

**İzoforon Analoglarının Sentezi,
Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri**

Özge Özşen

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ocak 2011

**Synthesis, Biotransformation and Biological Activities
of Isophorone Analogues**

Özge Özşen

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

January 2011

**İzoforon Analoglarının Sentezi,
Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri**

Özge Özşen

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: **Doç. Dr. İsmail KIRAN**

Ocak 2011

*Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu'nun 29.05.2009 tarih ve 2009-10 sayılı kararı ile desteklenmiştir.*

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özge Özşen'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “**İzoforon Analoglarının Sentezi, Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri**” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. İsmail KIRAN

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Selma YARLIGAN UYSAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Monoterpenler çok eski zamanlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu doğal bileşiklerden koku ve tat (aroma) maddeleri olarak da faydalanılması, her geçen gün önemlerini daha da arttırmaktadır.

Bu çalışmada bir monoterpen olan izoforon molekülü ve analoglarının, *Alternaria alternata*, *Neurospora crassa* ve *Fusarium culmorum* küfleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. Oluşan metabolitlerin yapıları spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Bazı patojen mikroorganizmalara karşı biyolojik etkileri araştırıldı ve minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri belirlendi.

Çalışmalar sonucunda 4 α -hidroksi ve 7 β -hidroksi izoforon türevlerinin antimikrobiyal etkisinin izoforona göre daha fazla olduğu, fakat etoksi türevi olan 1-hidroksi-3,5,5-trimetil-2-sikloheksen'in ise önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, biyolojik aktivite, biyoteknoloji, izoforon, mikroorganizmalar

SUMMARY

Monoterpenes have been used in the treatment of many diseases since ancient times. The use of these natural compounds as Flavouring agents has also increased their importance more and more, recently.

In this study, the fungal biotransformations of isophorone, which is a monoterpene, and its analogue were carried out by *Alternaria alternata*, *Neurospora crassa* and *Fusarium culmorum*. The structures of the metabolites were elucidated by spectroscopic methods. Their biological activities were tested against some pathogenic microorganisms and the minimum inhibitory concentration values were determined.

It was observed that, 4 α -hydroxy and 7 β -hydroxy isophorone derivatives showed higher antimicrobial effects when compared with that of isophorone whereas ethoxy isophorone (1-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexane) showed no significant antimicrobial activity.

Key words: Biotransformations, biological activity, biotechnology, isophorone, microorganisms

TEŞEKKÜR

Akademik yaşantımda çok önemli bir yere sahip olan, çalışmamı büyük bir titizlikle yönetip desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına yakın ilgi ve alaka gösteren, değerli fikirleriyle beni her zaman destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Semra İLHAN'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarına katkıda bulunan Araş.Gör. Bükay YENİCE GÜRSU ve Burcu AKÇAL'a,

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Nazife KAYA ve Türkan TİKNA'ya,

Son olarak hayatımın başlangıcından bu yana maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sonsuz hoşgörü ve özverileriyle beni destekleyen değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım gerçekleştirilmesinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonunca desteklenen 200919015 nolu proje altyapısından yararlanmışım.

Arş. Gör. Özge ÖZŞEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
BÖLÜM-1: GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Giriş ve Amaç	2
1.2. Doğal Ürünler ve İlaç Molekülleri	4
1.3. Terpenler	6
1.4. Monoterpenler	8
1.4.1. Monoterpenlerin önemi	10
1.4.2. Monoterpenlerin biyolojik etkileri	11
1.5. Mikrobiyal Transformasyon (Biyotransformasyon)	13
1.5.1. Monoterpenlerin biyotransformasyonu	14
1.5.2. <i>Alternaria alternata</i> ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	15
1.5.3. <i>Fusarium culmorum</i> ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	17
1.5.4. <i>Neurospora crassa</i> ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	19
1.6. İzoforon	22
BÖLÜM-2: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
2.1. Genel Deneysel Bilgiler	25

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2. Biyotransformasyon Çalışmaları	26
2.2.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması	26
2.2.2. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besi yeri bileşenleri	26
2.2.2.1. Nutrient broth	26
2.2.2.2. Nutrient agar	26
2.2.2.3. Mueller hinton agar	27
2.2.2.4. Mueller hinton broth	27
2.2.2.5. Sabouraud %4 dextrose agar	27
2.2.2.6. Sabouraud dextrose broth	28
2.2.2.7. Potato dextrose agar	28
2.2.2.8. α -Medium	28
2.2.2.9. Taze yatık agar besi yeri	29
2.2.3. Agar difüzyon ve MİK yönteminde kullanılan çözeltiler	29
2.2.3.1. Fizyolojik tuz çözeltisi	29
2.2.3.2. Mc Farland standardı	29
2.2.4. Mikroorganizmaların hazırlanması	30
2.2.5. Substrat hazırlanması ve ilavesi	30
2.2.6. Metabolitlerin ekstraksiyonu	31
2.2.7. Metabolitlerin izolasyonu	31
2.2.8. Metabolitlerin tanımlanması	31
2.3. Substratın (3) Sentezi	33
2.4. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	34
2.4.1. Kullanılan mikroorganizmalar	34
2.4.2. Agar difüzyon yöntemi	34
2.4.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi	35
BÖLÜM-3: SONUÇLAR ve TARTIŞMA	37
3.1. Substratın (3) Sentezi	38

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. İzoforon'un <i>Neurospora crassa</i> ile Biyotransformasyonu	40
3.3. Substratın (3) <i>Alternaria alternata</i> ile Biyotransformasyonu	44
3.4. Substratın (3) <i>Neurospora crassa</i> ile Biyotransformasyonu	45
3.5. Substratın (3) <i>Fusarium culmorum</i> ile Biyotransformasyonu	46
3.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	47
3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi	50
3.8. Sonuç	53
BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Terpenlerin izopren birimlerinin gösterilmesi	7
1.2 Mevalonat yolu	9
1.3 Limonen ve β -iyonon molekülleri	11
1.4 <i>Artemisia filifolia</i> Torr. bitkisinin resimleri	22
1.5 İzoforon molekülünün yapısı	23
2 Biyotransformasyon aşamaları ve metabolit izolasyonu çalışma şeması	32
3.1 Substrat sentezi	38
3.2 3 Nolu molekülün ^1H -NMR spektrumu	38
3.3 3 Nolu molekülün ^{13}C -NMR spektrumu	39
3.4 3 Nolu molekülün IR spektrumu	39
3.5 İzoforon ile <i>N. crassa</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK	40
3.6a M_1 'in İTK plağı	40
3.6b M_2 'nin İTK plağı	40
3.7 İzoforon'un <i>N. crassa</i> ile biyotransformasyon reaksiyonu	41
3.8a M_1 'in ^1H NMR spektrumu	41
3.8b M_2 'nin ^1H NMR spektrumu	42
3.9a M_1 'in ^{13}C -NMR spektrumu	42
3.9b M_2 'nin ^{13}C -NMR spektrumu	43
3.10 3 Nolu molekül ile <i>A. alternata</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK. 44	44
3.11 3 Nolu molekül ile <i>N. crassa</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK ...	45
3.12 Substrat ile <i>F. culmorum</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK	46
3.13 3 Nolu bileşiğin antifungal aktivite sonuçları	47
3.14 <i>E.coli</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	48
3.15 <i>S. typhimirum</i> 'un M_1 ve M_2 metabolitlerinin MİK görüntüsü	51
3.16 <i>P. vulgaris</i> 'in M_1 ve M_2 metabolitlerinin MİK görüntüsü	51
3.17 <i>S. aureus</i> 'un M_1 ve M_2 metabolitlerinin MİK görüntüsü	52

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
1	Monoterpenlerin sınıflandırılması	8
2	Önemli aktivite gösteren bazı monoterpenler	12
3	<i>A. alternata</i> küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	15
4	<i>F. culmorum</i> küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	17
5	<i>N. crassa</i> küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar	19
6	Metabolitlerin antimikrobiyal aktivite değerleri	49
7a	M ₁ ve M ₂ metabolitlerinin MİK değerleri	50
7b	M ₁ ve M ₂ metabolitlerinin MİK değerleri	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklama</u>
$[\alpha]_D^{20}$	20 ⁰ C'de ölçülen spesifik çevirme açısı
AACT	Asetoasetil KoA tiyolaz
⁰ C	Santigrad derece
CDCl ₃	Döterokloroform
CHCl ₃	Kloroform
¹³ C NMR	Karbon Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPMDC	5-difosfomevalonat dekarboksilaz
EtOH	Etanol
FT-IR	Fourier Transform Infrared
g	Gram
GC-MS	Gaz kromatografisi/Kütle Spektrometresi
HMGR	3-Hidroksi-3-metilglutaril KoA redüktaz
HMGS	3-Hidroksi-3-metilglutaril KoA sentaz
¹ H NMR	Hidrojen Nükleer Manyetik Spektroskopisi
IPPI	İzopentenil pirofosfat izomeraz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Müler Hinton Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MK	Mevalonat kinaz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
NaBH ₄	Sodyumborhidrür
PMK	5-Fosfomevalonat kinaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklama</u>
ppb	Bir litre çözültideki çözünen maddenin mikrogram cinsinden değeri (parts per billion)
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
SGM	Sabouraud %4 Glukoz Medium
TCNE	Tetrasiyanoetilen
THF	Tetrahidro furan
TTC	Trifenil tetrazolyum klorit
µl	Mikrolitre

BÖLÜM - 1: GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Giriş ve Amaç

Tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan, saf bir kimyasal maddeye ya da ona eşdeğer olan bitkisel ya da hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren karışıma “ilaç” denir. Dünya Sağlık Örgütü ise ilacı “fizyolojik sistemleri ya da patolojik durumları alanın yararı için değiştirmek ya da incelemek amacıyla kullanılan ya da kullanılması öngörülen bir madde ya da ürün” olarak tanımlamaktadır. Eski tanımlamayla şifa, deva aracıdır. Tarih boyunca, bitkisel, mineraller, hayvansal kökenli madde ve karışımlar ilaç olarak kullanılmıştır (Aktay *vd.*, 2003).

İlaç temel olarak, fizyolojik sistemleri ya da patolojik durumları insanın yararına olacak şekilde değiştirir. Ancak, ilaçların tanı ve tedavi amacıyla kullanımları sırasında elde edilen yararların yanı sıra yan etkiler, toksik etkiler, alerjik reaksiyonlar ve ilaç etkileşimleri gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir. Tedavi sırasında hastaların %5-15'inde ilaçlara karşı istenmeyen bu reaksiyonlar gelişmekte, hastaların %0,1'inde ise bu etkiler ölümlü sonuçlanabilmektedir. İlaçların istenmeyen etkileri, ilaç kullanım sorunlarından yalnızca biridir ve ilaç geliştirme süreci ile ilacın klinik kullanımı aşamasında önemli bir yer tutmaktadır (Kayaalp, 2002; Aktay *vd.*, 2003).

İlaç aktif maddelerinin, yardımcı katkı maddeleri ile belirli oranlarda karıştırılarak, çeşitli ürün formlarında kullanıcıya sunulması “ilaç üretimi” olarak adlandırılır. Bu aşama ilaç etkinliği gösteren aday moleküllerin saptanmasını sağlar. Hedef moleküllerin seçiminde genellikle iki tür kütüphane kullanılır. Bunlar; doğal kaynaklı kimyasal maddeleri içeren kütüphaneler ile “kombinatoriyal kimya” teknolojisiyle üretilen ve sentetik kimyasal maddeleri de kapsayan etken madde kütüphaneleridir (Tübitak, 2004; www.kultur.k12tr/biyosemp/pdf/03__biyoteknoloji_2007.pdf).

İlaç geliştirmede öncelikli amaç, insanların yaşamında daha iyiye doğru bir değişiklik yapabilmektir. Geliştirilen her ilaç ile koruyucu, tedavi edici veya hastalığın belirti ve bulgularını azaltıcı bir etkinin elde edilmesi gerekmektedir. Bir ilaç geliştirmek ortalama 12–15 yıl sürmekte ve 802 milyon dolar harcanmaktadır. İlaç geliştirmek bu yüzden çok uzun ve pahalı bir süreçtir. En ufak bir hatada elde edilen tüm bilgiler güvenilirliğini ve değerini kaybedebilmektedir (Üresin, 2006).

Biyoloji, tıp ve kimya gibi bilimlerde meydana gelen ilerlemeler sayesinde hastalıkların veya hastalık bulgularının aydınlatılması, yeni ilaçların geliştirilmesine olanak tanır. Bu sebeple, ilaç geliştirmenin modern yaklaşımı; hastanın yararı için değiştirilmesi gereken patolojik veya fizyolojik olaylarda rol oynayan biyolojik moleküllerin (Hormonlar, lokal hormonlar ve benzeri endojen etkin maddeler, bunların sentezini yapan enzimler, bu maddelerin reseptörleri ve bu maddeleri yıkan enzimler v.s.) belirlenmesini, incelenmesini ve sonra incelemelerin sonuçlarına göre bu doğal moleküllerle etkileşime girebilecek yeni bileşiklerin tasarlanıp sentez edilmesini gerektirir. Yeni ilaçların geliştirilmesinde, yapı ile etki arasındaki ilişkinin incelenmesi de önemli bir rol oynar (Kayaalp, 2002).

Bu çalışmada; birçok biyolojik etkinliğe sahip olduğu bilinen *Artemisia filifolia* Torr. bitkisinin ana bileşenleri arasında yer alan ve bir monoterpenoid olan izoforon molekülü ve bu molekölün sentetik türevinin sentezi, mikrobiyal biyotransformasyon ile yeni doğal türevlerinin eldesi ve bu türevlerin bazı önemli patojen mikroorganizmalara karşı biyolojik aktivitelerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

1.2. Doğal Ürünler ve İlaç Molekülleri

Doğal olarak oluşan organik bileşikler canlılarda üç temel gruba ayrılabilir. Birinci gruba, tüm hücrelerde ortak olan primer metabolitler adı verilen bileşikler girer. Bu bileşikler hücrelerin büyüme ve üremelerinde merkezi rol oynarlar. İkinci gruba hücresel yapıları oluşturan proteinler, selüloz ve ligninler gibi yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler girer. Üçüncü grup ise canlıların büyüme ve üremesi için doğrudan ilişkisi olmayan, ama kendini üretenlere bazı avantajlar sağlayan sekonder metabolizma bileşenleri veya sekonder metabolitler olarak da adlandırılan doğal ürünlerden oluşmaktadır (Hanson, 2003; Clayden *et al.*, 2001).

Doğal ürünler özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer bazı hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde önemli role sahip olan bileşiklerdir. Temel yaşamsal işlevlerle doğrudan ilişkili olmasalar da canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olurlar. Bu ürünlerin genellikle onları üreten organizmalar üzerinde kanıtlanmış herhangi bir etkisi olmamasına karşın, organizmanın rakibi veya avcısı üzerinde engelleyici etkisi büyüktür (Mann, 1994).

Sekonder metabolitler; bitkilerin, çevresel koşullara uyum sağlama, savunma, korunma, hayatta kalma, neslini sürdürme ve ekosistemle ilişkilerini düzenlemelerinde yardımcı olurlar. Bu bileşikler organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Sekonder metabolitler, ara metabolizma ürünlerinden farklı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli olan; atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme gibi birtakım fonksiyonları üstlenirler. Bu görevler dışında; antibiyotik, kematerapötik, pestisid, immünsüpresif ve antilipolitik ajan gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere de sahiptirler. Bu nedenle endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Fonksiyonlarındaki çeşitliliğe benzer şekilde kimyasal yapıları bakımından da çok büyük çeşitlilik gösterirler. Sekonder metabolitler başta ilaç sanayinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır (Büber

ve Aan, 2004; Oskay and Oskay, 2009).

