül ağırlığı: 342,30

3.3.8. α , β - Sellobiyoz (Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2)

Saf olarak izole edilen Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2 bileşiğinin analitik kolon ve genel gradient sistemiyle gerçekleştirilen YPSK analiz sonucu ve UV spektrumu sırasıyla Şekil 3.62 ve 3.63’te verilmiştir.

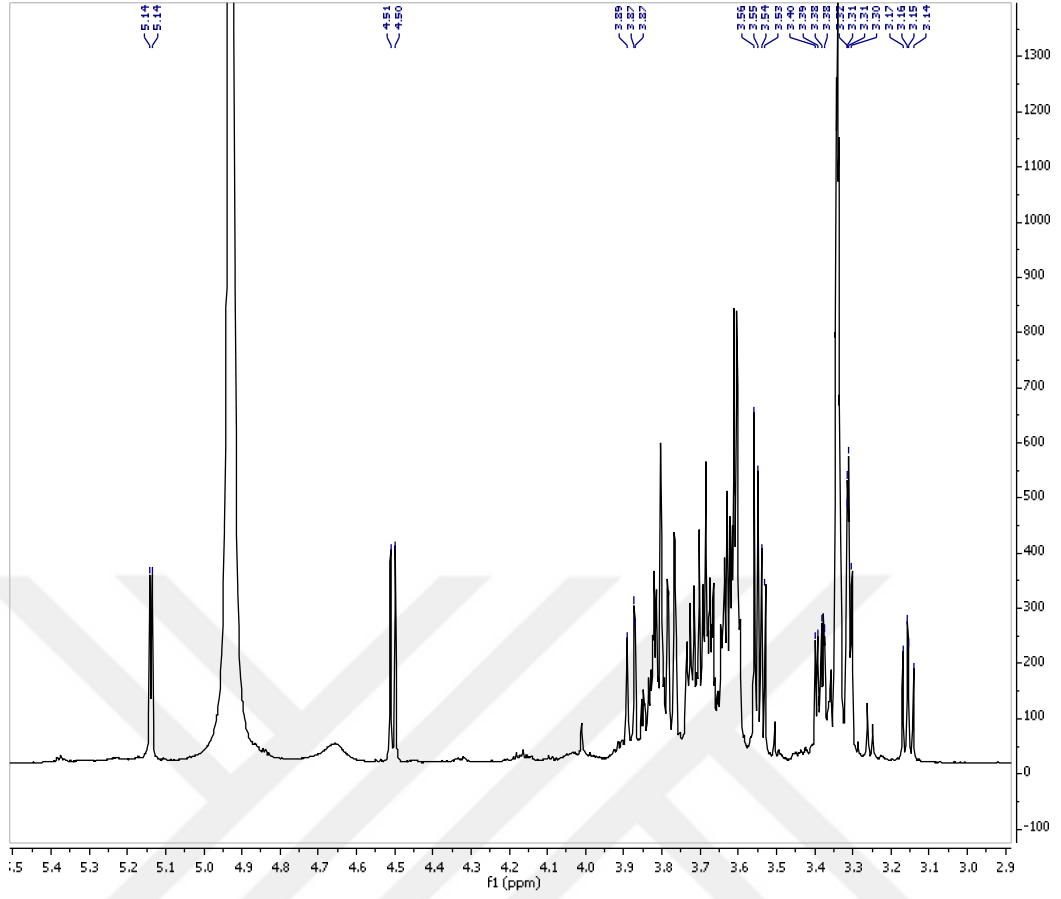


Şekil 3.62. Hekzan:Etilasetat 40:60 S7'nin YPSK kromatogramı

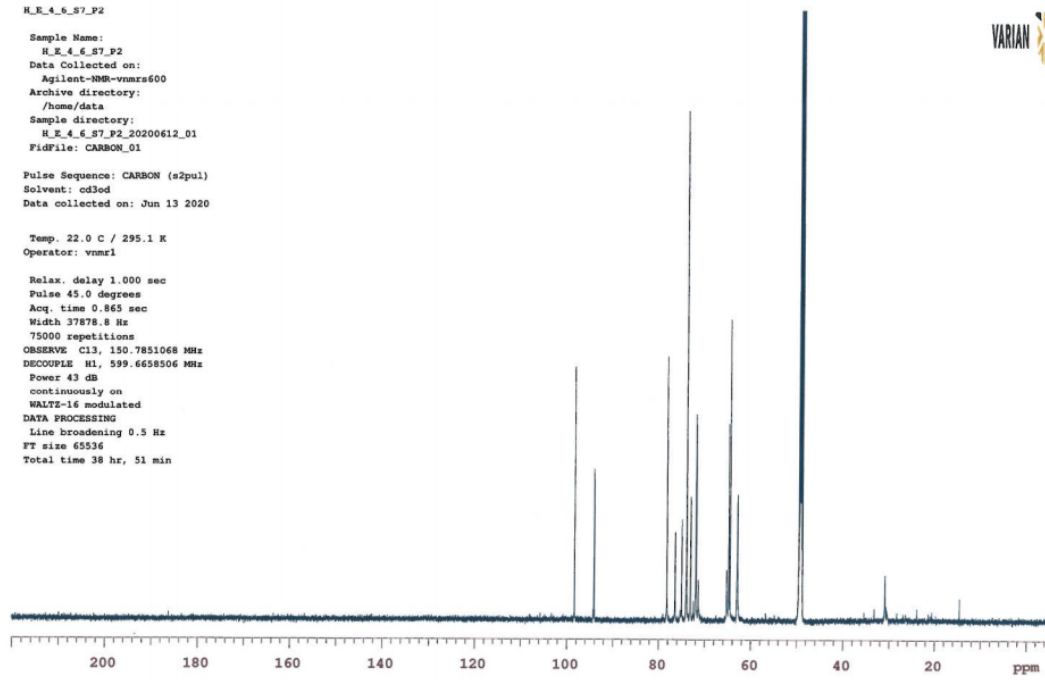


Şekil 3.63. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin UV spektrumu

Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2 isimli sekonder metabolitin Şekil 3.64 ve 3.65'te verilen NMR spektrumları ve Çizelge 3.15'te verilen NMR dataları yorumlanarak bir disakkarit birimi sellobiyoz olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.64. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.65. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ^{13}C -NMR spektrumu

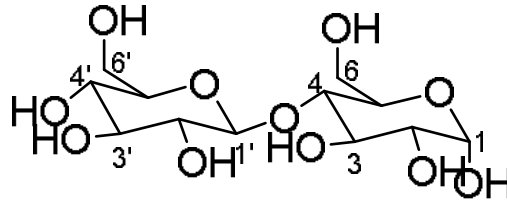
Çizelge 3.15. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin ^1H ve ^{13}C NMR dataları

^1H and ^{13}C NMR Data of cellobiose		
#	δ_{H} (multi, J [Hz])	δ_{C} , type
1	5.14 (1H, d, 3.7)	93.88
2	3.61 (1H, dd, 9.8, 3.7)	71.87
3	3.57-3.88 (m)	71.98
4	3.54 (1H, dd, 11.2, 6.0)	78.02
5	3.57-3.88 (m)	70.75
6	3.57-3.88 (m)	60.60
1'	4.50 (1H, d, 7.8)	98.19
2'	3.16 (1H, dd, 9.2, 7.8)	73.82
3'	3.57-3.88 (m)	76.16

Çizelge 3.15. Devam

#	δ_H (multi, J[Hz])	δ_C , type
4'	3.57-3.88 (m)	70.12
5'	3.57-3.88 (m)	76.63
6'	3.57-3.88 (m)	61.25

Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2 sarı renkte amorf bir katı olarak izole edilmiştir. Bileşikte herhangi bir kromofor grubu olmadığı için UV absorpsiyon yapmamıştır. 1H ve ^{13}C NMR verileri soforozda belirtilen disakkarit yapısına benzer bir düzen içerisinde görünmektedir. ^{13}C NMR spektrumunda 12 karbon piki açığa çıkarmış olup bu iki heksoz monomerinin oluşturduğu bir disakkarite işaret etmektedir. Verilerin incelenmesi ve Roslung ve arkadaşlarının literatürlerindeki verilerle kıyaslanması sonucu bileşiğin Şekil 3.66'da gösterilen α,β -sellobiyoz olduğu sonucuna varılmıştır (Roslund ve ark., 2008).



