

**Karyofillen Oksit'in Neurospora crassa ile
Biyotransformasyonunun İncelenmesi**

Zeynep Durceylan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Eylül 2007

**Biotransformation of Caryophyllen Oxide
by the Fungus Neurospora crassa**

Zeynep Durceylan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

September 2007

**Karyofillen Oksit'in Neurospora crassa ile
Biyotransformasyonunun İncelenmesi**

Zeynep Durceylan

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

Eylül 2007

Zeynep Durceylan' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “ Karyofillen Oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonunun incelenmesi ” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Doç. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Betül DEMİRCİ

Üye : Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ

Üye : Doç. Dr. Tamer AKAR

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

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada bir seskiterpen olan karyofillen oksit molekülünün Neurospora crassa fungal kültürü ile biyotransformasyon reaksiyonu ve reaksiyon sonucu oluşan metabolitin antimikrobiyal ve radikal süpürücü etkisi incelenmiştir.

Biyotransformasyon sonucu bir mono hidroksillenmiş metabolit elde edilmiş ve kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Metabolitin yapısı, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve EIMS spektrumları kullanılarak aydınlatılmıştır.

Karyofillen oksit ve elde edilen 12-hidroksi karyofillen oksit'in antimikrobiyal ve DPPH radikal süpürücü etki incelemesi sonucunda ise herhangi bir etki tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Karyofillen oksit, Neurospora crassa

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the biotransformation reaction of caryophyllene oxide, a sesquiterpen, by Neurospora crassa and determine the antimicrobial and radical scavenging activities of the metabolite.

Biotransformation with N. crassa yielded a mono hydroxylated derivative and purified by column chromatography. The metabolite structure was elucidated by analyzing the ¹H- NMR, ¹³C-NMR and EIMS spectra.

In addition, antioxidan activities of caryophyllene oxide and its metabolite were also evaluated, but no activities were observed.

Keywords: Biotransformation, Caryophyllene oxide, Neurospora crassa

TEŞEKKÜR

“Karyofillen oksit molekülünün *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonun incelenmesi” konulu bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Doç. Dr. İsmail KIRAN’ın danışmanlığında yürütülmüştür.

Tez çalışmalarım süresince göstermiş oldukları destek ve yardımlarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. İsmail KIRAN’a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca deneysel çalışmalarına katkılarından dolayı Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ’ye, Sayın Doç. Dr. Betül DEMİRCİ’ye ve Arş. Gör. Gökâl İŞCAN’a ve Uzm. Ecz. Emil Civişov’a

Spektroskopik analiz çalışmalarına katkıda bulunan Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (BİBAM)’ne,

Son olarak çalışmalarım sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme ve arkadaşlarıma,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

Zeynep DURCEYLAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TESEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii

BÖLÜM-1: GİRİŞ

1. Giriş.....	2
1.1. Biyotransformasyon.....	4
1.1.1. Biyotransformasyonun tanımı.....	4
1.1.2. Biyotransformasyonun kısa tarihçesi.....	4
1.1.3. Biyotransformasyon ve enzimler.....	7
1.1.4. Biyokatalizörler.....	9
1.1.5. Enzimatik reaksiyonların avantajları.....	13
1.1.6. Biyotransformasyon teknikleri.....	15
1.1.7. Başlıca biyotransformasyon reaksiyonları.....	16
1.1.8. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen faktörler.....	17
1.1.9. <i>Neurospora crassa</i>	17
1.1.10. Terpenler.....	18
1.1.10.1. Seskiterpenler.....	20

BÖLÜM-2: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Biyotransformasyon Çalışmaları.....	22
--	----

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması.....	22
2.1.2. <i>N. crassa</i> 'nın üretimi için kullanılan sıvı besi yeri bileşenleri.....	22
2.1.3. Mikroorganizmanın hazırlanması.....	22
2.1.4. Substratın hazırlanması.....	23
2.1.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu.....	23
2.1.6. Metabolitlerin izolasyonu.....	23
2.1.7. Genel deneysel bilgiler.....	24
2.1.8. Seskiterpen halkasının numaralandırılması.....	24
2.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....	25
2.2.1. Kullanılan mikroorganizmalar.....	25
2.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini.....	25
2.2.3. DPPH radikal süpürücü etkinin İTK ile incelenmesi.....	26

BÖLÜM-3: SONUÇ ve TARTIŞMA

3.1. Substrat Molekülü ve Yapı Tanımlanması.....	28
3.2. Karyofillen Oksit'in <i>Neurospora crassa</i> ile Biyotransformasyonu.....	29
3.3. Karyofillen Oksit ve Metabolitin Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları...	32
3.4. Karyofillen Oksit ve Metabolitin Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	33

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ.....	34
---------------------------------------	-----------

BÖLÜM-5: SPEKTRUMLAR

Spektrum 1: Karyofillen oksit'in MS spektrumu.....	41
Spektrum 2: Karyofillen oksit'in ¹ H NMR spektrumu.....	42
Spektrum 3: Karyofillen oksit'in ¹³ C NMR spektrumu.....	43

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
Spektrum 4: Metabolitin'in MS spektrumu.....	44
Spektrum 5: Metabolit'in ¹ H NMR spektrumu-1.....	45
Spektrum 6: Metabolit'in ¹ H NMR spektrumu-2.....	46
Spektrum 7: Metabolit'in ¹³ C NMR spektrumu.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1.	Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu.....	6
1.2.	Oksidoredüktazların genel reaksiyon tipi.....	7
1.3.	Transferazların genel reaksiyon tipi.....	8
1.4.	Hidrolazların genel reaksiyon tipi.....	8
1.5.	Liyazların genel reaksiyon tipi.....	8
1.6.	İzomerazların genel reaksiyon tipi.....	9
1.7.	Ligazların genel reaksiyon tipi.....	9
1.8	<i>N. crassa</i> 'nın sıvı besi yerindeki görünümü.....	18
1.9.	Terpenlerin temel yapı birimleri.....	19
2.1.	Karyofillen oksit molekülünün numaralandırılması.....	24
3.1.	Karyofillen oksit molekülünün yapısı.....	28
3.2.	Karyofillen oksit'in <i>Neurospora crassa</i> ile biyotransformasyonu...	31
3.3.	CO ve COM1' in antioksidan aktivite incelemesi.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	12
1.2. Terpenlerin sınıflandırılması.....	19
3.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) (µg/ml) sonuçları.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
¹³ C-NMR	Karbon 13-Nükleer Manyetik Rezonans
CO	Karyofillen oksit
COM1	12-hidroksi karyofillen oksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DPPH	Difenil pikril hidrazil
EIMS	Elektron iyonizasyonu kütle spektrumu
EtOAc	Etil asetat
G (+)	Gram pozitif
G (-)	Gram negatif
GC	Gaz Kromatografisi
¹ H-NMR	Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
H ₂ O	Su
IUB	Uluslar Arası Biyokimya Derneği
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MHA	Mueller Hinton agar
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
MR	Metisillin dayanıklı
MS	Kütle spektrumu
MÖ	Milattan önce
N	Normal
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Sodyum bifosfat

Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
OGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik izolatlar
OH	Hidroksil
ppm	Milyonda bir kısım
St1	Kloramfenikol
St2	Ampisilin
St3	Ketokonazol

BÖLÜM-1: GİRİŞ

1. GİRİŞ

Günümüzde biyotransformasyon, biyoteknolojinin temel konularından biri olarak hızla gelişmektedir (Evans,1989). Biyoteknoloji; mikroorganizmaların, hücre ve doku kültürlerinin ve bunların çeşitli kısımlarının teknik uygulama potansiyelinden yararlanmak amacıyla biyoloji, kimya, biyokimya, mikrobiyoloji, genetik mühendisliği ve daha birçok bilim dalının bütünleşmiş bir uygulama alanını kapsamaktadır. Biyoteknoloji, diğer birçok bilim dalından farklı olarak multi disiplinler özelliğe sahiptir (Telefoncu, 1995). Temel bilimlerdeki gelişmelerin üzerine kurulan günümüz biyoteknolojisinin çevre biyoteknolojisi, gıda biyoteknolojisi, mayalanma biyoteknolojisi, enzim biyoteknolojisi, tarım biyoteknolojisi, tıbbi biyoteknolojisi ve gen biyoteknolojisi gibi değişik uygulama alanları bulunmaktadır (Kolankaya, 2000).

Çalışmamızda *Neurospora crassa* fungal kültürünün seskiterpenler üzerindeki biyotransformasyon reaksiyonları açısından biyoteknolojik potansiyeli araştırılmıştır. *Neurospora crassa* nemli ve tropikal bölgelerde yaygın olarak görülen bir fungal kültürdür (Perkins and Turner 1988, Turner et al., 2001). Çeşitli *Neurospora* türleri ve alt türleri genetik ve biyokimyasal çalışmalar için önemli imkânlar sağlar (Gücin ve Tamer, 1994). Literatürde söz konusu fungal kültür kullanılarak yapılan çalışmalar:

- Steroid hormonlar ile biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve hidroksillenmiş türevlerin elde edildiği belirtilmiştir (Stone et al., 1955; Maugras et al., 1973a; Maugras et al., 1973b).
- Seskiterpen yapısına sahip sedrol, diizoforon ve patculi alkolün biyotransformasyonları gerçekleştirilmiş ve diizoforon ve sedrol'ün monohidroksillenmiş türevlerinin elde edildiği belirtilmiştir (Akar, 2005).

Bu bağlamda çalışmamızda ilk olarak seskiterpen yapısına sahip, karanfil yağından izole edilen, gıda, koku ve kimya sektöründe kullanım alanı olan karyofillen oksit molekülünün biyotransformasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonucunda karyofillen oksitin bir monohidroksillenmiş türevi elde edilmiştir. İkinci aşamada ise elde edilen türevin antimikrobiyal ve DPPH radikal süpürücü etkisi incelenmiştir.

1.1. Biyotransformasyon

1.1.1. Biyotransformasyonun tanımı

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik sistemlerin doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak, doğal substratları olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümler söz konusudur (Davies et al., 1989; Martin, 1991; Poppe and Novak, 1992; Roberts, 1992; Hanson, 1995; Berger, 1995; Loughlin, 2000; Faber, 2004). Günümüzde önemi giderek artan biyoteknolojik çalışmaların önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon reaksiyonları, aşağıda sıralandığı gibi pek çok kullanım alanı dışında toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre sorunlarının giderilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir (Hanson, 1995; Telefoncu, 1995; Faber, 2004).

- ✓ İlaç etken maddeleri üretimi,
- ✓ Koku maddeleri üretimi,
- ✓ Gıda katkı maddesi üretimi,
- ✓ Enerji üretimi,
- ✓ Antibiyotik üretimi,
- ✓ Aminoasit üretimi.

1.1.2. Biyotransformasyonun kısa tarihçesi

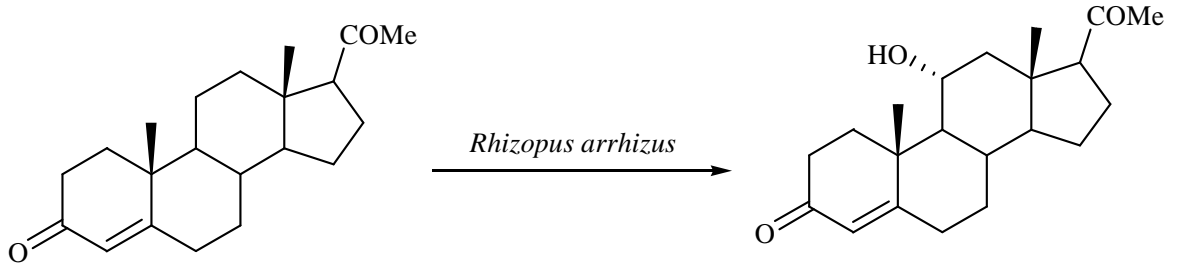
Biyotransformasyon ve biyoteknoloji birlikte düşünüldüğünde M.Ö 3000 yılında ilk ekmek mayasının, ilk alkolik mayalanmanın ve ilk sirke yapımının gerçekleştirildiği dönemlere kadar gidilebilir. Elbette o dönemlerde bu işlemler bilinçli olarak yapılmasa da insanlar bu sayede ilk kez mayalanmayı öğrenmişlerdir. Sonraki dönemlerdeki önemli gelişmeler ise tarihsel gelişimleri baz alınarak aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Roberts, 1992; Telefoncu, 1995; Hanson, 1995).