Son yıllarda tüm ülkelerde, ruhsatlandırılmış ilaçlar ve antibiyotikler dikkate alındığında bu maddelerin %95'inin doğal kaynaklı olduğu göze çarpmaktadır. İlaç üretiminde halen en verimli sonuç sağlayan etken maddeler grubu, doğal kaynaklı bileşiklerdir. Bunlar; genellikle kara bitkileri, kara hayvanları, deniz organizmaları ve mikroorganizmaların metabolitleridir. Bu gruplar arasındaki deniz organizmaları son 20–30 yılda yoğun bir şekilde araştırılan çok zengin bir doğal kaynak olarak göze çarpmaktadır. Mikroorganizmalar ise önemini sayılarının on binlerle ifade edilmesiyle göstermektedir (Tübitak, 2004; www.kultur.k12tr/biyosemp/pdf/03__biyoteknoloji_2007.pdf).

Biyolojik etki gösteren doğal kaynaklı bileşikler, doğrudan ilaç etken maddesi olarak kullanılabilmesinin yanı sıra modifikasyon ve türevlendirme gibi yarı sentezle değiştirilebilir. Böylece daha etkili ve daha az toksik moleküller elde edilebilir. “İlaç adayı tasarımı” araştırmaları, bilinen moleküllerin biyoinformatik ve işlevsel biyoloji gibi bilgisayar yöntemlerinin kullanılmasıyla, hedef protein ya da diğer moleküllerin işlevsel bölgelerine karşı uyum gösterecek moleküllerin bilgisayar ortamında tasarlanmasıdır. Bu araştırmalar aynı zamanda, tedavi edici özelliği olan moleküllerin bulunmasını da hızlandırmaktadır. Bu şekilde bilgisayar destekli tasarım ve modelleme kullanılarak yeni bileşiklerin keşfi mümkündür. Söz konusu yöntem “Rasyonel İlaç Tasarımı” olarak adlandırılır. Bu araştırmalar sonucunda, tespit edilen moleküllerin sentezlenmesi, etkinliklerinin incelenmesi ve etkenliği saptanan moleküllerin daha ileri çalışmalar sonucu ilaç olarak kullanılabilmesi, ilaç geliştirmenin diğer aşamalarını oluşturmaktadır (Tübitak, 2004).

1.3. Terpenler

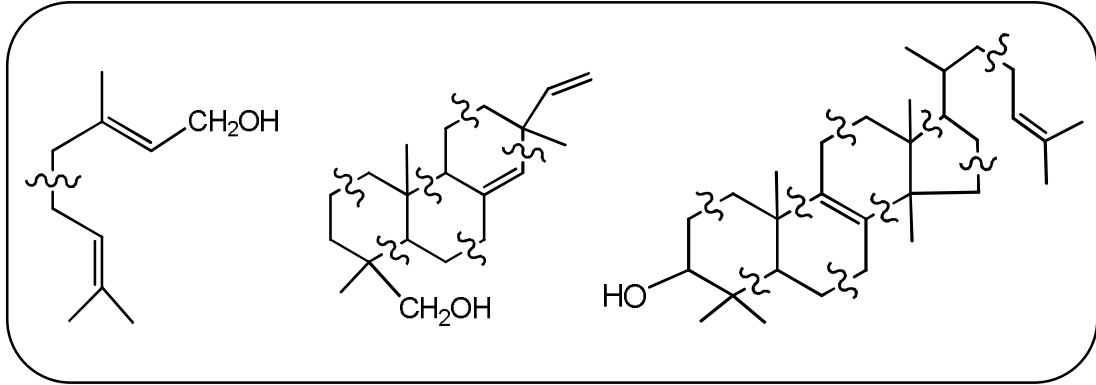
Terpenler, doğal ürünlerin en yaygın ve kalabalık sınıfıdır. Hoş kokulu ve viskoz maddelerdir. Terpen sözcüğü “Terebentin” sözcüğünden üretilmiştir. Çoğu hidrokarbondur; ancak alkol, aldehit, keton gibi oksijen içeren bileşiklerde olabilirler. Bu bileşikler bitkilerde ve hayvanlarda birçok farklı işlevi bulunurken gıdalarda da aroma bileşenleri olarak önemlidirler. Örneğin turuncgiller, tarçın ve diğer baharat aromaları birkaç terpen ile karakterize edilir. Terpenler başlıca bitkiler, özellikle iğne yapraklılar, tarafından üretilmekle beraber bazı böceklerde de (örneğin: *Papilionidae* cinsindeki kelebekler) osmeteriyumlarında terpenler salgırlar. Limonen ve citral (limon), kamfor ve pinen (çam ağaçları), geraniol ve timol (gül) ve mentol en yaygın bilinen terpenlerdir (Umay, 2007).

Terpenler halkalı, düz zincirli, kısmen halkalı veya kısmen düz zincirli bileşikler olabileceği gibi çift bağlar, hidroksil grupları ve daha başka işlevsel grup da içerebilirler. Günümüzde tanımlanan terpenlerin sayısı 40.000 civarındadır. Kimyasal anlamda terpenler, yapısı çeşitli fakat belli sayıda izopren (2-metil-1,3-butadien) birimlerine sahip olan moleküller (izoprenoidler) grubu olarak tanımlanabilir. Terpenler tek, iki, üç ya da daha fazla izopren birimi içerebilir (Akay, 2002; Keskin, 2010).

Terpenler genellikle bitkilerin tamamının veya bazı kısımlarının ekstraksiyon ya da buhar destilasyonlarına maruz bırakılmaları ile elde edilirler. Uçucu yağlar olarak da bilinen bu ekstraktlar, parfümlerin hazırlanması, yiyecek ve içeceklerde hoş tat ve aroma kazandırılması yanı sıra bitki kökenli bazı ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Keskin, 2010).

Terpenler, içerdikleri izopren birimlerinin sayısına göre hemiterpenler (tek izopren birimi), monoterpenler (iki izopren birimi), seskiterpenler (üç izopren birimi), diterpenler (dört izopren birimi), sesterterpenler (beş izopren birimi), triterpenler (altı

izopren birimi), tetraterpenler (sekiz izopren birimi) ve politerpenler (pek çok izopren birimi) olmak üzere sekiz sınıf olarak incelenirler. Yapısında oksijen bulunduran terpenler adlandırılırken sonlarına “-oid” eki alırlar. Örneğin; oksijen içeren monoterpenler, monoterpenoidler olarak isimlendirilirler.



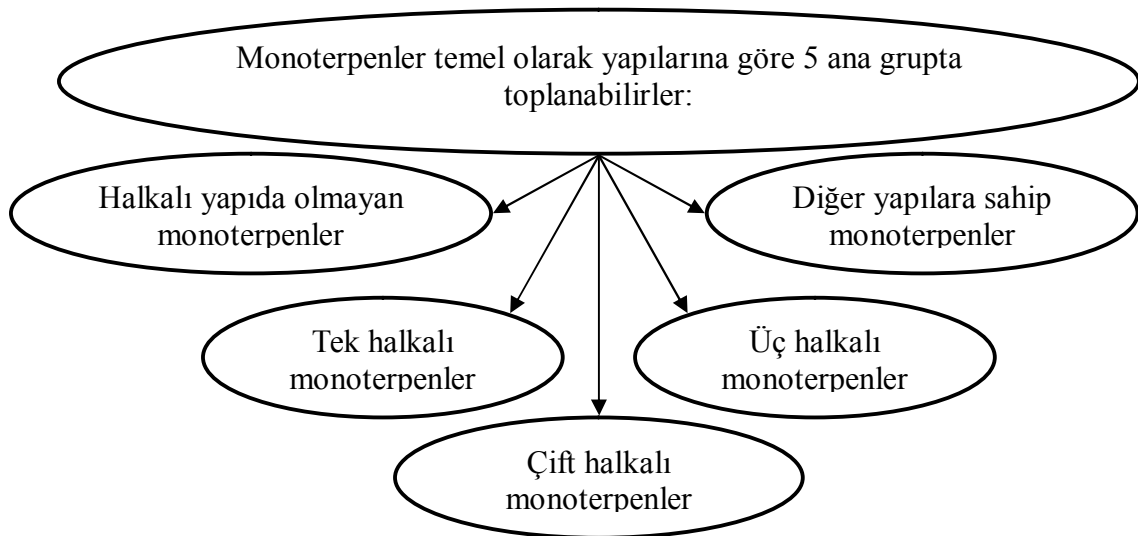
Şekil 1.1. Terpenlerin izopren birimlerinin gösterilmesi

Terpen ve terpenoidler, pahalı olmayan kolayca temin edilebilen ve yenilenebilir maddelerdir. Bu bileşikler çoğu bitki ve çiçekteki esans yağlarının başlıca bileşekleridir. Esans yağları gıdalara tatlandırıcı olarak, parfümeride, koku tedavisinde (aroma terapi), geleneksel ve alternatif tıpta kullanılırlar. Doğal terpenlerin sentetik değişiklikleri ve türevleri, parfümeri ve gıda tatlandırıcı katkı maddelerindeki çeşitliliği çok arttırmıştır. Özellikle monoterpenler ve monoterpenoidler ayrıca doğal aroma kimyasallarının üretiminde kullanılabilecek çok geniş bir alana sahiptir (Keskin, 2010).

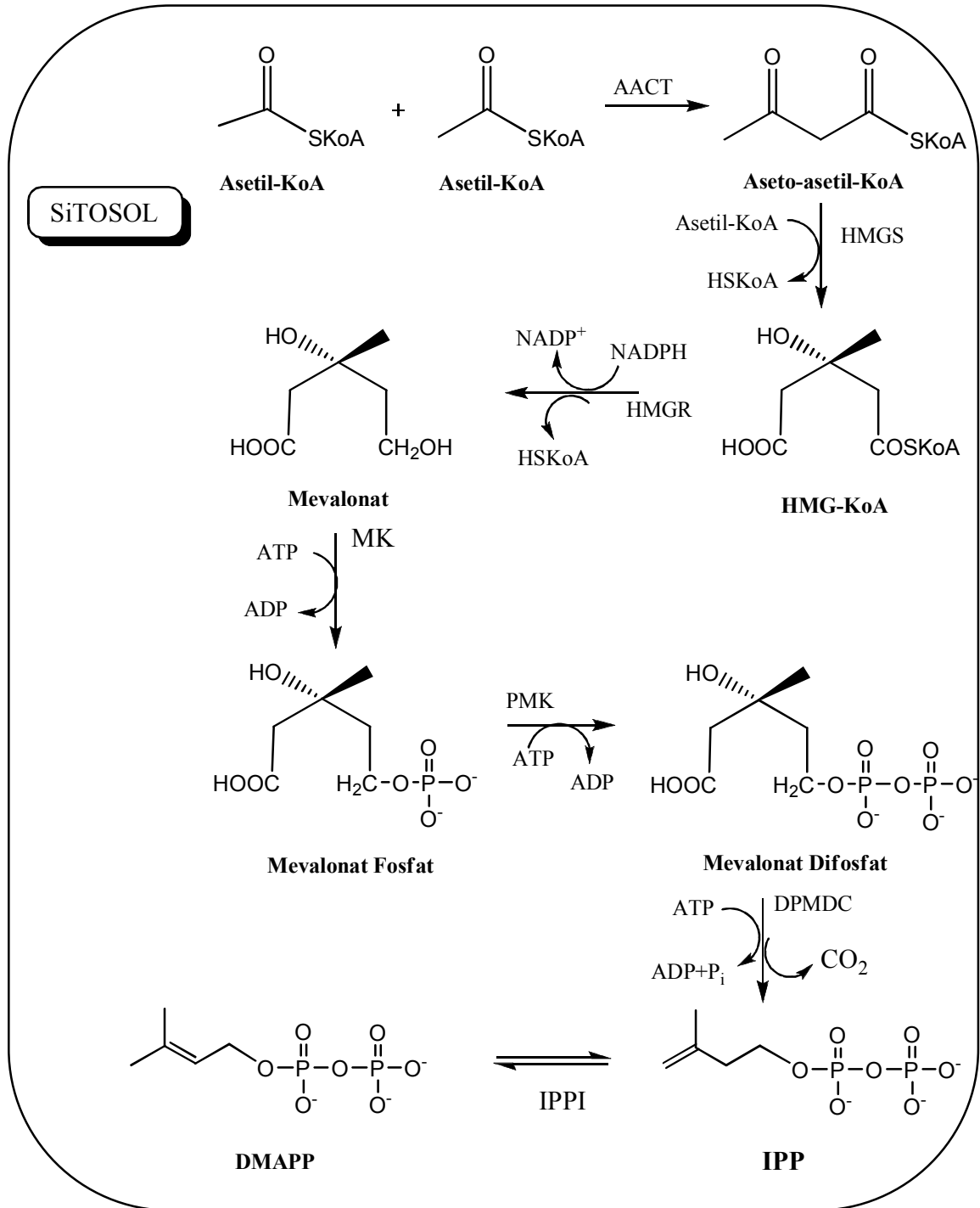
1.4. Monoterpenler

Monoterpenler iki izopren biriminden oluşur ve $C_{10}H_{16}$ moleküler formülüne sahiptirler. Özellikle bitkiler tarafından oluşturulurlar. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin salgı sistemlerinde depolanırlar. Doğadaki canlıların tümü sekonder metabolit olarak çeşitli izopren türevlerini sentezlemektedirler. Monoterpenlerin ilk zamanlarda sadece yedek karbon kaynağı olarak sentezlendikleri düşünülse de, son araştırmalara göre bitkilerin önemli bir savunma ve çoğalma aracı olduklarını göstermiştir (Carvalho and Fonseca, 2006).

Tablo 1. Monoterpenlerin sınıflandırılması



Doğada tanımlanmış halde 40.000 adet bileşik terpen, yaklaşık 740 adet ise bilinen monoterpen bulunmaktadır. Monoterpenlerin hücrenin sitosol kısmında sentezlendikleri düşünülmektedir. Biyosentezinde ise, izopren birimlerinin çıkış maddesi aktive edilmiş asetik asit olarak da bilinen “Asetil koenzim A (Asetil Co-A)” bileşiğidir. İzopren birimlerinin aktif formu “izopentenil pirofosfat (IPP)”dir. IPP bileşiği ise “IPP izomeraz (IPPI)” enzimi ile “dimetilallil pirofosfat (DMAPP)”a dönüştürülür. DMAPP yapısındaki elektrofilik metilen grubu ile IPP’nin yapısında bulunan nükleofilik metilen grubu birleşimi sonucu “geranilpirofosfatı (GPP)” oluşur. GPP bir monoterpendir ve aynı zamanda diğer monoterpenlerin başlangıç maddesidir (Keskin, 2010).



