

146920

**BİYOAKTİF MONOTERPENLERİN
MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU**

Uzm. Ecz. Fatih DEMİRCİ

DOKTORA TEZİ

**BİYOAKTİF MONOTERPENLERİN MİKROBİYAL
TRANSFORMASYONU**

Uzm. Ecz. Fatih DEMİRCİ

DOKTORA TEZİ

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı'nda
Eskişehir, Aralık 2000**

Danışman: Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fatih Demirci'nin "Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu" başlıklı Farmakognozi Anabilim Dalındaki, Doktora tezi ...18.../12.../2000 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

Üye : Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER

Üye : Prof. Dr. Ekrem SEZİK

Üye : Prof. Dr. Gülendir TÜMEN

Üye : Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..07.../12.../2000 tarih ve ..39.../1... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

"Hayat, biyotransformasyon'dur"

Değerli Eşim BETÖL'e

ÖZET

Doktora TEZİ

BİYOAKTİF MONOTERPENLERİN MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU

Uzm. Ecz. Fatih DEMİRCİ

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı
Eskişehir

Danışman : Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

Aralık, 2000

Bu çalışmada, karvakrol (1), timol (2), karvakrol metil eter (3), timol metil eter (4), karvon enantiyomerleri (5, 5') ve 55 farklı mikroorganizmayla gerçekleştirilen biyotransformasyonlarda oluşan 30 adet metabolit, kromato-spektral yöntemlerle aydınlatılmıştır.

Bunlardan, 9-hidroksi karvakrol (80), 7-hidroksi karvakrol metil eter (129), 9-hidroksi karvakrol metil eter (130), karvakrol metil eter-7,9-diol (131), karvakrol metil eter-7,8-diol (132), 7-hidroksi dehidrokarvakrol metil eter (133), 9-hidroksi timol metil eter (135) ve 10-hidroksi-(+)-neodihidrokarveol (113)'ün doğadaki varlığı ilk kez bu çalışma ile bildirilmektedir.

Headspace-SPME-GC/MS yöntemi ilk kez bu çalışmada mikrobiyal transformasyon ürünlerinin ekstraksiyonu ve teşhisi için kullanılmıştır.

Ayrıca, çalışma materyallerinin ve oluşan metabolitlerin *in vitro* antimikrobiyal ve antiviral aktiviteleri de incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyal transformasyon; karvakrol, timol, karvakrol metil eter, timol metil eter, (+)-karvon, (-)-karvon; headspace katı faz mikro ekstraksiyon (headspace-SPME); GC/MS; biyolojik aktivite

ABSTRACT

Doctor of Philosophy (PhD)

MICROBIAL TRANSFORMATION OF BIOACTIVE MONOTERPENES

MSc. Pharm. Fatih DEMİRÇİ

Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmacognosy
Eskişehir, TURKEY

Supervisor : Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

December, 2000

Microbial transformation studies of carvacrol (1), thymol (2), carvacrol methyl ether (3) and thymol methyl ether (4) and both enantiomers of carvone (5, 5') with 55 different organisms were performed. Chromato-spectroscopic techniques were applied in order to establish the structures of 30 metabolites.

9-Hydroxy carvacrol (80), 7-hydroxy carvacrol methyl ether (129), 9-hydroxy carvacrol methyl ether (130), carvacrol methyl ether-7,9-diol (131), carvacrol methyl ether-7,8-diol (132), 7-hydroxy dehydrocarvacrol methyl ether (133), 9-hydroxy thymol methyl ether (135) and 10-hydroxy-(+)-neodihydrocarveol (113) were assigned as natural for the first time.

The headspace-SPME-GC/MS technique was applied for the screening of microbial transformations and identification of the subsequent metabolites.

Substrates and the isolated metabolites were evaluated for their *in vitro* antimicrobial and antiviral activities.

Key words: Microbial transformation; carvacrol, thymol, carvacrol methyl ether, thymol methyl ether, (+)-carvone, (-)-carvone; headspace-SPME; GC/MS; biological activity

TEŞEKKÜR

Eczacılık Fakültesi Dekanı, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (TBAM) Müdürü Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER ve Doktora Tez Danışmanım Prof. Dr. Neş'e Kırmır'e göstermiş oldukları ilgi, destek ve yardımlardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez süresi boyunca her an büyük fedakarlıkla ve sabırla destek ve yardımlarını esirgemeyen eşim Yrd. Doç. Dr. Betül Demirci'ye;

Ayrıca yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Temel Özek, Yrd. Doç. Dr. Mine Kürkcüoğlu, Uzm. Bio. Nurhayat Tabanca, Uzm. Ecz. İlhan Boydağ ve Bio. Gökalp İşcan'a;

Hepsinin adını burada sıralayamayacağım Eczacılık Fakültesi'nin ve birlikte çalışmakta olduğum TBAM'ın çok değerli elemanlarına ve teknik personeline;

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden, mikroorganizmaların temini konusunda Doç. Dr. Kıymet Güven'e ve diğer arkadaşlara;

Patogen mikroorganizmaların temininde göstermiş olduğu yardım ve kolaylıkları dolayı Osman Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yurdanur Akgün'e;

Antiviral etki testleri için Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Burgu ve Dr. Taner Karaoğlu'na;

Çalışmalarımın bir kısmının gerçekleştirilmesine imkan veren Pakistan Karaçi Üniversitesi HEJ Kimya Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Atta-ur-Rahman ve yardımcısı Prof. Dr. Iqbal Choudhary'e ve arkadaşım Dr. Afgan Farooq'a ;

TÜBİTAK NATO doktora öncesi araştırma bursu ile 3 aylık bir sürede, tez projemin büyük bir bölümünü tamamladığım ve bir çok bilgi ve tecrübe edindiğim OLEMİSS - Mississippi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı ve mensuplarının benimle gerçekleştirmiş oldukları yararlı fikir alış-verişlerinden dolayı Dr. Khalid El-Sayed, Dr. Mark T. Hamann, Dr. Erdal Bedir, Dr. Ehab Abourashed, Dr. Khaled Orabi, Dr. Sheriff Khalifa ve eski Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Charles D. Hufford'a;

TBAM'a gelerek, biyotransformasyon konusunda tüm bilgilerini benimle paylaştığından dolayı Tokushima Bunri Üniversitesi değerli öğretim üyesi hocam Prof. Dr. Yoshiori Noma'ya;

Ayrıca desteklerinden dolayı Prof. Dr. Asakawa'ya;

Bazı NMR analizlerini gerçekleştirmiş olduğundan dolayı Dr. Hashimoto'ya;

Sonsuz *teşekkürlerimi* bildirmek isterim...

