

**İzoforon' un *Alternaria alternata* İle
Biyotransformasyonu Ve Biyolojik Etkileri**

Turgay Çelik

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Haziran 2009

**Biotransformation Of Isophorone By *Alternaria alternata*
And Biological Activities**

Turgay Çelik

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

June 2009

**İzoforon' Un *Alternaria alternata* İle Biyotransformasyonu
Ve Biyolojik Etkileri**

Turgay Çelik

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

Danışman: Doç. Dr. İsmail Kıran

Haziran 2009

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Turgay ÇELİK'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “İzoforon’un *Alternaria alternata* ile Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. İsmail KIRAN

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç Dr. İsmail KIRAN

Üye : Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ

Üye : Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cansu Filik İŞCEN

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmamızda bir monoterpen olan izoforon molekülünün *Alternaria alternata* fungal kültürü ile biyotransformasyonu ve oluşan metabolitlerin antimikrobiyal etkisi incelendi.

İzoforon'un *Alternaria alternata* ile biyotransformasyon sonucu iki farklı mono hidroksillenmiş metabolit ürettiği ince tabaka kromatografisi yardımıyla tespit edildi. Metabolitler kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırıldı ve yapıları spektroskopik yöntemler (GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC ve HMBC) kullanılarak (S)-4-hidroksi-3,5,5-trimetil-2-siklohegzen-1-on ve 3-hidroksimetil-5,5-dimetil-2-siklohegzen-1-on olarak tanımlandı.

Elde edilen metabolitlerin disk difüzyon metodu kullanılarak antimikrobiyal incelemeleri sonucu *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *MRSA* (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*) ve *Bacillus subtilis* mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal etki gösterdiği tespit edildi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri sırasıyla M₁ metaboliti için 9,4; 37,4; 37,5 ve 18,7 mg/ml, M₂ metaboliti için 10,5; 21,0; 21,0 ve 21,0 mg/ml olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Alternaria alternata*, biyolojik aktivite, biyoteknoloji, biyotransformasyon, izoforon

SUMMARY

The aim was to investigate microbial transformation of the monoterpene, isophorone, using the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and determine the antimicrobial activities of the metabolites.

Biotransformation of isophorone with *Alternaria alternata* yielded two mono hydroxylated derivatives as detected by thin layer chromatography. The metabolites were purified by silica gel column chromatography and their structures were identified as (S)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and 3-hydroxymethyl-5,5-dimethyl-2-cyclohexen-1-one on the basis of GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC and HMBC spectra.

Antimicrobial tests using disc diffusion methods indicated that M₁ and M₂ showed good antibacterial activities against *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *MRSA* (methicilline resistant *Staphylococcus aureus*) and *Bacillus subtilis*. The Minimum Inhibition Concentrations were calculated as 9,4; 37,4; 37,5 ve 18,7 mg/ml for M₁ and 10,5; 21,0; 21,0 ve 21,0 mg/ml for M₂, respectively.

Keywords: *Alternaria alternata*, biological activity, biotechnology, biotransformation, isophorone.

TEŞEKKÜR

“İzoforon’un *Alternaria alternata* ile biyotransformasyonu ve biyolojik etkileri” konulu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Doç. Dr. İsmail KIRAN danışmanlığında yürütülmüştür.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonunca desteklenen 200919015 nolu proje altyapısından yararlanılmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu sabır ve desteklerinden dolayı danışmanım Sayın Doç. Dr. İsmail KIRAN’ a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ’ye,

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarına katkıda bulunan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Semra İLHAN’a,

Çalışmalarım sırasında teorik ve pratik konularda desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Emil CİVİŞOV’a, Araş. Gör. Gökalp İŞCAN’a, Biyolog Gamze ÇAYIRDERE’ye ve Özge ÖZŞEN’e,

Spektroskopik analiz çalışmalarının gerçekleşmesinde yardımcı bulunan Almanya-Marburg Üniversitesi’nden Prof. Dr. Michael Keusgen’a,

Son olarak manevi desteklerinden ötürü değerli arkadaşlarım Levent ÇELİK ve Mandy BRYTUS’a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Turgay ÇELİK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KAPAK	i
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
SPEKTRUM DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
BÖLÜM-1: GİRİŞ ve AMAÇ	
1.1. Giriş ve Amaç	2
1.2. Monoterpenler	3
1.3. Monoterpenlerin Önemi ve Kullanım Alanları	3
1.4. Monoterpenlerin Biyolojik Aktiviteleri	5
1.5. Endüstriyel Öneme Sahip Monoterpenler	5
1.5.1. Linalool	5
1.5.2. Geraniol	6
1.5.3. Karvakrol	7
1.5.4. Timol	8
1.5.5. Limonen	9
1.5.6. Karvon	11
1.5.7. Mentol	12
1.6. Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon)	14
1.7. <i>Alternaria alternata</i> ile Mikrobiyal Transformasyonlar	16

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

BÖLÜM-2: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Genel Deneysel Bilgiler	21
2.2. Biyotransformasyon Çalışmaları	21
2.2.1. Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması	21
2.2.2. <i>Alternaria alternata</i> 'nın Üretimi İçin Kullanılan Sıvı Besiyeri Bileşenleri	21
2.2.3. Mikroorganizmanın Hazırlanması	22
2.2.4. Substrat Hazırlanması	22
2.2.5. Metabolitlerin Ekstraksiyonu	23
2.2.6. Metabolitlerin İzolasyonu	23
2.2.7. Metabolitlerin Tanımlanması	23
2.2.8. İzoforon'un <i>A. alternata</i> ile Biyotransformasyonu.....	23
2.3. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	27
2.3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	27
2.3.2. Agar Difüzyon Yöntemi	27
2.3.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK)' nun Belirlenmesi	28

BÖLÜM-3: SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. İzoforon Molekülünün <i>A. alternata</i> İle Biyotransformasyonu	30
3.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	34
3.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK)' nun Belirlenmesi	35

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ..... 38

BÖLÜM-5: SPEKTRUMLAR DİZİNİ 48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Linalool enantiyomerleri	6
1.2 Geraniol'ün yapısı	7
1.3 Karvakrol molekülü	8
1.4 Timol molekülü	9
1.5 Limonen molekülü enantiyomerleri	11
1.6 Karvon molekülü enantiyomerleri	12
1.7 Mentol'ün enantiyomer yapıları	13
1.8 Solidagenon molekülünün <i>A. alternata</i> ile biyotransformasyonu	17
1.9 Sinobufagin molekülünün <i>A. alternata</i> ile biyotransformasyonu	17
1.10 10-DAB molekülünün <i>A. alternata</i> ile biyotransformasyonu	18
1.11 Asetofenon molekülünün <i>A. alternata</i> ile biyotransformasyonu	18
2.1 İzoforon ile <i>A. alternata</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK.....	24
3.1 İzoforon ile <i>A. alternata</i> biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK	30
3.2 M ₁ 'in İTK' sı	30
3.3 M ₂ 'nin İTK' sı.....	30
3.4 M ₁ 'in HMBC korelasyonu	31
3.5 M ₂ 'in HMBC korelasyonu	33
3.6 İzoforon'un <i>A.alternata</i> ile biyotransformasyon reaksiyonu	33
3.7 <i>A. baumannii</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	36
3.8 <i>P. auriginosa</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	36
3.9 <i>E. coli</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	36
3.10 <i>B. subtilis</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	37
3.11 <i>MRSA</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	37
3.12 <i>S. aureus</i> antibakteriyal aktivite sonuçları	37

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	Bileşiklerin (İzoforon, M ₁ ve M ₂) ¹³ C NMR spektroskopisine ait veriler	26
3.1	Metabolitlerin antibakteriyal aktivite değerleri	34
3.2	M ₁ ve M ₂ metabolitlerin MIK değerleri (mg/mL)	35

SPEKTRUM DİZİNİ

<u>Spektrum</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 İzoforon'un ^1H -NMR spektrumu	49
5.2 İzoforon'un ^{13}C -NMR spektrumu	50
5.3 M_1 'in kütle spektrumu	51
5.4 M_1 'in ^1H -NMR spektrumu	52
5.5 M_1 'in ^{13}C -NMR spektrumu	53
5.6 M_1 'in HMBC spektrumu	54
5.7 M_2 'in kütle spektrumu	55
5.8 M_2 'in ^1H -NMR spektrumu	56
5.9 M_2 'in ^{13}C -NMR spektrumu	57
5.10 M_2 'in HMBC spektrumu	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
⁰ C	: Santigrad derece
ml	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ppb	: Bir litre çözeltildeki çözünen maddenin mikrogram cinsinden değeri
µl	: Mikrolitre
¹ H-NMR	: Hidrojen nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
¹³ C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HMBC	: Uzun mesafe proton ve karbon etkileşimlerinin korrelasyonu
HSQC	: İki boyutlu heteronükleer korrelasyon spektroskopisi
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
br.s	: Geniş tekli pik
CDCl ₃	: Dötoro kloroform
d	: İkili pik
DMSO	: Dimetil sülfoksit
IR	: İnfrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
MHA	: Mueller hinton agar
MHB	: Müler hinton broth
MHz	: Megahertz
MIK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SGA	: Sabouraud %4 Glukoz Agar
TTC	: Trifenil tetrazolyum klorit

BÖLÜM – 1: GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal kaynaklı bileşikler arasında yer alan monoterpenler, endüstriyel uygulamaları ve farmasötik potansiyellerinden dolayı büyük ticari öneme sahiptirler. İlaç sanayinde bu bileşikler doğrudan ilaç etken maddesi veya yarı sentezle değiştirilerek daha etkili ve daha az toksik moleküller haline dönüştürülmek suretiyle kullanılabilirler. Ayrıca, model bileşik veya sentez başlangıç maddesi olarak da kullanılabilirler. Monoterpenler doğada yaygın olarak bulunmakta, fakat saflaştırıldıklarında elde edilen verim her zaman istenilen düzeyde olamamaktadır. Bu sorun, günümüzde biyoteknolojik yöntemler kullanılarak ve organik sentez kimyası ile büyük oranda aşılabilmektedir (Graham, 1995; Tübitak, 2004).

Artemisia filifolia, yapısında ana bileşen olarak (-)-kafur, 1,8-sineol (eucalyptol) ve izoforon gibi monoterpenleri içeren bir bitkidir. Yapılan biyolojik testler sonucunda, (-)-kafur ve 1,8-sineol bileşiklerinin kansere karşı koruyucu etki, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite başta olmak üzere birçok biyolojik etki gösterdiği belirtilmiştir (Torrance and Steelink, 1974; <http://medplant.nmsu.edu/artfil.shtml>). Bu bileşiklere yapısal benzerlik gösteren ve ana bileşenlerden biri olan izoforon ile ilgili ise, herhangi bir biyolojik etki çalışması yapılmamıştır.

Gıda ve ilaç hammaddesi olarak yaygın kullanıma sahip monoterpenlerin biyotransformasyonları ile yeni potansiyel enantiomerik seçicilikte, saf koku ve tat moleküllerinin ve ilaç aday moleküllerinin üretilmesi, son yıllarda büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir. Bu çalışmada, bir monoterpen olan izoforon molekülünün *Alternaria alternata* küfü ile mikrobiyal transformasyon ile analoglarının eldesi ve biyolojik etkilerinin (antibakteriyel) incelenmesi hedeflenmiştir.

1.2. MONOTERPENLER

Monoterpenler iki izopren ünitesinden oluşan 10 karbonlu bileşiklerdir. İzopren türevleri genelde uçucu yağ ve oleozinlerin karakteristik bileşenleridir. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin salgı sistemlerinde depolanırlar. Diğer bitkilerde ise minör metabolitler olarak bulunurlar. Doğadaki tüm canlılar, genellikle çeşitli izopren türevlerini sekonder metabolit olarak sentezlemektedirler. Mevalonat yoluyla sentezlendiği düşünülen izopren moleküllerinin, prokaryotik organizmalar tarafından deoksiksiloz-5-fosfat yoluyla sentezlendikleri belirtilmiştir Günümüzde yapısı tayin edilmiş yaklaşık 40 bin terpen ve 740 kadar monoterpen bilinmektedir (McCaskill and Croteau, 1998; Lange and Croteau, 1999; Withers and Keasling, 2007).

Monoterpenler genel olarak yapılarına göre 5 ana grupta toplanırlar. Bunlar;

- Halkalı yapıda olmayan (Asiklik) monoterpenler
- Tek halkalı (Monosiklik) monoterpenler
- Çift halkalı (Bisiklik) monoterpenler
- Üç halkalı (Trisiklik) monoterpenler
- Diğer yapılara sahip monoterpenler

Monoterpenlerin ilk etapta bitkiler tarafından yedek karbon kaynağı olarak sentezlendikleri düşünülmüştür. Fakat yapılan son araştırmalar, bu bileşiklerin bitkiler tarafından bir savunma ve çoğalma aracı olarak kullandıklarını ortaya koymuştur (Carvalho and Fonseca, 2006).

1.3. MONOTERPENLERİN ÖNEMİ VE KULLANIM ALANLARI

Terpenoitler, petrokimya sanayinin gelişmesine kadar olan sürede, birçok kimyasal maddelerin türetilmesinde kullanılmıştır. Ticari olarak koku ve tat maddeleri, parfüm hammaddeleri olarak kullanımları yanında eczacılık teknolojisinde ilâçların

kötü koku ve tatlarını örtmek için de kullanılmaktadır. Tıbbi özelliklerinden dolayı da kullanımları bilinmektedir. Bu konu ile ilgili daha ayrıntılı bilgi bir sonraki bölümde verilmektedir.

Monoterpenler; hidrofobik yapıda, polimerleşme ve otooksidasyona yatkın maddeler olup, gıda ve kozmetik sanayinde de yaygın olarak kullanılan genelde doğal moleküllerdir. Sahip oldukları doğal tat ve koku özelliklerinden dolayı, yeni tat ve kokulu moleküllerin sentezlenmesinde de başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadırlar. En çok kullanılanları, bol miktarda ve ucuz olarak kolaylıkla bulunabilen asiklik (özellikle: geraniol, nerol, linalool ve esterleri), monosiklik (*L*-mentol, (-)-karvon, α -terpineol ve esterleri) ve bisiklik (pinen, kâfur, borneol) monoterpenlerdir (Bauer *et. al.*, 1997; Teisseire *et. al.*, 1994; Pybus *et. al.*, 1999). Ayrıca, monoterpenler (pulegon, karvon, α -terpineol, vb.) birçok biyoaktif ve doğal maddenin tam sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. Örneğin timol, koku ve gıda sanayinde çok önemli bir yere sahip olan mentol üretiminde başlangıç maddesi olup, katalitik hidrojenasyon sonucu mentol enantiyomerleri elde edilmektedir (Pybus *et. al.*, 1999).

Monoterpenler, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi gibi temel fonksiyonlarında rol almadıkları düşünüldüğü için sekonder metabolit sınıfına sokulmuştur. Ancak son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar, monoterpenlerin bitkilerin kimyasal ekolojilerinde patojenlere karşı savunma, polinasyon için böcek çekici (feromon) ve allelopatik madde (örneğin yarışmalı fitotoksin) gibi fonksiyonlara sahip olduklarını göstermiştir. İnsektisit (piretrinler), pestisit (bornil asetat), böcek kovucu (sitronellol, pulegon) özelliklerinden dolayı zirai mücadelede etkin olarak kullanılmaktadırlar (Croteau *et. al.*, 1992; Mann *et. al.*, 1994; Tavera, 1999; Samuelsson, 1999).

Günümüzde çoğu monoterpen sentetik olarak üretilebildiği gibi rektifikasyon işlemi ile uçucu yağdan ayrılabilirler. Bu şekilde monoterpenler kolay ve ucuz maliyetlerde elde edilebilir. Buna iyi bir örnek olarak, α -pinen ve limonen eldesi verilebilir (Sezik vd, 1986). Bunun yanında, son dönemlerde biyotransformasyon

reaksiyonlarını da içeren doğal türevlerinin elde edilmesi ve kullanımında önem kazanmıştır (Cheetham, 1999; Van damme and Soetaert, 2002).