Şekil 3.66. Hekzan: Etilasetat 40:60 S7 P2'nin kimyasal formülü

α,β -Sellobiyoz

(2S, 3R, 4R, 5S, 6R) -6- (hidroksimetil) -5 - (((2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) tetrahidro-2H -piran-2-il) oksi) tetrahidro-2H-piran-2,3,4-triol

Kimyasal formül: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Gerçek ağırlık: 342,12

Molekül ağırlığı: 342,30

4. TARTIŞMA

Deniz kaynaklı *Rhizopus oryzae* Went & Prins.Geerl. mantarı hakkında yapılan literatür taraması sonucu daha önce yapılan farmakognozik çalışmaya ait bir kayıt bulunamamıştır. Bu mantar enzim üretimi, organik asit sentezi ve çeşitli fermente gıdalarda kullanılmaktadır. Çalışmalarımız sonucu dokuz sekonder metabolit izole edilerek yapısı aydınlatılmıştır. Bu metabolitlerden dört tanesi ilk kez keşfedilen yeni mikofenolik asit türevleridir. Trivial isimleri “penicacid H, penicacid I, penicacid J ve penicacid K”dir. Diğer izole edilen bileşikler daha önceden farklı kaynaklardan elde edilmiştir.

Bu metabolitlerden aurasperon D, daha önce mangoda bulunan *Aspergillus niger*’den (Ghosal ve ark., 1979), depolanan pamuk tohumlarında bulunan *Aspergillus niger* ’den(Ehrlich ve ark., 1984) üzümlerde bulunan *Aspergillus niger* C-433’ten (Bouras ve ark., 2005), *Heteroscyphus tener* (Steph.) Schiffn. bitkisinde endofitik olarak bulunan *Aspergillus niger*’den(Li ve ark., 2013), Mısır’ın Kızıl Deniz kıyılarından toplanan *Echinodictyum flabelliforme* süngerinden elde edilen mantar *Aspergillus flavus* Af/MMA 2018’den (Awady ve ark., 2019), *Parmotrema ravum* likeninin talluslarından izole edilen *Aspergillus niger* Tiegh mantarından (Padhi ve ark., 2020) izole edilmiştir. Padhi ve arkadaşlarının çalışmasında *Aspergillus niger* Tiegh mantarından elde edilen aurasperon D’nin antimikrobiyal etkisi araştırılmış fakat herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Diğer bir metabolit olan dianhidroaurasperon C daha önce çöl bitkisi *Fallugia paradoxa*’tan elde edilen *Aspergillus tubingensis*’ten (Zhan ve ark., 2007), *Melia azedarach*’tan izole edilen *Aspergillus sp.* KJ-9 endofitik mantardan (Xiao ve ark., 2014), deniz kaynaklı mantar *Aspergillus foetidus* KMM 4694’ten (Antonov ve ark., 2019), kahverengi alg *Leathesia nana*’dan elde edilen *Aspergillus sp.* XNM-4’ten (K. Xu ve ark., 2019) izole edilmiştir. K. Xu ve ark. tarafından yürütülen çalışmada

sitotoksik aktivitesi incelenmiş fakat yeterli bulunmamıştır. *Aspergillus tubingensis* G131 suşundan da izole edilmiş ve antioksidan etki bakımından araştırılmış fakat başarılı sonuç alınamamıştır (Carboué ve ark., 2019).

Daha eski tarihli başka bir çalışmada *Aspergillus* M39 suşundan saflaştırılmış dianhidroaurasperon C ve rubrofusarin B'nin KB hücrelerinde çoklu ilaç direncini tersine çevirmede etkili olduğu bulunmuştur (Ikeda ve ark., 1990).

Asperpiron A, *Aspergillus niger*'den izole edilen doğal bir bileşiktir, bis-nafto- γ -piron (BNP) olarak adlandırılan önemli bir aromatik poliketid grubunda yer almaktadır ve çeşitli biyolojik (antitümör, antimikrobiyal ve antioksidan) aktivitelerine sahiptir. Bu aktivitelerinin yanı sıra yapılan bir çalışmada Asperpiron A'nın osteoklastogenez üzerindeki etkilerini araştırmak ve mekanizmasını keşfetmek amaçlanmıştır. Asperpiron A'nın, konsantrasyonu 1 μ m'ye ulaştığında ve sitotoksikite olmaksızın (10 μ m'ye ulaşana kadar) RANKL ile indüklenen osteoklastogenezini inhibe ettiğini bulunmuştur. Araştırma sonucunda Asperpiron A'nın, NFATc1, Ca²⁺ sinyali ve oksidatif stresin yanı sıra MAPK ve NF- κ B sinyal yollarını baskılayarak RANKL kaynaklı osteoklast oluşumunu zayıflattığı tespit edilmiş ve bu sonuç da bu bileşiğin osteoporozun önlenmesi veya tedavisi için potansiyel bir aday ilaç olabileceğini göstermektedir (X. Chen ve ark., 2019).

Bir deniz yosunu olan *Sargassum sp.*'den izole edilen deniz kaynaklı *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30'dan, 11 asperpiron tipi bileşikler izole edilmiştir. Yapılan bir çalışmada tüm BNP'ler, insan tümör hücrelerine (IC₅₀ > 30 μ M) karşı zayıf sitotoksikite göstermiştir. Asperpiron A belirgin COX-2-inhibitör aktivite sergilemiştir (Fang ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise Japonya, Sakai'de toprak örneklerinde bulunan *A. niger*'den izole edilen asperpiron A'nın

Taq DNA polimeraz üzerinde inhibe edici aktivite gösterdiğini bildirilmiştir (Lima ve ark., 2019).

İzole edilen metabolitlerden soforoz ise daha önce arı sütünden (Siddiqui ve Furgala, 1965) ve *Candida bombicola* mayasından izole edilmiştir. *Candida bombicola* mayası tarafından sophorolipidlerin üretimi sırasında az miktarlarda serbest soforozun varlığını tespit edilmiştir. Soforozun açığa çıkmasının, sophorolipidlerin hidrolizi sonucu açığa çıkan asetillenmiş soforoz türevlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Al-Jasim ve ark., 2016)

Disakkarit soforoz ile hidroksile yağ asitlerinin birleşiminden oluşan sophorolipidler yüzey aktif özellikte maddelerdir ve 40 yılı aşkın süredir bilinmektedir. Ticari olarak bu moleküller, *Starmerella bombicola* mayasından elde edilir ve yüzey aktif maddeler için yenilenebilir bir alternatif sunmaktadır (Delbeke ve ark., 2018).