Bu uzun listenin sonunda, tüm zorluklara rağmen akademik hayatımı başlangıcından itibaren manevi olarak destekleyen ailemin tüm fertlerine şükranlarımı sunarım.

Fatih Demirci

* Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu (AÜAF 980312)

* Üçüncü Dünya Bilimler Akademisi (TWAS), İtalya
(TWAS South South Travel Fellowship, HEJ, Karaçi Pakistan)

* Tübitak BAYG (NATO A2) Yurt Dışı Araştırma Bursu
(Mississippi Üniversitesi, Oxford, ABD)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Biyotransformasyon.....	2
1.1.1. Biyotransformasyonun Tanımı.....	2
1.1.2. Biyojik Türevlerin Elde Edilmesi.....	3
1.1.3. Biyokatalizörler.....	5
1.1.4. Kısa Tarihçesi.....	10
1.1.5. Biyotransformasyon ve Farmakognozi.....	11
1.1.6. Biyotransformasyon ve Fermantasyon.....	12
1.1.7. Biyotransformasyon Reaksiyonları.....	12
1.1.8. Klasik Kimyasal Reaksiyonlara Üstünlükleri.....	13
1.1.9. Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler.....	15
1.1.10. Biyotransformasyon ve Enzimler.....	16
1.2. Doğal Koku ve Tat Maddeleri.....	16
1.2.1. Monoterpenler.....	17
1.2.1.1. Karvakrol.....	19
1.2.1.2. Timol.....	20
1.2.1.3. Karvakrol Metil Eter.....	20
1.2.1.4. Timol Metil Eter.....	21
1.2.1.5. Karvon.....	21
1.2.2. Monoterpenlerin Biyosentezleri.....	22
1.2.3. Monoterpenlerin Sınıflandırılması.....	25
1.2.4. Monoterpenlerin Önem ve Kullanımları.....	28
1.2.5. Monoterpenlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	30
1.2.5.1. Karvakrol.....	31
1.2.5.2. Timol.....	35

1.2.5.3.	Karvakrol Metil Eter.....	41
1.2.5.4.	Timol Metil Eter.....	41
1.2.5.5.	Karvon.....	41
1.3.	Monoterpenlerin Biyotransformasyonu.....	44
1.3.1.	<i>In vivo</i>	44
1.3.2.	<i>In vitro</i>	46
1.3.3.	Enzimler ve Reaksiyonları.....	47
1.3.3.1.	Karvakrol.....	51
1.3.3.2.	Timol.....	51
1.3.3.3.	Karvon.....	52
1.3.4.	Monoterpen Biyotransformasyonlarında Karşılaşılan Sorunlar....	53
1.3.5.	Monoterpen Biyotransformasyonunun Avantajları.....	54
1.4.	Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) Tekniği.....	54
2.	MATERYAL VE METOT.....	56
2.1.	Materyaller, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar.....	56
2.1.1.	Materyaller.....	56
2.1.2.	Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	57
2.1.3.	Aletler.....	57
2.1.4.	Mikroorganizmalar.....	58
2.2.	Metot.....	60
2.2.1.	Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması.....	60
2.2.2.	Mikroorganizma İnokülasyonu.....	60
2.2.3.	Sıvı Besi Yerleri.....	60
2.2.4.	Biyotransformasyon Ön Çalışmaları.....	62
2.2.4.1.	İki Aşamalı Yöntem.....	62
2.2.4.2.	Tek Aşamalı Yöntem.....	63
2.2.5.	Preparatif Biyotransformasyon.....	64
2.2.6.	Metabolitlerin Ekstraksiyonu.....	64
2.2.6.1.	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon.....	64
2.2.6.2.	Headspace Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME).....	65
2.2.7.	İzolasyon.....	65
2.2.7.1.	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	66
2.2.7.2.	Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK).....	67
2.2.7.3.	Kolon Kromatografisi (KK).....	67
2.2.8.	Yapı Tayini.....	68
2.2.8.1.	Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi (GC/MS).....	68

2.2.8.2.	Fourier Transform İnfrared Spektrofotometrisi (FT/IR).....	68
2.2.8.3.	Gaz Kromatografisi/ Fourier Transform İnfrared Spektrofotometrisi (GC-FT/IR).....	68
2.2.8.4.	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR).....	69
2.2.8.5.	X-Işınları Difraksiyonu.....	69
2.3.	Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	70
2.3.1.	Antibakteriyal Aktivite.....	70
2.3.2.	Antifungal Aktivite.....	71
2.3.3.	Antiviral Aktivite.....	72
3.	BULGULAR	74
3.1.	Biyotransformasyon Ön Çalışması Sonuçları.....	74
3.2.	Karvakrol'ün (1) Mikrobiyal Transformasyonu.....	76
3.2.1.	Metabolit 1-5.....	76
3.2.2.	Metabolit 6.....	77
3.2.3.	Diğer Denemeler.....	80
3.3.	Timol'ün (2) Mikrobiyal Transformasyonu.....	81
3.4.	Karvakrol Metil Eter'in (3) Mikrobiyal Transformasyonu.....	82
3.4.1.	Metabolit 7.....	83
3.4.2.	Metabolit 8.....	85
3.4.3.	Metabolit M9.....	87
3.4.4.	Metabolit 10-11.....	89
3.5.	Timol Metil Eter'in (4) Mikrobiyal Transformasyonu.....	90
3.5.1.	Metabolit 12.....	91
3.5.2.	Metabolit 13.....	93
3.6.	Karvon (5 ve 5') Mikrobiyal Transformasyonu.....	95
3.6.1.	Metabolit 14.....	95
3.6.2.	Metabolit 15-16.....	98
3.7.	Headspace-SPME-GC/MS Sonuçları.....	98
3.7.1.	Metabolit M15a ve M15b.....	101
3.7.2.	Metabolit M16a ve M16b.....	101
3.7.3.	Metabolit M17a ve M17b.....	101
3.7.4.	Metabolit M18a ve M18b.....	101
3.7.5.	Metabolit M19a ve M19b.....	101
3.7.6.	Metabolit M20a ve M20b.....	101
3.7.7.	Metabolit M21a ve M21b.....	101
3.7.8.	Metabolit M22a ve M22b.....	101