1.4. MONOTERPENLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Monoterpenler, çok eski zamanlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. En yaygın kullanımları; antibakteriyal, antifungal, antiviral, rubefiyan, kaşıntı, acı tonik, iştah açıcı, gastrointestinal rahatsızlıklarda, ekspektoran, sedatif, anestezi, analjezik, antioksidan, antitussif, antiakne, antiinflamatuvar vb. etkilerinden dolayıdır (Sticher *et. al.*, 1974; Kieslich, 1976; Charlwood *et. al.*, 1991; Tavera, 1999; Cutler, 1999). Monoterpenlerin, hücre düzeyinde enerji metabolizmalarına etki ettikleri bilinmektedir. Son zamanlarda ise, *in vitro* ve *in vivo* deneylerle de desteklenen sonuçlara göre, bazı kanser türlerinin (meme, karaciğer, akciğer, pankreas, prostat vb.) önlenmesinde ve tedavisinde rol oynadıkları bildirilmiştir (Cabral *et. al.*, 1994; Boon *et. al.*, 2000; Tavera, 1999; Crowell, 1999; Yanishlieva *et. al.*, 1999; Cole and Schweickert, 2003).

1.5. ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP MONOTERPENLER

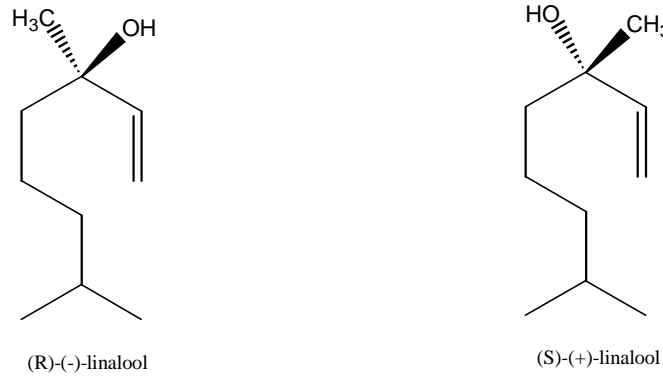
1.5.1. Linalool

Linalool, *Lavandula augustifolia* Mill., *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Cymbopogon citratus* türlerini içeren birkaç iyi bilinen tür tarafından üretilen yağların ana bileşenidir. İlginç bir şekilde birçok linalol üreten tür geleneksel tıpta ve aromaterapide kullanılır (Elisabetsky *et al.*, 1995).

Linalool bir çok koku bileşiklerinde koku bileşeni olarak kullanılır. Ev temizliği

için kullanılan deterjanlar gibi kozmetik dışı ürünlere ek olarak dekoratif olarak kullanılan kozmetik ürünlerinde, şampuanlarda, tuvalet sabunlarında bulunabilir (Letizia *et. al.*, 2003).

Linalool, Vitamin A ve Vitamin E sentezine ek olarak geraniol, nerol, citral ve onun türevleri gibi geniş aralıktaki kimyasal kokuların üretimi için anahtar bileşiktir (Mercier *et. al.*, 1994; Osadchii *et. al.*, 1997)



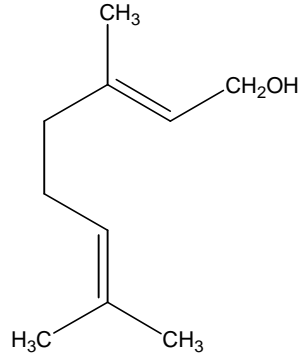
Şekil 1.1. Linalool enantiyomerleri

1.5.2. Geraniol

Geraniol, bir monoterpenoid alkoldür ve gül, palmarosa ve sitronella (Java tipi) yağının ana bileşenidir. Geraniol aynı zamanda küçük miktarlarda geranium, limon ve diğer birçok yağlarda bulunur. Suda çözünmeyen, fakat çoğunlukla organik çözücülerde çözünen, solgun, sarı yağmsı net olarak görünür. Çoğunlukla parfümlerde yaygın olarak kullanılmış olan gül kokusuna sahiptir. Şeftali, ahududu, greyfurt, kırmızı elma, erik, ıhlamur, portakal, limon, karpuz, ananas ve yaban mersini aromalarında da kullanılır (Ohloff, 1990).

Araştırmalar geraniol'ün, etkili bir sivrisinek kovucu olduğunu göstermiştir

(Barnard ve Xue, 2004). Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda limon yaprağında ve diğer herbal aroma yağlarında bulunan geraniol' ün *in vivo* ve *in vitro* alışmalarda hepatoma ve melanom huceleri ile murine losemi hucelerine karşı anti tümör aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Shoff *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1997).



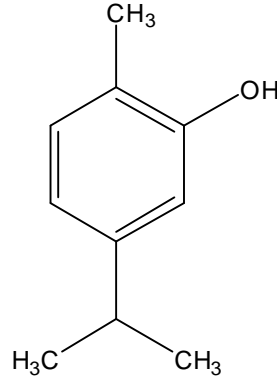
şekil 1.2. Geraniol molekülü

1.5.3. Karvakrol

Karvakrol, bir monoterpenoid fenoldür. Karvakrol, *Origanum vulgare* ve kekikten elde edilen yağlarda bulunur. Karvakrol, bazı bakteri türlerinin gelişimini engelleme özelliğine sahiptir. Düşük toksik özellikleri ile beraber hoş kokusu ve tadından dolayı bakteriyel gelişimi engellemek için gıda katkı maddesi olarak önerilen bir bileşiktir (Ultee and Smith, 2001). Antimikrobiyal zelliklerinin bakteri membranının bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Di Pasqua *et. al.*, 2007; Cristani *et. al.*, 2007).

Karvakrol, insan iyon kanallarının potansiyel aktivatörüdür. Karvakrol'n insan dili üzerinde uygulanması sıcaklık hissine neden olur. Farelerde, karvakrol hızlı biçimde metabolize edilir ve atılır. Ana metabolik yol fenolik grubun glukuronik asit ile

esterifikasyonudur. Bir diğerk ikincil yol ise, terminal metil gruplarının primer alkollere oksidasyonudur. 24 saat sonra karvakrol veya onun metabolitlerinin neredeyse tamamının bir gün içinde vücut dışına atıldığı saptanmıştır (Austgulen *et. al.*, 1987).



Şekil 1. 3. Karvakrol molekülü

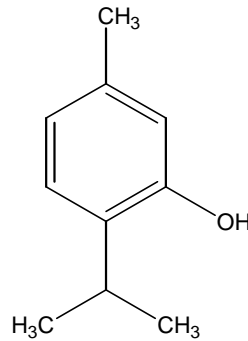
1.5.4. Timol

Timol, izopropil metil fenol olarak ta bilinen simen türevi monoterpenoid bir fenoldür. Karvakrol ile izomer olan timol, güçlü antiseptik özelliğe ve hoş aromatik kokuya sahiptir. Timol suda kısmen çözünür, fakat alkollerde ve diğerk organik çözücülerde tamamen çözünür. Timol ve karvakrol, günümüzde bakteri ve fungi öldürücü güçlü anti mikrobiyal moleküller arasında yer almaktadır.

Acem otu (*Monarda fistulosa* ve *Monarda didyma*), modern ticari ağız yıkama formüllerinde temel aktif bileşen olan timolün doğal kaynaklarıdır. Amerika’ da yapılan çalışmalarda, bu bitkilerden elde edilen yağların güçlü antiseptik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Küçük yaralar ve deri enfeksiyonları için sözkonusu bitki lapaları kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitkiyi içeren bir çay, diş çürükleri ve dişetinden kaynaklanan boğaz enfeksiyonlarında ve ağız tedavisinde kullanılmaktadır (Tilford, 1997). Fareler üzerinde yapılan son tıbbi araştırmalar, kekik ekstraktının β 2-reseptörlerine sahip olan organlar üzerinde (nefes borusu ve uterus) rahatlatıcı etkiye

sahip olduğu sonucunu göstermiştir (Wienkötter *et. al.*, 2007).

1994 yılında 5 lider sigara üreticisi şirket tarafından yayınlanan raporda timol molekülü, 599 sigara katkı maddesinden bir tanesi olarak yer almıştır. Sigaranın tadını iyileştirmek amacıyla kullanıldığı ve nefes borusunu rahatlatma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Timol sekobarbital ve diazepam gibi diğer depresanlara benzer gabaercik aktiviteye sahiptir (Priestley *et. al.*, 2003). Yaygın bir şekilde kullanılan anesteziik propofol'e (2,6-diizopropilfenol) yakın bir biyolojik etki gösterir. Timol molekülü, propofol'e oranla azaltılmış gücünden ve güvenli doz-etki eğrisinden dolayı yasal depresan olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Iwersen *et. al.*, 2001; Kranioti *et. al.*, 2007).



Şekil 1.4. Timol molekülü

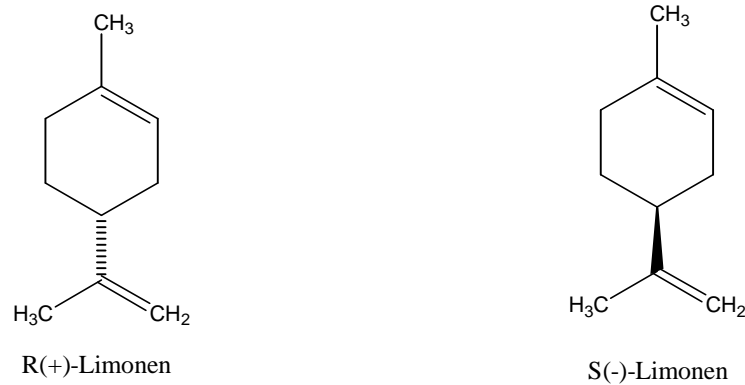
1.5.5. Limonen

Limonen, tek halkalı monoterpen olarak sınıflandırılan bir moleküldür. Portakal kokusuyla oda sıcaklığında sıvı ve renksizdir. İsmi limondan alır ve limon başta olmak üzere diğer turunç meyvelerinde önemli oranda bulunurlar. Bilinen en önemli ve kullanım alanı en geniş olan monoterpenler arasında yer alır. Limonen, kiral bir karbon atomuna sahiptir ve farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip iki doğal formu mevcuttur. Limonen'in üretiminde endüstriyel kaynak olan turunç meyvesi (R)-(+)-

limonen içerir. Rasemik limonen dipenten olarak da bilinir (Simonsen, 1947; Van der Werf *et. al.*, 2000).

(+)-Limonen'in ana kullanım alanı, karvon sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanımınıdır (Fahlbusch *et. al.*, 2002). Limonen, yaygın olarak kozmetik ürünlerinde bulunur. Turunç'un ana koku bileşeni olarak (+)-limonen gıda üretiminde ve bazı ilaçlarda, örneğin tatlandırıcı olarak kullanılır. Limonen, temizlik ürünlerine, örneğin el temizleyicilere, limon portakal kokusu vermek ve makine parçalarından yağın uzaklaştırılmasında olarak da kullanılabilir. Aynı zamanda boyanmış tahtalara uygulandığı zaman boya sökücü olarak işlev görebilmektedir. Kolay alev alabilen bir molekül olarak limonen, biyo yakıt olarak ta düşünülmektedir (Green Car Congress, 2007).

Limonen, yüksek sıcaklıklarda izopren oluşturmak için parçalanmasına rağmen bozunmaksızın distilasyonla saflaştırılabilen kararlı bir monoterpendir. Nemli havada kolayca karvon ve karveol oluşturmak üzere oksidasyona uğrar Sülfür ile dehidratasyonu sonucu *p*-simen molekülüne dönüşür. Limonen doğal olarak (R)-enantiyomer olarak bulunur, fakat 300 C'de dipentene rasemize olur (Pakdela *et. al.*, 2001).



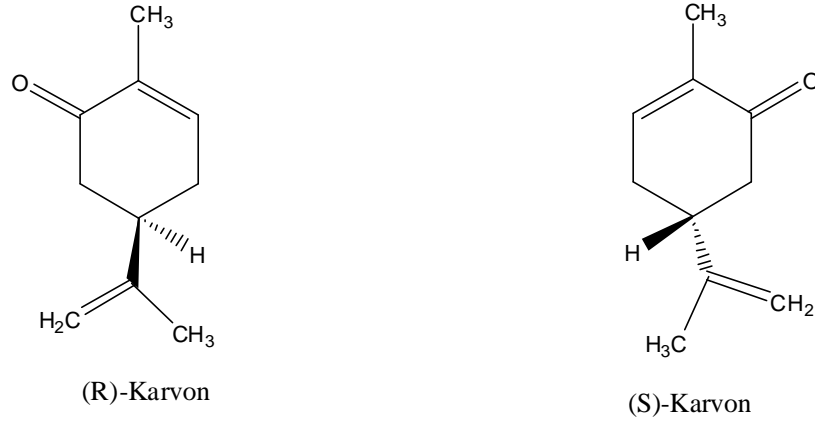
Şekil 1.5. Limonen molekülü eantiomerleri

1.5.6. Karvon

Karvon, monoterpen ailesinin bir üyesidir ve doğal olarak birçok özyağlarında bulunur. En bol olarak karaman kimyonunun çekirdeklerinde ve dereotunda bulunur (De Carvalho *et. al.*, 2006). Karvon molekülü, 2 enantiyomere sahiptir. S-(+)-karvon, karaman kimyonu kokusu, enantiyomeri olan R-(+)-karvone bahçe nanesi gibi koku vermektedir (Theodore *et. al.*, 1971).

Karaman kimyonu (Caraway), antik Romalılar tarafından tıbbi amaçlar için kullanıldı, fakat karvon 1841 yılına kadar Varrentrapp tarafından elde edilene kadar, saf bileşik olarak elde edilememiştir. İlk olarak Schweizer tarafından, karvol olarak adlandırılmıştır. Goldschmidt ve Zürrer, karvon molekülünün limonen ile keton bağlantılı olduğunu tanımlamış ve yapı 1894 yılında Wagner tarafından ortaya konmuştur (Wagner, 1894; De Carvalho *et. al.*, 2006).

Her iki karvon enantiyomeri, gıda ve aroma endüstrisinde kullanılmaktadır. R-(-)-karvone, havalandırma ürünlerinde ve birçok yağlarda bulunmaktadır. Karvon içeren yağlar, aromaterapi ve alternatif tıp alanında kullanıma sahiptir. Naneli sakızın R-(-)-karvon içerdiği bilinmektedir (De Carvalho *et. al.*, 2006). S-(+)-karvon aynı zamanda patateslerin depolama süresince erken filizlenmesini önlemek için de kullanılmaktadır. *In vivo* çalışmaları, her iki karvon enantiyomerinin esas olarak dihidrokarvonik asit, karvonic asit ve uroterpenelon olarak metabolize edildiğini göstermiştir (Engel and Adric, 2001).