Sellobiyoz ise β -(1,4') glikozidik bağ ile bağlanan iki glikoz molekülünden oluşur. Glikozidik bağdaki konfigürasyonu maltozdan farklıdır. Maltozda olduğu gibi, sellobiyozun aglikonu da bir hemiasetaldir ve α veya β olabilir. Aglikon bir hemiasetal olduğu için sellobiyoz mutarotasyona uğrar. Aynı sebepten dolayı sellobiyoz bir indirgeyici şekerdir (Ouellette ve Rawn, 2018). Sellobiyoz, tüm birimlerin β -1,4'-glikozidik bağlarla bağlı olduğu bir homopolisakkarit olan selülozun hidrolizi ile üretilir (Ouellette ve Rawn, 2015).

Sellobiyozun hidroliz ile açığa çıkması *R. oryzae* mantarının selülaz üretmiş olduğu sonucuna varmamızı sağlamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda da *R. oryzae* mantarının enzim üretme yeteneği bildirilmiştir (Kupski ve ark., 2015).

R. oryzae mantarından izole edilen tüm yeni metabolitler mikofenolik asit türevleridir. Mikofenolik asit, antibakteriyel, antifungal, antiviral, immünosupresif ve antikanser etkilere sahiptir ayrıca klinikte organ nakli sonrasında vücudun organı reddetmesine engel olmak için vücudun bağışıklık sistemini zayıflatma amacıyla diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (Siebert ve ark., 2017). Bu bilgilerden hareketle deniz kaynaklı *R. oryzae* mantarının umut vadeden ve araştırılması gereken bir potansiyel biyoaktif metabolit kaynağı olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde yeni bir araştırma alanı ve bu konuda yapılan ikinci tez çalışması olması kapsamında bu tezde gerçekleştirilen çalışmaların amacı, deniz kaynaklı mantardan biyoaktif sekonder metabolitlerin izolasyonu ve bu ekstrenin 3 farklı biyoaktivitesi araştırılmıştır.

Bu konuda gerçekleştirilen çalışmaların amacı deniz kaynaklı mantarlardan elde edilebilecek çok farklı kimyasal yapılarda sekonder metabolitler izole etmek ve bu metabolitlerin biyoaktivitelerini araştırmaktır. Özellikle henüz etkili tedavilerin bulunmadığı çeşitli hastalıklar için yeni ilaç moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok kanser türü, viral ve fungal enfeksiyonlar, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar başarıyla tedavi edilememektedir. Patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere ve kanser hücrelerinin antitümör ilaçlara karşı direnç geliştirmesi de yeni ilaç arayışlarına yol açmaktadır. Bu durum geleneksel ilaç kaynağı olan doğal kaynaklara yönelimi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu ilaç keşfetmek ve geliştirmek için doğal ürünlerin ve/veya sentetik varyasyonlarla yeni yapıların oluşturulmasının oldukça yaygın ve verimli olduğu sonucuna varılmıştır.

Doğal kaynaklar arasında en çok ihmal edilmiş olan deniz canlıları ve bu canlılardan elde edilen mantar ve bakterilerin araştırılmaya değer, yüksek kimyasal çeşitlilik ve yüksek biyoaktivite göstermeleri nedeniyle son yıllarda daha çok dikkat çekmektedir. Bugüne kadar çeşitli sağlık otoritelerinden onay almış 14 deniz kaynaklı bileşik bulunmaktadır. Bunların çoğu dünya çapında en önde gelen ölüm nedenlerinden kanser tedavisinde etkili bileşiklerdir. Şu an klinik çalışmaları devam eden onlarca bileşik de yine çeşitli kanser türlerinde etkili bulunmuştur.

Çalışma planımız; *Rhizopus oryzae* deniz kaynaklı mantarının ham ekstresinin hem YPSK analizi hem de ekstrenin biyoaktivite taramaları ile başlanmış olup orta düzeyde sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite gözlemlendiğinden çeşitli sekonder metabolitlerin izolasyonunun gerçekleştirilmesi ardından bu metabolitlerin YPSK, NMR ve diğer spektroskopik yöntemlerle yapılarının aydınlatılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonunda mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid türevi, mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid metil esteri, mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid metil ester türevi ve mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranosid yapısında dört yeni metabolit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Bugüne kadar olan literatürler araştırıldığında bu dört maddenin daha önce hiçbir türden izole edilmemiş yeni maddeler olduğu tespit edilmiştir. Mikofenolik asit inozin monofosfat dehidrogenaz inhibitörü etkili ve klinikte kullanılan bir bileşiktir. Özellikle aktive olmuş lenfositlerde de novo pürin sentezini engellemektedir. *Penicillium brevicompactum*, *P. stoloniferum* ve *P. scabrosum*, *P. nagemi*, *P. saferi*, *P. patus-mei*, *P. griseobrunneum* ve *P. viridicatum* gibi toprakta bulunan mantar türler tarafından diğer türevlerinin üretildiği keşfedilmiştir. İzole edilen diğer bileşikler ise aurasperon D, dianhidroaurasperon C, asperpiron A, sellobiyoz ve soforozdur. Ham ekstre ile antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite testleri gerçekleştirilmiş, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite orta düzeyde gözlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda çok sayıda metabolit izole edilmiş olması ve bunların biyoaktivite potansiyelinin bulunması deniz kaynaklı canlılar üzerinde daha çok çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir. Daha detaylı araştırmalar sonucu çok daha farklı kimyasal yapıda ve farklı biyoaktiviteler gösteren bileşikler izole edilebilir ve bunlar doğrudan veya modifikasyonlarla klinikte kullanılabilecek forma dönüştürülebilir.

Bu çalışma *Rhizopus oryzae* üzerinde sekonder metabolit izolasyonu ve biyoaktivite araştırması konusunda ilk çalışmadır. Gerçekleştirilen biyoaktivite testlerinden farklı olarak antiviral, antifungal, antienflamatuar ve nöroprotektif aktivite gibi testler yapılabilir ve etki taraması genişletilebilir.



ÖZET

Rhizopus oryzae Mantarı Üzerine Farmakognozik Araştırmalar

Denizler ve okyanuslar, yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için büyük potansiyele sahip değerli bir kaynağı temsil eden biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlere sahip çok çeşitli türleri içerir. Deniz kaynaklı mantarlar, kimyasal yapılarındaki ve biyolojik aktivitelerindeki çeşitliliklerinden dolayı, biyolojik olarak aktif ürünlerin yeni umut verici kaynakları olarak büyük ilgi görmektedir.

Bu tezin amacı, deniz süngerinden (*Dendrectilla tremitensis*) izole edilen *Rhizopus oryzae* Went & Prins.Geerl. mantarı tarafından üretilen sekonder metabolitlerin araştırılması ve mantar ekstresinin antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Bu deniz mantarı, ekstresinin YPSK-UV analizi ve daha önce bu konuda yapılan bir çalışma olmadığı için seçilmiştir.

Silika jel tatbik edilen vakum likit kromatografisinde (VSK) hekzan, etil asetat, dikolorometan ve metanol solvan sistemleri kullanılarak ham ekstreden 13 fraksiyon elde edilmiştir. Seçilen fraksiyonlar sefadeks kolona uygulanmış ve sonrasında İTK analizleriyle alt fraksiyonlara ayrılmıştır. Fraksiyonlardan sekonder metabolitlerin saflaştırılması için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde semipreparatif kolon kullanılmıştır.