Şekil 1.2. Mevalonat yolu

1.4.1. Monoterpenlerin önemi

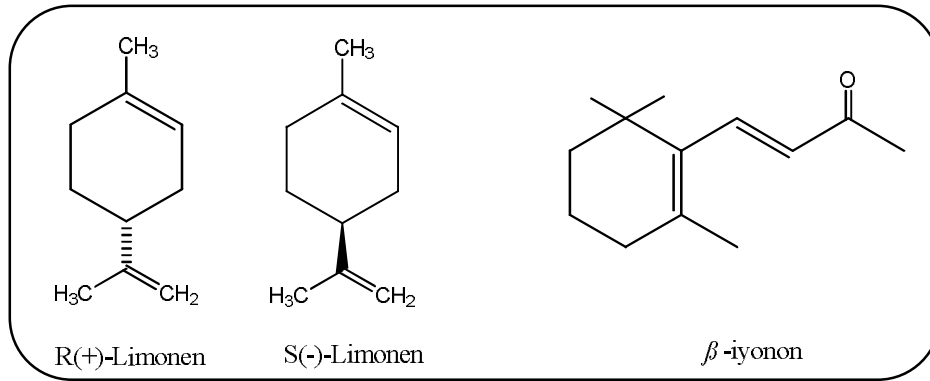
Monoterpenler, doğal koku ve tat özellikleriyle birçok biyoaktif ve doğal moleküllerin sentezlenmesinde, evlerde kullanılan genel temizlik malzemelerinde esans maddesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadırlar. Parfüm hammaddeleri olarak kullanımlarının yanında eczacılık teknolojisinde kötü koku ve tatları gizlemek için de tercih edilmektedirler. Gıda sektöründe genellikle yiyeceklerde ve alkollü-alkolsüz içeceklerin üretiminde katkı maddesi olarak kullanımları yaygındır. Ayrıca monoterpenler, endüstride elektronik cihaz ve kablo temizliği yanı sıra uçak malzemelerinin temizlenmesinde de kullanılmaktadır (De-Oliveira *et al.*, 1997; Keskin, 2010).

Monoterpenler, bitkilerin kimyasal ekolojilerinde önemli rol oynarlar. Bunun yanında, patojenlere karşı doğal mücadelede, tozlaşma için böcek çekici olarak ve allelopatik madde (feromen) salgılama gibi fonksiyonlara da sahiptirler (Mann *et al.*, 1994; Çelik, 2009).

Böcekler genellikle beslendikleri bitkilerden aldıkları terpenleri büyüme hormonları ve feromene çevirirler. Feromen; hayvanların (özellikle böceklerin) birbirleri ile iletişimlerini sağlayan kimyasallara verilen addır. Doğaya zararlı olmayan bazı feromenler; böcek kovucu, insektisit ve pestisit gibi özelliklerinden dolayı tarım endüstrisinde zirai mücadele amaçlı olarak etkili bir biçimde kullanılmaktadırlar (Vandamme and Soetaert, 2002; Karabacak, 2007).

Günümüzde, çoğu monoterpenler sentetik olarak üretilebilmektedir. Monoterpenler ve seskiterpenler küçük moleküllü terpenler oldukları için su buharı destilasyonu ile ayrılabilirler. Daha büyük molekül yapıları terpenleri ayırmada ise ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (Karabacak, 2007).

Endüstriyel boyutta en çok kullanılan monoterpener, limonen, β -iyonon, linalool ve esterleri, L-mentol, (-)-karvon, α -terpineol ve pinendir. Örneğin; limonen, bilinen en geniş kullanım alanına sahip terpenler arasında yer alır. Ayrıca limonen ile yapılmış çok sayıda biyolojik etki çalışması mevcuttur. Parfümeri, kozmetik ve gıda sanayinde, polimer kimyası, temizlik ürünlerinde esans kokusu vermek amaçlı kullanılırlar. β -iyonon ise; makyaj malzemeleri, parfümler, şampuanlar gibi şahsi bakım malzemeleri yanı sıra, ev temizlik ürünlerinde kullanımı yaygın olan bir bileşiktir (Van der Werf *et al.*, 2000; Keskin ve Yıldırım, 2010).

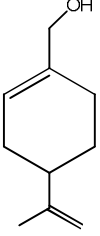
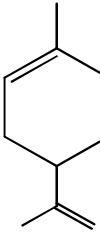
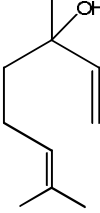
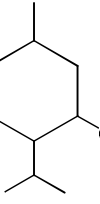
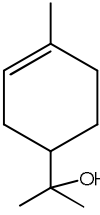


Şekil 1.3. Limonen ve β -iyonon molekülleri

1.4.2. Monoterpenlerin biyolojik etkileri

Monoterpenler, küçük molekül yapısına sahip olmalarına rağmen uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. En yaygın kullanımları; antiseptik (timol, sineol), antibakteriyal, antifungal, antiviral, rubefiyon (terementi yağı), kaşıntıya karşı (mentol), acı tonik, iştah açıcı, gastrointestinal rahatsızlıklarda, ekspektoran, sedatif, anestetik (öjenol), analjezik, antioksidan, antitussif, antiakne ve antiinflamatuvar vb. tedavi edici özelliklerinden dolayıdır. Monoterpenlerin hücre düzeyinde enerji metabolizmalarına etki ettikleri bilinmektedir. Yapılan son çalışmalarda monoterpenerin *in vitro* ve *in vivo* deneylerle de desteklenen sonuçlara göre, bazı kanser türlerinin (meme, karaciğer, akciğer, pankreas, prostat vb.) önlenmesinde ve tedavisinde etkin oldukları ispatlanmıştır (Edris, 2007; Demirci *vd.*, 2008).

Tablo 2. Önemli aktivite gösteren bazı monoterpenler

Monoterpen		Biyolojik Etkinliği	Kaynaklar
Perilil Alkol		<ul style="list-style-type: none"> ❖ Antiproliferatif aktivite ❖ Kemoterapötik aktivite ❖ Antikanserojen aktivite ❖ Antiplasmodif aktivite 	<ul style="list-style-type: none"> - Xanthakis <i>et al.</i>, 2009 - Matos <i>et al.</i>, 2008 - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Olagnier <i>et al.</i>, 2007
Limonen		<ul style="list-style-type: none"> ❖ Antioksidan aktivite ❖ Antikanserojen aktivite ❖ Antianjiyojenik & proapoptotik etki ❖ Antibakteriyal Aktivite ❖ İlaç geçirgenliğini artırma 	<ul style="list-style-type: none"> - Juniur <i>et al.</i>, 2009 - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Edris, 2007 - Jirovetz <i>et al.</i>, 2007 - Cornwell <i>et al.</i>, 1996
Linalool		<ul style="list-style-type: none"> ❖ Antibakteriyal aktivite ❖ Antifungal aktivite ❖ Anti-inflamatuar aktivite 	<ul style="list-style-type: none"> - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Peana <i>et al.</i>, 2002
Mentol		<ul style="list-style-type: none"> ❖ Antiproliferatif aktivite ❖ Anestezik aktivite ❖ Antiparazitik aktivite 	<ul style="list-style-type: none"> - Park <i>et al.</i>, 2009 - Watt <i>et al.</i>, 2008 - Kiuchi <i>et al.</i>, 2002
α -terpineol		<ul style="list-style-type: none"> ❖ Antifungal aktivite ❖ Antibakteriyal aktivite ❖ Antioksidan aktivite 	<ul style="list-style-type: none"> - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Joy <i>et al.</i>, 2007 - Hassan and Radwan, 2010

1.5. Mikrobiyal Transformasyon (Biyotransformasyon)

Biyotransformasyon; mikroorganizma, bitki ve izole enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen kimyasal dönüşümlere verilen isim olarak tanımlanabilir. Biyotransformasyon reaksiyonları için kullanılan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilen mikrobiyal hücrelerdir. Bitki ve hayvan hücrelerinde, enzim çeşitliliği göz önüne alınırsa bu tip reaksiyonların kararlı ve tutarlı olmaması, dolayısıyla reaksiyonların kontrolünün zorluğu, düşük verim eldesi sebebiyle tercih edilmemektedir. Bitki ve hayvan hücrelerinin bu dezavantajların aksine mikrobiyal hücreler, çok daha farklı tipte substratları metabolize edebilmektedir. Ayrıca mekanik olarak daha kararlı yapıya sahip olup buldukları ortama uyumları açısından avantaj sağlamaktadır (Arnold, 2000; Loughlin, 2000).

Biyotransformasyon reaksiyonları ise; *in vivo* şartlarda vücuda giren yabancı maddelerin enzimler ile zararsız hale getirilmesini (detoksifikasyon) ifade etmektedir. Bu reaksiyonlar özellikle, karaciğerdeki enzimler tarafından gerçekleştirilen yükseltgeme, indirgeme, dekarboksilasyon ve hidroliz tepkimelerini kapsamaktadır. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda çoğu zaman polaritesi yüksek, vücuttan atılımı kolay, inaktif moleküller oluşur. Bu moleküller, ikinci bir sistemle vücuttan atılır. Bu tür reaksiyonların mikroorganizmalar aracılığı ile bilinen substratlardan yola çıkılarak, laboratuvar şartlarında yeni metabolitlerin sentezlenmesine “Mikrobiyal Transformasyon” denmektedir (İşcan, 2009).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik kimyasal metodlara göre çok daha ılıman şartlarda gerçekleşirler ve çevre dostudurlar. Ayrıca ekonomik açıdan daha ucuza ve daha kısa sürede ve yüksek verimler ile gerçekleştirilirler. Kimyasal sentez metodları ile genelde hedef moleküller, ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar olarak elde edilmektedir. İlaç etken maddesi sentezlenmesinde özellikle tek enantiyomer üretmek oldukça önemlidir. Biyotransformasyon ile enantiyomerlerden birinin seçimli dönüşüme uğratarak rasemik karışımlardan ayrılması mümkündür.

Geniş bir çeşitliliğe sahip olan biyotransformasyon reaksiyonlarının bir diğer özelliği de sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek reaksiyonları gerçekleştirebilme olanağıdır. Tüm bu üstünlükler dikkate alındığında biyotransformasyonlar, zamanla klasik üretim ve elde yöntemlerinin yerini almaya adaydır denilebilir (Telefoncu, 2010).

Mikrobiyal transformasyonlarda en verimli ve yaygın dönüşümler, oksidoredüktaz ve hidrolazların katalizlediği reaksiyonlardır. Bunların dışında, dehidrasyon, kondenzasyon ve degradasyon reaksiyonları, yeni karbon-karbon ve hetero atom bağ oluşumu, izomerizasyon ve yer değiştirme reaksiyonlarına da rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda genellikle substrat olarak; asiklik bileşikler, terpenler, aromatik bileşikler, oksijen veya azot içeren heterosiklik bileşikler, alkaloitler ve karbonhidratlar kullanılmaktadır (Kieslich, 1976; Loughlin, 2000).

1.5.1. Monoterpenlerin biyotransformasyonu

Monoterpenlerin biyotransformasyonu son yıllarda enantiyomerce saf hoş tat ve kokulara sahip bileşiklerin ılıman koşullarda üretilmesine olanak sağladığı için ilgi çekmektedir. Oluşan ürünlerin “doğal” kabul edilmesi biyotransformasyonun önemini daha da arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda genellikle immobilize enzimler (hücre dışı preparatlar), hücre ekstraktları veya bütün hücre sistemleri kullanılmaktadır.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında doğal kayaklardan izole edilen veya ticari olarak elde edilebilen saf veya yarı saf enzimler kullanılır. Reaksiyon ürününün kolay, hızlı ve spesifik elde edilmesini sağlar. Ancak izolasyonu, özel reaksiyon koşulları ve kofaktör gerektirmesinden dolayı enzimlerle çalışmak oldukça pahalı ve güçtür. Bütün hücre sistemleri, izole enzimlere göre hem daha ucuz hem de daha pratiktir ama bunların yanı sıra reaksiyon ortamında istenmeyen yan ürünler oluşabilmektedir. Ayrıca reaksiyon ortamının kontamine olma riski de mevcuttur. Bu olumsuzluklar işlemin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Buna rağmen, hücre membranı tarafından korunan birden fazla

enzimin aynı anda çalışması ve kofaktör ihtiyacının olmaması büyük avantaj sağlamaktadır (Carvalho and Fonseca, 2006; İşcan, 2009).

Gıda ve ilaç hammaddesi olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan monoterpenlerin biyotransformasyonları ile doğal aroma kimyasallarının üretimi, son yıllarda tüketicilerin doğal ve sağlıklı ürünlere rağbet etmeleri sebebiyle her geçen gün önemini arttırmaktadır (Çelik, 2009). Monoterpenlerin doğada bol miktarda bulunması, biyodönüşüm reaksiyonları için başlangıç maddesi olarak kullanılmasını daha da olumlu kılmaktadır. Ayrıca, ilaç geliştirmede en önemli aşamalarından bir tanesinde önemli biyolojik etkinliğe sahip molekülleri türevlendirme aşamasıdır. Biyotransformasyon reaksiyonları bu amaçla son yıllarda sıkça kullanılmakta ve daha etkili ve suda kolayca çözünebilen türevlerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

1.5.2. *Alternaria alternata* ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Literatürde *Alternaria alternata* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiş biyotransformasyon reaksiyonları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 3. *A. alternata* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: Grindelik asit	Metabolitler: 6 β -Hidroksigrindelik asit 3 β -Hidroksigrindelik asit
Kaynak: Hernandez <i>et al.</i> , 1997	
Substrat: 1 β -Hidroksibakkatin I	Metabolitler: 5-Deasetil-1 β -hidroksibakkatin I 13-Deasetil-1 β -hidroksibakkatin I 5,13-Dideasetil-1 β -hidroksibakkatin I
Kaynak: Zhang <i>et al.</i> , 1998	
Substrat: Solidegenon	Metabolit: 3-Okzosolidegenon
Kaynak: Schameda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2004	

Tablo 3. (Devam) *A. alternata* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: Cinobufagin	Metabolitler: 12 β -Hidroksilcinobufagin 3-Okzo-12 β -hidroksilcinobufagin 12-Okzo-deasetilcinobufagin 12-Okzo-cinobufain
Kaynaklar: Ye <i>et al.</i> , 2004 Ye and Guo, 2005 Ye and Guo, 2008	
Substrat: 13-Deoksibaccatin	Metabolitler: 7 β -Hidroksi-deasetilbaccatin 7 α -Hidroksi-10-asetilbaccatin
Kaynak: Arnone <i>et al.</i> , 2006	
Substrat: Asetofenon	Metabolit: Asetofenon yapısında bulunan keton grubunun stereospesifik olarak β -OH'e indirgenmiş formu
Kaynak: Kurbanoglu <i>et al.</i> , 2007	
Substrat: Bufatolin	Metabolitler: 3-Ketobufatolin 12 β -Hidroksil-bufatolin 3-Keto-12 β -hidroksil-bufatolin
Kaynak: Xin <i>et al.</i> , 2009	
Substrat: Ginsenosid Rb ₁ [R ₁ :O-glc(2→1)glc, R ₂ : O-glc(6→1)glc]	Metabolitler: Gipenosid XVII [R ₁ :O-glc, R ₂ : O-glc(6→1)glc] Ginsenosid F ₂ [R ₁ , R ₂ : O-glc]
Kaynak: Zhao <i>et al.</i> , 2009	
Substrat: Ginsenosid Rc [R ₁ :O-glc(2→1)glc, R ₂ : O-glc(6→1)araf]	Metabolitler: Ginsenosid Mb [R ₁ :O-glc, R ₂ : O-glc(6→1)araf] Ginsenosid F ₂ [R ₁ , R ₂ : O-glc]
Substrat: Ginsenosid Rb ₂ [R ₁ :O-glc(2→1)glc, R ₂ : O-glc(6→1)araf]	Metabolitler: Bileşik O [R ₁ :O-glc, R ₂ : O-glc(6→1)araf] Ginsenosid F ₂ [R ₁ , R ₂ : O-glc]