Şekil 1.6. Karvon molekülü enantiomerleri

1.5.7. Mentol

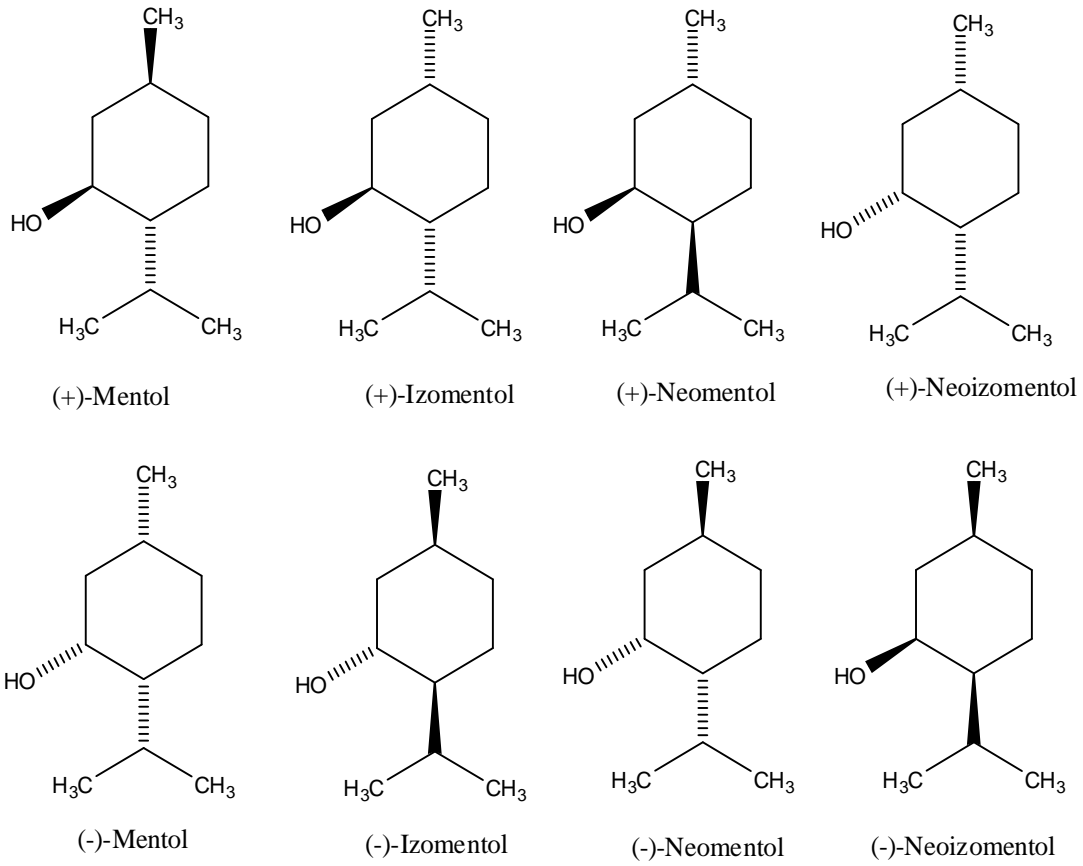
Mentol sentetik olarak yapılan veya naneşekeri yağı veya diğer nane yağlarından elde edilen bir monoterpendir. Kristal, açık veya beyaz renkte olup oda sıcaklığında katıdır. Doğada bulunan mentolün ana formu, (1R,2S,5R) konfigürasyonuna sahip (-)-mentoldür. Mentol, lokal anestezik etkiye sahiptir ve küçük boğaz gıcıklanmalarında rahatlama için yaygın biçimde kullanılır.

Mentol birçok ürün içerisinde değişik nedenlerden dolayı bulunur (Eccles, 1994; Braina *et. al.*, 2006).

- Reçetesiz ürünlerde, örneğin öksürük ilaçları ve dudak balsamlarında,
- Kaşıntı önleyicilerde,
- Kas kramplarında, burkulmalarda, baş ağrıları ve yalnız veya kamfor, okaliptüs yağı veya kapsaisin gibi moleküller ile birlikte benzer koşullarda rahatlama için lokal analjezik olarak,
- Göğüs ve sinüsler için ferahlatıcılarda (Örneğin Vicks, Vaporub),
- Serinlik hissi sağlayıcı olarak güneş yanıklarının tedavisinde,
- Özel sigaralarda tatlandırma amaçlı, sigara içmekten kaynaklanan boğaz ve sinüs rahatsızlıklarını ve tartışmalı olan içicilerin ağız kokusunu azaltmak için
- Oral hijyen ürünlerinde ve ağız kokusu ilaçlarında ağız yıkama, diş macunu, ağız

ve dil spreyi gibi daha genel biçimde (örneğin sakız ve şekerlerde) tatlandırıcı aroma olarak,

- Haşere öldürücü olarak bal arılarının nefes borusu parazitlerine karşı,
- Parfümeride mentol çiçeksi işaretleri vurgulamak için metil esterleri hazırlamada,
- Bazı güzellik ürünlerinde (örneğin saç şekillendiricilerde)



Şekil 1.7. Mentol'ün enantiyomer yapıları

1.6. BİYOTRANSFORMASYON (MİKROBİYAL TRANSFORMASYON)

Biyotransformasyon, farmakolojik olarak *in vivo* şartlarda vücuda giren yabancı maddelerin enzimler ile zararsız hale getirilmesi reaksiyonlarını ifade etmektedir. Bunlar, özellikle karaciğerde bulunan enzimler tarafından gerçekleştirilen bir seri yükseltgeme, indirgeme, dekarboksilleme ve hidroliz reaksiyonlarıdır. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucu genellikle vücuttan atılımı kolay olan, polaritesi yüksek ve inaktif metabolitler oluşur (detoksifikasyon) (İscan, 2008). Bunun yanı sıra, ilaçlardan inaktif metabolitlerini oluşturan birçok metabolik biyotransformasyon reaksiyonları, vücutta sentezlenen (endojen) bileşikleri biyolojik aktivitesi olan metabolitlere de dönüştürebilirler (Brunton, 1996).

Mikroorganizmalar, doku kültürleri ve izole enzim sistemleri aracılığıyla da gerçekleştirilmekte ve bilinen maddelerden yola çıkılarak laboratuvar şartlarında yeni metabolitlerin üretimi mümkün olmaktadır. Bu durum, mikrobiyal transformasyon olarak adlandırılmaktadır (Roberts, 1995; Kieslich, 1997; Hashimoto ve Ozaki, 1999).

Mikrobiyal transformasyonlarda en yaygın olarak kullanılan dönüşümler, oksidoredüktaz ve hidrolaz enzimlerinin katalizlemiş olduğu yükseltgenme (örneğin inert bir atoma hidroksil grubu ilavesi) ile C-N, glikozit, peptit, ester ve amit gruplarının hidroliz reaksiyonlarıdır (Loughlin, 2000). Bu tip reaksiyonlarla, geleneksel kimyasal sentezlerle gerçekleştirilmesi oldukça güç olan reaksiyonların yüksek verimle ve tek bir enantiomer yapıda elde edilmesine olanak sağlanır (Kieslich, 1976; Hanson, 1995; Roberts *et al.*, 1995; Faber, 1997).

Günümüzde hızlı gelişim gösteren biyotransformasyon alanında hedeflenen reaksiyonlar, şu şekilde sıralanabilir (Rehm and Reed, 1984; Poppe and Novak, 1992; Faber, 1997; Abourashed *et. al.*, 1999):

- ✓ Başlangıç maddesinin seçici olarak türevlendirilmesi,
- ✓ Başlangıç maddelerinin hedeflenen metabolitlere kısmi yıkılımı,
- ✓ Başlangıç maddesinin farklı maddelere dönüştürülmesi,
- ✓ Memeli metabolizmasının *in vivo* taklidi.

Endüstride biyotransformasyon teknolojisi, kimyasal sentezlerin yerine alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Telefoncu, 1995). Bunun en iyi örneği polimer kimyasının ana bileşiklerinden olan akrilamid molekülünün üretimidir. Akrilamid, akrilnitrilden *Rhodococcus rhodochrous* adlı mikroorganizma ile biyotransformasyonu sonucu elde edilmektedir. Bu bileşiğin Japonya'da yıllık üretim miktarı, yaklaşık 30000 ton'dur. Glikozdan fruktoz üretimi, daha basit bir dönüşümle gerçekleşmekte ve yıllık üretim 1 milyon ton ile miktar olarak ilk sırada yer almaktadır. Gıda endüstrisinde pazarı gittikçe artan düşük laktoz' lu ürünlerin üretimi de bu tip endüstriyel ürünlere iyi bir örnektir (Liese and Filho, 1999).

Son yıllarda gıda katkı ve ilaç hammaddesi özellikleri taşıyan birçok aramolekülün üretiminde de mikrobiyal transformasyon reaksiyonları, yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda katkı maddesi olarak vanilin ve ilaç hammaddeleri olarak şimik asit/kinik asit ve timidin moleküllerinin üretimi örnek olarak verilebilir.

Vanilin, taze *Vanilla planifolia* meyvalarında glikovanilin olarak bulunmaktadır. Meyvelerin fermantasyonu sırasında oksidasyonla glikovanilik alkole ve hidrolizle glikoz ve vanilik alkole dönüşür. Vanilik aldehit'in oksidasyonu ile son ürün olan vanilini verir. Yıllık talep 120 ton olmasına rağmen sadece 2 ton miktarında üretilebilmektedir. Sentetik olarak ise fenolden elde edilmektedir (Liese and Filho, 1999).

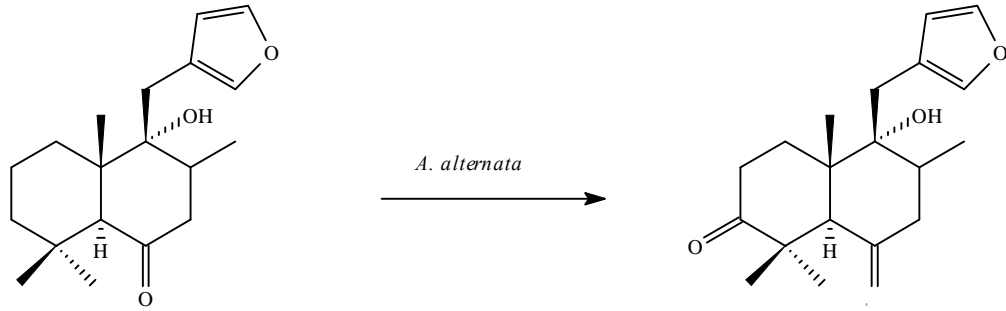
Şikimik asit/kinik asit *Influenza* (grip) virüsüne karşı kullanılan ilacın sentezinde ara madde olarak önem taşımaktadır. Timidin, birçok antiviral nükleositin sentezinde kullanılmaktadır. Özellikle, AIDS virüsüne karşı kullanılan 3'-deoksi-3'-azidotimidin (AZT) sentezi için ihtiyaç duyulmaktadır (Liese and Filho, 1999).

İzoforon, renksiz, naneyağı kokusuna sahiptir ve endüstride doğal ve sentetik reçinelerin, yağların, böcek öldürücülerin, boyaların ve yazı mürekkeplerinin çözücüsü olarak yaygın biçimde kullanılır (Samimi, 1982; WHO, 1995). İzoforon çoğunlukla sentetik olarak üretilmesine rağmen, doğada yaban mersini (cranberry) başta olmak üzere bazı bitkiler içerisinde bulunur (ATSDR, 1989).

1.7. *Alternaria alternata* İLE MİKROBİYAL TRANSFORMASYONLAR

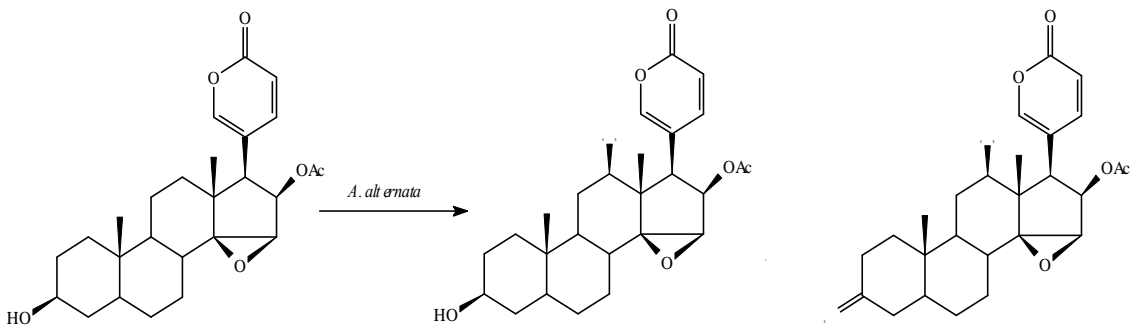
Literatürde *A. alternata* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiş ve aşağıda özetlenen biyotransformasyon reaksiyonlarına rastlanmıştır.

Bir diterpen olan solidagenon molekülünün *A. alternata* (ATCC 44501) ile mikrobiyal transformasyonu sonucunda, C₃ konumuna keton grubunun ilavesi sonucu tek bir metabolit oluşmuştur (Hirschmann *et.al.*, 2004).



Şekil 1.8. Solidagenon molekülünün *A. alternata* ile biyotransformasyonu

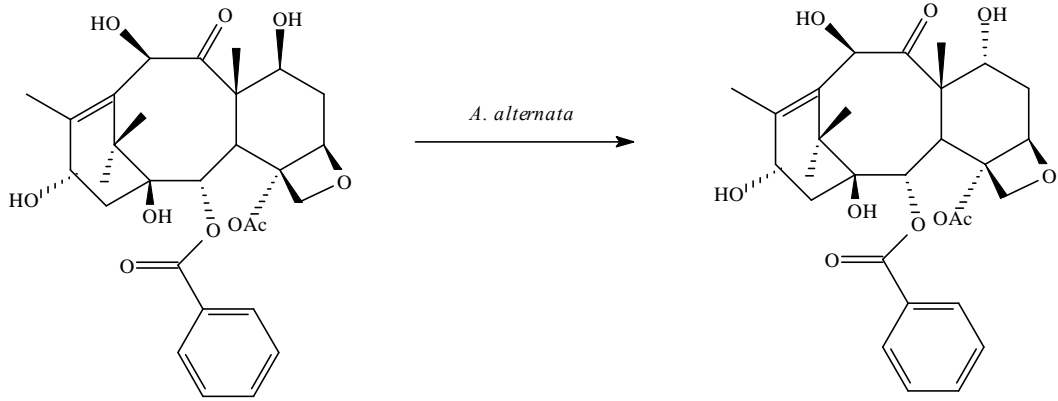
Bir diğer çalışmada, kanser türlerine (carcinoma) karşı etki gösteren bufadienolid yapısına sahip molekülün *A. alternata* (AS 3.4578) ile mikrobiyal transformasyonu incelenmiştir. Bu moleküllerden biri olan cinobufagin molekülünden 2 farklı metabolit elde edilmiştir. Metabolitlerden bir tanesi moleküldeki C halkasına β - konumunda hidroksil grubu ilavesi, diğeri ise bu hidroksil grubuna ilaveten 3β - konumunda mevcut hidroksil grubunun keton grubuna yükseltgenmesi sonucu oluşmuştur (Ye ve Guo, 2005; Ye ve Guo, 2008; Xin *et.al.*, 2009).



Şekil 1.9. Sinobufagin molekülünün *A. alternata* ile biyotransformasyonu

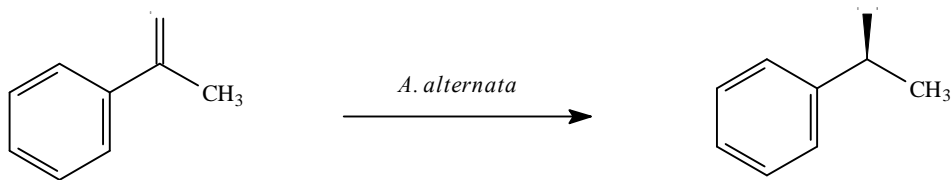
Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan bir tanesi olan Taxol'un sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılan 10-deasetilbaccatin III (10-DAB) molekülünün *A.*

alternata (ICRM 42.94) ile mikrobiyal transformasyonunda ise, yapıda mevcut 7β -konumundaki hidroksil grubunun stereokimyası, 7α - konumuna dönüştürülmesiyle sonuçlanmıştır (Arnone *et.al.*, 2006).



Şekil 1.10. 10-DAB molekülünün *A. alternata* ile biyotransformasyonu

Asetofenon'un *A. alternata* (EBK-4) ile pH 6,5 ve 28°C sıcaklıkta 26 saat süreyle gerçekleştirilen mikrobiyal transformasyonu sonucu, yapıdaki keton grubu stereospesifik olarak β -hidroksil'e indirgenmiştir (Kurbanoglu vd., 2007).



Şekil 1.11. Asetofenon molekülünün *A. alternata* ile biyotransformasyonu

A. alternata ile gerçekleştirilen mikrobiyal transformasyon reaksiyonları; genellikle yapıya stereospesifik olarak hidroksil gruplarının ilavesi, asetil grubunun hidrolizi, mevcut hidroksil gruplarının keton grubuna epimerleşmesi ve yükseltgenmesi ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu sonuçlar, *A. alternata* küfünün iyi bir biyolojik hidroksilleme ajanı olarak kullanılabilceğini ortaya koymaktadır.