3.8. Biyolojik Aktivite Sonuçları.....	104
3.8.1. Antibakteriyal Aktivite.....	104
3.8.2. Antifungal Aktivite.....	104
3.8.3. Antiviral Aktivite.....	105
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	106
5. KAYNAKLAR.....	112
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Progesteron'un biyotransformasyonu.....	10
1.2.	Endüstriyel biyotransformasyonlar.....	14
1.3.	Potansiyel endüstriyel biyotransformasyonlar.....	15
1.4.	Terpenlerin biyosentezi.....	23
1.5.	Monoterpenlerin biyosentezi.....	24
1.6.	Aromatik monoterpenlerin biyosentezi.....	24
1.7.	Sentetik yolla mentol üretimi.....	30
1.8.	Karvakrol'ün <i>in vivo</i> biyotransformasyonu.....	45
1.9.	Timol'ün <i>in vivo</i> biyotransformasyonu.....	46
1.10.	Karvon enantiyomerlerinin <i>in vivo</i> biyotransformasyonu.....	46
1.11.	β -İyon'da mikrobiyal transformasyon.....	47
1.12.	<i>p</i> -Simen'in biyotransformasyonu.....	51
1.13.	Timol'ün mikrobiyal transformasyonu ve metabolitleri.....	52
1.14.	Karvon'un biyotransformasyon ürünleri.....	53
2.1.	İki aşamalı yöntem.....	62
2.2.	Tek aşamalı yöntem.....	63
2.3.	Headspace-SPME-GC/MS yöntemi ile biyotransformasyon metabolitlerinin analizi.....	65
2.4.	Vakum sıvı kromatografi (VSK) sistemi.....	67
3.1.	Karvakrol'ün mikrobiyal transformasyonu.....	76
3.2.	9-Hidroksi karvakrol'ün (80) spektral verileri (MS, ^1H ve ^{13}C NMR).....	79
3.3.	Karvakrol metil eter'in mikrobiyal transformasyonu.....	82
3.4.a.	7-Hidroksi karvakrol metil eter'in (129) kütle spektrumu.....	84
3.4.b.	7-Hidroksi karvakrol metil eter'in (129) spektral verileri (IR ve ^1H NMR).....	85
3.5.a.	9-Hidroksi karvakrol metil eter'in (130) kütle spektrumu.....	86
3.5.b.	9-Hidroksi karvakrol metil eter'in (130) ^1H NMR spektrumu.....	87
3.6.a.	Karvakrol metil eter 7,9-diol'ün (131) spektral verileri (MS ve IR).....	88
3.6.b.	Karvakrol metil eter 7,9-diol'ün (131) spektral verileri (^1H ve ^{13}C NMR).....	89
3.7.	Timol metil eter'in mikrobiyal transformasyonu.....	90
3.8.a.	7-Hidroksi timol metil eter'in (134) kütle spektrumu.....	92
3.8.b.	7-Hidroksi timol metil eter'in (134) ^1H NMR spektrumu.....	93

3.9.	9-Hidroksi timol metil eter'in (135) spektral verileri (MS ve ¹ H NMR).....	94
3.10.	(-)-Karvon'un biyotransformasyonu ve metabolitleri.....	95
3.11.a.	10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol'ün (114) X-ışını spektral verileri.....	96
3.11.b.	10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol'ün (114) spektral verileri (MS, IR ve ¹ H NMR).....	97
3.12.a.	(+)-Karvon metabolitleri.....	99
3.12.b.	(-)-Karvon metabolitleri.....	99
4.1.	Monoterpenlerle gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarının özeti.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Yaygın olarak kullanılan Mikroorganizma Kültür Koleksiyonlarından bazıları.....	7
1.2.	Biyokatalizörlerin karşılaştırılması.....	9
1.3.	Her iki yöntemin karşılaştırılması, avantaj ve dezavantajları.....	10
1.4.	Terpenoitlerin sınıflandırılması.....	18
1.5.	Karvakrol'un biyolojik aktiviteleri.....	32
1.6.	Timol'un biyolojik aktiviteleri.....	36
1.7.	Karvon'un biyolojik aktiviteleri.....	42
2.1.	TBAM Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu (TCC).....	58
2.2.	İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri.....	66
2.3.	Mikrodilüsyon yönteminde kullanılan patojen mikroorganizmalar...	71
2.4.	Agar tüp dilüsyon yönteminde kullanılan patojen funguslar.....	72
3.1.	Materyallerin biyotransformasyonları için kullanılan mikroorganizmalar ve ön çalışmaların sonuçları.....	74
3.2.	Karvakrol'un mikrobiyal transformasyon metabolitleri.....	76
3.3.	Karvakrol metil eter'in metabolitleri.....	83
3.4.	Timol metil eter'in mikrobiyal transformasyon metabolitleri.....	91
3.5.	(-)-Karvon'un preparatif mikrobiyal transformasyonu ve metabolitleri.....	95
3.6.	Karvon enantiyomerlerinden Headspace-SPME yöntemi ile tanımlanan metabolitler.....	100
3.7.a.	(+)-Karvon'un <i>Absidia glauca</i> ile SPME analiz sonuçları.....	102
3.7.b.	(-)-Karvon'un <i>Absidia glauca</i> ile SPME analiz sonuçları.....	102
3.8.a.	(+)-Karvon'un <i>Cunnighamella echinulata</i> ile SPME analiz sonuçları.....	102
3.8.b.	(-)-Karvon'un <i>Cunnighamella echinulata</i> ile SPME analiz sonuçları.....	102
3.9.a.	(+)-Karvon'un <i>Penicillium claviforme</i> ile SPME analiz sonuçları....	102
3.9.b.	(-)-Karvon'un <i>Penicillium claviforme</i> ile SPME analiz sonuçları....	103
3.10.a.	(+)-Karvon'un <i>Pseudomonas putida</i> ile SPME analiz sonuçları.....	103
3.10.b.	(-)-Karvon'un <i>Pseudomonas putida</i> ile SPME analiz sonuçları.....	103
3.11.a.	(+)-Karvon'un <i>Pseudomonas stutzerii</i> ile SPME analiz sonuçları....	103
3.11.b.	(-)-Karvon'un <i>Pseudomonas stutzerii</i> ile SPME analiz sonuçları....	103
3.12.	Materyallerin mikrodilüsyon yöntemi ile MIC değerinin tayini.....	104
3.13.	Metabolitlerin mikrodilüsyon yöntemi ile MIC değerlerinin tayini...	104
3.14.	Antifungal Aktivite (% inhibisyon).....	105
3.15.	<i>In vitro</i> sitotoksik aktivite.....	105
3.16.	<i>In vitro</i> antiviral aktivite.....	105