1.5.3. *Fusarium culmorum* ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Literatürde *Fusarium culmorum* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiş biyotransformasyon reaksiyonları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 4. *F. culmorum* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: 4-Androsten-3-on	Metabolitler: 15 α -Hidroksiandrostendion 12 β ,15 α -Dihidroksi-4-androsten-3-on
Kaynak: Kołek and Świzdor, 1998	
Substrat: Testesteron, Androstendion	Metabolitler: 6 β -Hidroksiandrostendion 6 β -Hidroksitestesteron 15 α -Hidroksiandrostendion 15 α -Hidroksitestesteron
Substrat: Progesteron	Metabolitler: 15 α -Hidroksiprogesteron 12 β ,15 α -Dihidroksiprogesteron
Substrat: 17 α -Hidroksiprogesteron	Metabolitler: 16 β ,17 α -Dihidroksiprogesteron 15 α ,17 α -Dihidroksiprogesteron
Substrat: Dehidroepiandosteron (DHEA)	Metabolit: 7 α -Hidroksi-DHEA
Kaynak: Kołek, 1999	
Substrat: 5-Androsten-3 β ,17 β -diol	Metabolitler: 7 α -Hidroksi-DHEA 5-Androsten-13 β ,7 α ,17 β -triol

Tablo 4. (Devam) *F. culmorum* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: 17 α -Metil-5-androsten-3 β ,17 β -diol	Metabolit: 17 α -Metil-5-androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol
Substrat: Pregnenolon	Metabolitler: 3 β ,7 α -Dihidroksi-5-pregnen-20-on 3 β ,15 α -Dihidroksi-5-pregnen-20-on 3 β ,7 α ,15 α -Trihidroksi-5-pregnen-20-on
Substrat: 5-Androsten-3 β -ol	Metabolit: 5-Androsten-3 β ,7 α ,15 α -triol
Substrat: 5-Androsten-17-on	Metabolitler: 7 α -Hidroksi-5-androsten-17-on 2 α ,7 α -Dihidroksi-5-androsten-17-on 7 α ,15 α -Dihidroksi-5-androsten-17-on
Substrat: (+)-Nootkaton	Metabolitler: Nootkaton-11R,12-diol 9 β -Hidroksinootkaton
Kaynaklar: Noma <i>et al.</i> , 2001 Furusawa <i>et al.</i> , 2005	
Substrat: Farnesol	Metabolitler: 9,10-Epoksigeranilaseton (-)-8-Hidroksigeranilaseton
Kaynak: Gliszczyńska and Wawrzeńczyk, 2008	
Substrat: 10,11-Epoksifarnesol	Metabolitler: 9,10-Epoksigeranilaseton 9,10-Dihidroksigeranilaseton 10-Hidroksi-6,10-dimetilundek-5-en-2,9-dion
Substrat: Geranilaseton	Metabolitler: 8-Hidroksigeranilaseton 9,10-Dihidroksigeranilaseton 10-Hidroksi-6,10-dimetilundec-5-en-2,9-dion
Substrat: 9,10-Epoksigeranilaseton	Metabolit: 9,10-Dihidroksigeranilaseton

1.5.4. *Neurospora crassa* ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Literatürde *N. crassa* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiş biyotransformasyon reaksiyonları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 5. *N. crassa* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: Benzaldehit	Metabolit: (R)-Fenilasetilkarbinol
Kaynak: Rosche <i>et al.</i> , 2001	
Substrat: Diizoforon	Metabolit: 8 β -Hidroksidiizoforon
Kaynaklar: Kiran <i>et al.</i> , 2005 Akar, 2005.	
Substrat: <i>Ent</i> -18-asetoksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit	
Metabolitler: <i>Ent</i> -18-asetoksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -1 β ,18-dihidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -11 α ,18-dihidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -18-asetoksi-1 β -hidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -18-asetoksi-11 α -hidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -1 α ,18-dihidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit <i>Ent</i> -12 α ,18-dihidroksi-6-okzo-13-epi-manoiloksit	
Kaynak: Ghoumari <i>et al.</i> , 2006 García-Granados <i>et al.</i> , 2007.	
Substrat: <i>Ent</i> -8 α -hidroksilabda-13(16),14-dien	Metabolit: <i>Ent</i> -1 β -hidroksi- <i>ent</i> -6-okzo-manoil oksit 1 β -Hidroksi- <i>ent</i> -6-okzo-manoil oksit
Kaynak: García-Granados <i>et al.</i> , 2007.	

Tablo 5. *N. crassa* küfü ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar

Substrat: Androst-1,4-dien-3,17-dion (ADD)	
Metabolitler: 17 β -Hidroksiandrost-1,4-dien-3-on 14 α -Hidroksiandrost-1,4-dien-3,17-dion 6 β -Hidroksiandrost-1,4-dien-3,17-dion 11 α -Hidroksiandrost-1,4-dien-3,17-dion 6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-1,4-dien-3-on 7 β -Hidroksiandrost-1,4-dien-3,17-dion 14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-1,4-dien-3-on 6 β ,14 α -Dihidroksiandrost-1,4-dien-3,17-dion 11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-1,4-dien-3-on	
Kaynak: Famarzi <i>et al.</i> , 2007	
Substrat: Androst-4-en-3,17-dion (AD)	
Metabolitler: 6 β ,14 α -Dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion 6 β ,9 α -Dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion 7 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion 9 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion 14 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion Androst-4,6-dien-3,17-dion	
Kaynak: Famarzi <i>et al.</i> , 2008	
Substrat: Sedrol	Metabolitler: 3 β -Hidroksisedrol 12 β -Hidroksisedrol 10 α -Hidroksisedrol
Kaynaklar: Kiran <i>et al.</i> , 2010 Akar, 2005	
Substrat: Karyofillen oksit	Metabolit: 12 β -Hidroksi karyofillen oksit
Kaynaklar: Kiran <i>et al.</i> , 2010 Durceylan, 2007	

A. alternata, *F. culmorum* ve *N. crassa* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları, genel olarak yapıya stereospesifik hidroksil grubu ilavesi ile sonuçlanmıştır. Bu durum, *A. alternata*, *F. culmorum* ve *N. crassa* küflerinin iyi bir hidroksillenme ajanı olarak mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

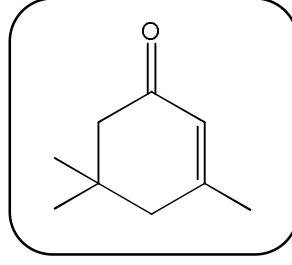
1.6. İzoforon

Bir monoterpenoid olan izoforon, $C_9H_{14}O$ molekül formülüne sahiptir. İzoforon *Artemisia filifolia* Torr. bitkisinin ana bileşenlerinden birisidir. Bu bitki ayrıca (-)-kamfor, 1,8-cineole (Eucalyptol) gibi monoterpenlerini de içermektedir. Yapılan biyolojik testler sonucunda, (-)-kamfor ve 1,8-sineol bileşiklerinin kansere karşı koruyucu etki, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite başta olmak üzere birçok biyolojik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu bileşiklere yapısal benzerlik gösteren ve ana bileşenlerden biri olan izoforon ile ilgili ise, 2008 yılına kadar herhangi bir biyolojik etki çalışmasına literatürde rastlanmamıştır (<http://medplant.nmsu.edu/artfil.shtml>; Torrance and Steelink, 1974). İzoforon, ayrıca bitkiler tarafından üretilen ve bitki antibiyotikleri (fitoaleksinler) olarak adlandırılan sekonder yapıya sahip bir bileşik olan kafeik aside de yapısal benzerlik göstermektedir (Desjardins *et al.*, 1995).

Fitoaleksinler, lipofilik yapıya sahip olup genelde sağlıklı bitki dokusunda bulunmazlar. Bu bileşikler patojen saldırı ya da stres koşullarında tepki olarak üretilirler. Bu bileşikler ve türevleri; fungus, bakteri ve nematodlar gibi çeşitli organizmaların büyümesini engelleyebilmekte, dolayısıyla pestisit ve fungusit olarak önemli aday moleküller arasında yer almaktadırlar (Grayer and Harborne, 1994; Prusky *et al.*, 1996).



Şekil 1.4. *Artemisia filifolia* Torr. bitkisinin resimleri



Şekil 1.5. İzoformon molekülünün yapısı

İzoformon molekülü ile ilgili ilk antimikrobiyal aktivite çalışması, grubumuz tarafından 2009 yılında gerçekleştirildi. Söz konusu çalışmada izoformon *A. alternata* fungal kültürü ile biyotransformasyona tabi tutuldu. Elde edilen 4 α -hidroksi izoformon ve 7 β -hidroksi izoformon türevleri çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdi (Çelik, 2009).

Söz konusu bilgiler ışığında bu çalışmada; izoformon molekülünün farklı analoglarının organik ve mikrobiyal reaksiyonlar ile eldesi ve oluşan moleküllerin bazı önemli bitki ve insan patojenlerine karşı biyolojik etkileri çalışıldı. Böylelikle, izoformon molekülünün ilaç etken madde potansiyeli taşıyıp taşımadığı ve hangi grupların biyolojik etkide önemli olduğunun ortaya konması hedeflendi.

BÖLÜM - 2: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Genel Deneysel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin aktive edilmesi ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan derin kültür tekniği için Gerhardt THO 500 Laboshake çalkalamalı inkübatör kullanıldı. Küflerin aktarılma ve steril koşullarda ekim işlemleri Herasafe steril kabininde gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktları buharlaştırıp çözücü fazından ayırma işlemleri ise Rotary Evaporatör RE 100 cihazı ile sağlandı. Kolon kromatografisi için Merck (1.09385.1000) silika jel 60 (230-400 mesh), kromatografi esnasında gerçekleştirilen İTK çalışmaları içinse 0,25mm kalınlığında silika jel plakaları (Merck silika jel GF254) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak etil asetat-hegzan (1:1) karışımı tercih edildi. Kolon kromatografisinden elde edilen spotlar, bileşenleri anisaldehit, sülfürik asit, metanol, asetik asit olan reaktif ile renklendirdikten sonra ısıtılarak (110°C) belirgin hale getirildi. Bu yöntem sonucunda saflaştırılan metabolitlerin yapısı, tek ve iki boyutlu spektral metotlar (¹H-NMR, ¹³C-NMR) kullanılarak aydınlatıldı. Bileşiklerin optik çevirme açısı Krüss P8000-T marka polarimetre cihazı ile ölçüldü ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$; $c = 125 \text{ mg/1mL MeOH}$; $l = 0,025 \text{ dm}$; $\alpha =$ gözlenen sapma açısı). FT-IR spektrumu ise Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre cihazında alındı.

2.2. Biyotransformasyon Çalışmaları

2.2.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Çalışmalarımızda kullanılan küfler; *Neurospora crassa*, *Alternaria alternata* ve *Fusarium culmorum* Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarından sağlandı. Alınan kültürler, +4°C’de muhafaza edildi.

2.2.2. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besi yeri bileşenleri

2.2.2.1. Nutrient broth (Merck 1.05443)

Pepton	5,0 g
Et ekstrakt	3,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 8 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 1,1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri test organizmalarının üretiminde kullanıldı.

2.2.2.2. Nutrient agar (Merck 1.05450.0500)

Pepton	5,0 g
Et ekstrakt	3,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 20 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri test organizmalarının (bakterilerin) üretiminde kullanıldı.

2.2.2.3. Mueller hinton agar (Sigma M-9552)

Et ekstraktı	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	12,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 38 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri antimikrobiyal aktivite çalışmalarında bakteriler için kullanıldı.

2.2.2.4. Mueller hinton broth (Merck 1.10293)

Et ekstrakt	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 21 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri MİK çalışmalarında bakteriler için kullanıldı.

2.2.2.5. Sabouraud %4 dextrose agar (Fluka 84088)

Bakteriyolojik pepton	10,0g
Bakteriyolojik dekstroz	40,0g
Agar	15,0g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 65 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu

besiyeri antimikrobiyal aktivite çalışmalarında küfler için kullanıldı.

2.2.2.6. Sabouraud dextrose broth

Bakteriyolojik pepton	10,0 g
Bakteriyolojik dekstroz	40,0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri bileşenleri tartılarak saf suda çözüldü ve otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C'de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri MİK belirlenmesi çalışmalarında küfler için kullanıldı.

2.2.2.7. Potato dextrose agar (Merck 1.10130)

Patates özü	4,0 g
D(+)-Glukoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 39 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C'de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri antimikrobiyal aktivite çalışmalarında küfler için kullanıldı.

2.2.2.8. α -medium

Glikoz	20,0 g
Pepton	5,0 g
Yeast ekstrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g
Saf Su	1000 mL

Besiyeri bileşenleri tartılan saf suda çözülerek hazırlanan besi yeri, 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL besiyeri olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerin ağzıları

alüminyum folyo ile kaplı pamukla kapatıldı. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri biyotransformasyon reaksiyonları için kullanıldı.

2.2.2.9. Taze yatık agar besi yeri

Potato dekstroz agar	5,85 g
Agar	1,2 g

Karışımı saf su ile 150 mL’ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri soğumadan 15 adet patolojik şişelere ilave edildi, otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra şişeler içerisindeki erimiş haldeki besiyerleri donmadan önce 45°’ye yakın eğim oluşturacak şekilde steril kabinin içerisinde ve UV ışığı altında 24 saat boyunca soğumaya bırakılmak suretiyle hazırlandı. Bu besiyeri biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmaların stoklanmasında ve sıvı besiyerine ilave edilmeden önce aktifleşmesini sağlamak için kullanıldı.

2.2.3. Agar difüzyon ve MİK yönteminde kullanılan çözeltiler

2.2.3.1. Fizyolojik tuz çözeltisi

NaCl	8,5 g
Saf su	70 mL
Saf su	1000 mL

Tartılan NaCl ilk önce 70 mL saf suda çözüldü, ardından 1000 mL’ye tamamlandı. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi.

2.2.3.2. Mc Farland standardı

BaCl ₂ (%1,175, 0.048 M)	0,5 mL
H ₂ SO ₄ (%1, 0.18 M)	99,5 mL

Yukarıdaki çözeltiler karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda okutuldu. Bu dalga boyunda absorbans değeri 0,08-0,10 aralığına girip girmediği kontrol edildi. Bu değer 0,5 Mc Farland standardı olarak kabul edildi. Standardın bulanıklığı ile bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlandı. 0,5 Mc Farland standardı, mL'de 10^8 bakteri yoğunluğunun bulanıklığına karşılık gelmektedir (Çolak, 2006)

2.2.4. Mikroorganizmaların hazırlanması

Hazırlanmış olan ve 250 mL'lik erlende bulunan 100 mL'lik α -medium besi yerine, önceden hazırlanan en taze alt kültürdeki küfler steril kabinde her erlene bir öze ucu dolusu kadar olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerde yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de (120 rpm) inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra mikroorganizmalar, diğer erlenlere eşit miktarlarda olacak şekilde ve steril koşullarda aktarıldı. Sıvı besi yerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.2.5. Substrat hazırlanması ve ilavesi

Her substrat (0,5 mL veya 500 mg) 40 mL aseton içerisinde çözüldükten sonra, daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan küf içerisine inkübasyonun üçüncü gününde her erlene eşit hacimde ilave edildi. İnkübasyon oda sıcaklığında çalışan dairesel çalkalayıcı üzerinde 8 gün boyunca sürdürüldü. Bu sürenin sonunda biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve metabolit oluşumunun maksimum düzeye olduğu ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edildi. Erlenler üzerine etil asetat ilavesi ile biyotransformasyon sona erdirildi. Daha sonra ekstraksiyon ve izolasyon aşamalarına geçildi.