Sonuç olarak, deniz kaynaklı *Rhizopus oryzae* mantarından nafto γ -piron, disakkarit, aromatik poliketid türevleri gibi farklı etken madde gruplarına ait 8 maddenin yapısı aydınlatılmıştır. Yaptığımız araştırmalar sonucunda elde ettiğimiz bilgiye göre dört madde ilk kez izole edilen yeni maddelerdir. Yapı tayininde LCMS-TOF ve ^1H , ^{13}C ve iki boyutlu NMR teknikleri kullanılmıştır.

Mantarın ham ekstresinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerine bakılmıştır. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ölçülerek yapılan antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda *S. aureus*'a karşı MIC: 31,25 $\mu\text{g/mL}$ değerinde orta derecede antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.

DPPH, SO, NO, ABTS yöntemleri kullanılarak yapılan antioksidan aktivite tayininde *Rhizopus oryzae*'nın yapılan dört metoda göre antioksidan aktivite göstermediği bulunmuştur. *Rhizopus oryzae*'nin MTT yöntemi kullanılarak yapılan sitotoksik aktivite tayininde, HCT -116 kolon kanserine karşı kayda değer (16,7 $\mu\text{g/mL}$ IC50) bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Deniz kaynaklı mantarlardan yeni biyolojik olarak aktif metabolitlerin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla, bir deniz süngeri (*Dendrectilla tremitensis*) örneğinden izole edilen, *Rhizopus oryzae* mantarında bulunan biyoaktif bileşenleri inceledik. Ham ekstrenin kromatografik yöntemlerle analizi sonucu bu mantardan 8 madde izole edilmiştir. Yapılan

analizler sonucu dördünün yeni etken maddeler olduğu doğrulanmıştır. Bunlar 3-metoksi mikofenolik asit 7-*O*-glukopiranozid metil ester türevi trivial adıyla penicacid H, 3 -metoksi mikofenolik asit-7-*O*-glukopiranozid türevi trivial adıyla penicacid I, 3-metoksi-mikofenolik asit 7-*O* glukopiranozid metil ester türevi trivial adıyla penicacid J ve 3-metoksimikofenolik asit 7-*O* glukopiranozid metil ester türevi trivial adıyla penicacid K'dir. Bu maddeler daha önce herhangi bir kaynaktan izole edilmemiştir.

Bu çalışmada sunulan sonuçlara ve literatür kayıtlarına göre, deniz kaynaklı mantarları içeren deniz ortamının mükemmel bir doğal ürün ve ilaç endüstrisinin gelişimi için son derece önemli olan benzersiz biyoaktif metabolitlerin kaynağı olduğu sonucuna varabiliriz.

Anahtar Sözcükler: Deniz kaynaklı doğal ürünler, deniz kaynaklı mantarlar, *Rhizopus oryzae*



SUMMARY

Pharmacognostical Investigations on *Rhizopus oryzae* Fungi

Seas and oceans contain a wide diversity of species with biologically active secondary metabolites that represent a valuable source with great potential for the development of novel therapeutic agents. Marine-derived fungi are of great interest as new promising sources of biologically active products due to their diversity in chemical structures and biological activities.

The objective of this thesis was the investigation of the secondary metabolites produced by *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. isolated from the marine sponge (*Dendrectilla tremitensis*) and the assessment of antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of fungi extract. This marine fungi was chosen, based on its HPLC-UV analysis and no previous studies on this subject. The crude extract was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel employing a step gradient of n-hexane-EtOAc, dichloromethane and methanole to give 13 fractions. Selected fractions were subjected to sephadex column chromatography than thin layer chromatography. Semipreparative HPLC was used to purify secondary metabolites.

In conclusion, a total of 8 were successfully identified comprising diverse structural groups including naphtho- γ -pyrans, disaccharides and aromatic polyketide derivatives from the sponge-associated fungus *Rhizopus oryzae* in this study, to the best of our knowledge, four of which were confirmed as new natural products. The structures of the compounds were elucidated by performing mass spectrometry as well as one and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) experiments. The fungal extract was examined for antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities. For antimicrobial activity determination minimum inhibitory concentration was calculated and as a result, it was found that the crude extract has antimicrobial activity against *S. aureus* with MIC: 31.25 $\mu\text{g/mL}$ value.

Antioxidant activity of the crude extract was determined by DPPH, SO, NO, ABTS methods. According to the obtained results, *Rhizopus oryzae* didn't show any antioxidant activity by all methods. The cytotoxic activity of *Rhizopus oryzae* extract against HCT -116 colon cancer cells was evaluated by using MTT assay. The results show that crude extract shows significant (16,7 $\mu\text{g/mL}$ IC₅₀) cytotoxic activity.

With the goal of isolation and identification of novel biologically active metabolites from marine-derived fungi, we have investigated the bioactive constituents from a sponge-derived fungal *Rhizopus oryzae*. Chromatographic separation of the crude extract obtained from this fungal strain, yielded 8 compounds, in this study, to the best of our knowledge, four of which were confirmed as new natural products. These compounds are: 5-methoxy mycophenolic acid-7-*O*-glucopyranoside that was trivially named as penicacid H, of 5-methoxy mycophenolic acid-7-*O*-glucopyranoside that was trivially named as penicacid I, 3-methoxy mycophenolic acid derivative-7-*O*-glucopyranoside methyl ester that was given a trivial name penicacid J, and 3-methoxy mycophenolic acid derivative-7-*O*-glucopyranoside methyl ester that was given a trivial name penicacid K.

According to the results presented in this study and literature backgrounds, we can conclude that the marine environment including marine-derived fungi are an excellent source of natural products and a source of unique bioactive metabolites, which are extremely important for the development of the drug industry.

Keywords: Marine derived natural products, marine derived fungi, *Rhizopus oryzae*



KAYNAKLAR

- AKIYAMA K, TERAGUCHI S, HAMASAKI Y, MORI M, TATSUMI K, OHNISHI K, HAYASHI H (2003). New Dimeric Naphthopyrones from *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, **66**(1): 136-139. doi:10.1021/np020174p
- AL-JASIM A, DAVIS M, COSSAR D, MILLER T, HUMPHREYS P, LAWS AP (2016). Isolation of sophorose during sophorolipid production and studies of its stability in aqueous alkali: epimerisation of sophorose to 2-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannose. *Carbohydr Res*, **421**: 46-54. doi:10.1016/j.carres.2015.12.001
- AL-SAIF SSA-L, ABDEL-RAOUF N, EL-WAZANANI HA, AREF IA (2014). Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **21**(1): 57-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.06.001>
- ANJUM K, ABBAS SQ, SHAH SA, AKHTER N, BATOOL S, HASSAN SS (2016). Marine Sponges as a Drug Treasure. *Biomol Ther (Seoul)*, **24**(4): 347-362. doi:10.4062/biomolther.2016.067
- ANTONOV AS, LESHCHENKO EV, ZHURAVLEVA OI, DYSHLOVOY SA, VON AMSBERG G, POPOV RS, DENISENKO VA, KIRICHUK NN, AFIYATULLOV SS (2019). Naphto- Γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus foetidus*. *Natural Product Research*: 1-4. doi:10.1080/14786419.2019.1610954
- AWADY MEE, BOULIS AG, ATTIA AO, SHAABAN M (2019). Dimeric naphtho⁰³-pyrones and further diverse bioactive metabolites from the marine-derived *Aspergillus flavus* Af/MMA 2018. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, **18**: 245 - 253.
- BALAKRISHNAN D, KANDASAMY D, NITHYANAND P (2014). A review on Antioxidant activity of marine organisms. *International Journal of ChemTech Research*, **6**: 974-4290.
- BERGMANN W, BURKE DC (1955). CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXIX. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. III.1 SPONGOTHYIMIDINE AND SPONGOURIDINE2. *The Journal of Organic Chemistry*, **20**(11): 1501-1507. doi:10.1021/jo01128a007
- BERGMANN W, BURKE DC (1956). Contributions to the Study of Marine Products. XL. The Nucleosides of Sponges.1 IV. Spongosine2. *The Journal of Organic Chemistry*, **21**(2): 226-228. doi:10.1021/jo01108a020
- BERGMANN W, FEENEY RJ (1951). CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I.1. *The Journal of Organic Chemistry*, **16**(6): 981-987. doi:10.1021/jo01146a023
- BERGMANN W, STEMPIEN MF (1957). Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosine1. *The Journal of Organic Chemistry*, **22**(12): 1575-1577. doi:10.1021/jo01363a009