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection, ABD
Atm	Atmosfer basınç
BHV-1	Bovine Virus Tip-1
br	Geniş
¹³ C NMR	Karbon Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi
CAS	Chemical Abstract Search
CDCl ₃	Dötoro kloroform
CFU	Koloni oluşturuvcu ünite
CPE	Viral sitopatolojik etki
d	Çift Pik, dublet
dak	Dakika
DEPT	-CH, -CH ₂ ve -CH ₃ gruplarının tespit edildiği NMR tekniği (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DKID ₅₀	Enfekte edilen dokuların en az % 50'sinde enfeksiyon oluşturan virüs konsantrasyon
DMSO	Dimetil sülfoksit
EAGLE MEM	Eagle's Minimum Essential Medium (hücre kültürü besi yeri)
ED ₅₀	Etkin Dozun %50'si
EIMS	Elektron iyonizasyonu kütle spektrometrisi
EtOAc	Etilasetat
EtOH	Etanol
FDS	Fötal Dana Serumu
FEMA	Maddenin GRAS listelerindeki genel numarası
FT/IR	Fourier Transform infrared spektroskopisi
g	Gram
GC/MS	Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi
GRAS	Generally Recognised As Safe
GC-FT/IR	Gaz kromatografisi/ Fourier Transform İnfrared spektrofotometrisi
¹ H NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi
Headspace	Uçucu maddelerin üst kısmı, buhar fazı, konsantre oldukları kısım
HK	Hücre kontrol
IC ₅₀	İnhibe edici konsantrasyonun %50'si
IMI	International Mycological Institute, İngiltere
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
İ.P.	Periton içi
İ.V.	Damar içi
J	Coupling constant, yarımlama sabiti (Hz)
kg	Kilogram
l	Litre
LC ₅₀	Öldürücü konsantrasyonun %50'si
LD ₅₀	Toksik / öldürücü dozun %50'si
m	Çoklu pik, multipllet
M	Molarite
m/z	Kütle/yük
M ⁺	Moleküler iyon
MA	Molekül ağırlığı
MDBK	Modin Darby Bovine Kidney Hücre Kültürü
MEDLINE	Tıbbi araştırmalar ve biyolojik aktivite veri tabanı
MeOH	Metanol
MHA	Müller Hinton Agar (mikrobiyolojik besi yeri)
MHB	Müller Hinton Broth
MIC	Minimal inhibe edici konsantrasyon
ml	Mililitre
mmol	Milimol

Kısaltma

Açıklama (Devam)

N	Normalite
NADH	İndirgenmiş nikotin adenin dinükleotit
NADP	Nikotin adenin dinükleotit fosfat
NADPH	İndirgenmiş nikotin adenin dinükleotit fosfat
NAPRALERT	Natural Products Alert (Illinois Üniversitesi), doğal maddeler veri tabanı
NRRL	Northern Regional Research Laboratory, ABD
P.O.	Ağızdan
PDA	Potato Dextrose Agar (mikrobiyolojik besi yeri)
PDMS	Polidimetilsiloksan
ppm	Milyonda bir kısım
q	Dörtlü pik, kuartet
rpm	Bir dakikada gerçekleşen rotasyon
s	Tek pik, singlet
S.C.	Deri altı
SDA	Sabouraud Dextrose Agar (mikrobiyolojik besi yeri)
sept	Yedili pik, septet
SMPE	Katı faz mikro ekstraksiyon
sp.	Tür
t	Üçlü pik, triplet
TBAM	Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve İlaç Araştırma Merkezi
TCC	TBAM Kültür Koleksiyonu (2000)
TMS	Trimetil silan
UV	Ultra Viole (mor ötesi)
VK	Virüs kontrol
VSK	Vakum sıvı kromatografisi
$[\alpha]_D$	Sodyum lambasında, spesik rotasyon = $100 \alpha/lc$
δ	Shift, kimyasal kayma (ppm)
λ_{max}	UV'de dalga boyunun maksimum absorpsiyonu
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre

Not: Tezin içinde kullanılan formül numaraları koyu renkte ve parantez (n) ile, kaynaklar ise köşeli parantez [n] ile verilmiştir. Enantiyomer maddeler (') ile işaretlenmiştir.