2.2.6. Metabolitlerin ekstraksiyonu

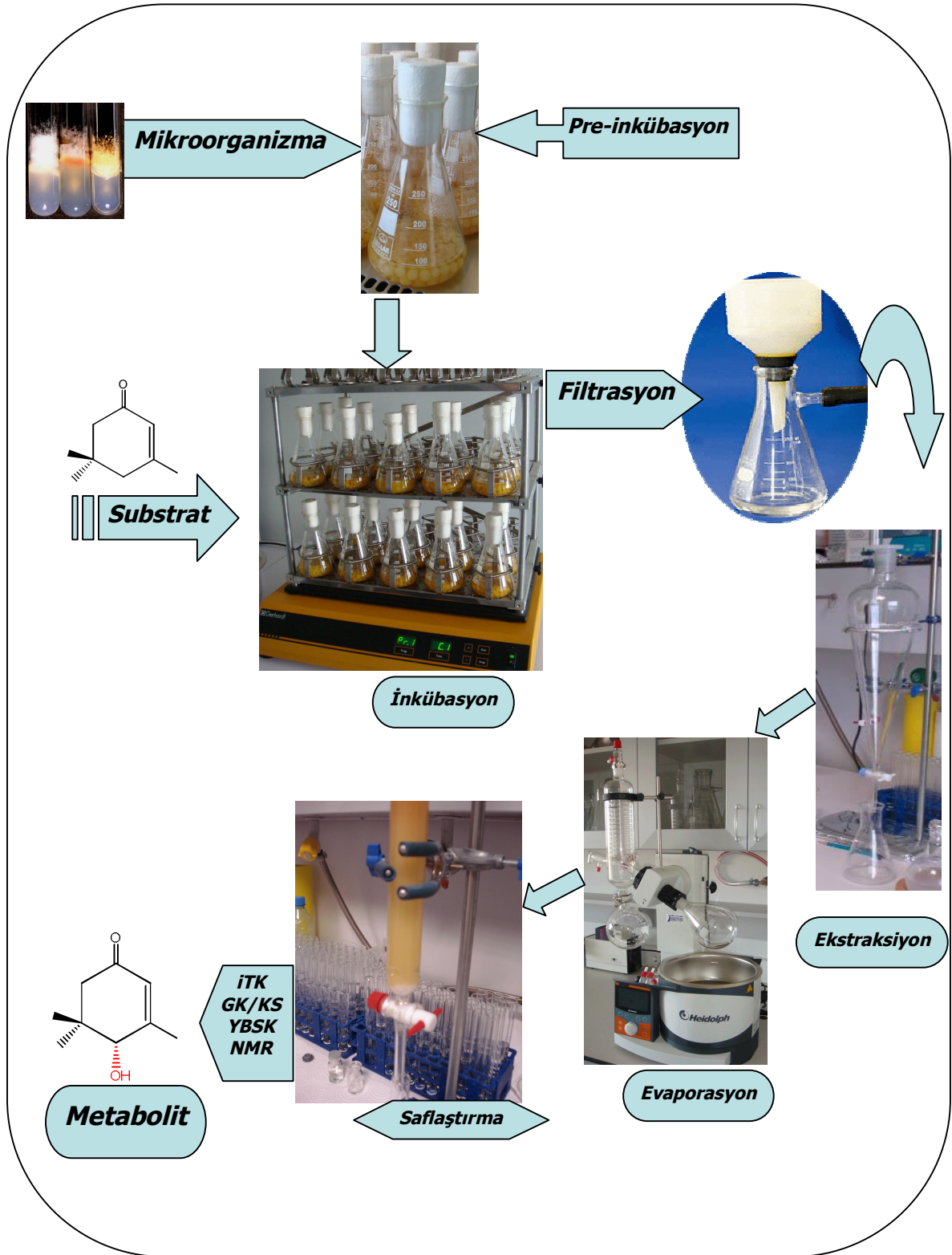
Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak metabolit oluşumu izlendi. Deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 2 mL alındı ve 3–5 mL EtOAc ilave edildi. Bir dakika süreyle vorteks kullanarak karıştırıldı. Etil asetatlı üst faz, başka bir pipet ile susuz Na₂SO₄'ta kurutulduktan sonra bir numune kabına aktarıldı ve azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırıldı. Oluşan metabolitlerin spotları İTK ile kontrol edildi.

2.2.7. Metabolitlerin izolasyonu

Biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besiyerlerine 1/1 oranında EtOAc ilave edildi. Besiyeri iyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden vakum altında süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar, ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlar, susuz Na₂SO₄'ta kurutulduktan sonra yoğunlaşmaya bırakıldı. Elde edilen kalıntı, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak petrol eteri ve etil asetat ile hegzan ve etil asetat kullanıldı. Kolondan ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlendi.

2.2.8. Metabolitlerin tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT/APT, Optik çevirme açısı ve IR gibi spektroskopik metodlar kullanılarak veya literatürdeki spektroskopik değerleri karşılaştırılarak aydınlatıldı.



Şekil 2. Biotransformasyon aşamaları ve metabolit izolasyonu çalışma şeması

2.3. Substratın (3) Sentezi

İzoforon (1) molekülü (3 mL) MeOH (50 mL) ve tetrahidrofuran (150 mL) içerisinde çözüldü. Sodyum borhidrür (3,5 g) 0°C'de -buz banyosu- çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon 3-4 saat boyunca oda sıcaklığında sürdürüldü. Daha sonra reaksiyon karışımına %10'luk HCl ilave edildi. Reaksiyon karışımı etil asetat ile ekstrakte edildikten sonra, su ve sodyum hidrojen karbonat çözeltileri ile 3'er kere yıkandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen karışım evaporatörde uçuruldu ve 1-hidroksi-3,5,5-trimetil-2-sikloheksen (2) (2,63 g) enantiyomerik karışım olarak elde edildi. Bu bileşik saflaştırılma yapılmadan bir sonraki reaksiyon için kullanıldı.

Elde edilen epimerik karışım (2) (2,63 g) etanol (100 mL) içerisinde çözülüp 25°C'de karışımın üzerine yavaş yavaş tetrahiyanoetilen (270 mg) ilave edildi. Reaksiyon manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya bırakıldı. Reaksiyonun gidişatı İTK ile kontrol edildi ve reaksiyon 3-4 saat sonra sonlandırıldı. Etanol ortamdan evaporatör ile uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım kolon kromatografisi işlemine tabi tutuldu. Kolondan %5'lik etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak 3 nolu molekül (1,8 g) saf olarak elde edildi.

2.4. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Mikrobiyal biyotransformasyonlarda kullanılan başlangıç maddeleri ve oluşan bazı metabolitlerin farklı yöntemlerle biyolojik etkileri incelendi.

2.4.1. Kullanılan mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında; *Salmonella typhimurum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, Medisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* bakterileri; *Candida glabrata* ve *Candida albicans* mayaları; *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus paraciticus*, *Geotichum candidum* ve *Botrytis cinerea* küfleri kullanıldı. Mikroorganizmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

2.4.2. Agar difüzyon yöntemi

Bu yöntem antimikrobiyal aktivite belirlenmesi aşamasında kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde test kültürleri Nutrient Broth (NB)'da aktiflendi. Bakterilerin aktivasyonu için ise Nutrient Agar (NA) petri kabı içerisine 3–4 mm olacak şekilde 25 mL NA besiyeri döküldü. Her bir bakteri kültürü NA üzerine öze yardımı ile sürülerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu aktif bakteri süspansiyonunu mL'de 10^8 olacak şekilde steril serum fizyolojik ilave edilerek Mc farland 0,5 bulanıklığına göre hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar Mueller Hinton Agar (MHA) petrilerinin yüzeyine steril eküvyon çubukları ile sürüldü. 1-Etoksi-3,5,5,-trimetil-2-sikloheksen (**3**) molekülü 100µg/20µL'de olacak şekilde derişimi ayarlanarak aseton-su karışımında çözüldü. Bu karışımından her petri için 20 µL alınarak, agar yüzeyinde steril

delici yardımıyla açılan kuyucuklara ilave edildi. Çözücü etkisini kontrol etmek amaçlı aynı oranda aseton: su karışımı da aynı işlemlerle açılan kuyucuklara ilave edildi. Oda sıcaklığında maddenin difüzyonu için 4°C’de 1 saat bekletildikten sonra, test organizmasının sıcaklık isteğine bağlı olarak inkübasyona bırakıldı. 1 gün sonra petrilerdeki disk çapını kapsayan inhibisyon çapı mm olarak ölçüldü.

Küfler için inokulum derişimi konidiumların Thoma lamında mikroskopik sayımı ile ayarlandı. Spor oluşumunu teşvik eden potato dextroz agar (PDA) yatık tüplere inokule edilen küf suşları 27–30°C’de 5 gün inkübe edildi. Oluşan sporlar, steril %0,1 lik Tween 80 çözeltisi ile süspande edilerek steril vidalı kapaklı bir tüpe aktarıldı. Spor zincirlerinin kopması için spor süspansiyonu vortekste şiddetli bir şekilde birkaç dakika çalkalandı. Bir miktar spor süspansiyonu Thoma lamına damlatıldı ve lamel ile kapatıldıktan sonra 40x10 büyütmede 8 büyük karedeki sporlar sayılarak iki ile çarpıldı. Thoma lamının sayım sonucu $A \times SF \times 10.000$ formülü ile hesaplandı. Bu formülde $A=16$ büyük karede sayılan hücre adedi, SF seyreltme faktörü ve 10.000 ise mm^3 deki sayım sonucunu 1mL’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir sabittir. İnokulum derişimi 10^6 CFU/mL olacak şekilde seyreltme yapılarak kullanıldı. Bakteriler ile gerçekleştirilen işlemlerin aynısı küfler için de tekrarlandı. Oda sıcaklığında maddenin difüzyonu için 4°C’de 1 saat bekletildikten sonra, test organizmasının sıcaklık isteğine bağlı olarak inkübasyona bırakıldı. 3–4 gün sonra petrilerdeki disk çapını kapsayan inhibisyon çapına bakıldı (Çolak, 2006).

2.4.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

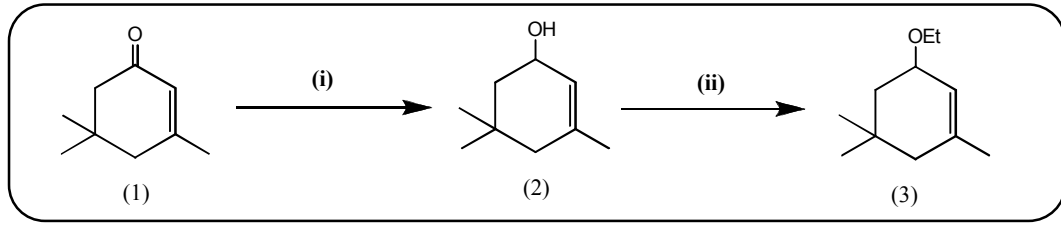
Test edilecek kimyasal maddeler M_1 (151 mg) ve M_2 (176 mg) hassas terazide tartılıp steril DMSO (1 mL) eklenerek stok solüsyon hazırlanmak üzere çözüldü. Kimyasal maddeler, DMSO içerisinde homojen oluncaya kadar karıştırıldı. “U” tipi 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakların her bir kuyucuğuna 100’er μ L steril Mueller Hinton Broth (MHB) ve aynı miktarda stok solüsyon ilave edildi. İyice karıştırdıktan sonra birinci kuyucuktan 100 μ L alınarak ikinci kuyucuğa aktarıldı ve bu işlemleri yaparken

maddenin iki katlı bir (1, 1/2, 1/4, 1/8, ...) derişim serisi elde edildi. 11. kuyucuk pozitif kontrol ve 12. kuyucuk ise negatif kontrol olarak adlandırıldı. Pozitif kontrol kuyucuğunda sadece organizma kullanılırken negatif kontrol kuyucuğunda ise sadece besiyeri kullanıldı ve kontaminasyonun olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra her kuyucuğa mL'de 10^5 hücre içeren mikroorganizma süspansiyonundan aktarıldı. Kapakları kapatılarak bakteri ve maya için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin olup olmadığını daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa trifenil tetrazolyum klorit (TTC) çözeltisinden 20 µL ilave edilerek, 3–4 saat 37°C etüvde bekletildi. Çözelti rengi berrak olan, yani mikroorganizma büyümesinin olmadığı kuyucuktaki derişim, MİK değeri olarak belirlendi (Çolak, 2006).

BÖLÜM - 3: SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Substratın (3) Sentezi

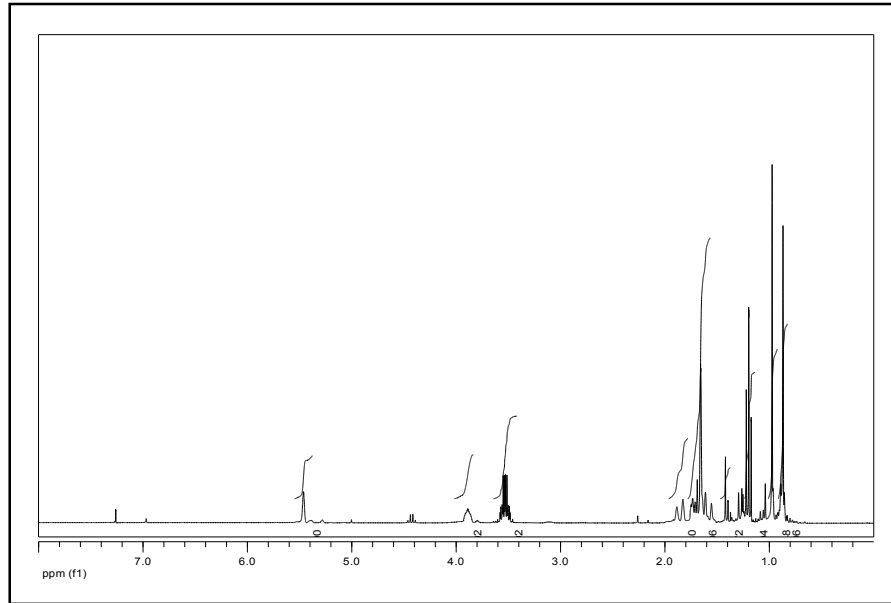
Substrat sentezi, aşağıdaki şekilde özetlendiği üzere iki adımda gerçekleştirildi. İlk adımda izoforon molekülü sodyum borhidrür ile metanol ve tetrahydrofuran içerisinde indirgenerek epimerik alkol karışımı elde edildi. Elde edilen epimerik karışım (2), literatürde ilk olan bir yöntem kullanılarak (Kıran *vd*, Yayınlanmamış sonuçlar) TCNE katalizörlüğünde etil alkol ile reaksiyonu sonucu saf etoksi izoforon (3) molekülüne %60–70 verimle dönüştürüldü. Dönüşümü gerçekleştirilen substratın (3) optik çevirme açısı ($[\alpha]_D^{20}$), $-3,2^\circ$ olarak ölçüldü.