- M.Ö 2000 yılında Mezapotamya’da şarap üretimi,
- MÖ. 300 yılında bira üretimi,
- 1150 yılında etanol üretimi,
- 14. yy’da endüstriyel anlamda sirke üretimi,
- 1650 yılında kültür mantarı üretimi,
- 1818 yılında mayaların mayalanma özelliğinin keşfedilmesi.

Biyotransformasyon alanındaki ilk uygulamayı, Pasteur tarafından 1858 yılında *Penicillium glaucum* fungal kültürü ile DL-amonyum tartarattan L-amonyumun, D-enantiyomerinin seçimli yıkımı ile elde edilmesi oluşturmaktadır. Yine 1864 yılında Pasteur tarafından yapılan çalışmada, etanolün *Acetobacter aceti* ile asetik asite biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, biyotransformasyon alanında literatürde yayınlanan ilk çalışmadır. Bu çalışmalar 1886’da Brown tarafından genişletilmiş ve etanolün oksidasyonunu da gerçekleştiren *Bacterium aceti* olarak adlandırılan mikroorganizma ile propanol, propiyonik aside yükseltgenmiştir. Bu çalışma aynı organizma ile mannitolün fruktoza ve dekstrozun glukonik aside biyotransformasyonu ile ilgili Berthelot tarafından daha önce yapılan çalışmaların devamıdır. Bununla birlikte daha önceki çalışmaların çoğunda saf kültürlerin eksikliği söz konusudur. 1874’te Dumas tarafından yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile sülfürün, hidrojen sülfüre indirgendiği belirtilmiştir. Bunu 1898’de Windisch tarafından furfuralın, furfuril alkolle indirgenebileceğinin açıklanması izlemiştir. Bu yüzyılın başlarında *S. cerevisiae* fungal kültürünün kullanımına dayanan pek çok biyotransformasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Özellikle Liebig ve Neuberg tarafından gerçekleştirilen bu biyotransformasyonların bazıları 1. Dünya savaşı süresince aseton, gliserol ve bütanolün mikrobiyolojik olarak üretimine yöneliktir. 1921’de Neuberg tarafından maya ile kiral asetoin kondenzasyonu geliştirilmiştir. Fermantasyon ortamına benzaldehidin ilave edilmesi ile asetaldehit kondenzasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta ketol oluşmuştur. Bu çalışma, 1934’te bir alkaloid olan efedrin’in ticari sentezine temel oluşturmuştur. Yine 1930’larda vitamin C’nin sentezi endüstriyel uygulamalarda yararlı bir gelişmedir. Modern uygulamaların temelini steroid hormonların mikrobiyal transformasyonu oluşturmuştur. Buna en iyi örnek, dehidroizoandrosteron ve testosteron arasındaki dönüşüm reaksiyonudur. 1937 yılında *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen bu dönüşümün

ilk aşamasında, söz konusu fungal kültür dehidroizoandrosteronu androsterodiona oksitlemiş, daha sonra da C-17'de bulunan keto grubu seçimli ve stereospesifik olarak testosteron vermek üzere alkole indirgenmiştir (Hanson, 1995; Roberts et al., 1995; Dixan, 1999; Faber, 2004).

1952 yılında ise Murray tarafından *Rhizopus arrhizus* fungal kültürü ile progesteronun 11. pozisyonuna bir hidroksil grubunun α - konumunda stereospesifik olarak ilavesi gerçekleştirilerek 11 α -hidroksiprogesteron molekülü sentezlenmiştir (Şekil 1.1) (Murray and Peterson, 1952).



Şekil 1.1. Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu

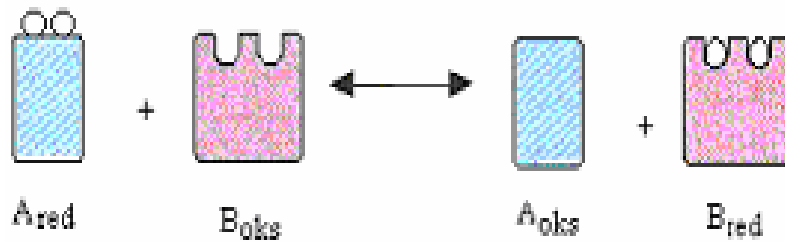
Bu çalışmayı takiben androstenedionun bakteriyel biyotransformasyonu ile çeşitli steroid hormonların eldesi gerçekleştirilmiştir. İlaç etken maddesi üretiminde önemli bir gelişme, *Penicillium chrysogenum* tarafından üretilen doğal penisilinün β -laktam, ampicilin ve amoksisilin gibi yarı sentetik penisilinlerin etken maddesi olan 6-aminopenisillanik aside dönüşümünün keşfedilmesidir. İlaç etken maddesi özelliğine sahip moleküllerin içerdiği fonksiyonel grupların stereo kimyası, ilaçların etkinliği bakımından çok önemlidir. Genellikle yararlı etkileri bir enantiyomerde bulunan bu moleküllerin hazırlanmasında çoğu zaman güncel kimyasal yöntemler yetersiz kalmaktadır. Özellikle 1960'lardaki talidomit felaketiyle diğer enantiyomerlerin yan etki hatta toksik olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle spesifik enantiyomerin üretimi ilaç endüstrisinde önemlidir. Biotransformasyon reaksiyonları ile tek enantiyomerin seçimli üretimi daha kolay gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas putida* bu amaç için kullanılan mikroorganizmalardan biridir (Hanson, 1995).

Geçmişteki spesifik enzim uygulamaları, hazır enzim sistemlerine ulaşamaması nedeniyle kısıtlı iken, genetik mühendislik ve yeni geliştirilen DNA teknikleriyle bir organizmadan diğerine genetik bilgi transferine olanak sağlanmış ve bu sınırlama ortadan kaldırılmıştır (Hanson, 1995; Roberts et al., 1995; Dixan, 1999; Faber, 2004).

1.1.3. Biyotransformasyon ve enzimler

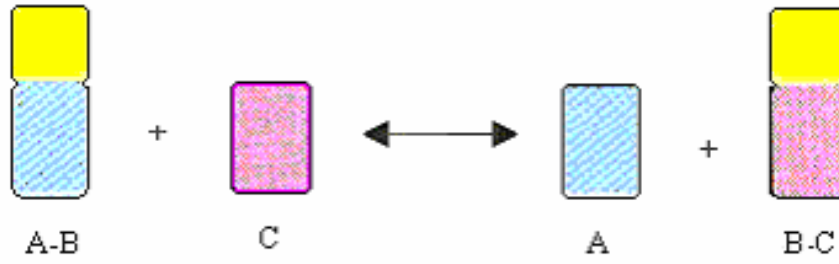
Temelde tüm biyotransformasyon reaksiyonları enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu enzim grupları hakkındaki bilgiler tüm biyokatalizörlerle uygulanan reaksiyonların mekanizmaları hakkında fikir vermektedir. Enzimler, IUB (International Union of Biochemistry) Adlandırma Komitesi tarafından, katalizledikleri reaksiyon çeşitlerine göre birçok alt grupları olmakla birlikte başlıca 6 ana gruba ayrılmışlardır (Gözükara, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Koolman and Röhm, 2002). Bunlar;

1) **Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarını katalizler. Örneğin; CH-OH, CH=CH, C=O, CH-NH₂, CH-NH gruplarının indirgenme ve yükseltgenmelerini katalizleyen enzimler bu gruptadır. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir;



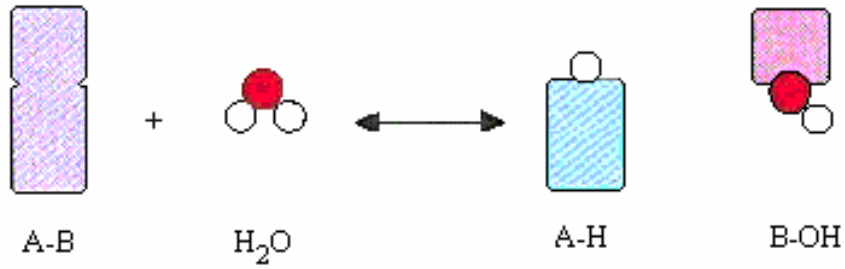
Şekil 1.2. Oksidoredüktazların genel reaksiyon tipi

2) **Transferazlar:** Fonksiyonel grupların transferini katalizler. Örneğin; fosfat, asetat, glikozil ve açıl gibi fonksiyonel grupların bir substrattan başkasına eklemesini sağlar. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



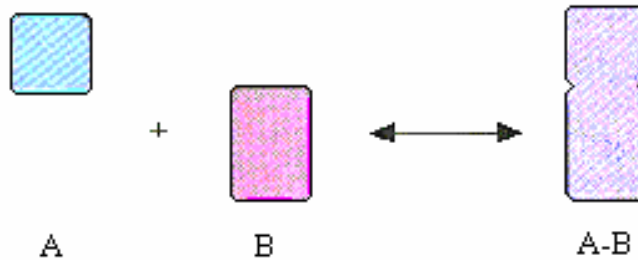
Şekil 1.3. Transferazların genel reaksiyon tipi

3) Hidrolazlar: Esterlerin, glikozitlerin, amitlerin ve peptidlerin hidrolizlerini katalizleyen enzim sistemleridirler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



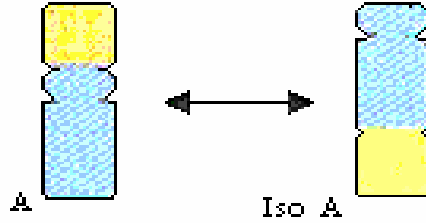
Şekil 1.4. Hidrolazların genel reaksiyon tipi

4) Liyazlar: Genelde H-X tipinde fonksiyonların C=C, C=O ve C=N çifte bağlarına katılımını veya çıkışını sağlayan reaksiyonları katalizler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



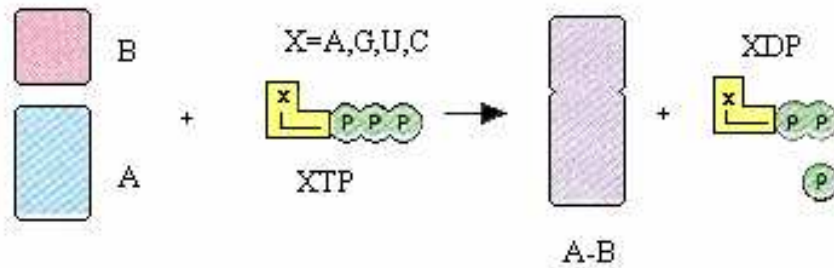
Şekil 1.5. Liyazların genel reaksiyon tipi

5) İzomerazlar: Bu tip enzimler çifte bağ yer değişimi, Z/E ve cis/trans izomerizasyon, rasemizasyon ve epimerizasyonlarını katalizlerler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 1.6. İzomerazların genel reaksiyon tipi

6) Ligazlar: ATP enerjisi sayesinde C-O, C-S, C-N ve C-C gibi katılımları katalizlerler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 1.7. Ligazların genel reaksiyon tipi

1.1.4. Biyokatalizörler

Biyotransformasyon reaksiyonları temel olarak bütün hücre sistemleri veya izole enzim sistemleri ile gerçekleştirilir. Bu reaksiyonlarda kullanılan biyokatalizörler şu şekilde sıralanabilir (Demirci,2000; Akar, 2005) :

A) Bütün hücre sistemleri

a. Mikroorganizmalar

Prokaryotlar (tek hücreli, çekirdek zarı olmayan canlılar) ve ökaryotlar (gerçek çekirdeğe sahip tek veya çok hücreli canlılar) olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır.