BÖLÜM – 2: MATERYAL, METHOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. GENEL DENEYSEL BİLGİLER

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitin yapısı, tek ve iki boyutlu spektral metotlar (^1H NMR, ^{13}C NMR, GC-MS, HMBC ve HSQC) kullanılarak aydınlatıldı. GC-MS spekturumları, 6890 N Network GC System ve 5975 Inert Mass cihazlarıyla alındı. ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spekturumları Bruker DPX 500 Fourier Transform spektrofotometresiyle 125 MHz'de Döteryo kloroform tetrametilsilan ile uluslar arası standartlar referans alınarak yapıldı. Kolon kromatografisi için 60 (Merck, 230–400 mesh) tipi silika jel kullanıldı. İnce tabaka kromatografisi (ITK), 0.25 mm kalınlığında hazır silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) üzerinde (60-80 $^{\circ}\text{C}$) (1:1) hekzan–etil asetat çözelti sistemiyle izlendi. Bileşiklerin spotları, vanilin-sülfirik asit ve metil alkol-sülfirik asit çözeltileriyle renklendirildikten sonra ısıtılarak belirgin hale getirildi. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında standart antibiyotik olarak penisilin, vankomisin ve tetrasiklin kullanıldı.

2.2. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARI

2.2.1. Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması

Çalışmamızda kullanılan küf *Alternaria alternata*, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Ana Bilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlandı ve +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.2.2. *Alternaria alternata*'nın Üretimi İçin Kullanılan Sıvı Besiyeri Bileşenleri

Glukoz	20 g
Pepton	5 g
Maya özütü	5 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	5 g

Yukarıda belirtilen besiyeri bileşenleri tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH 7,0 olacak şekilde 0,1 N HCl veya KOH ilave edildi. 250 ml'lik erlenlerin her birine 100 ml besiyeri konularak erlenlerin ağızları pamukla kapatıldı ve pamuğun üzeri alüminyum folyo ile kaplandı. Besiyerleri, 121°C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

2.2.3. Mikroorganizmanın Hazırlanması

Oda sıcaklığında, katı besiyerinde bulunan mikroorganizma 250 ml'lik erlende bulunan 100 ml'lik sıvı besiyerine laminar akış kabininde bir öze ucu dolusu miktarda ilave edildi. Daha sonra çalkalamalı koşullarda (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmanın yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra (24–48 saat), eşit miktarda steril sıvı besiyeri içeren diğer erlenlere steril koşullarda aktarıldı. Sıvı besiyerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı koşullarda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada ortama substrat eklenerek biyotransformasyon süreci başlatıldı.

2.2.4. Substrat Hazırlanması Ve İlavesi

0.5 ml izoforon 4 ml aseton içerisinde çözüldükten sonra, daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan küf içerisinde 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 ulaştığı ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edildi. Erlenler üzerine etil asetat ilavesi ile biyotransformasyon sona erdirildi. Daha sonra ekstraksiyon ve izolasyon aşamalarına geçildi.

2.2.5. 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. 1 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. İTK ile kontrol edildi.

2.2.6. Metabolitlerin İzolasyonu

Biyotransformasyon işlemi durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besi yerlerine 1/1 oranında EtOAc ilave edildi. İyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden vakum altında süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstre edildi. Toplanan ekstreler, susuz Na₂SO₄'ta kurutulduktan sonra yoğunlaşmaya bırakıldı. Elde edilen ekstre, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak petrol eterinin polaritesi etil asetat ilavesiyle arttırılarak gradient bir sistem kullanıldı. Ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlendi.

2.2.7. Metabolitlerin Tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC ve IR gibi spektroskopik metodlar kullanılarak veya bilinen bir madde ise literatürdeki spektroskopik değerleri karşılaştırılarak aydınlatıldı.

2.2.8. İzoforon'un *A. alternata* ile Biyotransformasyonu

Yapılan İTK'da, başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan iki yeni spot gözlemlendi. Karışım kolon kromatografisine tabi tutuldu.



Şekil 2.1. İzoforon ile *A. alternata* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK

Kolondan %5'lük etil asetat çözeltisi (petrol eteri içerisinde) ile saflaştırılan ilk madde başlangıç maddesi oldu.

Kolonda %15'lik etil asetat çözeltisi (petrol eteri içerisinde) kullanılarak ilk metabolit (**M₁**) (121 mg) saf olarak elde edildi.

MS (m/z) : 154 (M^+)($C_9H_{14}O_2$)

Erime noktası : Yağımsı madde

I.R. (V_{max}) : 3420, 1678 (KBr) cm^{-1}

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : 1.01 [(3H, s, $C(\underline{CH}_3)_2$), 1.05 [(3H, s, $C(\underline{CH}_3)_2$),
2.05 (3H, s, $-C=C-\underline{CH}_3$), 2.18 (1H, d, J 6.8 MHz, $\underline{CH}_A H_B$),
2.38 (1H, d, J 16.4 MHz, $\underline{CH}_A H_B$), 4.03 [1H, br. s, $-\underline{CH}(\underline{OH})$]
ve 5.85 (1H, br. s, $-\underline{CO}-\underline{CH}=\underline{C}-$)

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$ -TMS)'i Tablo 2.1'de verilmiştir.

Kolondan 20%’lik etil asetat çözültisi (petrol eteri içinde) kullanılarak ikinci metabolit (**M₂**) (145 mg) saf olarak elde edildi.

MS (m/z) : 154 (M^+)(C₉H₁₄O₂)

Erime noktası : Sıvı

I.R. (V_{max}) : 3400, 1670 (KBr) cm⁻¹

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 1.05 [(6H, s, C(CH₃)₂), 2.05 (3H, s, -C=C-CH₃),
2.14 (2H, s, -C=C-CH₂-), 2.27 (2H, s, -CO-CH₂-),
4.22 (2H, s, -CH₂OH) ve 6.15 (1H, s, -CH=C-)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃-TMS)‘i Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bileşiklerin (İzoforon, M₁ ve M₂) ¹³C-NMR spektroskopisine ait veriler

C	İzoforon (ppm)	M ₁ (ppm)	M ₂ (ppm)
1	199.9	199.0	200.0
2	125.4	126.2	122.1
3	160.3	161.1	162.2
4	33.5	76.7	33.6
5	50.7	48.9	51.5
6	45.1	38.5	40.2
7	33.5	26.9	65.0
8	24.5	21.5	29.7
9	28.4	21.2	28.2

2.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

2.3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Anti bakteriyal aktivite çalışmalarında; *Pseudomonas aureginosa* ATCC 10145, *Esheria coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* (klinik izolat), *Bacillus subtilis* NRS-744, MRSA (klinik izolat) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri; *Candida glabrata* (klinik izolat) ile *Candida albicans* (klinik izolat) mayaları; *Aspergillus niger* ATCC 10949, *Aspergillus flavus* ATCC 9807, *Aspergillus paraciticus* NRRL-465 ve *Geotrichum candidum* (wild type) küfleri kullanıldı. Mikroorganizmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

2.3.2. Agar Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal aktivite tayini için, agar difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntem bakteri, maya veya küf kültürü aşılınmış agar yüzeyine açılmış kuyuya, aktivite tayini yapılacak maddelerin çözeltilerinin yerleştirilmesiyle yapılır. İnkübasyon periyodunun sonunda var olan etken maddenin ortama yayılması ile duyarlı mikroorganizmalar ölür ya da gelişmeleri durur. Bunun sonucunda diskler etrafında şeffaf bölgeler oluşur(Kiran et. al., 2005). Deneyin yapılışı aşağıda özetlenmiştir.

Mueller Hinton Agar (MHA) ve Sabouraud %4 Glukoz Agar (SGA) ile hazırlanan besi ortamları otoklavlama sonrasında besiyerinin kalınlığı 4 mm olacak şekilde steril koşullarda, petrilere döküldükten sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Diğer taraftan spor oluşumunu sağlamak için fungal kültürler patates (potato) dekstroz agar içeren yatık besiyerlerinde 27°C'de 5-7 gün büyütüldü. Her bir bakteri için hücre

konsantrasyonu steril fizyolojik su ilave edilerek 10^8 CFU/ml olacak şekilde, Mc Farland 0,5 bulanıklılığına göre ayarlandı. Hazırlanan bu hücre süspansiyonu Drigalsi spatülü yardımıyla MHA ve SGA ile hazırlanan petriyelerdeki besiyeri üzerine yayıldı. DMSO içinde derişimi 168 (M_1) ve 299,45 (M_2) mg/ml olacak şekilde çözülerek hazırlanan test bileşiklerinin 20 μ L'si, agar yüzeyinde steril delici yardımıyla açılan kuyucuklara ilave edildi. Oda sıcaklığında ilave edilen maddenin difüzyonu için 4°C'de 1 saat bekletildikten sonra, test organizmasının sıcaklık isteğine bağlı olarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 16–18 saat sonra petriyelerdeki disk çapını da kapsayan inhibisyon çapı mm olarak ölçüldü (NCCLS, 1990a; Kiran vd, 2005).

2.3.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIK) Belirlenmesi

M_1 bileşiği (336 mg) ve M_2 bileşiği (598,9 mg) steril DMSO (2 mL) ile çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Önceden 100'er μ L steril Müler Hinton Broth (MHB) aktarılmış "U" tipi 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında, çift katlı seri dilüsyonlar ile değişik derişimlerde (M_1 için: 0,082-168 ve M_2 için: 0,14625-299,45 μ g/mL) çözeltiler hazırlandı. Bu kuyucuklara, otomatik çok kanallı pipet kullanılarak 20'şer μ L bakteri kültüründen ilave edildi. Plakların kapakları kapatılarak uygun sıcaklıklarda, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üremenin olduğu alanların daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa trifenil tetrazolyum klorit (TTC) çözeltilisinden (metanolde %1) 20'şer μ L ilave edilerek, 2 saat daha etüvde bekletildi. Çözelti rengi berrak olan, yani bakteri büyümesinin olmadığı kuyucuktaki derişim, MIK değeri olarak belirlendi (İşcan, 2008).

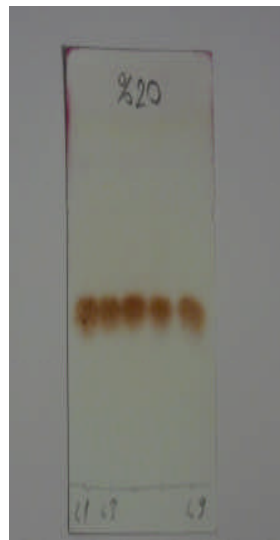
BÖLÜM-3: SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. İZOFORON MOLEKÜLÜNÜN *A. alternata* İLE BİYOTRANSFORMASYONU

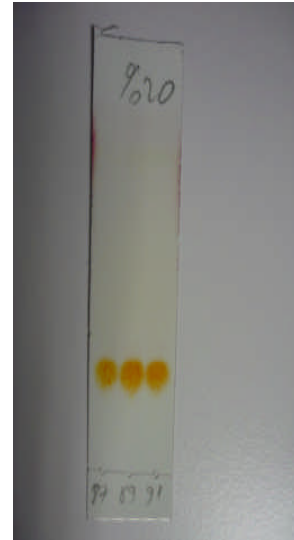
Sıvı besiyerinde 72 saat inkübasyonla çoğaltılan *A. alternata*, izoforon molekülü ile 8 gün boyunca oda sıcaklığında (21 °C) dairesel çalkalıyıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda elde edilen karışımda, başlangıç maddesi ile beraber iki polar metabolitin varlığı, İTK ile tespit edildi (Şekil 3.1). Karışım kolon kromatografisine tabi tutuldu.



Şekil 3.1. İzoforon ile *A. alternata* biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK plağı



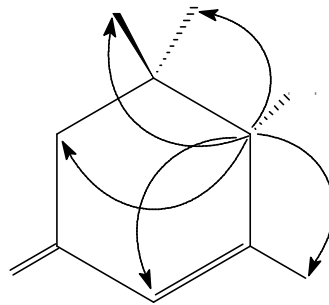
Şekil 3.2. M_1 'in İTK plağı



Şekil 3.3. M_2 'nin İTK plağı

Başlangıç maddesinin yapısı, mevcut NMR spektrumları ile karşılaştırılarak aydınlatıldı. Maddenin erime noktası ve IR spektrumu da literatür değerleri ile uyum göstermiştir. Başlangıç maddesi olan izoforon, kolonda % 10'luk etil asetat-petrol eteri elusyonu kullanılarak saflaştırıldı. Yapısı, mevcut NMR spektrumları ile karşılaştırılarak aydınlatıldı.

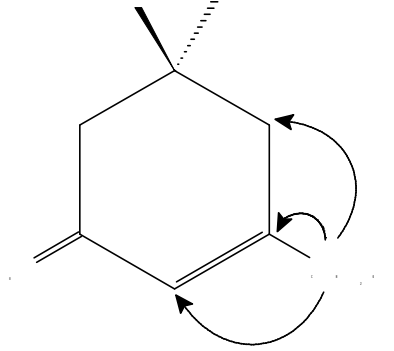
Kolonda daha sonra % 15'lik etil asetat-petrol eteri elusyonu kullanılarak yağimsı-katı karışımı ilk metabolit (M_1) izole edildi (**Şekil 3.2**). M_1 'in kütle spektrumu 154'de moleküler bir iyon gösterdi. Bu veri $C_9H_{14}O_2$ molekül formülünü ile uyum içinde olup, bu bileşiğin mono hidrosillenmiş bir türev olabileceği tespit edildi. Bileşiğin IR spektrumu alındığında, 3420 cm^{-1} 'de yayvan bir hidroksil piki ve 1678 cm^{-1} 'de de bir karbonil piki gözlemlendi. M_1 'in ^1H NMR sonuçları, izoforon'un ^1H NMR sonuçlarıyla benzer olmakla birlikte, δ_H 4.03'deki yeni bir hidroksil taşıyan metin protonunun görünümü, yapıya bir hidroksil grubunun ilave edilmiş olabileceğini gösterdi. Aynı metabolitin ^{13}C NMR sonuçları 9 karbona ait rezonans gösterirken, δ_C 76,7'deki düşük alanlı hidroksil içeren yeni bir karbon pikinin varlığı, yapıya bir hidroksil grubu ilave edildiği savını doğruladı. Yeni oluşmuş hidroksil grubunun gerçek konumu ve stereokimyası, metabolitin HMQC ve HMBC spektrum verilerinin, başlangıç maddesi olan izoforon molekülünün spektroskopik verileri ile karşılaştırılması sonucu tespit edildi. M_1 'in HMBC spektrumu incelendiğinde, δ_C 76,7'deki düşük alanlı bölgede hidroksil bağlanmış karbon pikinin (C-4), δ_H 1.01 [(3H, s, $C(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 2.18 (1H, d, J 6,8 MHz, $\underline{\text{C}}\text{H}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 2.38 (1H, d, J 16,4 MHz, $\text{C}\text{H}_\text{A}\underline{\text{H}}_\text{B}$) ve 4.03 [1H, br. s, $-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{OH})$] proton pikleri ile korelasyon gösterdiği tespit edildi (**Şekil 3.4**).