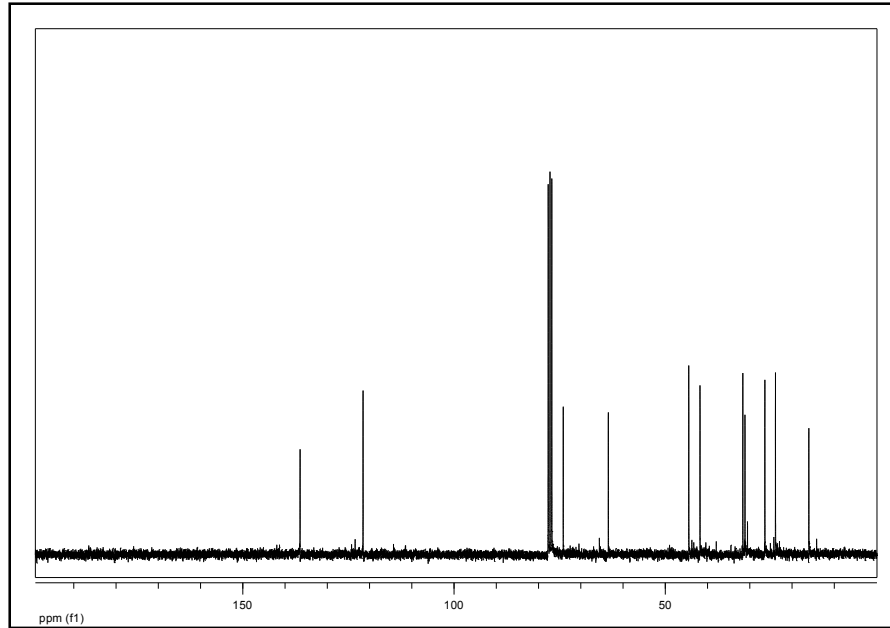
(i) MeOH, NaBH₄, THF, 0°C; (ii) EtOH, TCNE, 25°C

Şekil.3.1. Substrat sentezi

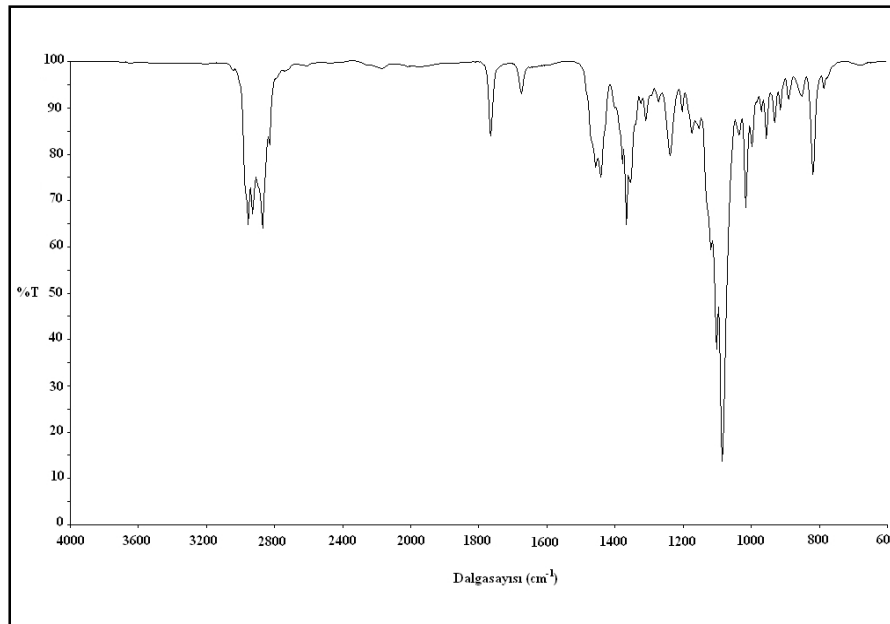
Moleküle ait ¹H ve ¹³C NMR spektrumları aşağıda sunuldu.



Şekil 3.2. 3 Nolu molekülün ¹H-NMR spektrumu



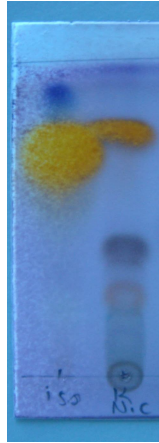
Şekil 3.3. 3 Nolu molekülün ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 3.4. 3 Nolu molekülün IR spektrumu

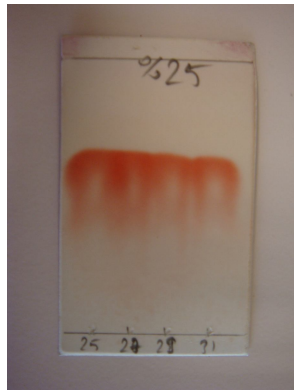
3.2. İzoforon'un *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonu

Yapılan İTK'da başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan iki yeni spot gözlemlendi. Karışım kolon kromatografisinde ayrıldı. Kolonda %10'luk etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak saflaştırılan ilk madde substrat molekülü olan izoforon oldu.

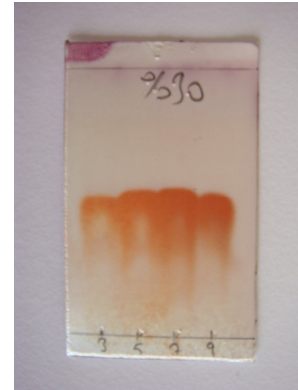


Şekil 3.5. İzoforon ile *N. crassa* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK

Kolonda % 25'lik etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak ilk metabolit (M_1) (164 mg) % 18 verimle saf olarak elde edildi. Kolondan %30'luk etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak ikinci metabolit (M_2) (121 mg) % 13 verimle saf olarak elde edildi.

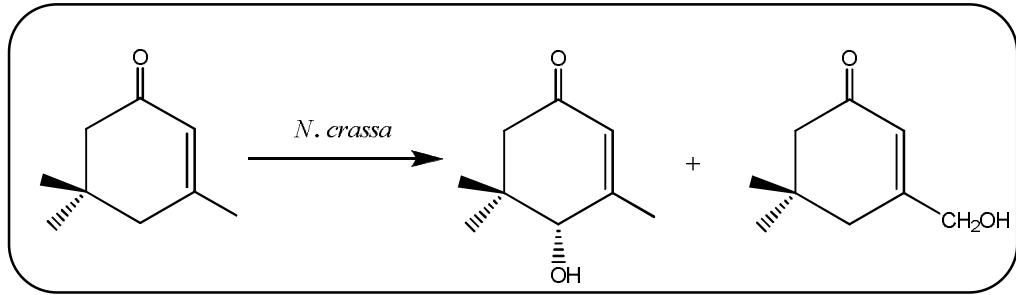


Şekil 3.6a. M_1 'in İTK plağı

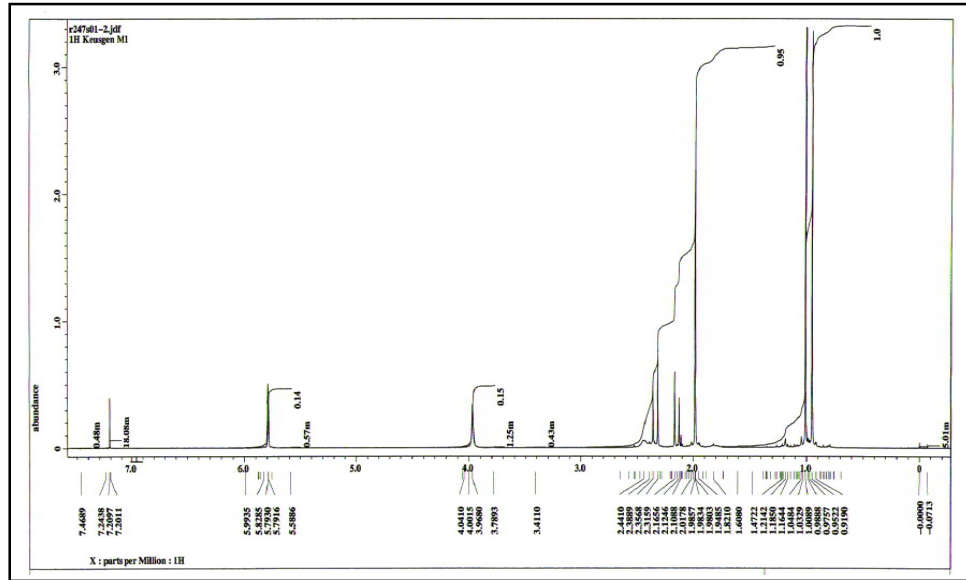


Şekil 3.6b. M_2 'nin İTK plağı

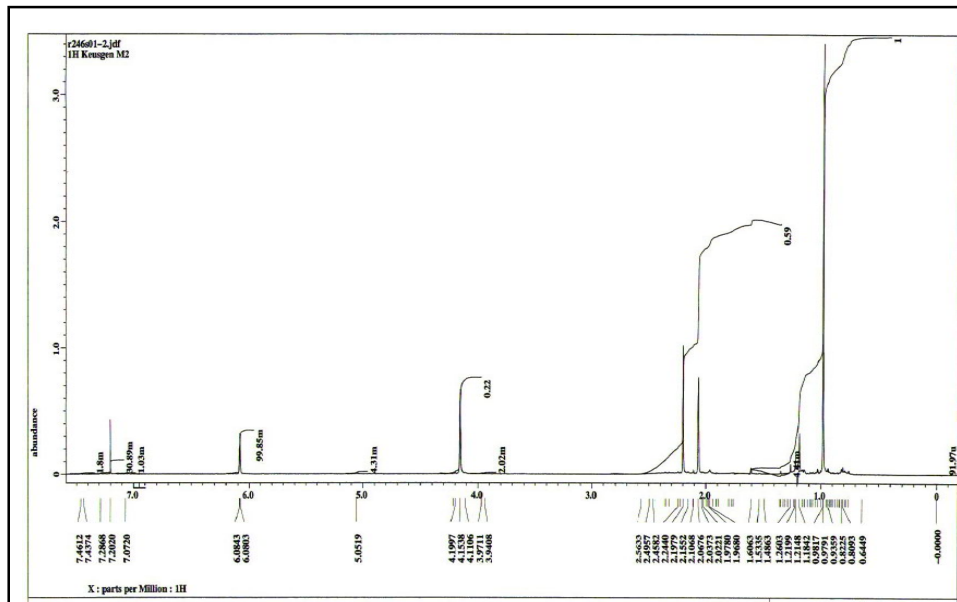
Elde edilen metabolitlere ait spektrumlar incelendiğinde, izoforonun 2 farklı monohidroksillenmiş türevleri olan 4α -hidroksi ve 7β -hidroksi izoforon moleküllerinin oluştuğu tespit edildi. Metabolitlerin yapısı, izoforon molekülünün *A. alternata* ile yapılan biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen metabolitler ile uyum gösterdi.



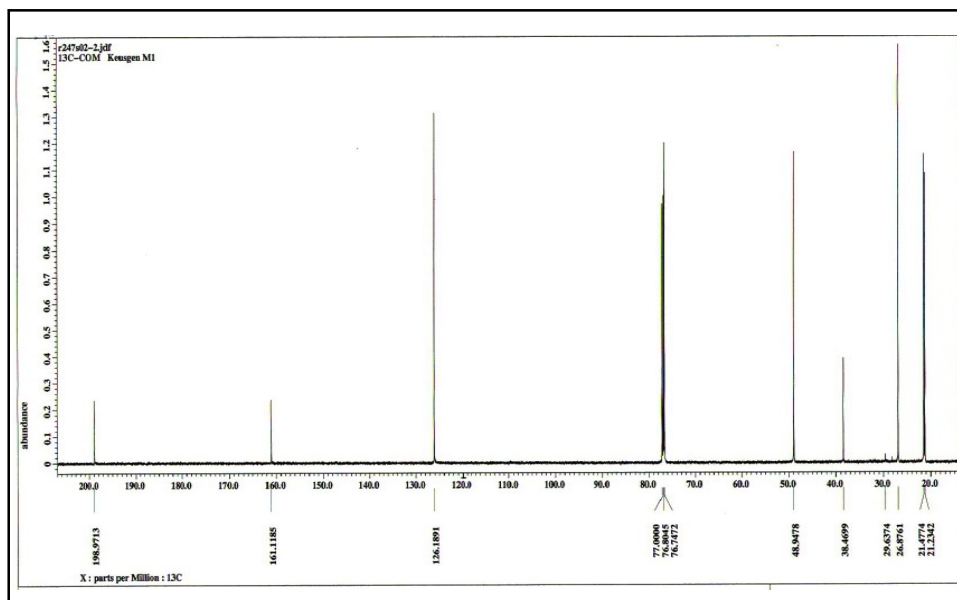
Şekil 3.7. İzoforon'un *N. crassa* ile biyotransformasyon reaksiyonu



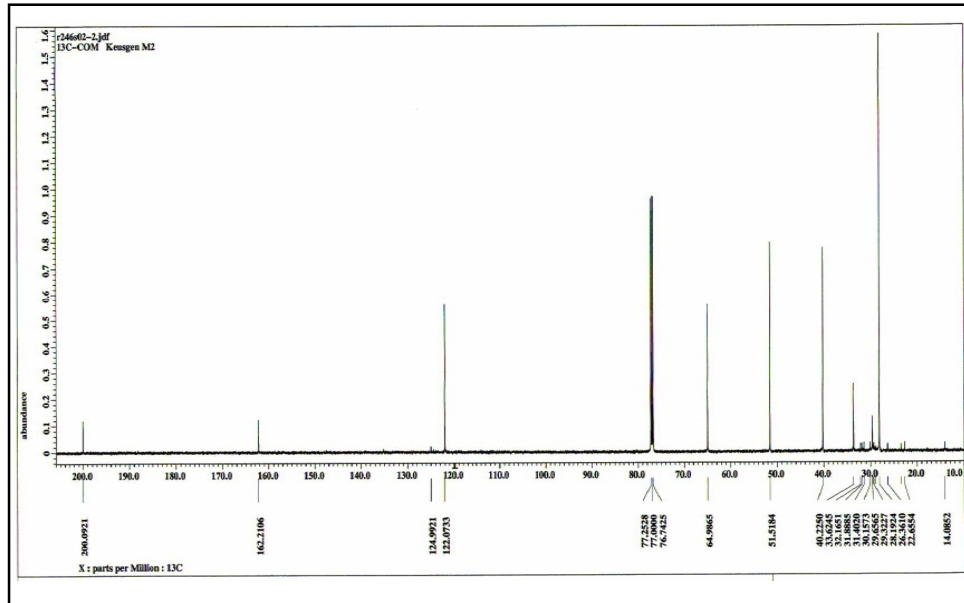
Şekil 3.8a. M₁'in ¹H NMR spektrumu



Şekil 3.8b. M_2 'nin ^1H NMR spektrumu



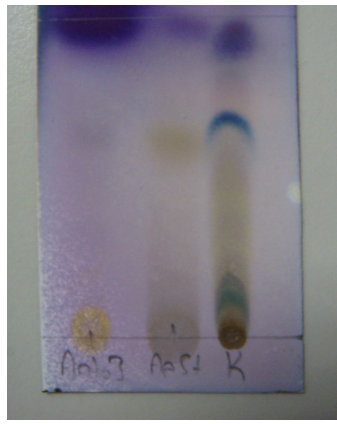
Şekil 3.9a. M_1 'in ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.9b. M₂'nin ¹³C-NMR spektrumu

3.3. Substratın (3) *Alternaria alternata* ile Biyotransformasyonu

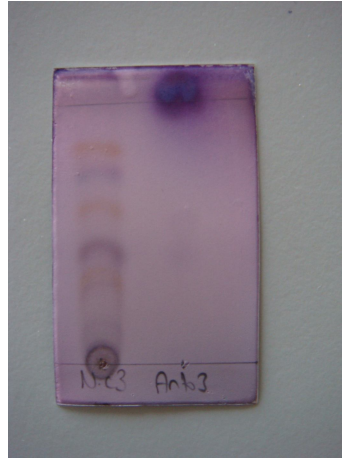
3 Nolu molekülünün *A. alternata* küfö ile gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu elde edilen karışımın İTK'sı aşağıdaki şekilde verilmiştir. Karışım kolon kromatografisine tabi tutularak metabolitler saflaştırmaya çalışılmasına rağmen saf olarak herhangi bir metabolit elde edilemedi.