Prokaryot grubunda yer alan mikroorganizmalar biyoçeşitlilikte önemli rol oynamaktadır. Hayat zincirinin ilk halkalarını, evrimsel boyut da dâhil olmak üzere, prokaryot ve tek hücreli mikroorganizmalar başlatmaktadır. Daha çok teknik nedenlerden dolayı araştırmaların yoğun olarak ökaryotlar üzerinde yapılmış ve prokaryotlarla ilgili daha az araştırma olması, bu alandaki çalışmaların önemini bir kez daha göstermektedir. Bitki kimyası ile yapılan araştırmalarla kıyaslandığı zaman mikroorganizmalarla çok daha az araştırma yapılmıştır. Buna rağmen mikrobiyolojik kökenli birçok yeni madde tanımlanmıştır ve bunların birçoğu da önemli biyolojik aktivitelere sahip ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır (Grabley and Thiericke, 1999; Harvey, 2000; Kendrick, 2000).

Mikroorganizmalar, ilaç etken maddelerinin elde edilmesi yanında, çevre, koku, gıda ve kimya sanayi gibi çok farklı alanlarda da kullanılmaktadır (Grabley and Thiericke, 1999).

b. Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri

Tüm canlı bitki, doku kültürü laboratuvarlarında üretilmiş dokular ve hücreler, biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılabilir. Tüm canlı bitkinin biyokatalizör olarak kullanımında dönüşümü araştırılacak olan materyal, toprağa veya suya ilave edilebileceği gibi, bitkinin iletim sistemine doğrudan da verilebilir.

Bitki hücrelerindeki enzimlerin çeşitliliği göz önüne alınırsa bu tip reaksiyonların kararlı ve tutarlı olmaması, dolayısıyla reaksiyonların kontrolünün zorluğu kolaylıkla anlaşılır (Banthorpe, 1994; Rhodes et al., 1992).

c. Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri

Bitkilerde olduğu gibi tüm canlı hayvan, doku ve hücre kültürleri içerdikleri enzimlerden dolayı biyotransformasyon amacıyla kullanılmaktadır. Canlı hayvan çalışmalarına örnek olarak solucan, fare ve tavşan ile yapılan biyodönüşüm araştırmaları verilebilir. Bitkilerin biyokatalizör olarak kullanımındaki tüm olumsuzluklar, hayvanların biyokatalizör olarak kullanımında da geçerlidir. Ayrıca tüm hayvanlarla yapılan deneylerde sonuçların kan, idrar gibi vücut sıvılarında aranması daha spesifik laboratuvar şartlarını gerektirmektedir (Boulnois, 2000; Aviv et al., 1983; Miyazawa, 1998).

d. İnsan metabolizması

Biyotransformasyon reaksiyonları insan vücudunda sürekli gerçekleşmektedir. Bundan dolayı, insanda bu tip reaksiyonlar çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Oluşan ürünler, yani metabolitler vücut sıvılarında aranır. Bitki ve hayvanların kullanımındaki tüm dezavantajların yanında etik kurallarda bu tür deneylerin daha az uygulanmasına neden olmuştur (Rollas, 1992; Dutcher and Derendorf, 1995).

B) İzole enzimler:

Biyotransformasyon reaksiyonlarında doğal kaynaklardan izole edilen veya ticari olarak elde edilebilen saf veya yarı saf enzimler kullanılır. İzole enzimlerle yapılan çalışmalarda hedeflenen dönüşümler gerçekleştirilebilir, ancak izole enzimlerin pahalı olması, özel reaksiyon koşulları ve kofaktöre gereksinim duyması gibi dezavantajları vardır. Reaksiyon ürününün genellikle kolay elde edilebilmesi ise en büyük avantajlarından biridir.

Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin sahip oldukları avantaj ve dezavantajlar, karşılaştırmalı olarak Çizelge 1.1.'de özetlenmiştir (Faber, 2004).

Çizelge 1.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları

Biyokatalizör	Avantaj	Dezavantaj
Bütün hücre sistemleri	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kofaktöre ihtiyaç duyulmaz 	<ul style="list-style-type: none"> • Pahalı donanım, • Büyük hacimlerle çalışma zorluğu, • Düşük derişim toleransı nedeniyle düşük verim, • Organik çözücülere düşük tolerans, • Yan ürün olasılığı.
İzole enzimler	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Basit düzenekler, ▪ Basit işlemler, ▪ Yüksek derişim toleransı nedeniyle iyi verim 	<ul style="list-style-type: none"> • Kofaktöre ihtiyaç duyulur.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında, genellikle bütün hücre sistemlerinin tercih edilmesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir (Faber, 2004; Akar, 2005):

- Potansiyel olarak yararlı pek çok enzim doğal ortamı olan hücre dışında kararsız olabilir.
- Hücre içi enzimler, hücre dışında özellikle hücre gelişmesi sırasında salınan proteazlar gibi enzimlerin hidrolitik saldırısına maruz kalabilirler.
- Hücre içi enzimler, aktivite gösterebilmeleri için bir ya da daha çok kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktörler, canlı hücre içerisinde hazır iken hücre dışında bunların sağlanması ekonomik bir güçtür.
- Enzimlerin izole edilmesi zaman ve kaynak yönünden pahalıdır.

Yine biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemleri içinde mikrobiyal hücrelerin tercih edilmesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir (Faber, 2004; Akar, 2005):

- ✓ Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı ve buna bağlı olarak metabolik hızı, bitki ve hayvan hücreleri ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyon reaksiyonunun hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesini sağlar.
- ✓ Genellikle mikrobiyal hücrelerde metabolize edilen substrat çeşitliliği bitki ve hayvan hücrelerine göre daha fazladır.
- ✓ Mikrobiyal hücrelerin sahip olduğu boyutlar ve etkili hücre duvarı yapısı onları bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlı kılar. Bu da değişik kültür tekniklerinde hücrenin ortamdaki direnci adına bir avantajdır.

1.1.5. Enzimatik reaksiyonların avantajları

a. Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir.

Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen aynı reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kez daha hızlıdır. Bu değer kimi zaman 10^{12} düzeyine de ulaşabilir ki bu kimyasal katalizörlerin ulaşamayacağı bir hızı ifade eder. Kimyasal bir katalizör işlevini gerçekleştirme için genellikle % 0,1–1 mol aralığına ihtiyaç duyarken, enzimatik bir reaksiyonda bu oran % 10^{-3} – 10^{-4} düzeyine düşer. Bu da enzimleri oldukça etkili kılar (Faber, 2004).

b. Enzimler geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir.

Enzimler bu özellikleri ile doğal substratları olmayan sentetik substratlar üzerinde de etkili olabilirler. Ayrıca sıklıkla sulu ortamda çalışmayı gerektirmezler. Bu da organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren durumlar için bir avantajdır (Faber, 2004).

c. Enzimlerin geniş bir reaksiyon spektrumu vardır.

Tüm katalizörler gibi enzimler de bir reaksiyonu hızlandırır, ancak reaksiyonun termodinamik dengesi yönünde etkileri olmadığından, bazı enzim katalizli reaksiyonlar her iki yönde de gerçekleşebilir. Ayrıca organik reaksiyonların hemen her tipine karşılık gelen bir enzimatik reaksiyon vardır. Örneğin; ester, amid, lakton, laktam, eter, asit anhidrit, epoksit ve nitrillerin hidrolizi ya da sentezi, alkan, alken, aromatik, alkol, aldehit ve keton, sülfid ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, halojenleme ve dehalojenleme, alkilleme ve dealkilleme, izomerleşme, alkiloin ve aldol reaksiyonları gibi (Faber, 2004).

d. Enzimler ılımlı koşullarda çalışırlar.

Enzimatik reaksiyonlar pH 5–8 (genellikle pH 7) ve 20–40°C (genellikle 30°C) koşullarında gerçekleşir. Bu ılımlı koşullar sayesinde istenmeyen yan reaksiyonlar minimum düzeye indirgenir (Faber, 2004).

e. Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden kalabilirler.

Enzimlerin çalışma koşulları benzer ya da aynı olduğundan tek bir ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi, reaksiyonu kolaylaştırır (Faber, 2004).

f. Enzimler üç tip seçicilik gösterirler.

Kimyasal seçicilik: Fonksiyonel grubun bir tek tipi üzerine seçicilik gösteren enzimlerin bu özelliği sayesinde, reaksiyon verimli ve yan ürün olasılığı düşük olarak gerçekleşir (Faber, 2004).

Bölgesel seçicilik: Kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde enzimler aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara seçicilik gösterirler (Faber, 2004).

Enantiyomerik seçicilik: Enzimlerin substrattaki kiral seçiciliğidir. Özellikle enantiyomerik olarak ve yüksek saflıkta istenen ürünün hazırlanmasında çok önemli bir özelliktir (Faber, 2004).

g. Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi çok zor ya da imkansız reaksiyonlar enzimatik olarak kolayca gerçekleştirilebilir.

Enzimatik reaksiyonların sağladığı önemli avantajlar nedeniyle, biyotransformasyon uygulamaları güncel kimyasal reaksiyonlarla karşılaştırıldığında önemli üstünlüklere sahiptir. Bunlardan başlıcaları aşağıda sıralanmıştır (Hanson, 1995; Faber, 2004).

- ✓ İlaçların, zirai kimyasalların ve gıda katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasalların hazırlanmasında,
- ✓ Enzimatik reaksiyonlarla doğal olarak ya da kimyasal olarak sentezlenmiş çeşitli bileşiklerin özel modifikasyonlarının hazırlanmasında,
- ✓ Yapı-etki ilişkilerinin araştırılması için türevlerin hazırlanmasında,
- ✓ Biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanmasında,
- ✓ Biyolojik sentez çalışmaları ve biyolojik sistemlerin taklit edilmesinde,
- ✓ Biyodegradasyonda (çevre, çevrebilim, geri dönüşüm, biyokütle, biyoenerji konularında) ön plana çıkmaktadır.

Ayrıca bu özellikleri ile biyotransformasyon reaksiyonları daha ekonomik ve çevre dostu alternatifler olarak nitelendirilirler (Faber, 2004).

1.1.6. Biyotransformasyon teknikleri

Biyotransformasyonda kullanılan beş teknik vardır (Telefoncu, 1995).

a. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon: Hücreler ideal besi ortamında üretilir. Yapılan ön-testlerle belirlenen konsantrasyonda ortama biyotransformasyona uğratılacak substrat katılır.

b. Stasyoner hücreler ile biyotransformasyon: Mikroorganizma ideal besi ortamında üretilir, filtrasyon ile ayrıldıktan sonra biyotransformasyon ortamında dağıtılır ve substrat ilave edilir.

c. Sporlar ile biyotransformasyon: Mikroorganizmalar spor oluşumu için ideal koşullarda üretilir ve sporlar misellerden ayrılıp soğukta saklanır. Biyotransformasyon yapılacağı zaman bu sporlardan yararlanır.

d. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon: Mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren bir polimer matrikste tutulur. İmmobilize hücreler istenildiği anda ortamdaki uzaklaştırılabilir ve yeniden kullanılabilir.

e. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon: İmmobilize hücrelerin biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılması daha ekonomik olmasına rağmen çok basit yapılı bir hücre bile binlerce enzim içerdiğinden istenmeyen yan reaksiyonların oluşması ve ortamın bu reaksiyonların ürünleri ile kirletilmesi söz konusudur. Halbuki yalnız biyotransformasyonu katalizleyen enzimin kullanılması durumunda bu sakınca ortadan kalkmaktadır.