Şekil 3.4. M_1 'in HMBC korelasyonu

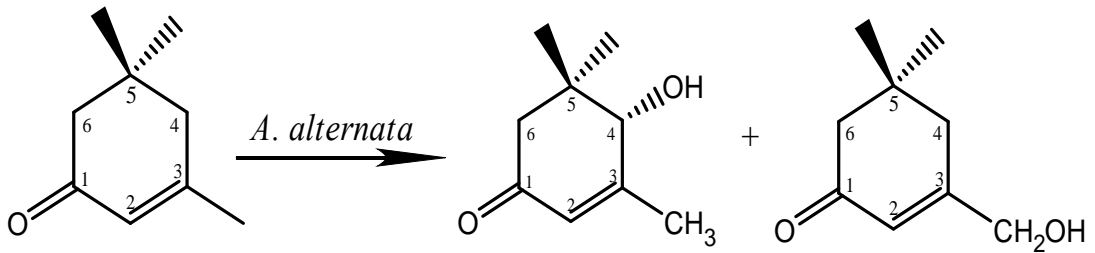
Tüm bu değerlendirmeler sonucunda, mikrobiyal hidrosillemenin C-4 karbonu üzerinde gerçekleştiği ve oluşan bileşiğin 4 α -hidroksi izoforon [**M**₁:(S)-4-hidroksi-3,5,5-trimetil sikloheksen-1-on] olduğu kanaatine varıldı. Literatür araştırması sonucu aynı metabolitin, 1981 yılında Mikami ve çalışma arkadaşları (Mikami *et. al.*, 1981) tarafından izoforon'un *A. niger* küfü ile yapılan biyotransformasyon sonucunda elde edildiği rapor edildi. Karşılaştırma sonucunda metabolitin spektroskopik verilerinin, literatür değerlerine uyum gösterdiği saptandı.

Son olarak kolondan % 20'lik etil asetat-petrol eteri elusyonu kullanılarak ikinci metabolit (**M**₂) izole edildi (**Şekil 3.3**). Yeni oluşmuş metabolitin yapı aydınlatılmasında, bu metabolitin kütle, IR, ¹³C NMR ve iki boyutlu (HSQC ve HMBC) spektrumları ile daha önce literatürde elde edilen metabolitlerin ve başlangıç maddesinin spektroskopik verilerinden yararlanıldı. **M**₂'nin kütle spektrumu alındığında 154'de bir moleküler iyon piki gözlemlendi. Bu veri, metabolitin kapalı formülünün C₉H₁₄O₂ olduğunu ortaya koymuştur. **M**₂'nin IR spektrumu incelendiğinde, 3400 cm⁻¹ de geniş bir hidroksil absorpsiyonu ve 1670 cm⁻¹'de de bir karbonil piki gözlemlendi. ¹H NMR spektrumu δ_H 4.22'de yeni bir hidroksil grubu taşıyan metilen protonlarının piklerini içeriyordu. Metabolitin ¹H NMR spektrumu substrat molekülün ile karşılaştırıldığında 1.00 ppm'deki piklerden birinin kaybolduğu ve δ_H 4.22'de 2H boyunda yeni bir hidroksil grubu taşıyan metilen protonlarının piklerini gözlemlendi. Bunun sonucu olarak da 7. konumdaki CH₃ grubunun hidrosillendiği sonucuna varıldı. Yapıya ilave edilen yeni hidroksil grubunun konumu, metabolitin HMQC ve HMBC spektrumlarının birlikte incelenmesiyle doğrulandı. **M**₂'in HMBC spektrumu incelendiğinde, δ_H 4,22 (2H, s, -CH₂OH) ppm'de hidroksil grubu takılmış metilen pikinin δ_C 33,6 (C-4), 122,1 (C-2) ve 162,2 (C-3) karbon pikleri ile korelasyon gösterdiği tespit edildi (**Şekil 3.5**).



Şekil 3.5. M_2 'in HMBC korelasyonu

Bu sonuç, mikrobiyal hidrosillemenin C-7 karbonu üzerinde gerçekleştiği ve oluşan bileşiğin 7 β -hidroksi izoforon [M_2 :3-hidroksimetil-5,5-dimetil-2-siklohegzen-1-on] olduğu kanaatine varıldı. Literatür araştırması sonucu aynı metabolitin, 1981 yılında Mikami ve çalışma arkadaşları (Mikami *et. al.*, 1981) tarafından izoforon'un *A. niger* küfü ile yapılan biyotransformasyon sonucunda elde edildiği bilgisine ulaşılmıştır. Karşılaştırma sonucunda M_2 'nin spektroskopik verilerinin, literatür değerlerine uyum gösterdiği saptandı.



Şekil 3.6. İzoforon'un *A.alternata* ile biyotransformasyon reaksiyonu

3.2. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında 6 adet bakteri [*P. auriginosa*, *E.coli*, *A. baumannii*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve MRSA (klinik izolat)], 2 adet maya (*C. glabrata* ile *C. albicans*) ve 4 adet küf (*A. niger*, *A. flavus*, *A. paraciticus* ve *G. candidum*) kullanıldı. Agar difüzyon yöntemi (NCCLS, 1990a; Kiran vd., 2005) kullanılarak gerçekleştirilen deney sonucunda oluşan şeffaf bölgelerin çapları ölçüldü ve standart olarak kullanılan antibiyotik madde ile karşılaştırıldı.

Aktivite testleri sonucunda her iki metabolitin maya ve küflere karşı bir biyolojik etkisinin olmadığı tespit edildi. Fakat bakterilerle yapılan biyolojik etki çalışmalarında ise metabolitler M₁ ve M₂'nin bazı bakterilere karşı standart olarak kullanılan antibiyotiklerden daha fazla veya eşdeğer etki gösterdikleri saptandı. Elde edilen değerler, aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo 3.1. Metabolitlerin antibakteriyal aktivite değerleri

Bakteriler	Izoforon	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

Tablodan da görüleceği üzere, her iki metabolitin 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 oluşturdu. Ayrıca M₁ metabolitinin *E. coli* bakterisine karşı 22 mm ve M₂ metabolitinin ise standart antibiyotiklere yakın inhibisyon zonları oluşturmaları dikkat çekicidir. Bu sonuç, izoforon analoglarının bazı bakterilere karşı potansiyel antibakteriyal ajan özelliği taşıdığını ortaya koymaktadır.

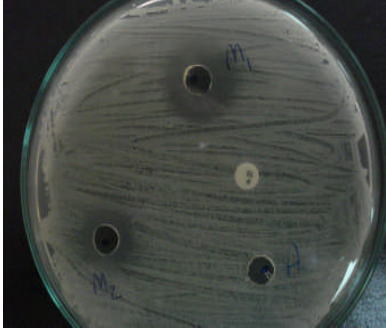
3.3. MİNİMUM İNHİBİSYON DERİŞİMİ (MIK)'NİN BELİRLENMESİ

Metabolitlerin antibakteriyal etki gösterdiği bakterilere karşı yapılan MIK testlerinin sonuçları, aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

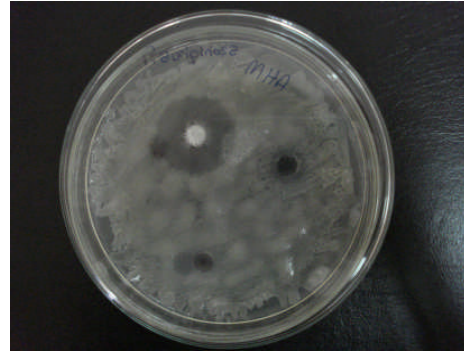
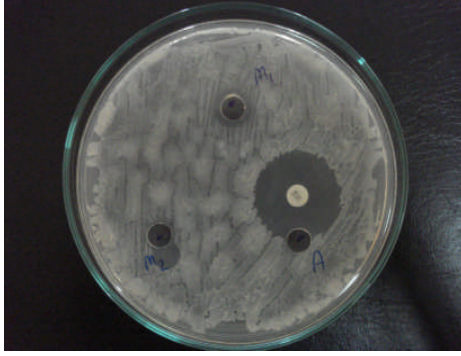
Tablo 3.2. M₁ ve M₂ metabolitlerin MIK değerleri (mg/mL)

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
<i>MRSA</i>	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

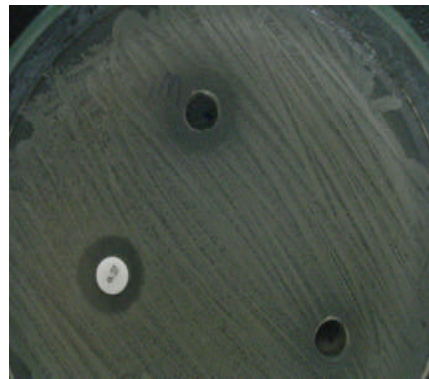
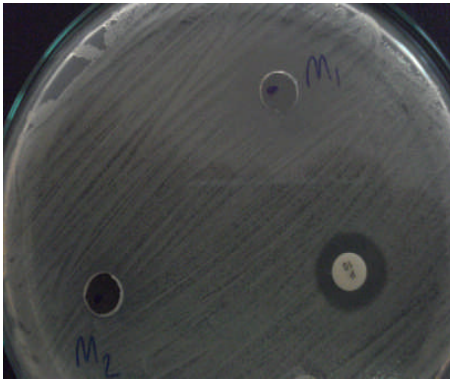
Tablodan da görüldüğü gibi, M₁'in *A. baumannii*, *B. subtilis*, *P. auriginosa* ve *S. aureus*'a karşı, M₂'nin ise *E. coli* ve *MRSA*'ya karşı daha düşük derişimlerde etki gösterdikleri saptandı. Elde edilen bu değerler, standart antibiyotiklerin MIK değerleri ile karşılaştırıldığında, M₁ ve M₂'nin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



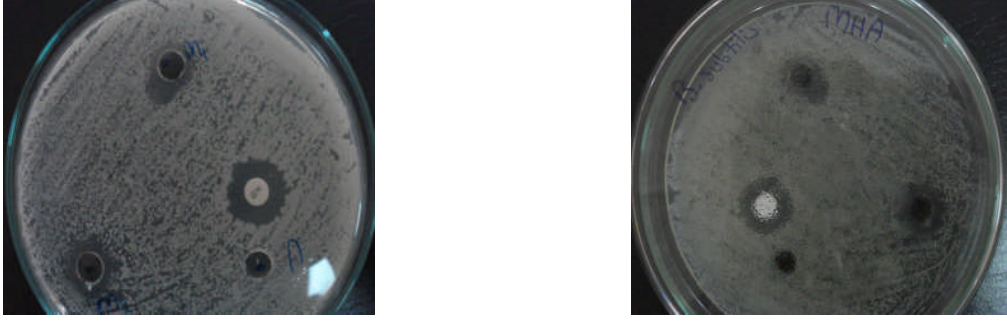
Şekil 3.7. *Acinetobacter baumannii* antibakteriyal aktivite sonuçları



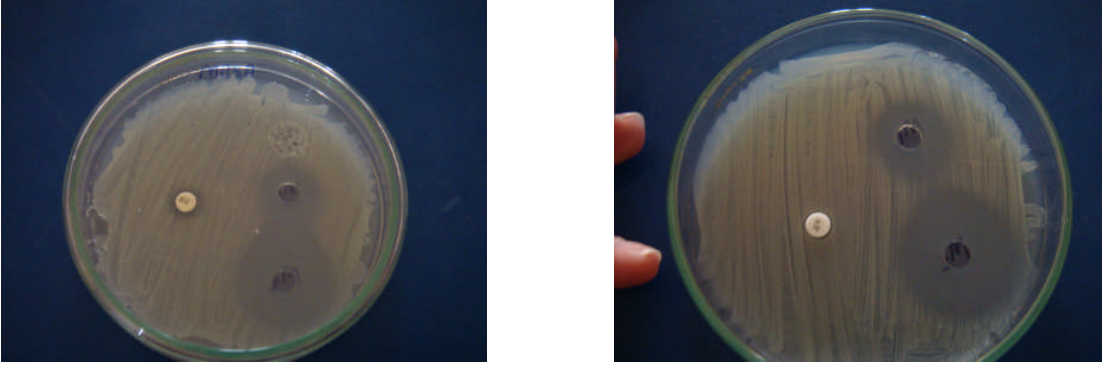
Şekil 3.8. *Pseudomonas aureginosa* antibakteriyal aktivite sonuçları



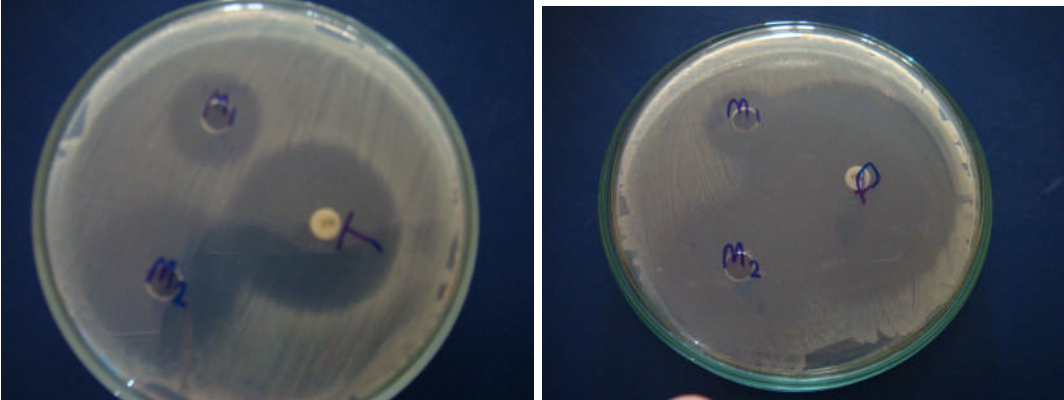
Şekil 3.9. *Escherichia coli* antibakteriyal aktivite sonuçları