şekil 3.10. 3 Nolu molekül ile *A. alternata* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK

3.4. Substratın (3) *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonu

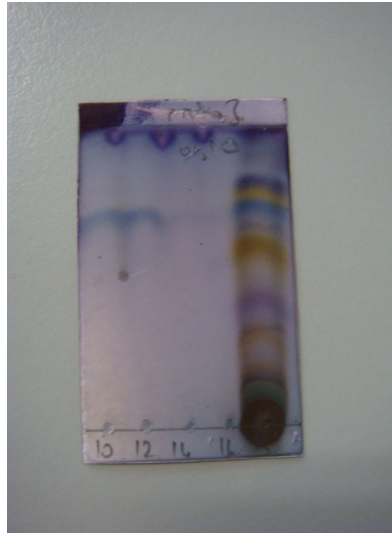
3 Nolu molekülünün *N. crassa* küfö ile gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu elde edilen karışımın İTK'sı aşağıdaki şekilde verilmiştir. Karışım kolon kromatografisine tabi tutularak metabolitler saflaştırmaya çalışılmış, kolonda % 25 ve 35'lik etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak saflaştırılan metabolitlerin NMR spektrumları alındığında, substrat molekülüne benzerlik göstermeyen spektrumlar elde edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve her denemede aynı sonuçla karşılaşıldı.



şekil 3.11. 3 Nolu molekül ile *N. crassa* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK

3.5. Substratın (3) *Fusarium culmorum* ile Biyotransformasyonu

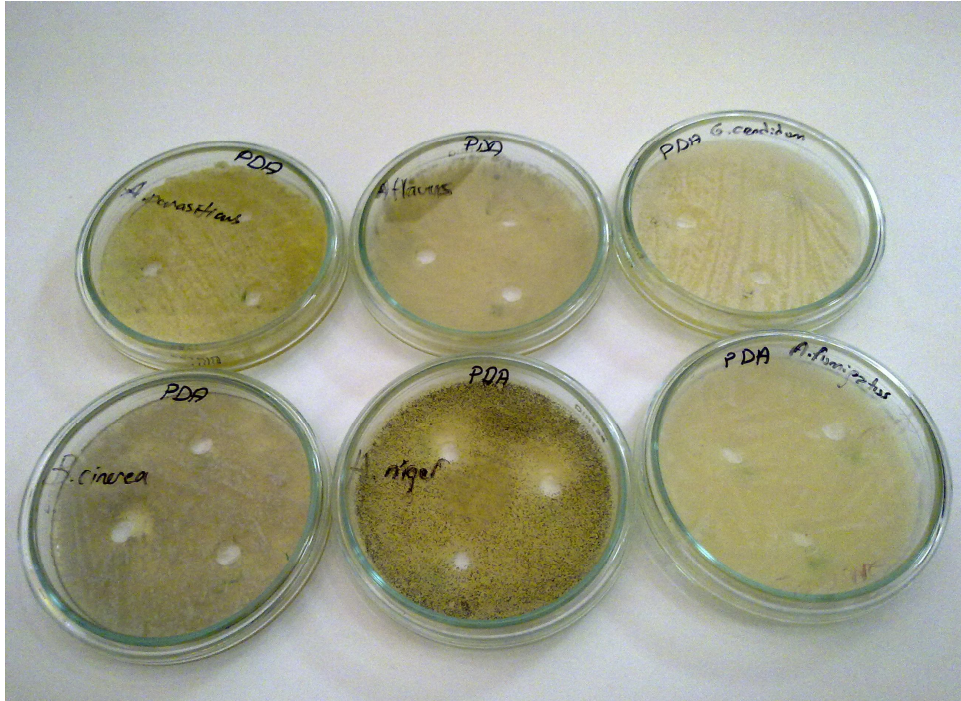
Substrat molekülünün *F. culmorum* küfö ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu sonucu elde edilen karışımın İTK plağı aşağıda verilmiştir. Karışımın kolon kromatografisi sonucu saf olarak herhangi bir metabolit elde edilemedi. Saflaştırma işlemi 3 kez tekrar edildi, fakat aynı sonuçla karşılaşıldı.



Şekil 3.12. Substrat ile *F. culmorum* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK

3.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Aktivite testleri sonucunda **3** nolu bileşiğin küflere karşı bir biyolojik etkisinin olduğu ancak bu etkinin zon oluşumu gerçekleştirecek kadar kuvvetli olmadığı sonucuna varıldı. Etken maddenin ilave edildiği kısımlarda mikroorganizma yoğunluğunda azalma gözlemlendi (Bkz. Şekil 3.13).

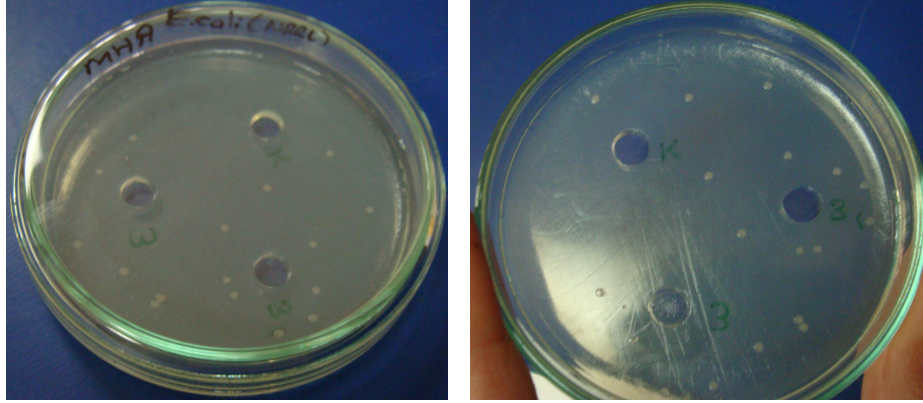


Şekil 3.13. 3 Nolu bileşiğin antifungal aktivite sonuçları

Şekil 3.13'den de görüldüğü gibi, **3** nolu bileşiğin oldukça zayıf antifungal etkisi olduğu saptanırken, net bir zon çapı oluşumu görülmedi. *A. niger* ve *B. cinerea* funguslarında yoğunluk azalması diğer petrilere nazaran daha iyi şekilde gözlemlendi.

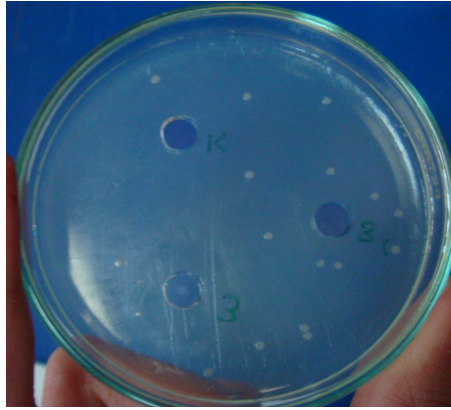
Bakteriler üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında zon oluşumu sadece *E. coli* bakterisine karşı gerçekleşti ve zon çapı 15 mm (**3**), zon oluşumunun

kontrolü için gerçekleştirilen paralelinin zon çapı 12 mm (3') olarak ölçüldü. Etken maddenin içerisinde çözöldüğü çözeltili karışımının (K) oluşturduğu herhangi bir zon çapı gözlenmedi (Bkz. Şekil 3.14).



(a)

(b)



(c)

Şekil 3.14. *E. coli* antibakteriyal aktivite sonuçları

İzoforon molekülünün mikrobiyal biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolitlerle yapılmış olan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında, her iki metabolitin de standart olarak kullanılan antibiyotiklere (penisilin, vankomisin, tetrasiklin) direnç

gösteren *A. baumannii*'ye karşı 24 (M₁) ile 19 (M₂) mm ve MRSA'ya karşı ise 20 (M₁) ile 18 (M₂) mm çapında inhibisyon zonları oluşturduğu ortaya kondu. Ayrıca M₁ metabolitinin *E. coli* bakterisine karşı 22 mm ve M₂ metabolitinin ise standart antibiyotiklere yakın inhibisyon zonları oluşturmaları dikkat çekti. Bu sonuç, izoforon analoglarının bazı bakterilere karşı potansiyel antibakteriyal ajan özelliği taşıdığını ortaya koymaktadır (Çelik, 2009).

Tablo 6. Metabolitlerin antimikrobiyal aktivite değerleri

Bakteriler	İzoforon	M ₁	M ₂	V	P	T
<i>A. baumannii</i>	17 mm	24 mm	19 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>E. coli</i>	9 mm	22 mm	12 mm	13 mm	30 mm	25 mm
MRSA	9 mm	20 mm	18 mm	15 mm	0 mm	7 mm
<i>B. subtilis</i>	0 mm	14 mm	10 mm	15,5 mm	13 mm	24 mm
<i>P. auriginosa</i>	9 mm	12 mm	9 mm	32 mm	25 mm	20 mm
<i>S. aureus</i>	0 mm	18 mm	8 mm	56,5 mm	35 mm	33 mm

V: Vankomisin (30 µg/disk); **P:** Penisilin (10 µg/disk); **T:** Tetrasiklin (10 µg/disk)

İzoforon: 18,5 mg/mL; **M₁:** 4,4 mg/mL; **M₂:** 6,0 mg/mL

3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Literatürdeki izoforon molekülünün biyotransformasyon reaksiyonu sonucu elde edilen metabolitlerin antibakteriyal etki gösterdiği bakterilere karşı yapılan MİK testlerinin sonuçları, aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çelik, 2009).

Tablo 7a. M₁ ve M₂ metabolitlerinin MİK değerleri

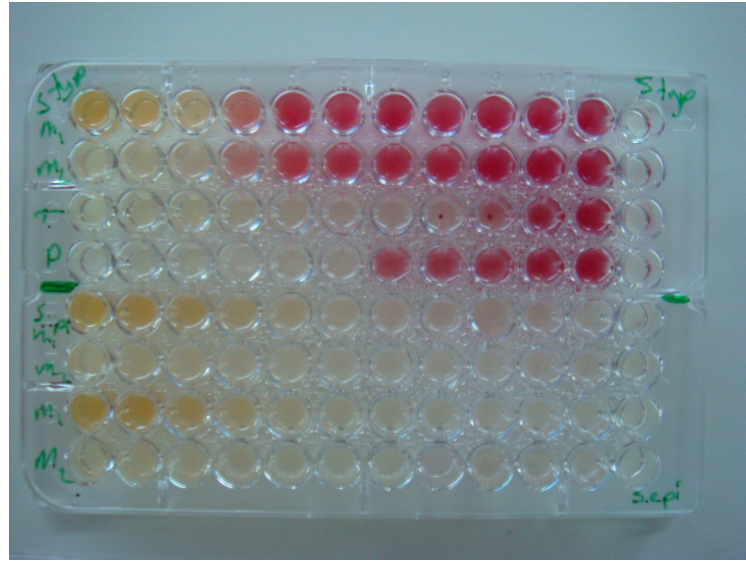
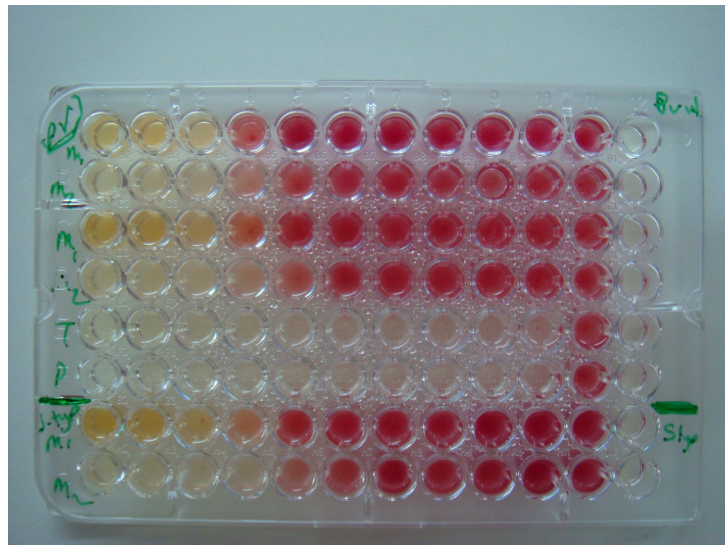
Bakteriler	M ₁ (µg/mL)	M ₂ (µg/mL)	Penisilin (µg/mL)	Tetrasiklin (µg/mL)
<i>A. baumannii</i>	0,0094	0,0105	375,0	375,0
<i>E. coli</i>	0,0374	0,0210	750,0	23,0
MRSA	0,0375	0,0210	750,0	188,0
<i>B. subtilis</i>	0,0187	0,0210	2,0	Yapılmadı
<i>P. auriginosa</i>	0,0374	0,0420	188,0	188,0
<i>S. aureus</i>	0,0374	0,0420	23,0	23,0

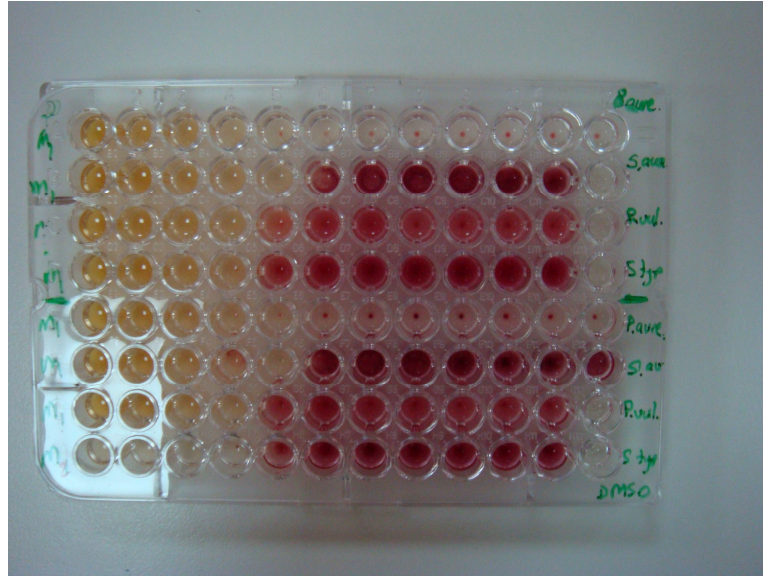
Tablodan da görüldüğü gibi, M₁'in *A. baumannii*, *B. subtilis*, *P. auriginosa* ve *S. aureus*'a karşı, M₂'nin ise *E. coli* ve MRSA'ya karşı daha düşük derişimlerde etki gösterdikleri saptandı. Elde edilen bu değerler, standart antibiyotiklerin MİK değerleri ile karşılaştırıldığında, M₁ ve M₂'nin türevlerinin özellikle *A. baumannii*'ye karşı potansiyel ilaç etken madde olabileceği sonucunu ortaya koymuştur (Çelik, 2009).

Yapılmış olan MİK çalışmasının devamı niteliğinde farklı derişimlerde ve farklı mikroorganizmalarla tekrar denemeler yapılmıştır. Bu çalışmalarda, M₁ maddesinin başlangıç derişimi 151 mg/mL, M₂ maddesinin başlangıç derişimi ise 176 mg/mL olarak alındı. Penisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin başlangıç derişimleri ise 1 mg/mL olarak alındı. Her iki antibiyotikte saf suda çözüldü.

Tablo 7b. M₁ ve M₂ metabolitlerinin MİK değerleri

<i>Bakteriler</i>	M ₁ ($\mu\text{g}\cdot 10^{-3}/\text{mL}$)	M ₂ ($\mu\text{g}\cdot 10^{-3}/\text{mL}$)	Penisilin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Tetrasiklin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>P. vulgaris</i>	0,472	0,55	< 0,488	< 0,488
<i>S. typhimirum</i>	0,472	0,55	< 0,488	< 0,488
<i>S. aureus</i>	0,236	0,275	< 0,488	< 0,488

**Şekil 3.15.** *S. typhimirum*'un M₁ ve M₂ metabolitlerinin MİK görüntüsü**Şekil 3.16.** *P. vulgaris*'in M₁ ve M₂ metabolitlerinin MİK görüntüsü



Şekil 3.17. *S. aureus*'un M₁ ve M₂ metabolitlerinin MİK görüntüsü

S. epidermidis ve *P. aeruginosa* bakterileri iyi üreme göstermediği için MİK sonuçları alınamadı. Tablo 7b'den de görülebileceği gibi metabolitler *S. aureus* bakterisine, *P. vulgaris* ve *S. typhimurum* bakterilerinden daha çok etki gösterdi. Elde edilen değerler, standart antibiyotiklerin MİK değerleri ile karşılaştırıldıklarında etkilerinin düşük olduğu görüldü.