1.1.7. Başlıca biyotransformasyon reaksiyonları

Bu reaksiyon tipleri 7 şekilde gruplandırılabilir (Faber, 2004):

- Oksidasyon
- Redüksiyon
- Hidroliz reaksiyonlar
- Katılım ve kondenzasyon
- İzomerleşme
- Yeni C-C bağlarının oluşumu
- Yeni hetero atomların ilavesi

Burada sıralanmış olan reaksiyonlar biyotransformasyon reaksiyonlarının neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir. Geniş bir çeşitliliğe sahip biyotransformasyon reaksiyonlarının bir özelliği de, sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek reaksiyonları gerçekleştirebilme olanağıdır. Bu tür reaksiyonları aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

- ✓ Benzer fonksiyonel gruplardan yalnız birinin reaksiyona sokulması,
- ✓ Enantiomerlerden birinin seçimli dönüşüme uğratılması ile rasemik karışımların ayrılması,
- ✓ Asimetrik merkeze bir grup sokulması,
- ✓ Aktive edilmemiş C-atomunun seçimli olarak fonksiyonel grup haline dönüştürülmesi.

1.1.8. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen faktörler

Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörleri canlılar ve enzimler olduğundan, reaksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli şartlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha farklı ve daha hassas olabilmektedir. Besi yerinin bileşimi, substratın derişimi, çalkalama hızı, zaman, ortamın sıcaklığı ve pH biyotransformasyon reaksiyonları için önemli faktörlerdir (Demirci, 2000; Akar, 2005).

1.1.9. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa, bir kırmızı ekme mantarı türüdür. “Sinir sporu” anlamına gelen *Neurospora* ismi, sporları üzerindeki çizgilerin aksonlara benzemesinden dolayıdır. *N. crassa*, laboratuvarında kolay büyütülebildiği ve haploit hayat döngüsü genetik analizi kolay kıldığı için bilimde bir model organizma olarak kullanılmaktadır. *Neurospora* genetiği üzerinde araştırma yapan Edwart Tatum ve George Wells Beadle Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödüllerini kazanmışlardır. Beadle ve Tatum, *N. crassa*'yı X ışınlarına maruz bırakıp mutasyonlara yol açmış, sonra da belli enzimlerde

bozukluklardan kaynaklanan metabolik bozukluklar gözlemlemiştir. Bu deneyler, iki araştırmacıyı belli genlerin belli proteinleri kodladığı sonucuna ulaştırmış ve “bir gen, bir enzim” hipotezini ortaya çıkarmıştır. Enzimlerin birden fazla proteinden oluştuğu fark edilince bu deyim “bir gen, bir polipeptid” olarak değiştirilmiştir. *N. crassa*'nın genomunun dizini 2003'te tam olarak çözülmüştür. Yedi kromozomdan oluşan genom toplam 43 mega baz uzunluğunda olup, yaklaşık 10.000 genden oluşmaktadır. (http://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Neurospora_crassa&oldid=741324).

Doğal ortamında *N. crassa*, tropik ve subtropik bölgelerde yaşar. Orman yangınlarından arta kalan bitki kalıntıları *Neurospora* türleri için uygun bir yaşam alanıdır (Perkins and Turner 1988, Turner et al., 2001).

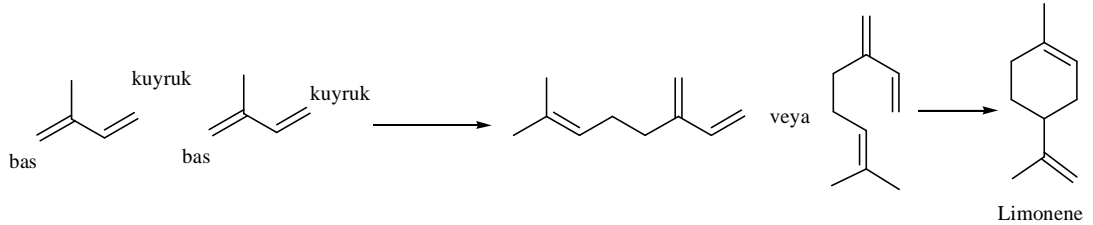


Şekil 1.8 *N. crassa*'nın sıvı besi yerindeki görünümü

1.1.10. Terpenler

Terpenler, doğal ürünlerin en yaygın gruplarından biridir. Bitkilerde ve hayvanlarda birçok farklı işlevleri bulunurken, gıdalarda da aroma bileşenleri olarak önemlidirler. Örneğin turuncgiller, tarçın ve diğer baharat aromaları birkaç terpen ile karakterize edilir. Limon ve sitral (her ikisi de limonda bulunur), kafur, pinen (çam ağaçları), ögenol (karanfil), anetol, timol, geraniol (gül) ve mentol en yaygın bilinen terpenlerdir.

Kimyasal anlamda terpenler, yapısı çeşitli fakat belli sayıda izopren birimlerine sahip olan bir moleküller grubu olarak tanımlanır (metilbüta-1,3-diene, hemiterpene olarak isimlendirilen 5 karbonlu atomdur) (Şekil 1.9) (Ruzicka and Meyer, 1921).



Şekil 1.9. Terpenlerin temel yapı birimleri

Bu tanım, temel moleküler iskelette izopren sayılarına dayanan terpenlerin rasyonel bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Terpenlerin sınıflandırılması

	Terpenler	İzopren birimi sayısı	Karbon atom sayısı
1	Monoterpenler	2	10
2	Seskiterpenler	3	15
3	Diterpenler	4	20
4	Sesterpenler	5	25
5	Triterpenler	6	30
6	Karotenoitler	8	40
7	Politerpen	> 100	> 500

Mono-, seski-, di-, ve sesterpenler baş-kuyruk şeklinde bağlanmış izopren'lerden meydana gelmiştir. Triterpenler, iki C15 ve karotenoidler (tetraterpenler) iki C20 biriminin kafa-kafaya bağlandıkları yapılarıdır. Terpenlerin çoğu hidrokarbon yapısına

sahip bileşiklerdir; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren gruplarda içerirler. Bu türevler çoğunlukla “**terpenoidler**” olarak adlandırılırlar. Mono- ve seskiterpenler uçucu yağların temel bileşenleri olmakla birlikte, diğer terpenler reçine, mum ve kauçuğun ana bileşenleridirler (<http://www.food-info.net/tr/qa/qa-fi69.htm>).

1.1.10.1. Seskiterpenler

Seskiterpenler, 15 karbon atomu içeren ve üç izopren biriminin birleşmesiyle oluşan doğal bileşiklerdir. Seskiterpen yapısında siklik hidrokarbonlar, alkoller, ketonlar ya da laktonlar bulunabilir. Bu bileşikler pek çok canlı sistemde özellikle de yüksek yapılı bitkilerde bulunurlar ve bir yüzyıldan fazla zamandır uçucu yağların bileşenleri olarak bilinirler. Eski araştırmacılar saf homojen bileşiklerin izolasyonunda güçlüklerle karşılaşmışlardır. Ayrıca alışılmış oksidatif degradasyon metotları seskiterpenoit bileşiklerine uygulandığında yeterli verim elde edilememektedir. Çünkü, ürünler çok basit bileşenler ya da kompleks karışımları içerdiği için ana bileşikler hakkında çok az bilgi elde edilebilmiştir. Bu bileşiklerin kimyası sadece son zamanlarda detaylı olarak incelenmiştir. Seskiterpenler, doymamış bileşiklerdir ve asiklik, monosiklik, bisiklik ya da trisiklik olabilirler. Günümüzde 1000’den fazla seskiterpen bilinmekte ve bunlar 100’den fazla karbon iskeleti taşımaktadır. Terpen türevlerinden mono ve seskiterpenler, uçucu bileşikler olup uçucu yağların bileşiminde yer alırlar. Bu bileşikler aromatik bitkilerin ve gıdaların aroma, koku ve tatlarından sorumlu olan maddelerdir. Aynı zamanda başta antimikrobiyal etki olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere de sahiptirler. Gıda, parfümeri ve ilaç sanayinde mono ve seskiterpenlerin yeni türevleri, geniş kullanım alanları bulabilme potansiyeline sahip olabilmektedirler. Bu nedenle bu bileşiklerin yeni türevlerinin eldesinde, son yıllarda hızlı bir gelişme gösteren biyotransformasyon tekniği, kimyasal sentez yöntemlerine tercih edilmektedir (Pinder, 1960; Skeya, 2000; Yıldırım, 2004; Akar, 2005).

BÖLÜM-2: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Biyotransformasyon Çalışmaları

2.1.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Çalışmamızda kullanılan fungus *Neurospora crassa*, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Kültür koleksiyonundan sağlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.2. *N. crassa*'nın üretimi için 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 tamamlanmıştır. pH 7,0 olacak şekilde 0,1 N HCl veya KOH ilave edilmiştir. 250 ml'lik erlenlerin her birine 100ml besiyeri konularak erlenlerin ağzları pamukla kapatılıp pamuğun üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Besiyerleri, 121 °C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3. 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 edilmiştir. Daha sonra çalkalamalı koşullarda (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmanın yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra (24-48 saat) bu misel büyüme, eşit miktarda steril sıvı besiyeri içeren diğer erlenlere steril koşullarda aktarılmıştır. Sıvı besiyerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı koşullarda (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki aşamada ortama substrat eklenerek biyotransformasyon süreci başlatılmıştır.

2.1.4. Substratın hazırlanması

200 mg karyofillen oksit 2 ml asetonda çözüldükten sonra bölüm 2.1.3' de belirtildiği şekilde, kültüre edilen fungusu inkübasyonun ikinci gününde eşit hacimlerde olacak şekilde, ilave edilmiştir. İnkübasyon, oda sıcaklığında 120 rpm hızla çalıştırılan dairesel çalkalayıcı üzerinde, bir hafta boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç içerisinde biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve dönüşümlerin maksimuma ulaştığı İTK ve GC-MS sistemi ile tespit edildiğinde numuneler üzerine etil asetat (EtOAc) ilave edilerek mikroorganizmaların canlılığına son verilmiş ve biyotransformasyon durdurulmuştur. Daha sonraki aşamada ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarına geçilmiştir.

2.1.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Metabolit oluşumunu izlemek amacıyla yapılan bir işlemdir, deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 2 ml alınmış ve 3-5 ml EtOAc ilave edilmiştir. 1 dakika süreyle vorteks kullanarak karıştırılmıştır. EtOAc'lı üst faz, başka bir pipet ile susuz Na₂SO₄'tan geçirilerek bir numune kabına aktarılıp azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır. İTK ve GC-MS sistemi ile kontrol edilmiştir.

2.1.6. Metabolitlerin izolasyonu

Biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besi yerlerine 1/4 oranında EtOAc ilave edilmiştir. 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 edilmiştir. Toplanan ekstreler susuz Na₂SO₄'tan geçirilerek yoğunlaşmaya bırakılmıştır. Elde edilen ekstre kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kolonda çözücü sistemi

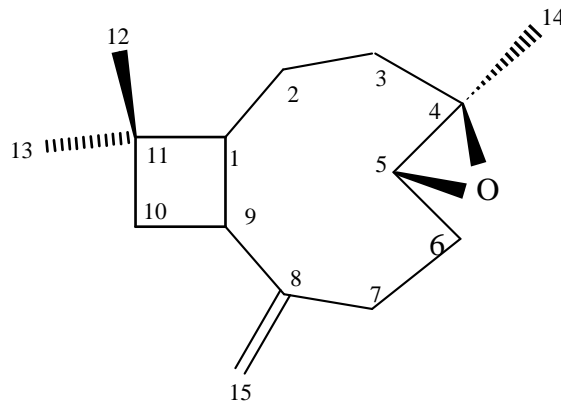
olarak n-hegzan'ın polaritesi petrol eteri ile artırılarak gradient bir sistem kullanılmıştır. Ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlenmiştir.