- BHADURY P, MOHAMMAD BT, WRIGHT PC (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **33(5)**: 325-337. doi:10.1007/s10295-005-0070-3
- BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, MUNRO MH, PRINSEP MR (2016). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **33(3)**: 382-431. doi:10.1039/c5np00156k
- BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, MUNRO MHG, PRINSEP MR (2015). Marine natural products. *Natural Product Reports*, **32(2)**: 116-211. doi:10.1039/C4NP00144C
- BONGIORNI L, PIETRA F (1996). Marine natural products for industrial applications. *Chem. Ind.*, **2**: 54-58.
- BONUGLI-SANTOS R, DOS M, VASCONCELOS S, PASSARINI M, VIEIRA G, LOPES V, MAINARDI P, SANTOS J, DUARTE L, OTERO I, DA A, YOSHIDA S, FEITOSA V, PESSOA A, SETTE L (2015). Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in microbiology*, **6**. doi:10.3389/fmicb.2015.00269
- BOURAS N, MATHIEU F, COPPEL Y, LEBRIHI A (2005). Aurasperone F--a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger* C-433. *Natural Product Research*, **19(7)**: 653-659.
- BUTLER MS, ROBERTSON AA, COOPER MA (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep*, **31(11)**: 1612-1661. doi:10.1039/c4np00064a
- CARBOUÉ Q, MARESCA M, HERBETTE G, ROUSSOS S, HAMROUNI R, BOMBARDA I. (2019). Naphtho-Gamma-Pyrones Produced by *Aspergillus tubingensis* G131: New Source of Natural Nontoxic Antioxidants. *Biomolecules*, **10(1)**.
- CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR (2019). Marine natural products. *Natural Product Reports*, **36(1)**: 122-173. doi:10.1039/C8NP00092A
- CHAGAS F, LIMA GC, DOS SANTOS VIN, COSTA LEC, DE SOUSA WM, SOMBRA VG, DE ARAÚJO DF, BARROS FCN, MARINHO-SORIANO E, DE ANDRADE FEITOSA JP, DE PAULA RCM, PEREIRA MG, FREITAS ALP (2020). Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. *Int J Biol Macromol*, **159**: 415-421. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.012
- CHEN X, WANG C, QIU H, YUAN Y, CHEN K, CAO Z, XIANG TAN R, TICKNER J, XU J, ZOU J (2019). Asperpyrone A attenuates RANKL-induced osteoclast formation through inhibiting NFATc1, Ca²⁺ signalling and oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **23(12)**: 8269-8279. doi:<https://doi.org/10.1111/jcmm.14700>
- CHEN XH, ZHOU GL, SUN CX, ZHANG XM, ZHANG GJ, ZHU TJ, LI J, CHE Q, LI DH (2020). Penicacids E-G, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium parvum* HDN17-478. *Chin J Nat Med*, **18(11)**: 850-854. doi:10.1016/s1875-5364(20)60027-9
- CHEN Z, ZHENG Z, HUANG H, SONG Y, ZHANG X, MA J, WANG B, ZHANG C, JU J (2012). Penicacids A-C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities

from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SOF07. *Bioorg Med Chem Lett*, **22(9)**: 3332-3335. doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.106

CHURCH FC, MEADE JB, TREANOR RE, WHINNA HC (1989). Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. *J Biol Chem*, **264(6)**: 3618-3623.

CITA YP, SUHERMANTO A, RADJASA OK, SUDHARMONO P (2017). Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **7(5)**: 450-454. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.024>

CUMASHI A, USHAKOVA NA, PREOBRAZHenskAYA ME, D'INCECCO A, PICCOLI A, TOTANI L, TINARI N, MOROZEVICH GE, BERMAN AE, BILAN MI, USOV AI, USTYUZHANINA NE, GRACHEV AA, SANDERSON CJ, KELLY M, RABINOVICH GA, IACOBELLI S, NIFANTIEV NE (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, **17(5)**: 541-552. doi:10.1093/glycob/cwm014

DELBEKE EIP, VAN GEEM KM, STEVENS CV, VAN BOGAERT INA. (2018). Chapter 14 - Sophorolipid Modification: The Power of Yeasts and Enzymes. In: *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes* Ed.: Bornscheuer, U. T.: AOCS Press. 315-341.

DESBOIS AP, MEARNs-SPRAGG A, SMITH VJ (2009). A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, **11(1)**: 45-52. doi:10.1007/s10126-008-9118-5

DESHMUKH SK, PRAKASH V, RANJAN N (2017). Marine Fungi: A Source of Potential Anticancer Compounds. *Front Microbiol*, **8**: 2536. doi:10.3389/fmicb.2017.02536

DIAS DA, URBAN S, ROESSNER U (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2(2)**: 303-336. doi:10.3390/metabo2020303

DYSHLOVOY SA, HONECKER F (2020). Marine Compounds and Cancer: The First Two Decades of XXI Century. *Marine Drugs*, **18(1)**: 20.

EHRLICH K, DELUCCA A, CIEGLER A (1984). Naphtho- γ -pyrone production by *Aspergillus niger* isolated from stored cottonseed. *Applied and Environmental Microbiology*, **48**: 1-4. doi:10.1128/AEM.48.1.1-4.1984

FANG W, LIN X, WANG J, LIU Y, TAO H, ZHOU X (2016). Asperpyrone-Type Bis-Naphtho- γ -Pyrone with COX-2-Inhibitory Activities from Marine-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Molecules*, **21(7)**. doi:10.3390/molecules21070941

GHAREEB MA, TAMMAM MA, EL-DEMERDASH A, ATANASOV AG (2020). Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. *Current Research in Biotechnology*, **2**: 88-102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.09.001>

GHOSAL S, BISWAS K, CHAKRABARTI DK (1979). Toxic naphtho-gamma-pyrone from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, **27(6)**: 1347-1351. doi:10.1021/jf60226a018