Tezde Adı Geçen Maddelerin Formül Numaraları Türkçe ve İngilizce Yazılışları

No	Türkçe	İngilizce
1	Karvakrol	Carvacrol
2	Timol	Thymol
3	Karvakrol metil eter	Carvacrol methyl ether
4	Timol metil eter	Thymol methyl ether
5	(+)-Karvon	(+)-Carvone
5'	(-)-Karvon	(-)-Carvone
6	Progesteron	Progesterone
7	11 α -Progesteron	11 α -Progesterone
8	İzopren	Isoprene
9	β -Mirsen	β -Myrcene
10	(E)- β -Osimen	(E)- β -Ocimene
11	(Z)- β -Osimen	(Z)- β -Ocimene
12	Alloosimen	Alloocimene
13	Geraniol	Geraniol
14	Nerol	Nerol
15	(+)-Linalool	(+)-Linalool
15'	(-)-Linalool	(-)-Linalool
16	Geranial	Geranial
17	Neral	Neral
18	Sitronellal	Citronellal
19	Tageton	Tagetone
20	Hidroksi-dihidrositronellal dimetil asetal	Hydroxy-dihydrocitronellal dimethyl acetal
21	Linalil asetat	Linalyl acetate
22	Geranil asetat	Geranyl acetate
23	Neril asetat	Neryl acetate
24	Sitronellik asit	Citronellic acid
25	Dehidrogeranik asit	Dehydrogeranic acid
26	Geranik asit nitril	Geranic acid nitrile
27	Sitronellik asit nitril	Citronellic acid nitrile
28	<i>p</i> -Simen	<i>p</i> -Cymene
29	(+)-4 <i>R</i> -Limonen	(+)-4 <i>R</i> -Limonene
29'	(-)-4 <i>S</i> -Limonen	(-)-4 <i>S</i> -Limonene
30	α -Terpinen	α -Terpinene
31	β -Terpinen	β -Terpinene
32-	γ -Terpinen	γ -Terpinene
33	Terpinolen	Terpinolene
34	(+)- α -Fellandren	(+)- α -Phellandrene
34'	(-)- α -Fellandren	(-)- α -Phellandrene
35	(+)- β -Fellandren	(+)- β -Phellandrene
35'	(-)- β -Fellandren	(-)- β -Phellandrene
36	(+)- α -Terpineol	(+)- α -Terpineol
37	(+)-Terpinen-4-ol	(+)-Terpinen-4-ol
38	(+)- δ -Terpineol	(+)- δ -Terpineol
39	(-)-Mentol	(-)-Menthol
40	(+)-Neomentol	(+)-Neomenthol
41	(-)-İzomentol	(-)-Isomenthol
42	(+)-Neoizomentol	(+)-Neoisomenthol
43	İzopulegol	Isopulegol
44	<i>cis</i> -Hekzahidro kuminil alkol	<i>cis</i> -Hexahydro cuminyl alcohol
45	(-)-Dihidrokarvon	(-)-Dihydrocarvone
46	(+)-Piperiton	(+)-Piperitone
47	(+)-İzomenton	(+)-Isomenthone
48	Pulegon	Pulegone

<u>No</u>	<u>Türkçe</u>	<u>İngilizce</u>
49	α -Terpenil asetat	α -Terpenyl acetate
50	(-)-Mentil asetat	(-)-Menthyl acetate
51	8-Merkapto- <i>p</i> -mentan-3-on	8-Mercapto- <i>p</i> -menthan-3-one
52	1- <i>p</i> -Menten-8-tiol	1- <i>p</i> -Menthen-8-thiol
53	(+)- α -Pinen	(+)- α -Pinene
54	(-)- β -Pinen	(-)- β -Pinene
55	(-)-Kamfen	(-)-Camphene
56	(+)- δ -3-Karen	(+)- δ -3-Carene
57	(+)-Borneol	(+)-Borneol
58	(+)- <i>cis</i> -Verbenol	(+)- <i>cis</i> -Verbenol
59	(+)-İzotujanol	(+)-Isothujanol
60	(+)- <i>cis</i> -Sabinol	(+)- <i>cis</i> -Sabinol
61	(+)- α -Kâfur	(+)- α -Camphor
61'	(-)- α -Kâfur	(-)- α -Camphor
62	(+)-Fenkön	(+)-Fenchone
63	(+)- <i>cis</i> -Verbenon	(+)- <i>cis</i> -Verbenone
64	(+)-Mirtenal	(+)-Myrtenal
65	(-)-Tuyon	(-)-Thujon
66	1,4-Sineol	1,4-Cineole
67	1,8-Sineol	1,8-Cineole
68	(+)-Kamik asit	(+)-Kamic acid
69	(+)-Kaminik asit	(+)-Kaminic acid
70	(+)-İzobornil asetat	(+)-Isobornyl acetate
71	Sabinil asetat	Sabinyl acetate
72	Teresantalol	Teresantalol
73	Trisiklen	Tricyclene
74	Perisiklokâfur	Pericyclocamphor
75	Artemisia keton	Artemisia ketone
76	(+)- <i>trans</i> -Krizantemik alkol	(+)- <i>trans</i> -Chrysantemic alcohol
77	α -Tuyaplisin	α -Thujaplicin
78	2,3-Dihidroksi- <i>p</i> -simen	2,3-Dihydroxy- <i>p</i> -cymene
79	2-(3-Hidroksi-4-metilfenil)propan-2-ol	2-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)propan-2-ol
80	9-Hidroksi karvakrol	9-Hydroxy carvacrol
81	2-Hidroksimetil-5-(1-metiletil)fenol	2-Hydroxymethyl-5-(1-methylethyl)phenol
82	2-(4-Hidroksimetil-3-hidroksifenil)propan-1-ol	2-(4-Hydroxymethyl-3-hydroxyphenyl)propan-1-ol
83	2-(3-Hidroksi-4-metilfenil)propanoik asit	2-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)propanoic acid
84	2-Hidroksi-4-(1-metiletil)benzoik asit	2-Hydroxy-4-(1-methylethyl)benzoic acid
85	2,5-Dihidroksi- <i>p</i> -simen	2,5-Dihydroxy- <i>p</i> -cymene
86	2-(2-Hidroksi-4-metilfenil)propan-1-ol	2-(2-Hydroxy-4-methylphenyl)propan-1-ol
87	5-Hidroksi-2-(1-metiletil)fenol	5-Hydroxy-2-(1-methylethyl)phenol
88	2-(4-Hidroksimetil-2-hidroksifenil)propan-1-ol	2-(4-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propan-1-ol
89	2-(2-Hidroksi-4-metilfenil)propanoik asit	2-(2-Hydroxy-4-methylphenyl)propanoic acid
90	3-Hidroksi-4-(1-metiletil)benzoik asit	3-Hydroxy-4-(1-methylethyl)benzoic acid
91	(+)-Karveol	(+)-Carveol
91'	(-)-Karveol	(-)-Carveol
92'	(-)-Karveol glukuronit	(-)-Carveol glucuronide
93	<i>p</i> -Küminik alkol	<i>p</i> -Cuminic alcohol
94	<i>p</i> -Küminik aldehit	<i>p</i> -Cuminic aldehyde
95	<i>p</i> -Kumat	<i>p</i> -Cumate
96	<i>cis</i> -2,3-Dihidroksi-2,3-dihidro- <i>p</i> -kumat	<i>cis</i> -2,3-Dihydroxy-2,3-dihydro- <i>p</i> -cumate
97	2,3-Dihidroksi- <i>p</i> -kumat	2,3-Dihydroxy- <i>p</i> -cumate
98	2-OH-3-Karboksi-6-okso-7-metil okta-2,4-dienoat	2-OH-3-Carboxy-6-oxo-7-methyl octa-2,4-dienoate