2.1.7. Genel DeneySEL Bilgiler

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitin yapısı, spektral metotlar (^1H NMR, ^{13}C NMR, GC-MS, EIMS) kullanılarak aydınlatılmıştır. GC-MS ve EIMS 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, 0.25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF₂₅₄) üzerinde (60-80°C) (7-3) hegzan–aseton çözelti sistemiyle izlendi. Bileşiklerin spotları vanilin-sülfirik asit çözeltisiyle renklendirildikten sonra ısıtılarak belirgin hale getirildi.

2.1.8. Seskiterpen halkasının numaralandırılması

Çalışmamızda biyotransformasyonu incelenen karyofillen oksit molekülünün numaralandırılması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Karyofillen oksit molekülünün numaralandırılması

2.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

2.2.1. Kullanılan mikroorganizmalar

Değişik kültür koleksiyonlarından (ATCC, NRRL) ve klinik (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi) izolatlardan elde edilen mikroorganizmalar %10'luk gliserol içinde Eppendorf tüplerde stok olarak -85°C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerden önce canlandırmak ve saflık kontrolü için petrielerde *Candida albicans* Sabouraud Dextrose Agar (SDA), diğer Gram pozitif G(+) ve Gram negatif G(-) bakteriler ise Müller Hinton Agar (MHA) besiyerlerine 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. Kullanımdan önce bütün mikroorganizmalar çift kuvvet Müller Hinton Broth (MHA) besiyerlerine aktarılıp tekrar 37°C'de 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini

Antimikrobiyal aktivite, *in vitro* mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Koneman et al., 1997; İşcan vd., 2002). Numuneler ve standartlar dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak 2000 µg/ml olacak şekilde çözdürülmüştür ve stok çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra numuneler önce 2 ml'lik Eppendorf mikrotüpler içinde 1,95 µg/ml'ye kadar distile su ile seri olarak seyreltilmiş aynı numuneler daha sonra 100 µl olmak üzere mikroplaklara aktarılmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakların son sırası mikroorganizma gelişimini görmek amacıyla sadece distile su ile doldurulmuştur ve değerlendirme aşamasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yukarıda belirtildiği üzere 24 saat 37°C'de sıvı besi ortamında çoğaltılmış mikroorganizmalar 10⁸ koloni oluşturucu ünite/ml olacak şekilde (çift kuvvet sıvı besi yerinde MacFarland No:0.5 standardı ile karşılaştırılarak) steril ortamda seyreltilmiştir. Mikroorganizmalar 100 µl olmak üzere tüm kuyucuklara ilave edilip 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Standart antimikrobiyal ajan olarak kloramfenikol ve ampicilin, *Candida albicans* için ise antifungal standart madde olarak ketokonazol negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bulanıklığın çok az olduğu ve üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki konsantrasyon, minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) olarak µg/ml cinsinden belirlenmiştir.

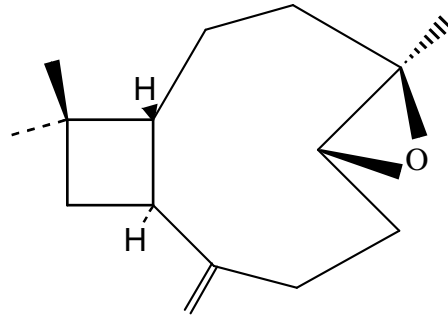
2.2.3. Radikal süpürücü etkinin İTK ile incelenmesi (Antioksidan aktivite)

Serbest radikal süpürücü etkisi azot merkezli stabil bir radikal olan 1,1-difenilpikrilhidrazil (DPPH•) kullanılarak Burits ve Bucar'a göre incelenmiştir (Burits and Bucar, 2000). CO ve COM1 ile birlikte pozitif standart olarak kullanılan Askorbik asit ve BHT (Butillenmiş Hidroksi Toluen) Silika Jel F₂₅₄ kaplı alüminyum plaklara (Merck, Darmstadt, Germany) uygulanarak n-hekzan: etil asetat (4:1, h/h) çözücü sistemi ile güçlendirildikten sonra %0,2'lik DPPH metanol çözeltisi plağa püskürtülmüştür. 30 dak. sonra İTK plağı üzerindeki mor tabandaki sarı lekeler standartlarla karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM-3: SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. Substrat Molekülü ve Yapı Tanımlanması

Biyotransformasyon çalışmasında kullanmış olduğumuz karyofillen oksit molekülü, Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. Molekül yapısı Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Karyofillen oksit molekülünün yapısı

Bu bileşiğin ^1H NMR spektrumu incelendiğinde, yapıdaki 3 tane metil gruplarına ait pikler sırasıyla 0,81 (6H, s, 13-Me ve 12-Me) ve 1,27 (3H, s, 14-Me)’de ve metilen grubuna ait olan pikler ise 2,10 (2H, m, 15-CH₂) ppm’de gözlenmiştir (Spektrum 2).

^{13}C NMR spektrumunda ise 3 tane metil piki [17.00 ppm (C-14), 21.63 ppm (C-12), ve 27.22 ppm (C-13)]; 5 tane metilen piki [39.16 ppm (C-3), 34.02 ppm (C-10), 30.20 ppm (C-6), 29.90 ppm (C-2) ve 29.80 ppm (C-7)]; 3 tane metin piki [59.82 ppm (C-5), 48.74 ppm (C-1) ve 39.77 ppm (C-9)] ve 2 tane kuartener karbon atomuna ait pik [63.75 ppm (C-4) ve 50.77 ppm (C-11)] ve son olarak da 2 tane çifte bağ içeren karbon atomlarına ait pik [151.83 ppm (C-15) ve 112.76 ppm (C-8)] gözlenmesi, söz konusu yapıyı doğrulamıştır (Spektrum 3).

3.2. Karyofillen Oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonu

Sıvı besiyerinde büyütülen *N. crassa* fungal kültürü, karyofillen oksit molekülü ile 7 gün boyunca dairesel çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda elde edilen karışımın ince tabaka kromatografisi (İTK), çözeltide başlangıç maddesi dışında bir polar metabolitin varlığını ortaya koymuştur. Başlangıç maddesi, %5'lik n-hegzan-petrol eteri karışımı ile kolondan izole edilmiş ve yapısı, mevcut NMR spektrumları ile karşılaştırılarak aydınlatılmıştır.

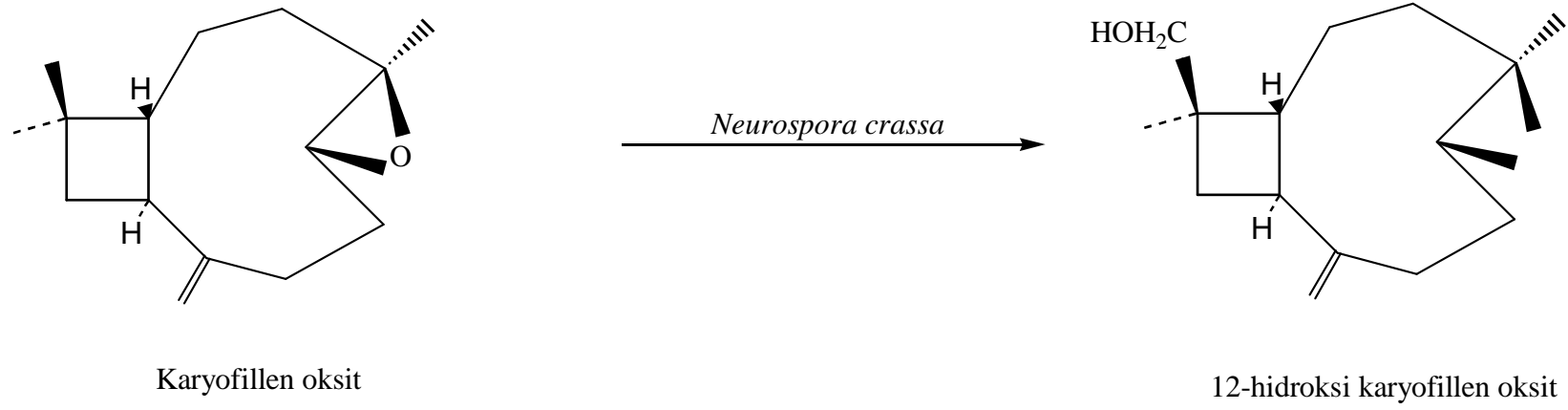
Daha sonra kolondan % 20'lik n-hegzan-petrol eteri elusyonu kullanılarak beyaz renkli katı bir metabolit izole edilmiştir.

Metabolitin kütle spektrumunda molekülün kapalı formülü olan $C_{15}H_{24}O_2$ 'e karşılık gelen 236'da bir pik gözlenmiştir (Spektrum 4).

Bu metabolitin 1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde, substrat molekülüne çok benzeyen bir madde olduğu belirlenmiştir. Bu metabolitin 1H NMR sonuçları başlangıç maddesi olan karyofillen oksit molekülünün 1H NMR sonuçlarıyla benzer olmakla birlikte metil gruplarına ait olan piklerde aşağı bölgeye doğru bir kayma gözlenmiştir. Ayrıca δ_H 3,33'deki yeni bir pikin varlığı, yapıya bir hidroksil grubunun ilave edilmiş olabileceğini göstermiştir (Spektrum 5 ve 6). Aynı metabolitin ^{13}C NMR sonuçları 15 karbonun rezonansını göstermiştir. Spektrum dikkatlice incelendiğinde, metil gruplarına ait olan 3 pikten 1 tanesinin metabolitin spektrumunda yer almadığı gözlenmiştir. δ_C 70,78 ppm'deki düşük alanlı hidroksil içeren yeni bir karbon pikinin varlığı ve başlangıçtaki yapıda bulunan 3 metil karbon pikinin 2'e düşmesi, metil gruplarından bir tanesinin hidroksillenmiş olduğunu ortaya koymuştur (Spektrum 7).

Elde edilen metabolitin yapısının 12- veya 13- hidroksi karyofillen oksit olduğu yukarıdaki bilgiler ışığında tespit edilmiştir. HMBC, nOe veya NOESY spektrumları alınmadığından, hidroksil grubunun 12. pozisyondaki metil grubuna mı yoksa 13. pozisyondaki metil grubuna mı bağlandığı tespit edilememiştir. Yapılan literatür araştırmaları sonucu elde edilen metabolit yapısının, karyofillen oksit molekülünün

Botrytis cinerea ile biyotransformasyonu sonucu oluşan ve 12-hidroksi karyofillen oksit olarak tanımlanan türevi (Duran et al., 1998) ile uyum gösterdiği saptanmıştır. Her iki molekülün de kütle, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları birbirleriyle örtüşmektedir. Bu verilerin uyumundan dolayı molekülün, 12-hidroksi karyofillen oksit olduğu ve mikrobiyal hidroksillemenin 12. pozisyonunda gerçekleştiğini ortaya konmuştur.



Şekil 3.2. Karyofillen oksit'in *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonu

3.3. Karyofillen Oksit ve Metabolitin Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Substrat (CO) ve metabolit (COM1) Gram pozitif G(+) ve Gram negatif G(-) insan patojeni mikroorganizmalara karşı bölüm 2.2.2’de belirtildiği şekilde incelenmiştir. Sonuçlar ayrı zamanlarda gerçekleştirilmiş üç deneyin ortalaması olarak Çizelge 3.1.’de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü üzere, gerek substrat gerekse metabolitin incelenen standart antimikrobiyal maddelere karşı zayıf antimikrobiyal etkili olduğu görülmüştür.