3.8. Sonuç

İzoforon ve izoforondan elde edilen metabolitlerin antimikrobiyal aktivite sonuçları kıyaslandığında; hidroksi izoforon türevlerinin antimikrobiyal etkisinin izoforona göre daha fazla olduğu, fakat etoksi türevinin ise daha az olduğu gözlemlendi. Bu durum şöyle açıklanabilir; izoforon molekülünde polar yapıya sahip ve enzim substrat etkileşiminde önemli bir grup olan keton grubu bulunmaktadır. Yapıya bu grup dışında ikinci bir polar grup olan hidroksil grubu ilavesinde, bu gurupların molekülün çözünürlüğünü artırdığı ve mikroorganizmaların hücre oluşum mekanizmaları üzerinde etkili olan enzimlere etki ederek üremelerini önlemesi muhtemeldir. Keton grubunun indirgenerek etoksi formuna dönüştürülmesi, aktivitenin büyük oranda ortadan kalkmasına neden olmakta, buda izoforonda mevcut keton grubunun biyolojik aktivite için elzem olduğunu ve geliştirilecek türevlerde mutlaka korunması gerektiğini ortaya koymaktadır.

BÖLÜM - 4: KAYNAKLAR DİZİNİ

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akar, T., 2005, Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s.
- Akay, F., 2002, İnula Heterolepis Uçucu Yağının Kalitatif ve Kantitatif Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 172 s.
- Arnold, L., 2000, Small Bugs, Big Business: The Economic Power of The Microbe, *Biotechnology Advances*, 18, 499-514.
- Arnone, A., Bava, A., Alemani, S., Nasini, G., Bombardelli, E. and Fontana, G., 2006, Microbial Transformation of 10-deacetylbaocatin III (10-DAB) by *Curvularia lunata* and *Trametes hirsuta*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 95-98.
- Aktay, G., Hancı, İ.H. ve Balseven, A., 2003, İlaç Etkileşimleri ve Hekim Sorumluluğu, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 12, 7, 276 s.
- Büber, E. ve Açıan, N.L., 2004, Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Biyoaktif Peptitler, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 43-48.
- Carvalho, C.C.R. and Fonseca, M.M.R., 2006, Biotransformation of Terpenes, *Biotechnology Advanced*, 24, 2, 134-142.
- Clayden, J., Greever, N., Warnen, S. and Wothers, P., 2001, *Organic Chemistry*, First Edition, Oxford University Press, New York, 1413-1414.
- Cornwell, P.A., Barry, B.W., Bouwstra, J.A. and Gooris, G.S., 1996, Models of Action of Terpene Penetration Enhancers in Human Skin; Differential Scanning Calorimetry, Small-angle X-ray Diffraction and Enhancer Uptake Studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 127, 1, 9-26.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çelik, T., 2009, İzoforon'un *Alternaria alternata* ile Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 58 s.
- Çolak, F., 2006, Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen Endosporlu Basillerin Antimikrobiyal Aktivite Açısından Taranarak Metabolitlerin Safılaştırılması, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 138 s.
- Demirci, F., Berber, H. ve İşcan, G., 2008, Biyokatalizörler Yardımıyla ρ -Simen'den Timokinon ve Benzeri Biyoaktif Metabolitlerin Üretimi, 106T117 Nolu Tübitak Projesi, Eskişehir.
- De-Oliveria, A.C.A.X., Ribeiro-Pinto, L.F. and Paumgarten, F.J.R., 1997, In Vitro Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by β -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds, Toxicology Letters, 92, 1, 39-46.
- Desjardins, A.E., McCormick, S.P. and Corsini, D.L., 1995, Diversity of Sesquiterpenes in 46 Potato Cultivars and Breeding Selections, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2267-2272.
- Durceylan, Z., 2007, Karyofillen oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 47 s.
- Edris, A.E., 2007, Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A review, Phytotherapy Research, 21, 4, 308-323.
- Faramarzi, M.A., Aghelnejad, M., Yazdi, M.T., Amini, M. and Hajarolasvadi N., 2008, Metabolism of Androst-4-en-3,17-dione by The Filamentous Fungus *Neurospora crassa*, Steroids, 73, 1, 13-18.
- Faramarzi, M.A., Hajarolasvadi, N., Yazdi, M.T., Amini, M. and Aghelnejad, M., 2007, Microbiological Hydroxylation of Androst-4-en-3,17-dione by *Neurospora crassa*, Biocatalysis and Biotransformation, 25, 1, 72-78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Furusawa, M., Hashimoto, T., Noma, Y. and Asakawa, Y., 2005, Biotransformation of Citrus Aromatics Nootkatone and Valencene by Microorganisms, Chemical Pharmaceutical Bulletin, 53, 11, 1423-1429.
- García-Granados, A., Martínez, A., Parra, A. and Rivas F., 2007, Manoyl-Oxide Biotransformations with Filamentous Fungi, Current Organic Chemistry, 11, 679-692.
- Ghousari, H., Benajiba, M-H., García-Granados, A., Fernández, A., Martínez, A., Rivas, F. and Arias, J.M., 2006, Biotransformations of Ent-18-acetoxy-6-ketomanoyl Oxides Epimers At C-13 with Filamentous Fungi, Phytochemistry, 67, 2294-2302.
- Gliszczynska, A. and Wawrzeńczyk, C., 2008, Oxidative Biotransformation of Farnesol and 10,11-Epoxyfarnesol by Fungal Strains, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 52-53, 40-48.
- Grayer, R.J. and Harborne, J.J., 1994, A survey of Antifungal Compounds From Higher Plants 1982-1993, Phytochemistry, 37, 1, 19-42.
- Hanson, J.R., 2003, Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 135 p.
- Hassan, R.A. and Radwan, H.M., 2010, The Lipids and Volatile Oil Constituents of *Leucaena glauca* (L.) Benth. Growing in Egypt and Their Biological Activity, Journal of Applied Sciences Research, 6, 5, 478-482.
- Hernandez, X.E., Kurina Sanz, M.B. and Giordano, O.S., 1997, Production of 6 β -hydroxygrindelic Acid from Grindelic Acid by *Alternaria alternata*, Biotechnology Letters, 19, 12, 1223-1225.
- İşcan, G., 2009, Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 83 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jirovetz, L., Buchbauer, G. and Eller, G., 2007, Composition and Antimicrobial Activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiovenda Essential Flower, Leaf and Stem Oils From Cameroon, *Journal of Essential Oil Research*, 19, 485-489.
- Joy, B., Rejan, A. and Abraham, E., 2007, Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essetial Oil From *Hedychium coronarium*, *Phytotherapy Research*, 21, 5, 439-443.
- Juniur, M.R.M., Rocha e Silva, T.A.A., Franchi, G.C., Nowill, A., Pastore, G.M. and Hyslop, S., 2009, Antioxidant Potential of Aroma Compounds Obtained by Limonene Biotransformations of Orange Essential Oil, *Food Chemistry*, 116, 1, 8-12.
- Karabacak, Ç., 2007, Bazı *Scutellaria orientalis* Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 95 s.
- Kayaalp, O.S., 2002, Farmakolojiye Giriş, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 464 s.
- Keskin, Y.S., 2010, Bazı Terpenlerin Biotransformasyonunun İncelenmesi, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 113 s.
- Keskin, Y.S. ve Yıldırım, K., 2010, *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ve *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile β -iyonon Bileşiğinin Biotransformasyonu, S.A.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 14, 1, 20-24.
- Kieslich, K., 1976, Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds, George Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 9-83.
- Kiran, I., Akar, T., Görgülü, A. and Kazaz, C., 2005, Biotransformation of Racemic Diisophorone by *Cephalosporium aphidicola* and *Neurospora crassa*, *Biotechnology Letters*, 27, 1007-1010.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kiran, I., Durceylan, Z., Kirimer, N., Başer, K.H.C., Noma, Y. and Demirci, F., 2010, Biotransformation of α -Cedrol and Caryophyllene Oxide by The Fungus *Neurospora crassa*, Natural Product Communications, 5, 4, 515-518.
- Kiran, I., Uyanık, C., Yıldırım, K., Özşen, Ö., Kaya, N., Tikna, T. ve Eser, A., Etoksi ve Metoksi Türevlerinin TCNE Katalizörlüğünde Sentezi, (yayımlanmamış).
- Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J. and Aoki T., 2002, Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity From *Chenopodium ambrosioides*, Journal of Natural Products, 65, 509–512.
- Kołek, T. and Świzdor, A., 1998, Biotransformation XLV. Transformations of 4-Ene-3-oxo Steroids in *Fusarium culmorum* Culture, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 67, 1, 63-69.
- Kołek, T., 1999, Biotransformation XLVII: Transformations of 5-ene Steroids in *Fusarium culmorum* Culture, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 71, 1, 83-90.
- Kurbanoğlu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoğlu, N.I. and Kılıç, H., 2007, Asymmetric Reduction of Acetophenone Analogues by *Alternaria alternata* Using Ram Horn Peptone, Tetrahedron: Asymetry, 18, 19, 2332-2335.
- Loughlin, W.A., 2000, Biotransformations in Organic Synthesis, Bioresource Technology, 74, 1, 49-62.
- Mann, J., 1994, Chemical Aspects of Biosynthesis, 1st Edition, Oxford University Press, New York, 96 p.
- Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs J.B., Bandhorpe, D.V. and Harborne, J.B., 1994, Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance, Longman Scientific and Technical Harlow, United Kingdom, 464 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matos, J.M., Schmidt C.M., Thomas, H.J., Cummings, O.W., Wiebke, E.A., Madura, J.A., Patrick, L.J. and Crowell, P.L., 2008, A Pilot Study of Perillyl Alcohol in Pancreatic Cancer, *Journal of Surgical Research*, 147, 2, 194-199.
- Mikami, Y., Fukunaka, Y., Arita, M., Obi, Y. and Kisaki, T., 1981, Preparation of Aroma Compounds by Microbial Transformation of Isophorone with *Apergillus niger*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 3, 791-793.
- Noma, Y., Hashimoto, T. and Asakawa, Y., 2001, Microbial Transformation of Adamantane, *Proceeding of the 45th TEAC*, 96-98.
- Olagnier, D., Costes, P., Berry, A., Linas, M-D., Urrutigoity, M., Dechy-Cabaret, O. and Benoit-Vical, F., 2007, Modifications of The Chemical Structure of Terpenes in Antiplasmodial and Antifungal Drug Research, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 22, 6075-6078.
- Oskay, D. and Oskay, M., 2009, Biotechnological Importance of Plant Secondary Metabolites, *E-Journal of New World Sciences Academy*, 4, 2, 31-41.
- Park, E-J., Kim, S-H., Kim, B-J., Kim, S-Y., So, I. and Jeon, J-H., 2009, Menthol Enhances an Antiproliferative Activity of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ in LNCaP Cells, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44, 125-130.
- Peana, A.T., D'Akuila, P.S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P. and Moretti, M.D.L., 2002, Anti-inflammatory Activity of Linalool and Linalyl Acetate Constituents of Essential Oils, *Phytomedicine*, 9, 8, 721-726.
- Prusky, D., Wattad, C. and Kobiler, D., 1996, Effect of Ethylene on The Activation of Quiescent Infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in Avocado Fruits, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 864- 868.
- Roman, P., Kandefler-Szerszen M., Trytek, M. and Fiedurek, J., 2007, Terpenes: Substances Useful in Human Healthcare, *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 55, 315-327.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rosche, B., Sandford, V., Breuer, M., Hauer, B. and Rogers, P., 2001, Biotransformation of Benzaldehyde into (R)-Phenylacetylcarbinol by Filamentous Fungi or Their Extracts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 309-315.
- Schamedda-Hirschmann, G., Astudillo, L. and Palenzuela, J.A., 2004, Biotransformation of Solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 93-97.
- Telefoncu, A., 2010, *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1-605.
- Torrance, S.J. and Steelink, C., 1974, New Monoterpenes From *Artemisia-Filifolia* (Torrey)-Structure, Synthesis, Rearrangements and Biosynthesis, *Journal of Organic Chemistry*, 39, 8, 1068-1074.
- Tübitak, 2004, *Biyoteknoloji ve Gen Teknolojileri Stratejisi: Vizyon 2023 Projesi*, Ankara.
- Umay, A., 2007, *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 45 s.
- Üresin, Y., 2006, *Klinik Araştırmalar*, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 25-32.
- Van Der Werf, M., Keijzer, P.M. and Van Der Schaft, H., 2000, *Xanthobacter sp. C20* Contains a Novel Bioconversion Pathway For Limonene, *Journal of Biotechnology*, 84, 133-143.
- Vandamme, E.J. and Soetaert W., 2002, Bioflavours and Fragrances via Fermentation and Biocatalysis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 1323-1332.
- Ye, M. and Guo, D., 2008, A New Bufadienolide Obtained From The Biotransformation of Cinobufagin by *Alternaria alternata*, *Natural Product Research*, 22, 1, 26-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ye, M. and Guo, D., 2005, Substrate Specificity For The 12 β -Hydroxylation of Bufadienolides by *Alternaria alternata*, Journal of Biotechnology, 117, 253-262.
- Ye, M., Qu, G., Guo, H. and Guo, D., 2004, Specific 12 β -Hydroxylation of Cinobufagin by Filamentous Fungi, Applied And Environmental Microbiology, 70, 6, 3521-3527.
- Xanthakis, E., Magkouta, S., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C. and Kolisis, F.N., 2009, Enzymatic Synthesis of Perillyl Alcohol Derivatives and Investigations of Their Antiproliferative Activity, Biocatalysis and Biotransformations, 27, 3, 1-9.
- Xin, X-L., Zhan, L-B., Li, F-Y., Ma, X-C., Liu, K-X., Han, J. and Guo, D-A., 2009, Microbial Transformation of Bufatolin by *Alternaria alternata* AS 3.4578, Journal of Asian Natural Products Research, 11, 1, 7-11.
- Watt, E.E., Betts, B.A., Kotey, F.O., Humbert, D.J., Griffith, T.N., Kelly, E.W., Veneskey, K.C., Gill, N., Rowan, K.C., Jenkins, A. and Hall, A.C., 2008, Menthol Shares General Anesthetic Activity and Sites of Action on The GABA_A Receptor With The Intravenous Agent, Propofol, European Journal of Pharmacology, 590, 1-3, 120-126.
- Zhang, J., Zhang, L., Wang, X., Qiu, D., Sun, D., Gu, J. and Fang, Q., 1998, Microbial Transformation of 10-Deacetyl-7-epitaxol and 1 β -Hydroxybaccatin I by Fungi from The Inner Bark of *Taxus yunnanensis*, Journal of Natural Products, 61, 497-500.
- Zhao, X., Wang, J., Li, J., Fu, L., Gao, J., Du, X., Bi, H., Zhou, Y. and Tai, G., 2009, Highly Selective Biotransformation of Ginsenoside Rb₁ to Rd by The Phytopathogenic Fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*), Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36, 5, 721-726.

<http://medplant.nmsu.edu/artfil.shtml>

www.kultur.k12.tr/biyosemp/pdf/03__biyoteknoloji_2007.pdf