- GHOSH B, RAY R (2011). Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review. *Journal of Applied Sciences*, **11**. doi:10.3923/jas.2011.2470.2486
- GIDDINGS LA, NEWMAN DJ (2013). Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **40(11)**: 1181-1210. doi:10.1007/s10295-013-1331-1
- GILBERT C, BOIVIN G (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49(3)**: 873-883. doi:10.1128/AAC.49.3.873-883.2005
- GOMES NGM, LEFRANC F, KIJOA A, KISS R (2015). Can Some Marine-Derived Fungal Metabolites Become Actual Anticancer Agents? *Marine Drugs*, **13(6)**: 3950-3991.
- GURNANI N, MEHTA D, GUPTA M, MEHTA B (2014). Natural Products: Source of Potential Drugs. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, **6**. doi:10.5829/idosi.ajbas.2014.6.6.21983
- GÜVEN K, COBAN B, SEZİK E (2019). Anticoagulant and antilipemic activities of polysaccharides from marine algae, *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment*, **25** (2), 232-257. **25**: 232-257.
- HABBU P, WARAD V, SHASTRI R, MADAGUNDI S, KULKARNI VH (2016). Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chin J Nat Med*, **14(2)**: 101-116. doi:10.1016/s1875-5364(16)60003-1
- HARPUR U, GENÇ Y, KHAN N, SARACOGLU I (2011). Radical Scavenging Effects of Different *Veronica* Species. *Records of Natural Products*, **5**.
- HART JB, LILL RE, HICKFORD SJH, BLUNT J, MUNRO M. (2000). The Halichondrins: Chemistry, Biology, Supply and Delivery. In: Ed. 134-153.
- HEALTH COTOSRIH. (1999). Marine-Derived Pharmaceuticals and Related Bioactive Agents. In: *Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health* Ed.: Washington, D.C.: NATIONAL ACADEMY PRESS.
- HOWELL WH, HOLT E (1918). TWO NEW FACTORS IN BLOOD COAGULATION—HEPARIN AND PRO-ANTITHROMBIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **47(3)**: 328-341. doi:10.1152/ajplegacy.1918.47.3.328
- HU Y, CHEN J, HU G, YU J, ZHU X, LIN Y, CHEN S, YUAN J (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar Drugs*, **13(1)**: 202-221. doi:10.3390/md13010202
- HUANG MH, HUANG SS, WANG BS, WU CH, SHEU MJ, HOU WC, LIN SS, HUANG GJ (2011). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *J Ethnopharmacol*, **133(2)**: 743-750. doi:10.1016/j.jep.2010.11.005
- HUGHES CC, FENICAL W (2010). Antibacterials from the Sea. *Chemistry – A European Journal*, **16(42)**: 12512-12525. doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201001279>

- HUHEIHEL M, ISHANU V, TAL J, ARAD SM (2002). Activity of Porphyridium sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J Biochem Biophys Methods*, **50(2-3)**: 189-200. doi:10.1016/s0165-022x(01)00186-5
- IKEDA S, SUGITA M, YOSHIMURA A, SUMIZAWA T, DOUZONO H, NAGATA Y, AKIYAMA S (1990). Aspergillus species strain M39 produces two naphtho-gamma-pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *Int J Cancer*, **45(3)**: 508-513. doi:10.1002/ijc.2910450323
- JIMÉNEZ C (2018). Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **9(10)**: 959-961. doi:10.1021/acsmmedchemlett.8b00368
- JIN L, QUAN C, HOU X, FAN S (2016). Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. *Marine Drugs*, **14(4)**: 76. doi:10.3390/md14040076
- JOEL EL, VALENTIN BHIMBA B (2013). Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. *Alexandria Journal of Medicine*, **49(3)**: 189-194. doi:10.1016/j.ajme.2013.04.003
- JONES EBG (2011). Fifty years of marine mycology. *Fungal diversity*, **50(1)**: 73. doi:10.1007/s13225-011-0119-8
- KILLING H (1913). Zur Biochemie Der Meersalgen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **83**: 171-197.
- KIM S-K. (2013). Past, Present, and Future of Marine Pharmacognosy. In: *Marine Pharmacognosy Trends and Applications* Ed.: Kim, S.-K., Boca Raton: CRC Press. 17-22.
- KIURU P, D'AURIA MV, MULLER CD, TAMMELA P, VUORELA H, YLI-KAUHALUOMA J (2014). Exploring marine resources for bioactive compounds. *Planta medica*, **80(14)**: 1234-1246. doi:10.1055/s-0034-1383001
- KJER J, DEBBAB A, ALY AH, PROKSCH P (2010). Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*, **5(3)**: 479-490. doi:10.1038/nprot.2009.233
- KLOTZ U (2006). Ziconotide--a novel neuron-specific calcium channel blocker for the intrathecal treatment of severe chronic pain--a short review. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **44(10)**: 478-483. doi:10.5414/cpp44478
- KOSKI RR (2008). Omega-3-acid Ethyl Esters (Lovaza) For Severe Hypertriglyceridemia. *Pharmacy and Therapeutics*, **33(5)**: 271-303.
- KÖNIG GM (1992). Meeresorganismen als Quelle pharmazeutisch bedeutsamer Naturstoffe. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **132**: 673-683.
- KUPSKI L, DE CARVALHO SILVELLO M, FONTES M, LIMA T, TREICHEL H, BADIALE-FURLONG E (2015). *R. oryzae* Cellulases: A New Approach to Degrading Lignocellulosic Material. *Journal of Food Biochemistry*, **39**. doi:10.1111/jfbc.12097

- LAGO J, RODRÍGUEZ LP, BLANCO L, VIEITES JM, CABADO AG (2015). Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. *Marine Drugs*, **13(10)**: 6384-6406.
- LEE H-K, ZHANG L, SMITH MD, WALEWSKA A, VELLORE NA, BARON R, MCINTOSH JM, WHITE HS, OLIVERA BM, BULAJ G (2015). A marine analgesic peptide, Contulakin-G, and neurotensin are distinct agonists for neurotensin receptors: uncovering structural determinants of desensitization properties. *Frontiers in Pharmacology*, **6(11)**. doi:10.3389/fphar.2015.00011
- LI X-B, XIE F, LIU S-S, LI Y, ZHOU J-C, LIU Y-Q, YUAN H-Q, LOU H-X (2013). Naphtho- γ -pyrones from Endophyte *Aspergillus niger* occurring in the liverwort *Heteroscyphus tener* (Steph.) Schiffn. *Chemistry & biodiversity*, **10(7)**: 1193-1201. doi:10.1002/cbdv.201300042
- LIMA M, OLIVEIRA MC, PIMENTA ATA, UCHOA PKS (2019). *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **30**: 2029-2059.
- LINDEQUIST U (2016). Marine-Derived Pharmaceuticals - Challenges and Opportunities. *Biomol Ther (Seoul)*, **24(6)**: 561-571. doi:10.4062/biomolther.2016.181
- LIU J, LUTHULI S, WU Q, WU M, CHOI J-I, TONG H (2020). Pharmaceutical and Nutraceutical Potential Applications of *Sargassum fulvellum*. *BioMed Research International*, **2020**: 2417410. doi:10.1155/2020/2417410
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ J, BENAIGES MD, VALERO F (2020). *Rhizopus oryzae* Lipase, a Promising Industrial Enzyme: Biochemical Characteristics, Production and Biocatalytic Applications. *Catalysts*, **10(11)**: 1277.
- LOU Z, SUN Y, RAO Z (2014). Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci*, **35(2)**: 86-102. doi:10.1016/j.tips.2013.11.006
- MALVE H (2015). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **8**. doi:10.4103/0975-7406.171700
- MARTINS A, VIEIRA H, GASPAR H, SANTOS S (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs*, **12(2)**: 1066-1101. doi:10.3390/md12021066
- MARTINS M, SILVA R, M. M. PINTO M, SOUSA E (2020). Marine Natural Products, Multitarget Therapy and Repurposed Agents in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, **13(9)**: 242.
- MATSUBARA K (2004). Recent advances in marine algal anticoagulants. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, **2(1)**: 13-19. doi:10.2174/1568016043477314
- MAYER AM, GLASER KB, CUEVAS C, JACOBS RS, KEM W, LITTLE RD, MCINTOSH JM, NEWMAN DJ, POTTS BC, SHUSTER DE (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci*, **31(6)**: 255-265. doi:10.1016/j.tips.2010.02.005