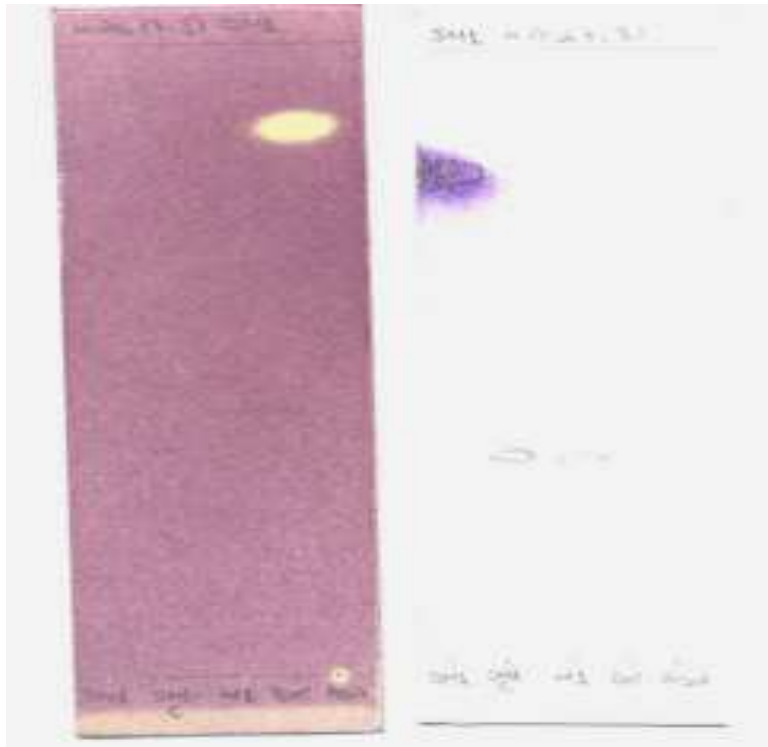
Çizelge 3.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ($\mu\text{g/ml}$) sonuçları

Patojen	Suş No	CO	COM1	St1	St2	St3
<i>Escherichia coli</i> , G(-)	NRRL B-3008	500	500	3.9	15.62	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , G(-)	ATCC 27853	500	500	7.8	15.62	-
<i>Proteus vulgaris</i> , G(-)	NRRL 3567	500	500	1.9	7.81	-
<i>Salmonella typhimurium</i> , G(-)	NRRL B-4420	500	500	7.8	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , G(+)	ATCC 12228	500	500	0.9	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (MR), G(+)	OGÜ	500	>1000	31.25	250	-
<i>Candida albicans</i> , maya	OGÜ	500	>1000	-	-	62.5

St1: Kloramfenikol; St2: Ampisilin; St3: Ketokonazol

3.4. Karyofillen Oksit ve Metabolitin Antioksidan Aktivite Çalışmaları

DPPH reaktifi kullanılarak yapılan antioksidan aktivite deneyinde de gerek substrat gerekse metabolit düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin olmadığı görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. CO ve COM1' in antioksidan aktivite incelemesi

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akar, T., 2005, Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Osmangazi Ü. Fen Bil. Ens., 101s.
- Banthorpe, D.V., 1994, Secondary metabolism in plant tissue culture: Scope and limitations, Nat. Prod. Rep. 11, 303-328.
- Berger, R.G., 1995, Aroma biotechnology, Springer Verlag, Berlin, 1995, 240p.
- Boulnois, G.J., 2000, Drug discovery in the new millennium: The pivotal role of biotechnology, Trends in Biotechnol. 18, 31-38.
- Burits, M. and Bucar, F., 2000, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil Phytother. Res., 14, 323-328.
- Davies, H.G., Gren, R.H., Kelly, D.R., and Roberts, S.M., 1989, Biotransformations in preparative organic chemistry: The use of isolated and whole cell systems in synthesis, Academic Pres, London, 134p.
- Demirci, F., 2000, Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal biyotransformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Ü. Sağlık Bil. Ens., 137s.
- Dixon, R.A. 1999, Plant natural products: The molecular genetics of biosynthetic diversity, Current Opinion in Biotechnology, 10, 130-136.
- Duran, R., Corrales, E., Galan, R.H., and Collado, I.G., 1999, Biotransformation of Caryophyllene Oxide by *Botrytis cinerea*, J. Nat. Prod., 62, 41-44.
- Dutcher, E., and Derendorf, H., 1995, Biotransformation In: Drug Actions, Medpharm. Sci. Pub., Stuttgart, pp. 19-31.
- Evans, W. C., 1989, Microbiological conversions, In: Trease and Evans Pharmacognosy, 13th Ed., pp. 302-307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Faber, K., 2004, Biotransformations in organic chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg, 454p.
- Gücin, F. Ve Tamer, A.Ü., 1994, Mikrobiyolojiye giriş, Uludağ üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ders notları, 198s.
- Gözükara, E.M., 1997, Biyokimya, Nobel tıp Kitapevleri, 2, 1225s.
- Grabley, S., and Thiericke, R., 1999, Drug Discovery From Nature, Springer-Verlag, Berlin.
- Hanson, J.R., 1995, An introduction to biotransformations in organic chemistry, Oxford University Press, Oxford, 92p.
- Harvey, A., 2000, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, Drug Discovery Today 5, 94-100.
- İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkcüoğlu M., and Başer, K.H.C. (2002). Antimicrobial screening: *Mentha piperita* essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3943-3946.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., 1997, Biyokimya, Şafak Yayınevi, Erzurum, 636s.
- Kendrick, W. B., 2000, Classification and biodiversity, Mycologue publications, New York.
- Kolankaya, N., 2000, Biyoteknolojiye bir bakış: Dünya ve Türkiye, Küreselleşme sürecinde biyoteknoloji ve biyogüvenlik, Sempozyum Bildirileri, 85s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., and Winn, W. C. (1997), Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology , Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, pp. 785-856.
- Koolman, J. and Röhm, K.H., 2002, Renkli biyokimya atlası, Nobel Tıp Kitapevleri, 435s.
- Loughlin, W.A., 2000, Biotransformations in organic synthesis, Bioresource Technology, 74, 49-62.
- Martin, A.M., 1991, Bioconversion of waste materials to industrial products, Elsevier Applied Science, London, 510p.
- Maugras, M.M., Hartemann, D., Granger, P., and Lematre, J., 1973a, Microbiological transformation of estrogens. Transformation of equilenine into 12 β -dihydroequilenine by *Neurospora crassa* . Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles, 277, 681-683.
- Maugras, M.M., Savigny, P., and Lematre, J., 1973b, Microbiological transformation of estrogens. 11 β -hydroxylation of estradiol by *Neurospora crassa*, Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles, 176, 3221-3223.
- Miyazawa, M., Nankai, H. and Kamcoka, H., 1995, Biotransformation of (+)-cedrol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*, Phytochemistry, 40, 69-72.
- Murray, H.C. and Peterson, D.H., 1952, Oxygenation of steroids by mucorales fungi, U.S. Patent 2602769 (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, USA).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Perkins, D.D. and Turner, B.C., 1998, *Neurospora* from natural Populations: Towardf the population biology of a haploid eukaryote, *Experimental Mycology* 12, 91-131.

Pinder, A.R., 1960, *THA Chemistry of the terpenes*, John Wiley&Sons, New York, 223p.

Poppe, L. and Novak, L., 1992, *Selective biocatalysis: A synthetic approach*, VCH, Weinheim, 319p.

Rhodes, M. J.C., Spencer, A., Hamill, J.D., and Robins, R.J., Flavor improvement through plant cell culture-In: *Biotransformation of Flavours*, Patterson, R.L.S., Charlwood, B.V., Macleod, G., Williams, A.A. (Ed.), 1992, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, pp. 42-64.

Roberts, S.M., 1992, *Preparative biotransformations: whole cell and isolated enzymes in organic synthyesis*, John Wiley&Sons, Chichester.

Roberts, S.M., Turner, N.J., Willets, A.J., and Turner M.K., 1995, *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*, Cambridge University press, Cambridge, 195p.

Rollas, S., 1992, *İlaçların metabolizması*, Marmara Üniversitesi Yayınları No: 525, Eczacılık Fakültesi No: 10, İstanbul.

Ruzicka, L. and Meyer, J., 1921, *Über sesquiterpenverbindungen I. Überführung descadinens in einen naphtalin-kohlenwasserstoff*, *Helvetica Chimica Acta*, 4, 505-510.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Schlenk, D., Stresser, D.M., Rimoldi, J., Arcand, L., Mccants, J., Nimrod, A.C., Benson, W.H., 1998, Biotransformation and estrogenic activity of Methoychlor and its metabolites in channel catfish, Mar. Environ Res., 46, 159-162.

Skeya, Ş., 2000, Sedrol'ün mikrobiyal transformasyon ürünleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Ü. Sağlık Bil. Ens., 63s.

Stone, D., Hayano, M., Dorfman, R.I., Hechter, O., Robinson, C.R., and Djerassi, C., 1955, Hydroxylation of deoxycorticosterone with *Neurospora crassa*, Journal of the American Chemical Society, 77, 3926-3927.

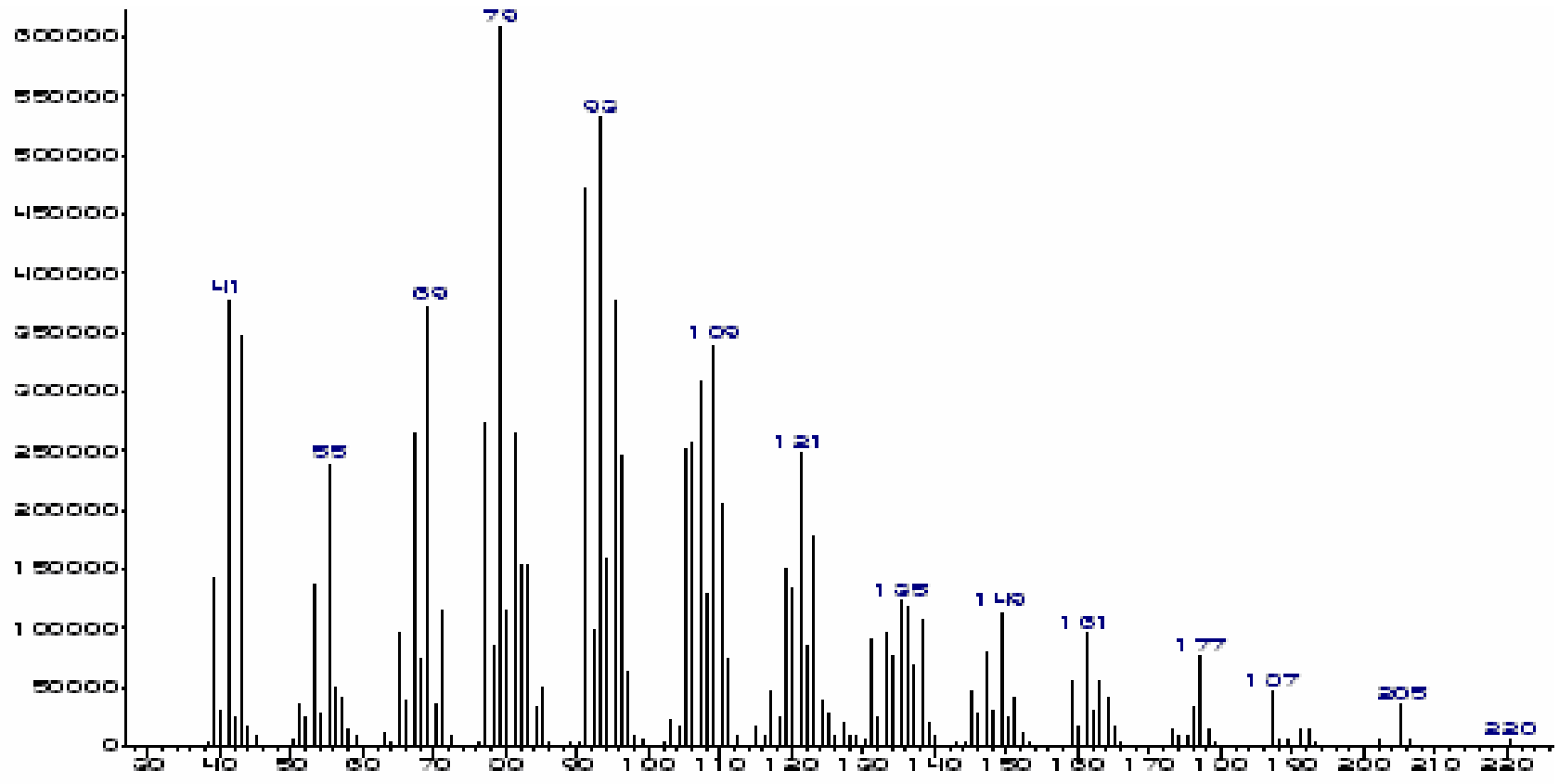
Telefoncu, A., 1995, Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No: 152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 356s.