Şekil 3.10. *Bacillus subtilis* antibakteriyal aktivite sonuçları



Şekil 3.11. *MRSA* antibakteriyal aktivite sonuçları



Şekil 3.12. *Staphylococcus aureus* antibakteriyal aktivite sonuçları

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abourashed, E.A., Clark, A.M. and Hufford, C.D., 1999, Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review, *Current Medicinal Chemistry* 6:359-374.
- Arnone, A., Bava, A., Alemani, S., Nasini, G., Bombardelli, E. and Fontana, G., 2006, Microbial transformation of 10-deacetylbaconin III (10-DAB) by *Culvaria lunata* and *Trametes hirsuta*, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 42:95-98.
- ATSDR., 1989, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for isophorone. U.S. Public Health Service. Atlanta, GA, ATSDR. PB90-180225.
- Austgulen, L.T., Solheim, E. and Scheline, R.R., 1987, Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol, *Pharmacology and Toxicology* 61(2):98-102.
- Barnard, D.R., and Xue, R., 2004, Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera:Culicidae), *Journal of Medical Entomology* 41(4):726-730.
- Bauer, K., Garbe, D. and Surburg, H., 1997, Common fragrance and flavor materials: Preparation, Properties and Uses, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Berger, R.G., 1995, *Aroma Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Boon, P.J.M., Boon, V.D. and Mulder, G.J., 2000, Cytotoxicity and biotransformation of the anticancer drug perillyl alcohol in PC12 cells and in the rat, *Toxicology and Applied Pharmacology* 167:55-62.
- Braina, K.R., Greena, D.M., Dykesb, P.J., Marks, R., Bola, T.S., 2006, The role of menthol in skin penetration from topical formulations of Ibuprofen 5% in vivo, *Skin Pharmacology and Physiology* 19:17-21.
- Brunton, L.L., 1996, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th edition, 7(1):1471.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burke, Y.D., Stark, M.J., Roach, S.L., Sen, S.E., and Crowell, P.L., 1997, Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* 32:151–156.
- Cabral, J.M.S., Best, D., Boross, L. and Tramper, J., 1994, *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publishing, Springer Netherlands, pp. 62-63.
- Carvalho, C.C.R and Fonseca, M.M.R., 2006, Biotransformation of terpenes, *Biotechnology Advanced* 24(2):134-142.
- Charlwood, B.V. and Charlwood, K.A., 1991, Monoterpenoids, In: *Methods in Plant Biochemistry, Terpenoids*, eds. Charlwood, B.V. and Banthorpe, D.V., Academic Press, London, England, pp. 43-98.
- Cheetham, P.S.J, 1999, Enzymes for flavor production, In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, eds. Flickinger, M.C. and Drew, S.W., John Wiley & Sons Inc, New York, pp.1004-1029.
- Cole, R.J. and Schweickert, M.A., 2003, *Handbook of secondary fungal metabolites*, Academic Press, London, England, pp. 103–115.
- Cristani, M., D'Arrigo, M. and Mandalari, G., 2007, Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15):6300–6308.
- Croteau, R., Craker, L.E. and Simon, J. E., 1992, *Herbs, Spices and Medicinal Plants, Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*, "Biochemistry of Monoterpenes and Sesquiterpenes of the Essential Oils, Vol. 1, Food Product Press, New York, USA, pp.81–133.
- Crowell, P.L., 1999, Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes, *Journal of Nutrient* 129:775S-778S.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cutler, H.G. and Cutler, S.J., 1999, *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 1–15.
- De Carvalho, C.C.C.R. and Da Fonseca, M.M.R., 2006, Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene, *Food Chemistry* 95:413-422.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. and Mauriello, G., 2007, Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55(12):4863–4870.
- Eccles, R., 1994, Menthol and related cooling compounds, *Journal of Pharmaceutic Pharmacology* 46: 618–630.
- E. Elisabetsky, e., Coelho de Souza, G.P., Dos Santos, M.A.C., Siqueira, I.R., Amador, T.A., 1995, Sedative properties of linalool, *Fitoterapia* 5: 407–414
- Engel, W. and Adric, J., 2001, In Vivo Studies on the Metabolism of the Monoterpenes S-(+)- and R-(-)-Carvone in Humans Using the Metabolism of Ingestion-Correlated Amounts (MICA), *Approach Food Chemistry, Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49(8):4069-4075.
- Faber, K., 1997, *Biotransformations in organic Chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp.1-80.
- Fahlbusch, K.G., Hammerschmidt, F.J., Johannes, P., Wilhelm, P., Dietmar, S., Kurt, B., Dorothea, G., Horst, S., 2002, *Flavors and Fragrances in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Goldfrank, L.R., Flomenbaum N.E., Lewin, N., Howland M.A., Hoffman, R.S. and Nelson L.S., *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2002.
- Graham, L.P., 1995, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, U.K., pp.1-100.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Green Car Congress, 2007, Cyclone Power to Showcase External Combustion Engine at SAE Event, Chicago, IL, USA.
- Hanson, J. R., 1995, An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, Oxford University Press, Oxford, England, pp.1-50.
- Hashimoto, S.I. and Ozaki, A., 1999, Whole Microbial Cell Process for Manufacturing Amino Acids, Vitamins or Ribonucleotides, Current Opinion Biotechnology 10:604-608.
- Hirschmann, G.S., Astudillo, L. and Palenzuela, J.A., 2004, Biotransformation of solidageneone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures, World Journal of Microbiology and Biotechnology 20:93-97.
- Iscan, G., 2008, Bazı doğal aromatik maddelerin mikrobiyal transformasyonu ve biyolojik etkileri, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 83s.
- International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 174 Isophorone, Geneva, WHO, 1995.
- Iwersen, B.S., Rösner, P., Kühnau, H.C., Junge, M. and Schmoldt, A., 2001, Death after excessive propofol abuse, International Journal of Legal Medicine 114 (4-5):248-51.
- Kieslich, K., 1976, Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 20–80.
- Kieslich, K., 1997, Biotransformations In: Fungal Biotechnology, ed. Anke, T., Chapman & Hall, Weinheim, Germany, pp.297-362.
- Kiran, I., İlhan, S., Akar, T., Tur, L. and Erol, E., 2005, Synthesis and evaluation of demethoxyviridin derivatives as potential antimicrobials, Zeitschrift für Naturforschung C 60c:686–692.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kranioti, E.F., Mavroforou, A., Mylonakis, P. and Michalodimitrakis, M., 2007, Lethal self administration of propofol (Diprivan), A case report and review of the literature, *Forensic Science International* 167(1):56–8.
- 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:Asymmetry* 18:2332-2335.
- Lange, B.M. and Croteau, R., 1999, Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants:cloning and heterologues expression of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint, *Archive Biochemistry and Biophysic* 365:170-174.
- Letizia, C.S., Cocchiara, J., Lalko, J., Api, A.M., 2003, *Food and Chemical Toxicology*, 41(7): 943-964.
- Liese, A., and Filho, M.V., 1999, Production of Fine Chemicals Using Biocatalysis, *Current Opinion Biotechnology* 10:595-603.
- Loughlin, W.A., 2000, Biotransformations in Organic Synthesis, *Bioresource Technology* 74:49-62.
- MacCaskill, D. and Croteau, R., 1998, Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, *Trends in Biotechnology* 16:349-355.
- Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V. and Harborne, J.B., 1994, *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, Longmann Sci.& Tech., Essex, England.
- Mercier, C., Chabardes, P., 1994, *Pure and Applied Chemistry* 66:1509.
- Mikami, Y., Fukunaga, Y., Arita, M., Obi, Y. and Kisaki, T., 1981, Preparation of aroma compounds by microbial transformation of isophorone with *Aspergillus niger*, *Agriculture and Biological Chemistry* 45(3):791-793.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1990a, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Approved Standard (M2-A4), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ,1990b, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard (M7-A2), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard (M38-A), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
- Ohloff, G., 1990, Riechstoffe und Geruchssinn Die molekulare Welt der Düfte, Springer, Berlin, Heidelberg, New York; Düfte – Signale der Gefühlswelt, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Wiley-VCH, Weinheim, 2004
- Osadachii, S.A., Tolstikov, G.A., 1997, Chemistry for Sustainable Development 5:79.
- Pakdela, H., Panteaa, D. and Roy, C., 2001, Production of dl-limonene by vacuum pyrolysis of used tires, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 57(1): 91–107.
- Poppe, L. and Novak, L., 1992, Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach, VCH, Weinheim, Germany, pp.15-40.
- Priestley, C.M., Williamson, E., Wafford, K. and Sattelle, D., 2003, Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*, British Journal of Pharmacology 140:1363–1372.
- Pybus, D. and Sell, C., 1999, The Chemistry of Fragrances, Royal Society of Chemistry, London, England.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rehm, H.J. and Reed, G., 1984, *Biotechnology: A Comprehensive Treatise, Biotransformations*, ed. Kieslich, K., Vol. 6a, Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Roberts, S.M., Turner, N.J., Willetts, A.J. and Turner, M.K., 1995, *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 155–167.
- Samimi, B., 1982, Exposure to isophorone and other organic solvents in a screen printing plant, *American Industrial Hygiene Association Journal* 43(1):43-48.
- Samuelsson, G., 1999, *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*, 4th Rev. Ed., Apotekarsoc Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Başaran, A., Saraçoğlu, I., Eröz, T. ve Özipek, M., 1986, Türkiye uçucu yağ kaynaklarının terpen kaynağı olarak değerlendirilmesi, ed. Şener, B., *Gazi Üniversitesi Yayınları* 113:257–259.
- Shoff, S.M., Grummer, M., Yatvin, M.B., and Elson, C.E., 1991, Concentration dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Research* 51:37–42.
- Simonsen, J.L., 1947, *The Terpenes*, 2nd edition, Cambridge University Press, London, England.
- Sticher, O., Wagner, H. and Wolff, P., 1974, *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity: Plant Mono- Di and Sesquiterpenoids with Pharmacological Activity*, Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 137–176.
- Tavera, H.L., 1999, Monoterpenes in Essential Oils: Biosynthesis and Properties, *Advanced Experimental and Medicinal Biology* 464:49-62.
- Teisseire, P.J. and Cadby, P., 1994, *Chemistry of Fragrant Substances*, VCH Publisher, New York, USA, p. 458.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Telefoncu, A, 1995, Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları 152:180–200.
- Theodore, J.L., Dante, G.G., Harris,J, Mon, T.R. and Teranishi, R., 1971, Chemical and sensory data supporting the difference between the odors of the enantiomeric carvones, Journal of Agriculture and Food Chemistry 19(4): 785.
- Tilford, G.L., 1997, Edible and Medicinal Plants of the West, Mountain Pres Publishing Co., Missoula, USA, p. 239.
- 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.
- Ultee, A. and Smid, E.J., 2001, Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, International Journal of Food Microbiology 64 (3): 373–8.
- Van der Werf, M., Keijer, 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.
- Wagner, G., 1894, Chemische Bericht 27:2270.
- Wienkötter, N., Begrow, F., Kinzinger, U., Schierstedt, D. and Verspohl, E.J., 2007, The effect of thyme extract on β_2 -receptors and mucociliary clearance, Planta Medica 73(7):629–635.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Withers, S.T. and Keasling, J.D., 2007, Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules, *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:980-990.

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 bufotalin by *Alternaria alternata* AS 3.4578, *Journal of Asian Natural Product Research* 11(1):7-11.

Ye, M. and Guo, D., 2005, Substrate specificity for the 12 β -hydroxylation of bufadienolides by *Alternaria alternata*, *Journal of Biotechnology* 117:253-262.

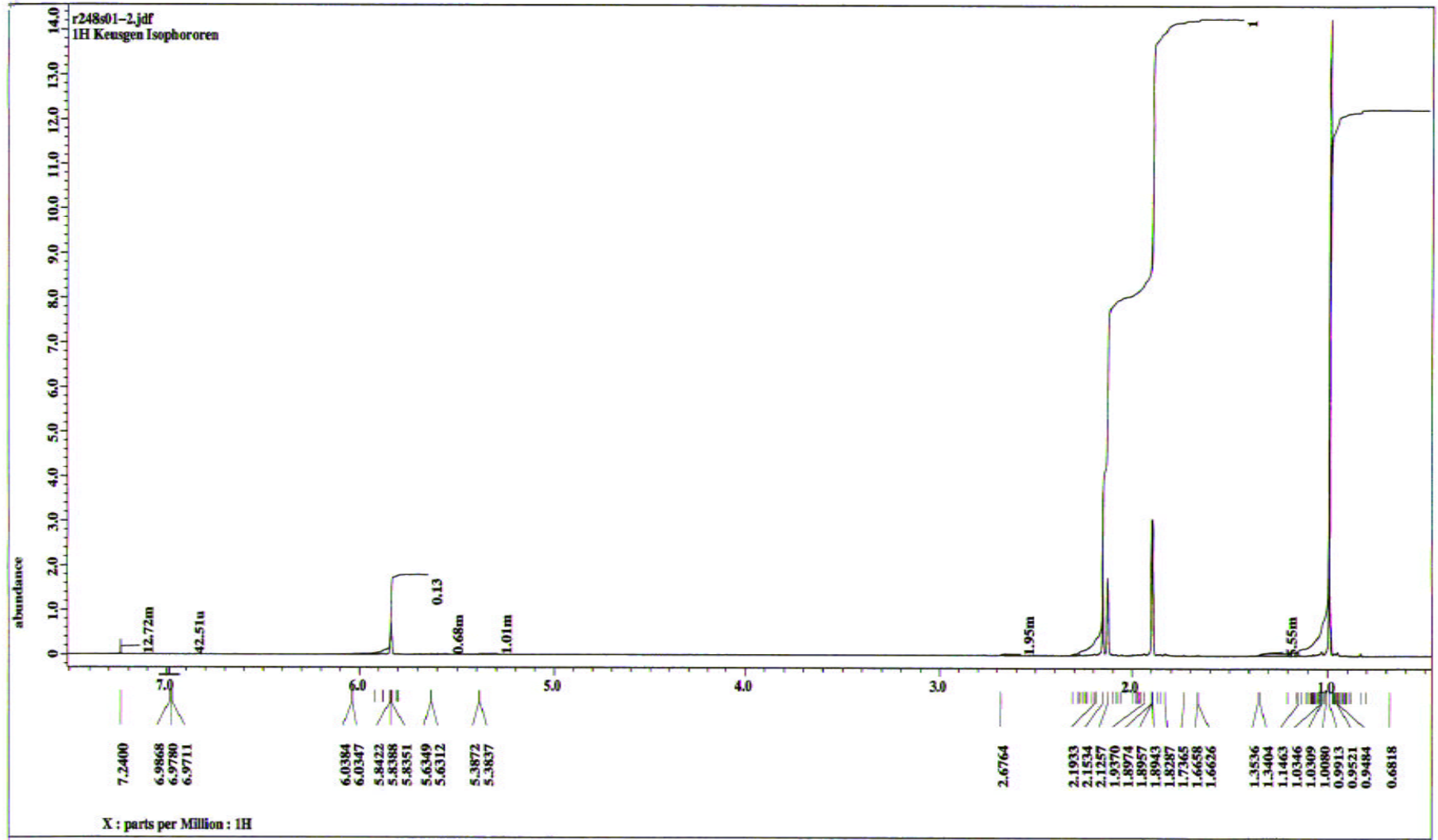
Ye, M. and Guo, D., 2008, A new bufadienolide obtained from the biotransformation of cinobufagin by *Alternaria alternata*, *Natural Product Research* 22(1):26-30.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H. and Raneva, V.G., 1999, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chemistry* 64:9-66.

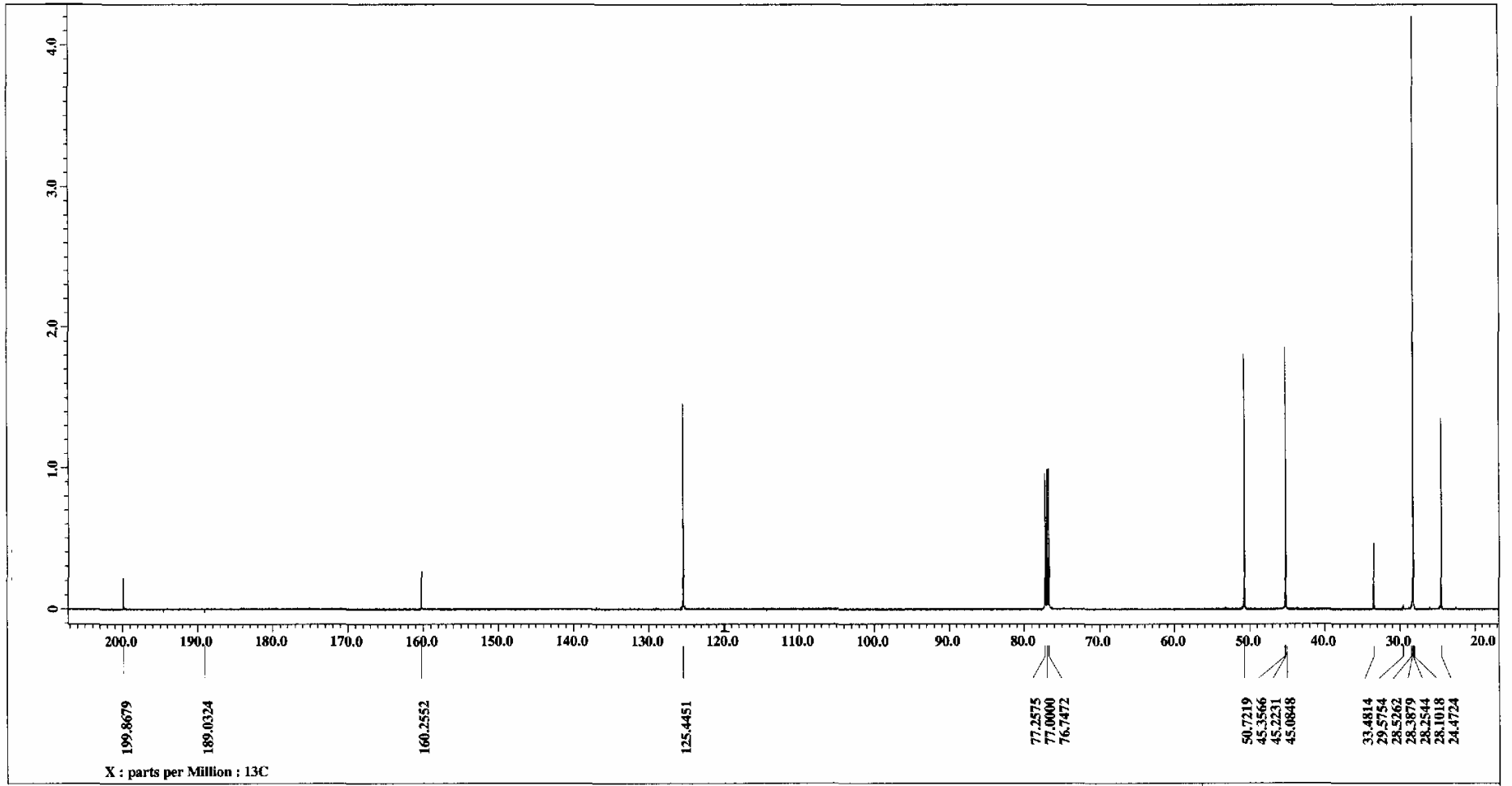
Yu, S.G, Hildebrandt, L.A., and Elson, C.E., 1995, Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice, *Journal of Nutrition* 125:2763–2767.