<u>No</u>	<u>Türkçe</u>	<u>İngilizce</u>
99	2-OH-6-Okso-7-metil-okta-2,4-dienoat	2-OH-6-Oxo-7-methyl-octa-2,4-dienoate
100	2-OH-penta-2,4-dienoat	2-OH-penta-2,4-dienoate
101	İzobütirat	Isobutyrate
102	4-Metil-2-okso-pentanoik asit	4-Methyl-2-oxo-pentanoic acid
103	p-Simenol	p-Cymenol
104	2-İzopropil-5-metil benzokinon	2-Isopropyl-5-methyl-benzoquinone
105	2,6-Dihidroksi timol	2,6-Dihydroxythymol
106	2-Hidroksi 3,6-kinon	2-Hydroxy 3,6-quinone
107	2,4-Dihidroksi-3,3-dimetil-6-okso-4-oktanoik asit	2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-6-oxo-4-octanoic acid
108	3,7-Dimetil-2,4,6-triokso-oktanoik asit	3,7-Dimethyl-2,4,6-trioxo-octanoic acid
109	2-Okso butirat	2-Oxo butyrate
110	Asetik asit	Acetic acid
111	Dihidrokarveol	Dihydrocarveol
112	1-Hidroksidihidrokarvon	1-Hydroxydihydrocarvone
113	1-Hidroksidihidrokarveol	1-Hydroxydihydrocarveol
114	10-Hidroksineodihidrokarveol	10-Hydroxyneodihydrocarveol
115	Dihidrokarveol 8,9-epoksit	Dihydrocarveol 8,9-epoxide
116	8-Hidroksi karvomentol	8-Hydroxy carvomenthole
117	10-Hidroksi-dihidrokarveol	10-Hydroxy-dihydrocarveol
118	Karveol 8,9-epoksit	Carveol 8,9-epoxide
119	Bottrosipikatol (6,8-Oksido-1- <i>p</i> -menten-9-ol)	Bottrosipicatole (6,8-Oxido-1- <i>p</i> -menthen-9-ol)
120	1- <i>p</i> -Menten-6,8-diol	1- <i>p</i> -Menthen-6,8-diol
121	5-Hidroksikarveol	5-Hydroxycarveol
122	1- <i>p</i> -Menten-8,9-diol	1- <i>p</i> -Menthen-8,9-diol
123	5-Hidroksikarvon	5-Hydroxycarvone
124	5-Hidroksidihidrokarvon	5-Hydroxydihydrocarvone
125	5-Hidroksidihidrokarveol	5-Hydroxydihydrocarveol
126	Karvon 8,9-epoksit	Carvone 8,9-epoxide
127	Dihidrokarvon 8,9-epoksit	Dihydrocarvone 8,9-epoxide
128	Dehidrokarvakrol	Dehydrocarvacrol
129	7-Hidroksi karvakrol metil eter	7-Hydroxy carvacrol methyl ether
130	9-Hidroksi karvakrol metil eter	9-Hydroxy carvacrol methyl ether
131	Karvarol metil eter 7,9-diol	Carvacrol methyl ether 7,9-diol
132	Karvarol metil eter 7,8-diol	Carvacrol methyl ether 7,8-diol
133	7-Hidroksi dehidrokarvakrol metil eter	7-Hydroxy dehydrocarvacrol methyl ether
134	7-Hidroksi timol metil eter	7-Hydroxy thymol methyl ether
135	9-Hidroksi timol metil eter	9-Hydroxy thymol methyl ether
136	(+)- <i>trans</i> -Dihidrokarvon	(+)- <i>trans</i> -Dihydrocarvone
136'	(-)- <i>trans</i> -Dihidrokarvon	(-)- <i>trans</i> -Dihydrocarvone
137	(+)-Neodihidrokarveol	(+)-Neodihydrocarveol
137'	(-)-Neodihidrokarveol	(-)-Neodihydrocarveol
138	(+)-Dihidrokarveol	(+)-Dihydrocarveol
138'	(-)-Dihidrokarveol	(-)-Dihydrocarveol
139	(+)- <i>cis</i> -İzodihidrokarvon	(+)- <i>cis</i> -Isodihydrocarvone
139'	(-)- <i>cis</i> -İzodihidrokarvon	(-)- <i>cis</i> -Isodihydrocarvone
140	(+)-İzodihidrokarveol	(+)-Isodihydrocarveol
140'	(-)-İzodihidrokarveol	(-)-Isodihydrocarveol
141	(+)-Neoizodihidrokarveol	(+)-Neoisodihydrocarveol
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	(-)-Neoisodihydrocarveol
142	(+)- <i>trans</i> -Karveol	(+)- <i>trans</i> -Carveol
142'	(-)- <i>trans</i> -Karveol	(-)- <i>trans</i> -Carveol
143	(+)- <i>cis</i> -Karveol	(+)- <i>cis</i> -Carveol
143'	(-)- <i>cis</i> -Karveol	(-)- <i>cis</i> -Carveol