- MAYER AM, RODRÍGUEZ AD, BERLINCK RG, HAMANN MT (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, **1790(5)**: 283-308. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.011
- MCLEAN J (1916). THE THROMBOPLASTIC ACTION OF CEPHALIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **41(2)**: 250-257. doi:10.1152/ajplegacy.1916.41.2.250
- MÉJANELLE L, F. LÓPEZ J, GUNDE-CIMERMAN N, GRIMALT JO (2000). Sterols of melanized fungi from hypersaline environments. *Organic Geochemistry*, **31(10)**: 1031-1040. doi:[https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00094-2)
- MERTENS JA, SKORY CD, IBRAHIM AS (2006). Plasmids for expression of heterologous proteins in *Rhizopus oryzae*. *Arch Microbiol*, **186(1)**: 41-50. doi:10.1007/s00203-006-0121-9
- MEUSSEN BJ, DE GRAAFF LH, SANDERS JPM, WEUSTHUIS RA (2012). Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **94(4)**: 875-886. doi:10.1007/s00253-012-4033-0
- MOGHADAMTOUSI SZ, NIKZAD S, KADIR HA, ABUBAKAR S, ZANDI K (2015). Potential Antiviral Agents from Marine Fungi: An Overview. *Marine Drugs*, **13(7)**: 4520-4538.
- MOLINSKI TF, DALISAY DS, LIEVENS SL, SALUDES JP (2009). Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, **8(1)**: 69-85. doi:10.1038/nrd2487
- MORFIN F, THOUVENOT D (2003). Herpes Simplex Virus resistance to antiviral drugs. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, **26**: 29-37. doi:10.1016/S1386-6532(02)00263-9
- MORRISON-GARDINER S (2002). Dominant fungi from Australian coral reefs. *Fungal diversity*, **9**: 105-121.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65(1-2)**: 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, MENZEL S, RUTH P, SCHMIDTKO A, STUTTGART WV. (2016). *Pharmakologie kompakt: Allgemeine und Klinische Pharmakologie, Toxikologie.* (Ed.): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON MARINE BIOTECHNOLOGY: BIOMEDICAL APPLICATIONS OF MARINE NATURAL P. (2002). In: *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products* Ed.: Washington (DC): National Academies Press (US)
- NEWMAN DJ, CRAGG GM (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, **75(3)**: 311-335. doi:10.1021/np200906s

- NEWMAN DJ, CRAGG GM (2016). Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". *Planta medica*, **82(9-10)**: 775-789. doi:10.1055/s-0042-101353
- NEWMAN DJ, CRAGG GM (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, **83(3)**: 770-803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
- NGO D-H, SANG VT, NGO D-N, WIJESEKARA I, KIM S-K (2012). Biological activities and potential health benefits bioactive peptides derived from marine organisms. *International journal of biological macromolecules*, **51**: 378-383. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001
- NOFIANI R, WEISBERG AJ, TSUNODA T, PANJAITAN RGP, BRILLIANTORO R, CHANG JH, PHILMUS B, MAHMUD T (2020). Antibacterial Potential of Secondary Metabolites from Indonesian Marine Bacterial Symbionts. *International Journal of Microbiology*, **2020**: 8898631. doi:10.1155/2020/8898631
- ORSI W, BIDDLE JF, EDGCOMB V (2013). Deep Sequencing of Subseafloor Eukaryotic rRNA Reveals Active Fungi across Marine Subsurface Provinces. *PLOS ONE*, **8(2)**: e56335. doi:10.1371/journal.pone.0056335
- OUELLETTE RJ, RAWN JD. (2015). 13 - Carbohydrates. In: *Principles of Organic Chemistry* Ed.: Ouellette, R. J. Rawn, J. D., Boston: Elsevier. 343-370.
- OUELLETTE RJ, RAWN JD. (2018). 28 - Carbohydrates. In: *Organic Chemistry (Second Edition)* Ed.: Ouellette, R. J. Rawn, J. D.: Academic Press. 889-928.
- PADHI S, MASI M, PANDA SK, LUYTEN W, CIMMINO A, TAYUNG K, EVIDENTE A (2020). Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum*. *Natural Product Research*, **34(18)**: 2573-2580. doi:10.1080/14786419.2018.1544982
- PANG K-L, OVERY DP, JONES EBG, CALADO MDL, BURGAUD G, WALKER AK, JOHNSON JA, KERR RG, CHA H-J, BILLS GF (2016). 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews*, **30(4)**: 163-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.08.001>
- PARTIDA MARTINEZ L, HERTWECK C (2005). Pathogenic Fungus Harbours Endosymbiotic Bacteria for Toxin Production. *Nature*, **437**: 884-888. doi:10.1038/nature03997
- PATEL S (2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech*, **2(3)**: 171-185. doi:10.1007/s13205-012-0061-9
- PEERAN MF (2016). A POTENTIAL SOURCE OF METHYL-EUGENOL FROM SECONDARY METABOLITE OF RHIZOPUS ORYZAE 6975. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, **7**: 187-192.
- PEERAN MF, PRASAD L, KAMIL D (2018). Characterization of Secondary Metabolites from *Rhizopus oryzae* and Its Effect on Plant Pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**: 705-710. doi:10.20546/ijcmas.2018.703.082

- PEJIN B, KARAMAN M. (2017). Antitumor Natural Products of Marine-Derived Fungi. In: *Fungal Metabolites* Ed.: Mérillon, J.-M. Ramawat, K. G., Cham: Springer International Publishing. 1-28.
- PENNINGTON MW, CZERWINSKI A, NORTON RS (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **26(10)**: 2738-2758. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>
- PETRINI O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* Ed.: Andrews J.H., H. S. S., New York: Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer. 179-198.
- PICARD KT (2017). Coastal marine habitats harbor novel early-diverging fungal diversity. *Fungal Ecology*, **25**: 1-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.10.006>
- POLLOCK CG, ROHRBACH B, RAMSAY EC (2000). Fungal dermatitis in captive pinnipeds. *J Zoo Wildl Med*, **31(3)**: 374-378. doi:10.1638/1042-7260(2000)031[0374:Fdicp]2.0.Co;2
- RADJASA OK, VASKE Y, NAVARRO G, VERVOORT H, TENNEY K, LININGTON R, CREWS P (2011). Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**: 6658-6674. doi:10.1016/j.bmc.2011.07.017
- RÄMÄ T, NORDÉN J, DAVEY ML, MATHIASSEN GH, SPATAFORA JW, KAUSERUD H (2014). Fungi ahoy! Diversity on marine wooden substrata in the high North. *Fungal Ecology*, **8**: 46-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.12.002>
- RATEB ME, EBEL R (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Natural Product Reports*, **28(2)**: 290-344. doi:10.1039/C0NP00061B
- RICHARDS TA, JONES MDM, LEONARD G, BASS D (2012). Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Annual Review of Marine Science*, **4(1)**: 495-522. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100802
- ROSLUND MU, TÄHTINEN P, NIEMITZ M, SJÖHOLM R (2008). Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and JH,H coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides. *Carbohydrate Research*, **343(1)**: 101-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.008>
- ROVIROSA J, DIAZ-MARRERO A, DARIAS J, PAINEMAL K, SAN-MARTÍN A (2006). Secondary metabolites from marine *Penicillium brevicompactum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **51**. doi:10.4067/S0717-97072006000100004
- SAGAR S, KAUR M, MINNEMAN KP (2010). Antiviral lead compounds from marine sponges. *Mar Drugs*, **8(10)**: 2619-2638. doi:10.3390/md8102619
- SAK K, KASEMAA K (2016). The role of natural plant-based products in the development of chemotherapy (In Estonian). *Eesti Arst (Estonian Doctor)*, **95**: 728-733.
- SCHOFIELD MM, JAIN S, PORAT D, DICK GJ, SHERMAN DH (2015). Identification and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic