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

BÖLÜM-5: SPEKTRUMLAR DİZİNİ

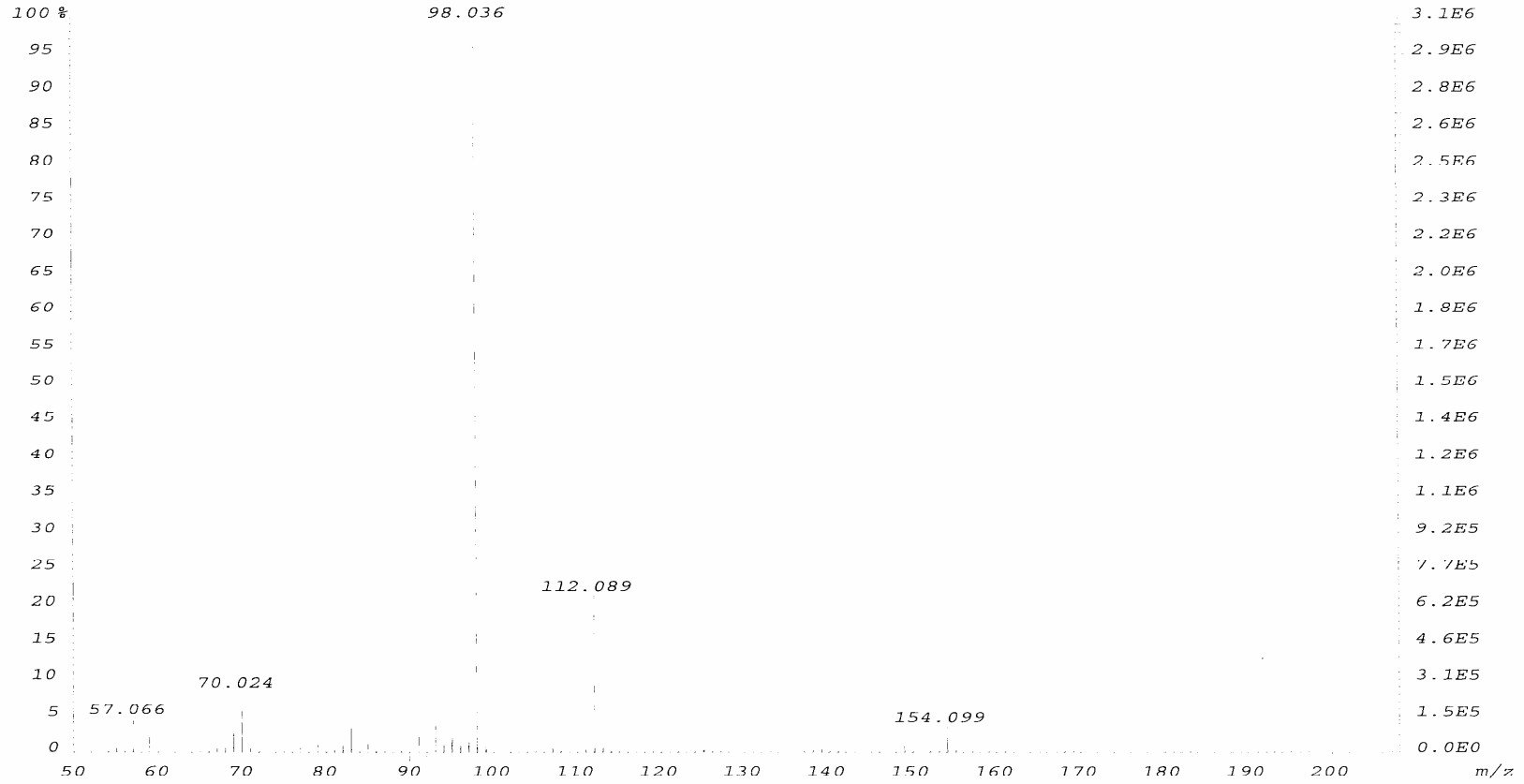


Spektrum 5.1. İzoforon'un ^1H -NMR spektrumu

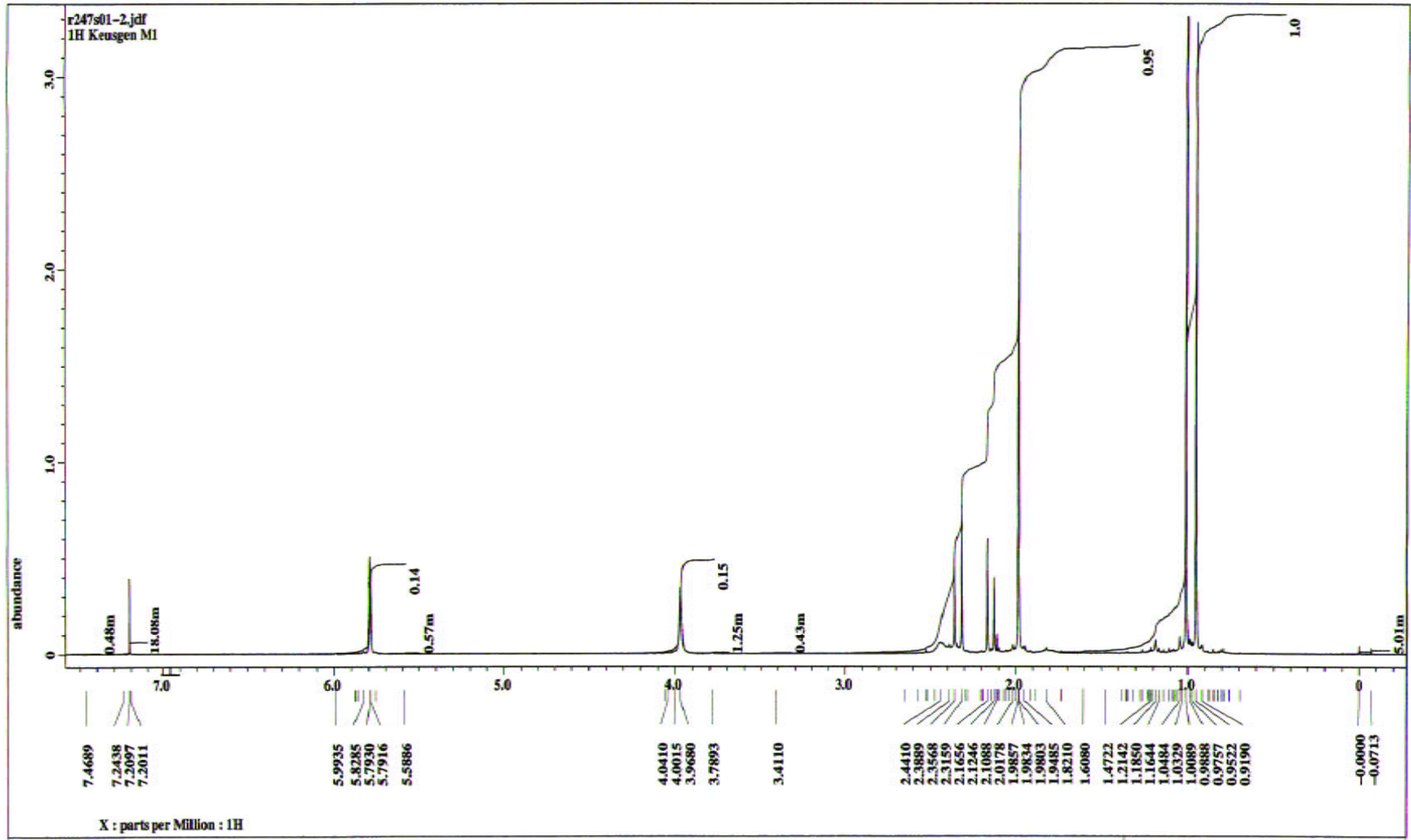


Spektrum 5.2. İzoforon'un ^{13}C -NMR spektrumu

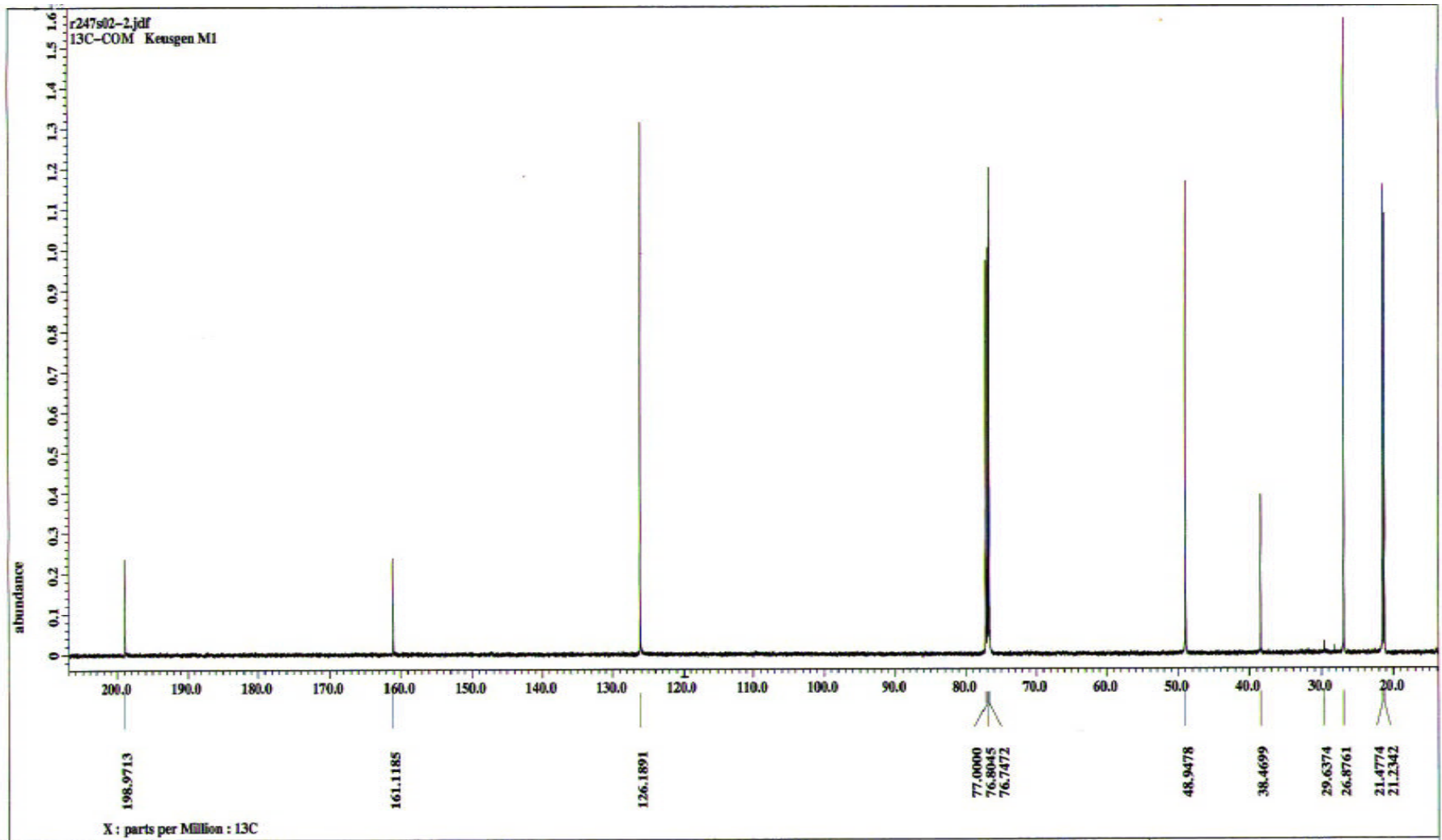
AutoSpec EI+ Magnet BpM:98 BpI:3079680 TIC:8805393 Flags:ACC
File Text:M 1