Yıldırım, H.N., 2004, Diizoforon'un *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonunun ve antifungal aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Ü. Fen Bil, Ens., 64s.

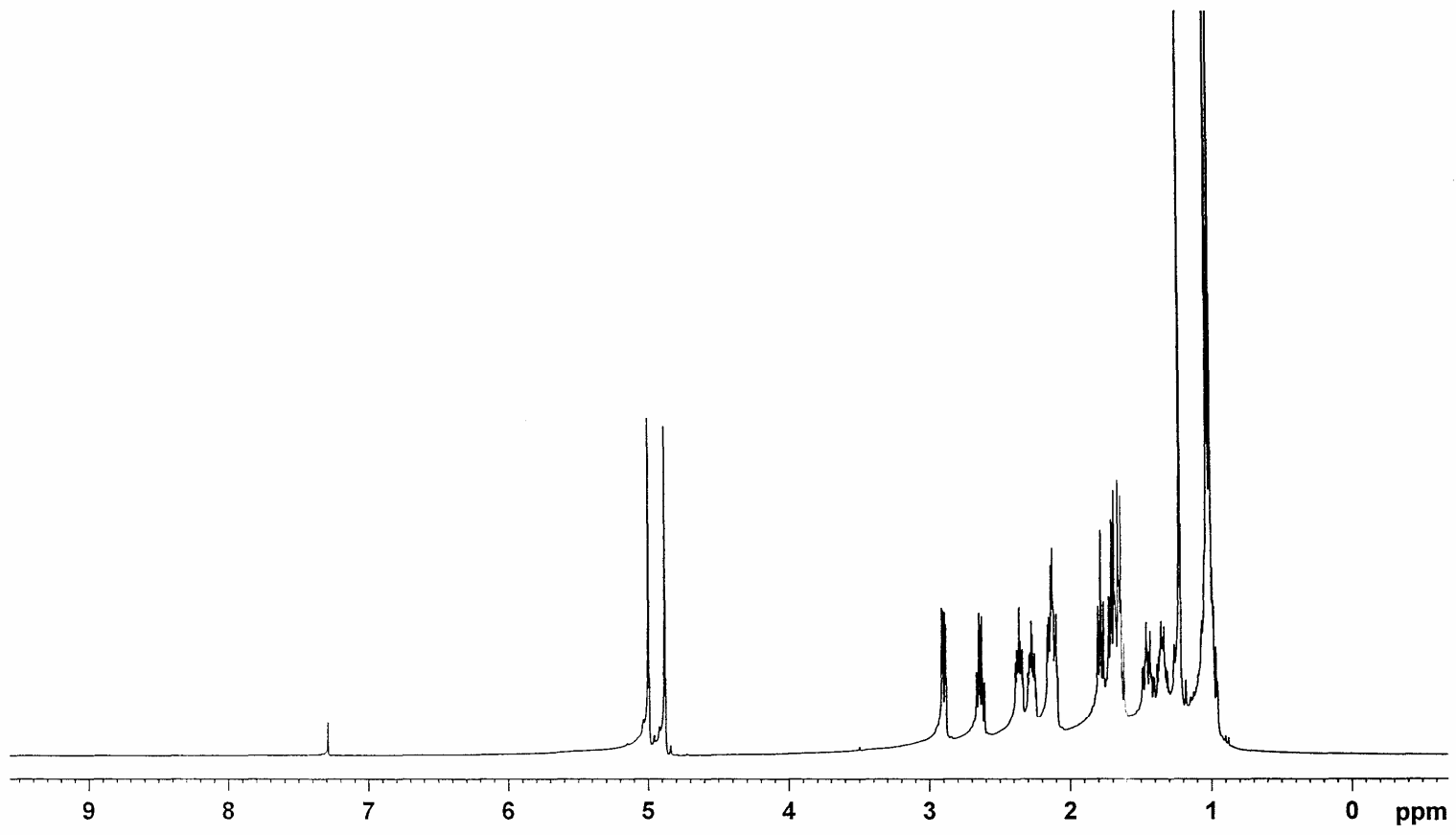
<http://www.food-info.net/tr/qa/qa-fi69.htm>

http://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Neurospora_crassa&oldid=741324

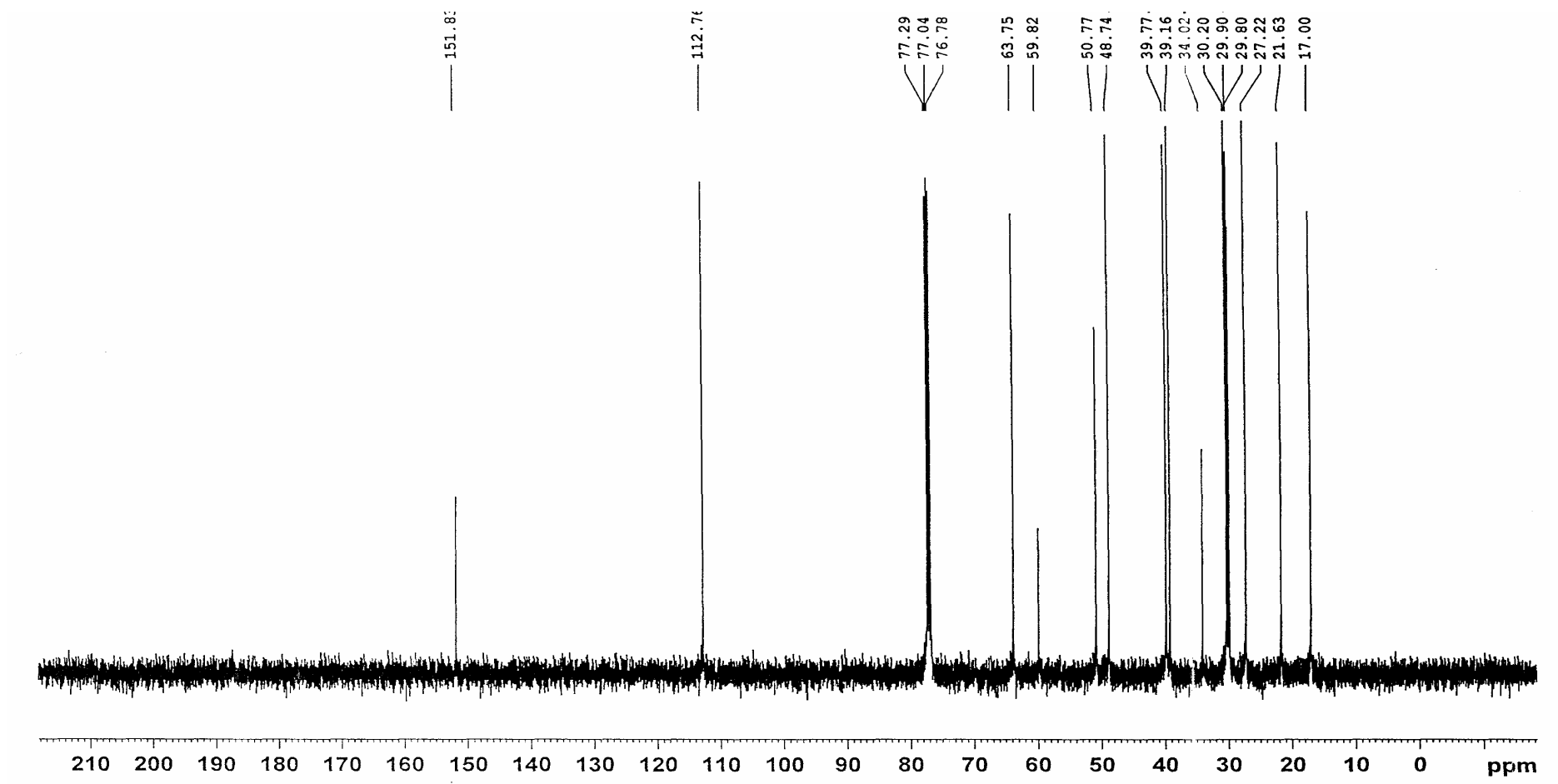
BÖLÜM-5: SPEKTRUMLAR



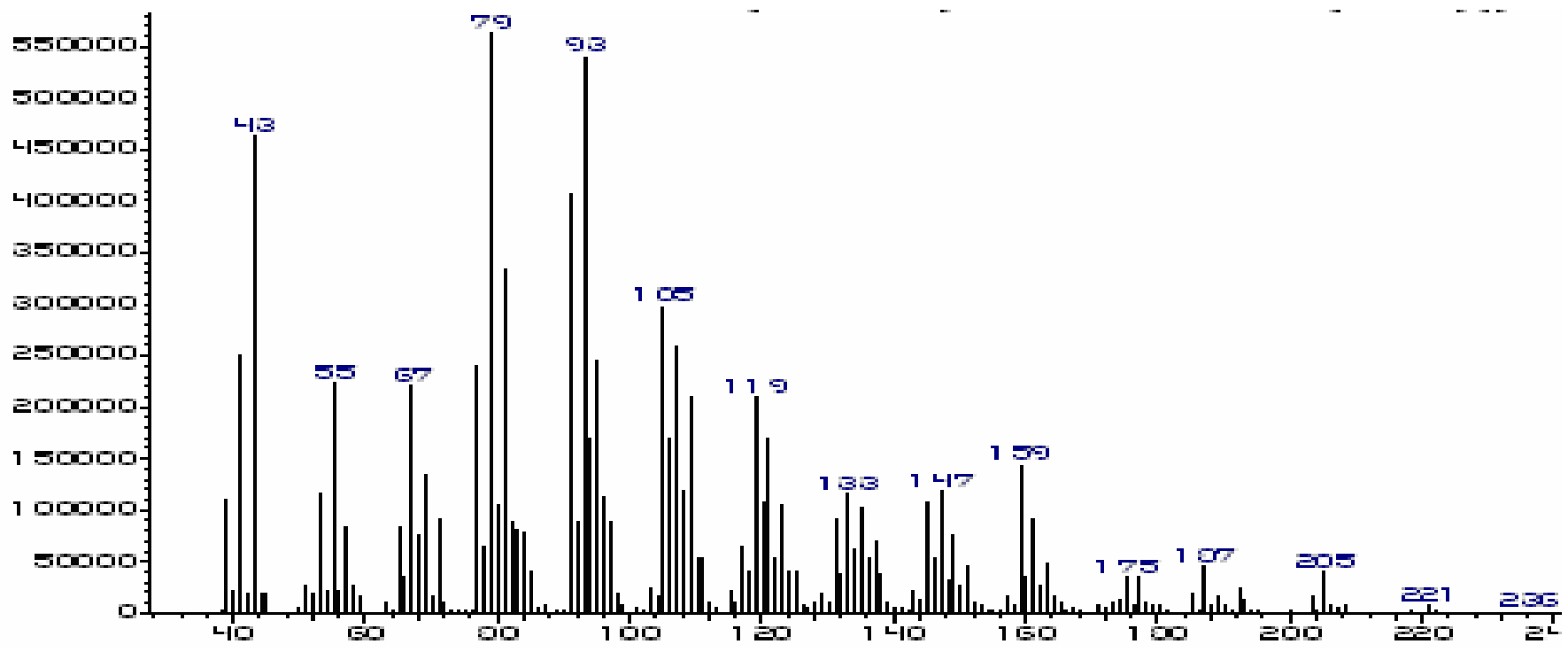
Spektrum 1: Karyofillen oksit'in Kütile spektrumu