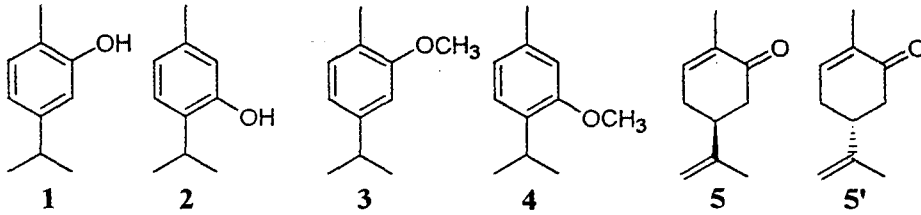
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde biyotransformasyon, modern çağın ve araştırmaların araçlarından olan biyoteknolojinin temel konularından biri olarak hızla gelişmektedir. Biyotransformasyon, yeni ilâç, koku ve tat maddelerine dönüşümü ele alırken, diğier taraftan Farmakobiyoteknoloji ve Biyofarmasötikler terimleri Farmakognozi ile birlikte kullanılmaya başlamıştır. Doğal maddeler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyonların ürünleri de doğal olduğu için bu yeni teknoloji Farmakognozi bilimi içinde yerini almıştır [1-12]. Klâsik yöntemlerle sentezinin yapılması zor veya imkânsız olan bir çok ilâç, koku ve tat hammaddesi biyotransformasyonla ucuz, çabuk ve verimli bir şekilde elde edilebilmektedir. Biyotransformasyon ürünlerinde, stereokimyasal özelliklerin korunabilmesi, genellikle rasemik ürünler veren kimyasal sentezlere karşı üstünlüklerinden biridir [13-20].

Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlâç Araştırma Merkezi (TBAM) bünyesinde 2 yıl önce kurulmuş olan biyotransformasyon ve biyolojik aktivite laboratuvarında sürdürülmekte olan araştırmaların bir bölümünü içeren bu çalışma, yurdumuzda bu alanda hazırlanan ilk doktora tezi olmaktadır [21]. İlk olmanın gereği olarak ve bundan sonra bu konuda yapılacak araştırmalara kaynak oluşturması amacıyla giriş bölümü geniş tutulmuştur. Bu bölüm dört ana başlık altında toplanmış, 1. Bölümde biyotransformasyonun ne olduğu tüm yönleriyle açıklanmaya çalışılmıştır. 2. Bölümde doğal koku ve tat maddeleri ve özellikle bu tezin materyalini oluşturan monoterpen sınıfı tanıtılmış ve materyallerle ilgili kaynak bilgileri verilmiştir. 3. Bölümde ise monoterpenlerin biyotransformasyonu konusunda günümüze kadar yapılmış olan araştırmalar özetlenmiştir. Biyotransformasyon araştırmaları kapsamında ilk kez bu çalışmada kullanılan Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (Solid Phase MicroExtraction= SPME) tekniği de 4. Bölümde tanıtılmıştır.

Çalışma materyali seçilirken, TBAM da süregelen uçucu yağ çalışmalarının paralelinde öncelikle monoterpenlerin ele alınmasının uygun olacağı düşünölmüştür. Karvakrol (1), ölkemiz ekonomisi için büyük değer taşıyan kekik

ve kekik uçucu yağının ana bileşimidir [22]. Merkezimizde yürütülmekte olan aktivite çalışmalarında ilginç sonuçlar vermektedir [23, 24]. Timol (2), karvakrol ile yapı benzerliğinden dolayı seçilmiş bir bileşiktir. Karvakrol ve timolün biyotransformasyonu sonucu oluşacak türevlerin de benzer olacağı düşünülmüştür. Bu iki bileşiğin dönüşümünün daha önce hiç ele alınmamış olması da diğer bir tercih nedenidir. Kaynak taramalarında sadece timolle yapılmış tek bir mikrobiyal transformasyon araştırmasına rastlanmıştır [27]. Bu iki monoterpenin metil eterleri: karvakrol metil eter (3) ve timol metil eter (4), kimyasal açıdan daha reaktif olabilecekleri düşüncesiyle materyal olarak kullanılmıştır. Karvon enantiyomerleri (5, 5') ile daha önce yapılmış pek çok araştırma olmasına rağmen biyotransformasyonları tekrarlanmıştır. Karvon ile ilgili araştırmaların tekrar denemesindeki amaç uygulamakta olduğumuz mikrobiyal biyotransformasyon yöntemlerinin kontrolü ve dönüşümler sonucu oluşan ürünlerin hızlı, kolay ve ekonomik olarak ekstraksiyonu için SPME tekniğinin ilk kez kullanılmasıdır.



Materyal olarak kullanılan monoterpenlerin ve biyotransformasyon ürünlerinin biyolojik aktivitelerini belirlemek amacıyla antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri de incelenmiştir.