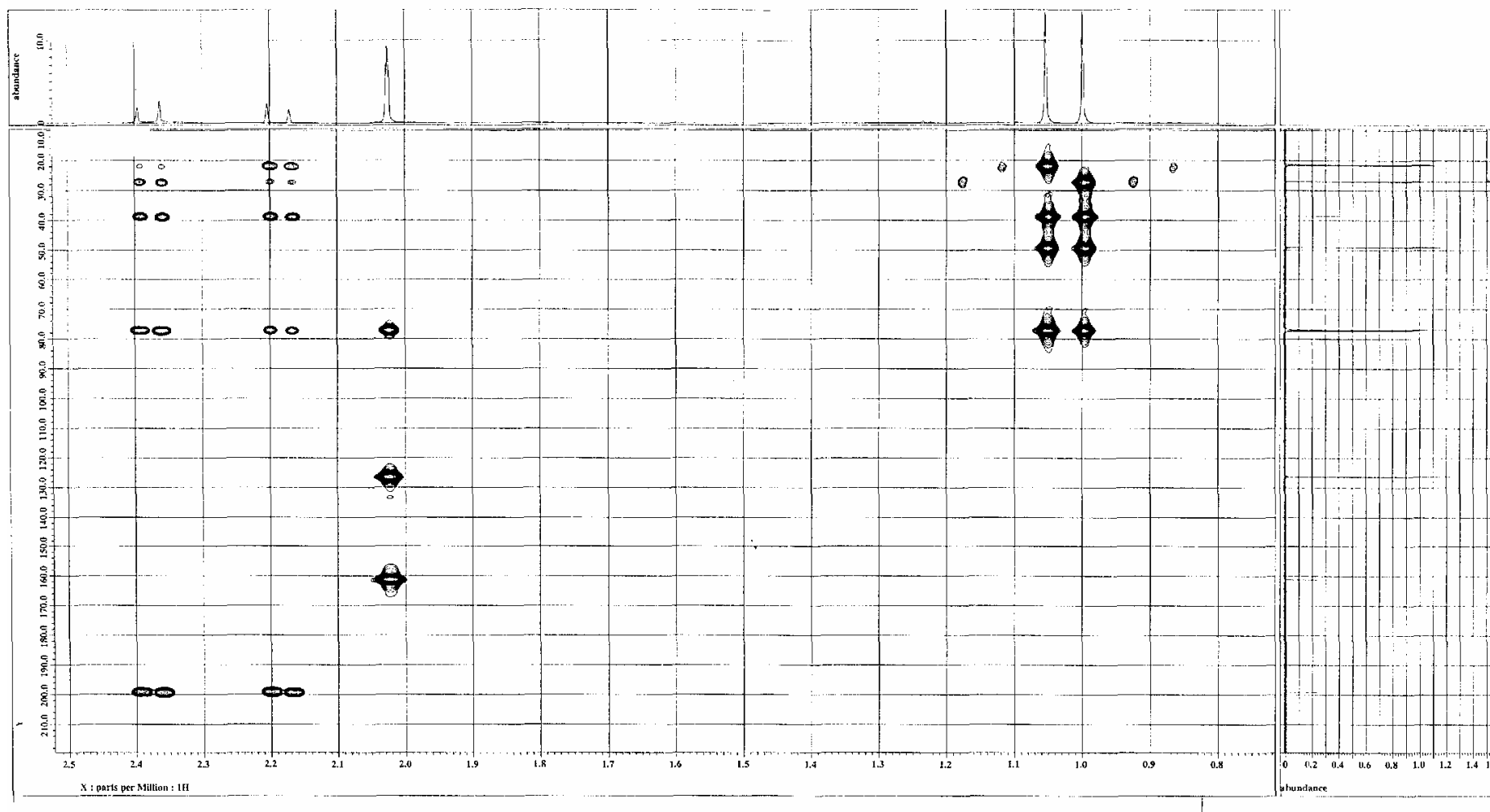
Spektrum 5.3. M₁'in kütle spektrumu



Spektrum 5.4. M_1 in ^1H -NMR spektrumu

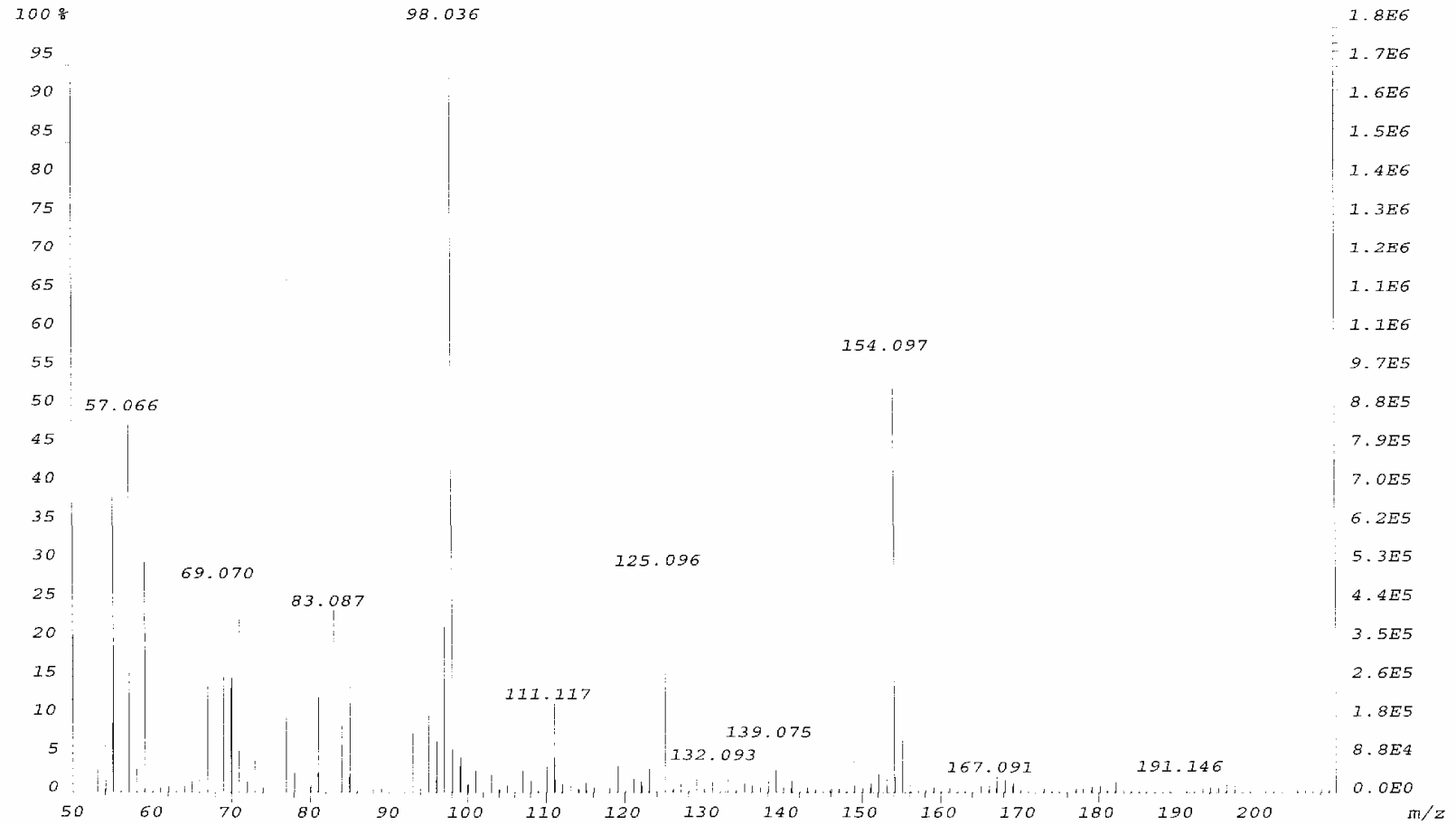


Spektrum 5.5. M₁'in ¹³C-NMR spektrum

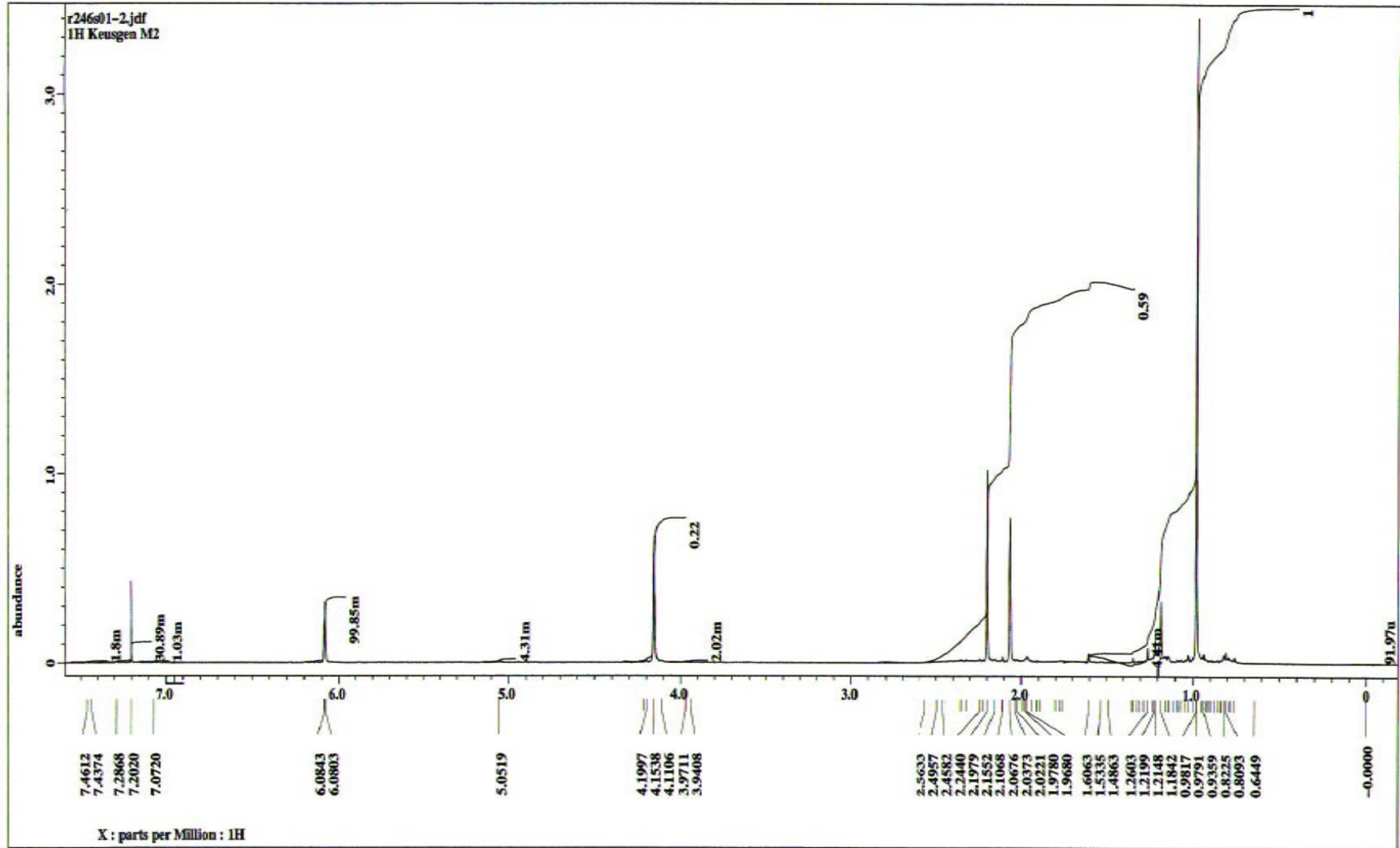
Spektrum 5.6. M_1 'in HMBC spektrum

AutoSpec EI+ Magnet BpM:98 BpI:1760973 TIC:18632320 Flags:ACC

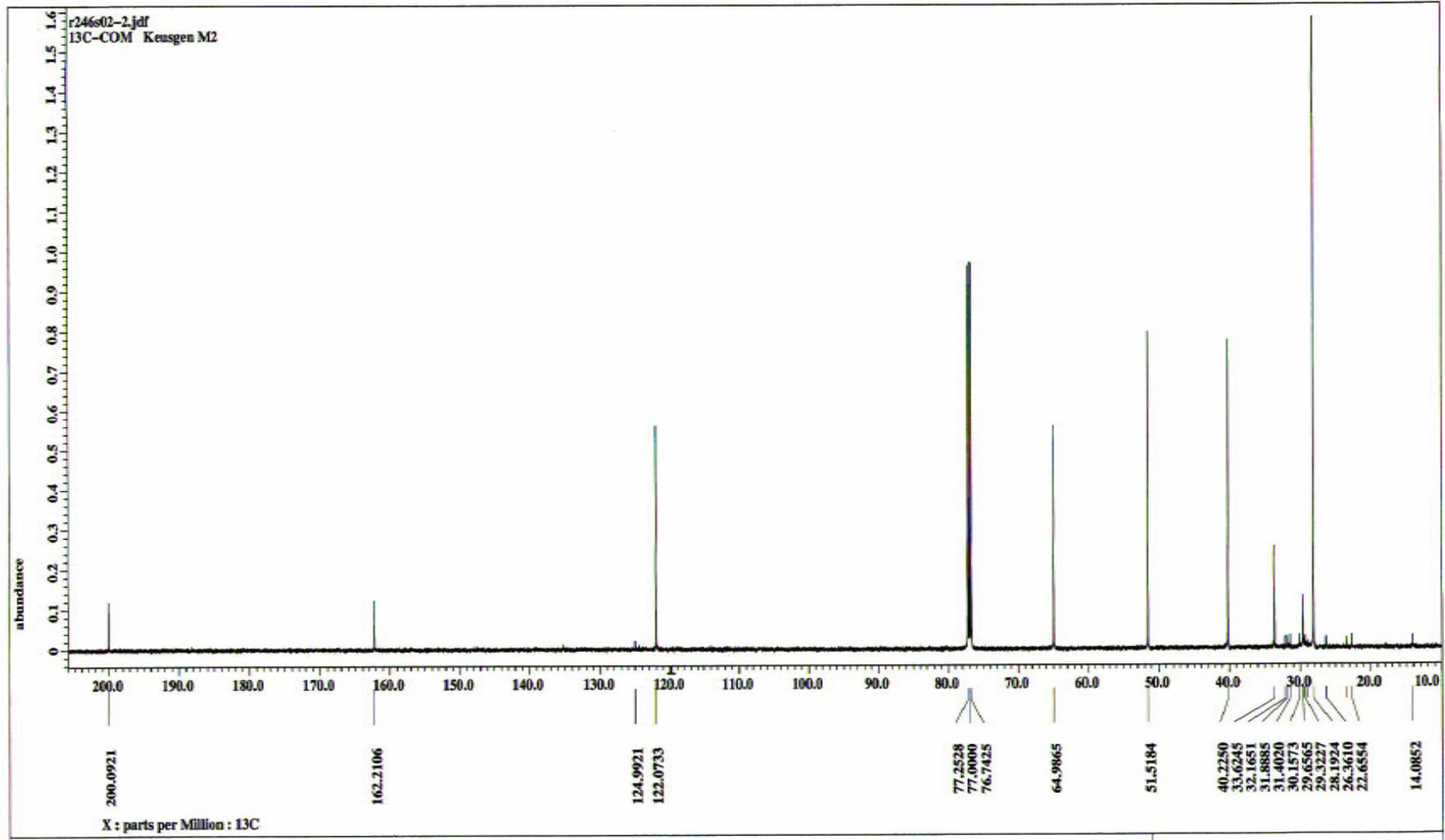
File Text:M 2

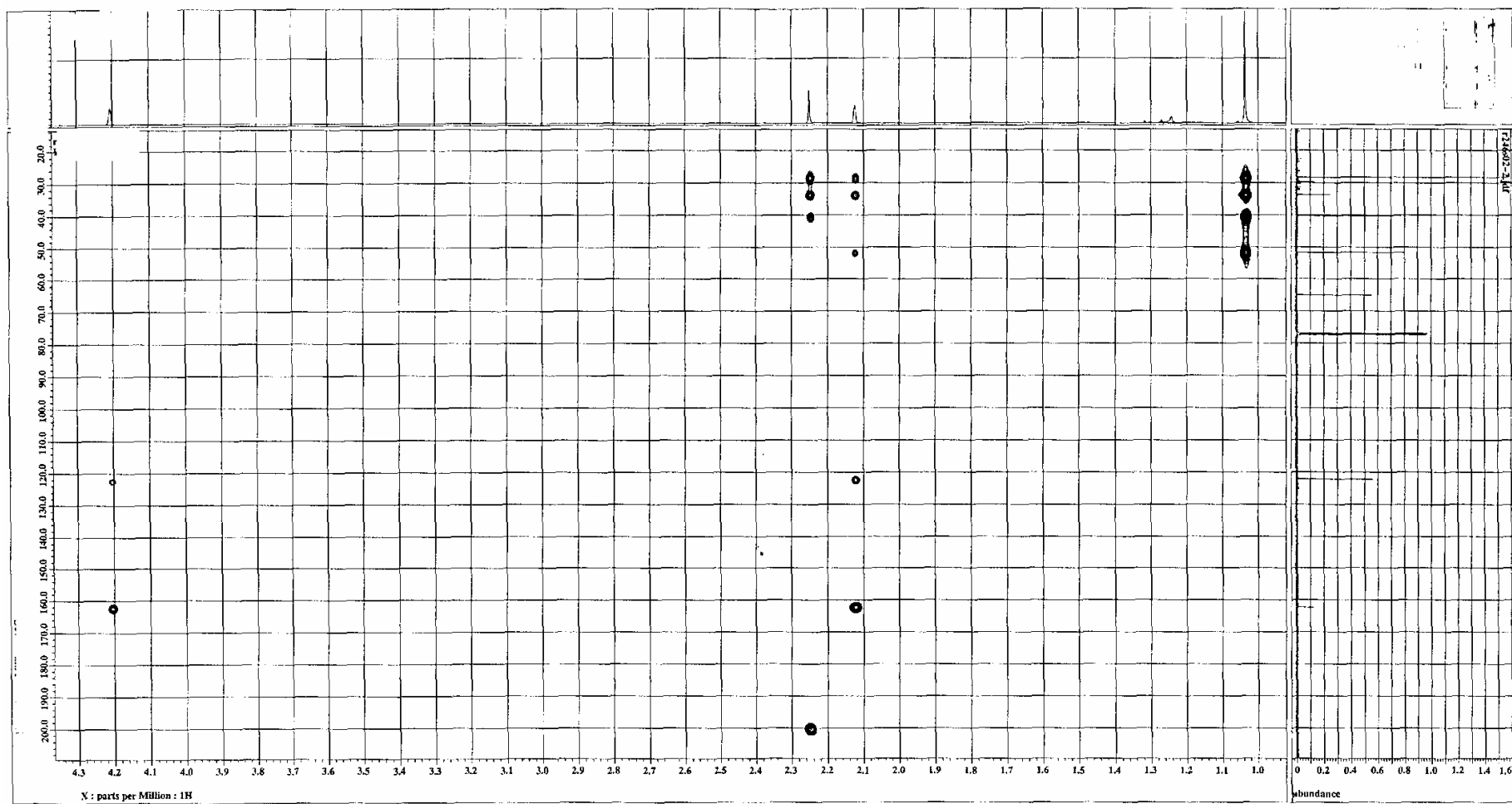


Spektrum 5.7. M₂'in kütle spektrumu



Spektrum 5.8. M_2 'in ^1H -NMR spektrum

Spektrum 5.9. M₂'in ¹³C-NMR spektrum



Spektrum 5.10. M_2' in HMBC spektrumu