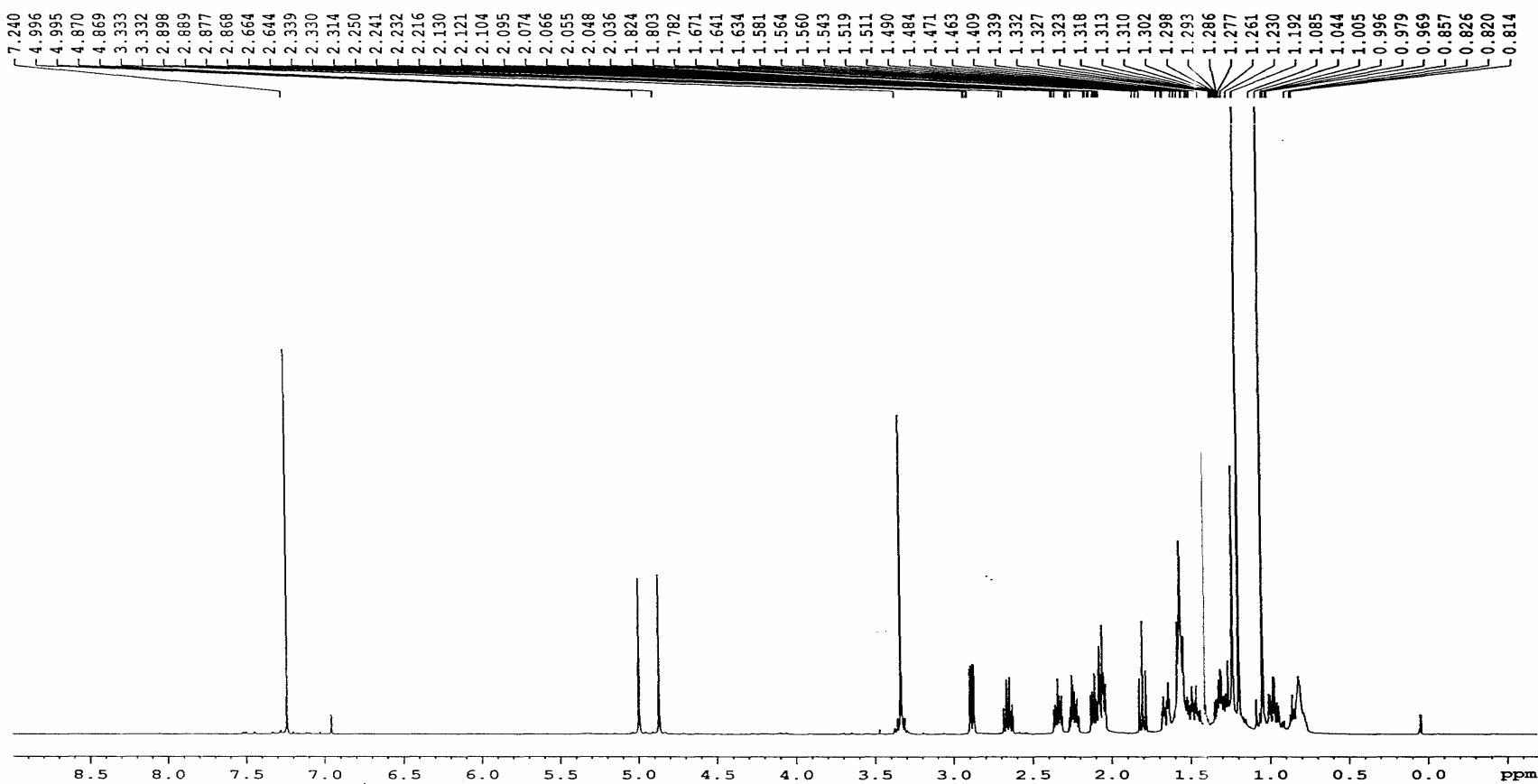
Spektrum 2: Karyofillen oksit'in ^1H NMR spektrumu



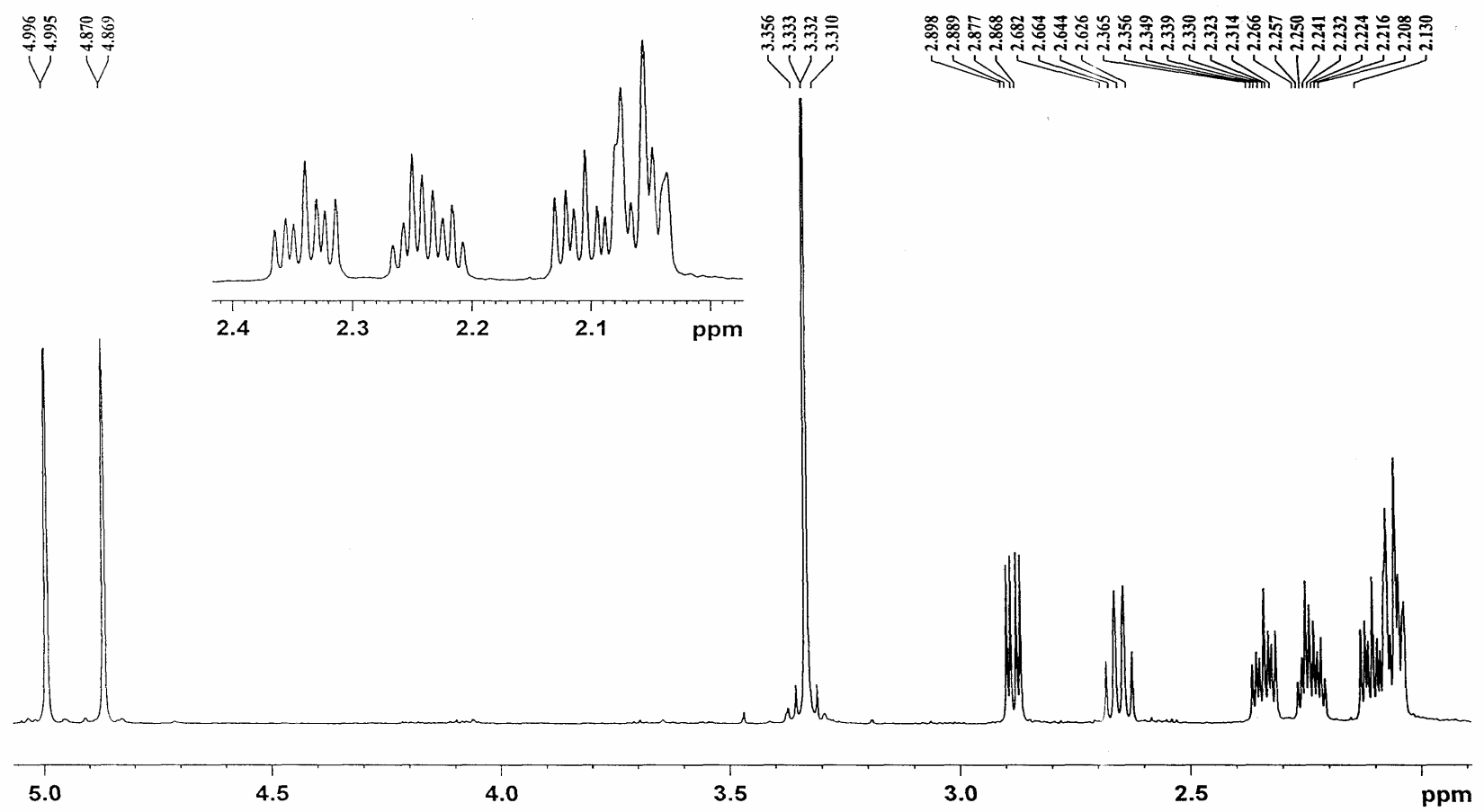
Spektrum 3: Karyofillen oksit'in ^{13}C NMR spektrumu



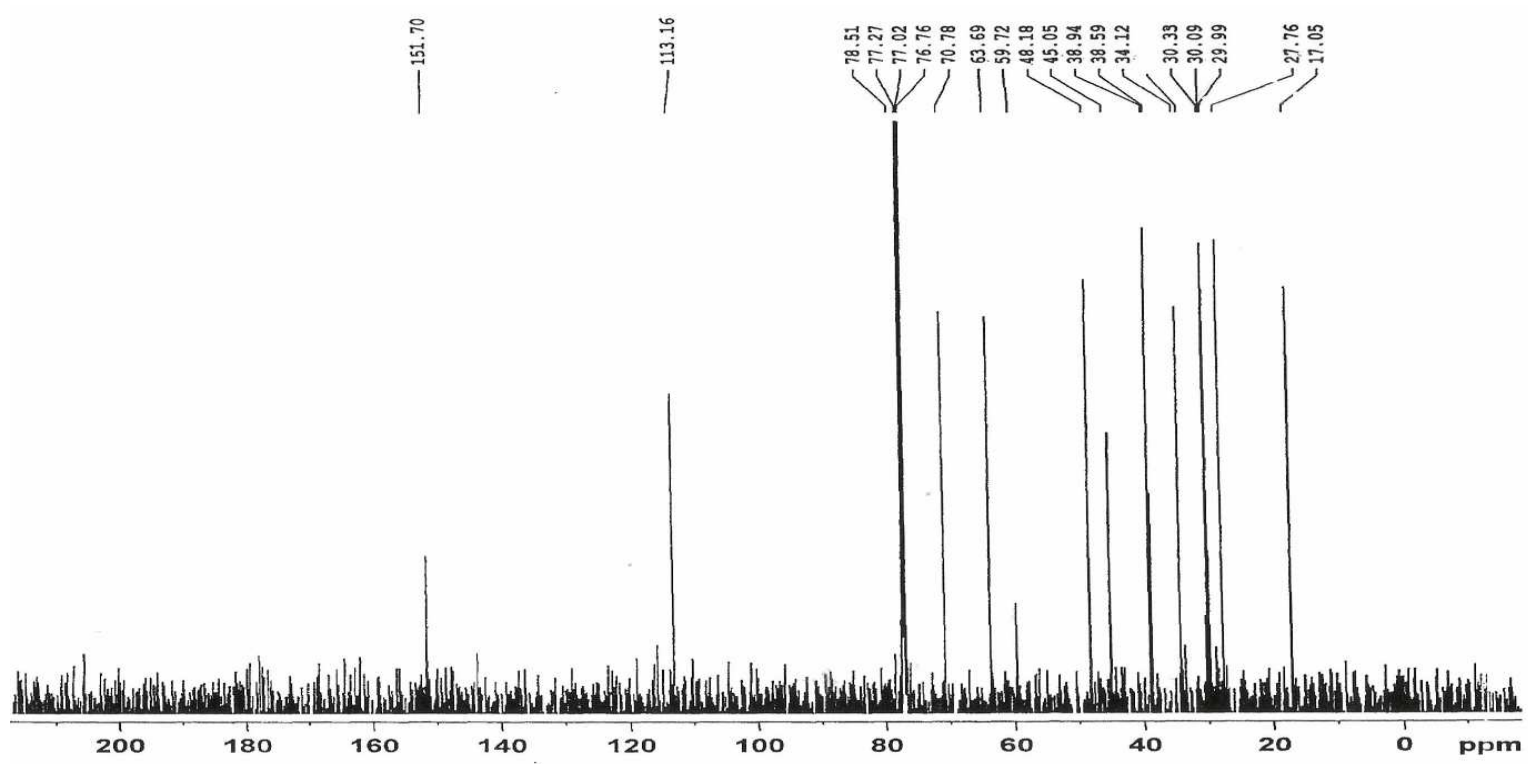
Spektrum 4: Metabolitin'in Kütile spektrumu



Spektrum 5: Metabolit'in ¹H NMR spektrumu-1



Spektrum 6: Metabolit' in ^1H NMR spektrumu-2



Spektrum 7: Metabolit'in ^{13}C NMR spektrumu