- natural product ET-743. *Environ Microbiol*, **17(10)**: 3964-3975. doi:10.1111/1462-2920.12908
- SHAABAN M, SHAABAN KA, ABDEL-AZIZ MS (2012). Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties. *Org Med Chem Lett*, **2**: 6. doi:10.1186/2191-2858-2-6
- SHIN HJ (2020). Natural Products from Marine Fungi. *Marine Drugs*, **18(5)**: 230.
- SHIRWAIKAR A, SHIRWAIKAR A, RAJENDRAN K, PUNITHA IS (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol Pharm Bull*, **29(9)**: 1906-1910. doi:10.1248/bpb.29.1906
- SIDDIQUI IR, FURGALA B (1965). Isolation and Characterization of Disaccharides from Royal Jelly. *Journal of Apicultural Research*, **4(2)**: 89-94. doi:10.1080/00218839.1965.11100109
- SIEBERT A, PREJS M, CHOLEWINSKI G, DZIERZBICKA K (2017). New Analogues of Mycophenolic Acid. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **17**: 734-745. doi:10.2174/1389557516666161129160001
- SONG X, TU R, MEI X, WU S, LAN B, ZHANG L, LUO X, LIU J, LUO M (2020). A mycophenolic acid derivative from the fungus *Penicillium* sp. SCSIO sof101. *Nat Prod Res*, **34(9)**: 1206-1212. doi:10.1080/14786419.2018.1553881
- SOWELL SM, NORBECK AD, LIPTON MS, NICORA CD, CALLISTER SJ, SMITH RD, BAROFSKY DF, GIOVANNONI SJ (2008). Proteomic Analysis of Stationary Phase in the Marine Bacterium “*Candidatus* Pelagibacter ubique”. *Applied and Environmental Microbiology*, **74(13)**: 4091-4100. doi:10.1128/aem.00599-08
- STONIK VA (2009). Marine Natural Products: A Way to New Drugs. *Acta Naturae*, **1(2)**: 15-25. doi:10.32607/20758251-2009-1-2-15-25
- TAISHI T, TAKECHI S, MORI S (1998). First total synthesis of ($\pm$)-stachyflin. *Tetrahedron Letters*, **39(24)**: 4347-4350. doi:[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00769-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00769-2)
- TAN RX, ZOU WX (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, **18(4)**: 448-459. doi:10.1039/b100918o
- TANTILLO C, DING J, JACOBO-MOLINA A, NANNI RG, BOYER PL, HUGHES SH, PAUWELS R, ANDRIES K, JANSSEN PA, ARNOLD E (1994). Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol*, **243(3)**: 369-387. doi:10.1006/jmbi.1994.1665
- TAYLOR JD, CUNLIFFE M (2016). Multi-year assessment of coastal planktonic fungi reveals environmental drivers of diversity and abundance. *The ISME Journal*, **10(9)**: 2118-2128. doi:10.1038/ismej.2016.24
- VALA AK, TRIVEDI HB, DAVE BP. (2016). Marine-Derived Fungi: Potential Candidates for Fungal Nanobiotechnology. In: *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology* Ed.: Prasad, R., Cham: Springer International Publishing. 47-69.

- WAINWRIGHT BJ, ZAHN GL, SPALDING HL, SHERWOOD AR, SMITH CM, AMEND AS (2017). Fungi associated with mesophotic macroalgae from the 'Au'au Channel, west Maui are differentiated by host and overlap terrestrial communities. *PeerJ*, **5**: e3532. doi:10.7717/peerj.3532
- WEINHEIMER AJ, SPRAGGINS RL (1969). The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. *Tetrahedron Lett*(**59**): 5185-5188. doi:10.1016/s0040-4039(01)88918-8
- WITTE AV, KERTI L, HERMANNSTÄDTER HM, FIEBACH JB, SCHREIBER SJ, SCHUCHARDT JP, HAHN A, FLÖEL A (2014). Long-chain omega-3 fatty acids improve brain function and structure in older adults. *Cereb Cortex*, **24**(11): 3059-3068. doi:10.1093/cercor/bht163
- WITVROUW M, DE CLERCQ E (1997). Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs. *General Pharmacology: The Vascular System*, **29**(4): 497-511. doi:[https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00563-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00563-0)
- WU R, WU C, LIU D, YANG X, JIAFENG H, ZHANG J, BINQIANG L, HE H, LI H (2015). Overview of Antioxidant Peptides Derived from Marine Resources: The Sources, Characteristic, Purification, and Evaluation Methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **176**. doi:10.1007/s12010-015-1689-9
- XIAO J, ZHANG Q, GAO Y-Q, SHI X-W, GAO J-M (2014). Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp. associated with *Melia azedarach*. *Natural Product Research*, **28**(17): 1388-1392. doi:10.1080/14786419.2014.904308
- XU K, CHUANLONG G, DAYONG S, MENG J, TIAN H, GUO S (2019). Discovery of Natural Dimeric Naphthopyrones as Potential Cytotoxic Agents Through ROS-Mediated Apoptotic Pathway. *Marine Drugs*, **17**: 207. doi:10.3390/md17040207
- XU Z, XIONG B, XU J (2019). Chemical Investigation Of Secondary Metabolites Produced By Mangrove Endophytic Fungus *Phyllosticta Capitalensis*. *Natural Product Research*: 1-5. doi:10.1080/14786419.2019.1656624
- YAMADA T, KIMURA H, ARIMITSU K, KAJIMOTO T, KIKUCHI T, TANAKA R (2017). Absolute Configuration of Eight Cephalimysins Isolated from the Marine-Derived *Aspergillus fumigatus*. *ChemistrySelect*, **2**(33): 10936-10940. doi:10.1002/slct.201702256
- YARDEN O (2014). Fungal association with sessile marine invertebrates. *Frontiers in microbiology*, **5**(228). doi:10.3389/fmicb.2014.00228
- ZHAN J, GUNAHERATH GMKB, WIJERATNE EMK, GUNATILAKA AAL (2007). Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*, **68**(3): 368-372. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.038
- ZHENG RY, CHEN G-Q, HUANG H, LIU X-Y (2007). A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*, **59**: 273-372.

ZHONG Q, WEI B, WANG S, KE S, CHEN J, ZHANG H, WANG H (2019). The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Marine Drugs*, **17(12)**: 674.

<https://www.midwestern.edu/departments/marinepharmacology/clinical-pipeline.xml>. Erişim Tarihi:
[16.11.2020]