1.1.BİYOTRANSFORMASYON

1.1.1. Biyotransformasyonun Tanımı

Biyotransformasyon, canlı organizma veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla kimyasal dönüşümlerin gerçekleştirilmesi ve yararlı ürünlerin elde edilmesi olup biyoteknoloji çalışmalarında temelini oluşturmaktadır. Çağımızın önemli bilim kollarından olup günümüzde ilaç, gıda, koku ve kimya alanlarına katkıları büyüktür [4-6, 10, 14-19, 28-32]. Bunların yanında enerji üretimi, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması, toksik endüstriyel atıkların degradasyonu (yıkımı) gibi alanlarda da uygulama bulmaktadır [5, 28, 33-37].

Aktivitesi bilinen veya bilinmeyen tüm bileşiklerin türevlerinin hazırlanması, yeni ilaç hammaddelerinin keşfi için gereklidir. Bu türevler sonuçta zirai ilaç, gıda ve koku maddeleri de olabilir. Bu tür işlemler genelde klâsik olarak, yarisentez veya sentez yöntemleriyle yapılmaktadır.

Günümüzde hızlı gelişim gösteren biyotransformasyon alanında hedeflenen reaksiyonlar şu şekilde sıralanabilir [4, 6, 14, 38]:

- Seçici transformasyon reaksiyonları: Başlangıç maddesinin seçici olarak türevlendirilmesi,
- Kontrollü mikrobiyal reaksiyonlar: Başlangıç maddelerinin hedeflenen metabolitlere kısmi yıkılımı,
- Biosentetik reaksiyonlar: Başlangıç maddesinin farklı maddelere dönüştürülmesi,
- Memeli metabolizmasının *in vivo* taklidi.

1.1.2. Biyolojik Türevlerin Elde Edilmesi

Biyolojik türevlerin yapılması, aşağıda sıralanan 7 başlık altında gruplandırılmaktadır [39]:

1. Mikrobiyal transformasyon: Canlılığı ve üremesi sağlanan mikroorganizmaların bulunduğu besi ortamlarına, başlangıç maddelerinin ilâvesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlardır. En kolay ve en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu tez çalışmasında da bu yöntem kullanılmıştır.

2. Prekürsörler tarafından yönlendirilmiş biosentez: Biosentetik prekürsörlerin analogları besi ortamına eklenerek sekonder metabolitler elde edilmektedir. Bu şekilde yapay prekürsör maddeleri, enzimatik faaliyetlerine dahil eden organizmalar istenen metabolitleri verebilmektedir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için organizmanın iyi tanınması ve biosentezin her aşamasının iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu yöntem, penisilin ve aminoglikozit yapısındaki antibiyotiklerin endüstriyel üretiminde kullanılmaktadır.

3. Enzimatik olmayan biyotransformasyon: Bazı sekonder metabolitlerin oluşumunda, nadir de olsa enzimlerin rol almadığı biyosentetik basamaklara rastlanmıştır. Bu reaksiyonlarda ısı, ışık gibi fiziksel etkenler veya kimyasal maddeler katalizör görevini görmektedir. Benzer çalışmalar *in vitro* olarak gerçekleştirilebilmektedir. Urdamisin E maddesinde, S-metil gurubunun selenyum analogunun oluşturulması buna örnektir.

4. Metabolik manipülasyon: Kültür şartlarının belli parametrelerinin değiştirilmesi ile farklı ürünler elde edilebilmektedir. Bu yöntem stres fermantasyonu şeklinde de adlandırılır. Sıcaklık ve pH değişimi, kültür ortamına farklı kimyasal maddelerin ilâvesi, çalkalama hızı ve şekli gibi... Bu tip çalışmalar oldukça iyi sonuçlar vermesine rağmen yeterince araştırılmamıştır.

5. Enzim inhibisyonu: Büyümekte olan hücre kültürüne spesifik bir enzim inhibitörü ilâve edildiğinde belirli bir biyosentetik yolun bloke edilmesinden dolayı reaksiyon ve ürün değişebilmektedir. Örnek: Rapamisin sentezinde, metirapon adlı sitokrom P-450 enzimi inhibitörünün ilâvesiyle, dört yeni ürün elde edilmiştir.

6. Mutasentez: Bir biyosentetik yolun mutasyonu sonucu enzimler daha önce elde edilen üründen farklı ürünler verecektir. Burada mutajen bazı kimyasal maddelerin ilâvesi veya UV radyasyonu ile değişimler görülmektedir. Bu tip değişimler sonucu makrolitler, antrasiklinler ve polieterlerin biyosentezlerinde verimin arttığı ve bazı durumlarda yeni maddelerin oluştuğu belirlenmiştir.

7. Genetik Mühendisliği: Genetik manipülasyonlar sonucu biyosentetik yolların değişimi sağlanarak, hibrit antibiyotiklerin üretimi son yılların en önemli buluşlarından birisidir.

Bu yöntemlere ilâve edebileceğimiz yeni bir başlık ise “kombinatoryal biyokataliz”dir. Günümüzde kombinatoryal kimya adı altında yeni bir dal geliştirilmiş daha sonra biyotransformasyon ürünleri de kombinatoryal biyokataliz adı altında bu grupta yer almıştır. Kombinatoryal kimya, aktif anahtar moleküllerin, bir dizi kimyasal sentez sonucu oluşan türevleri ile hazırlanan

kütüphaneler şeklinde de tanımlanabilir. Bu yöntemlerle seriler halinde ve hızlı bir şekilde, yarı otomatik veya tam otomatik olarak, çeşitli türevlendirmeler gerçekleştirilmekte, yüksek verimli tarama (high throughput screening = HTS) yöntemleriyle de biyolojik aktiviteleri ve kimyasal yapıları aynı anda incelenebilmektedir. Böylece, mikro düzeyde ve binlerce maddenin aynı anda sentezi ve analizi yapılabilmektedir. Türevlendirme, aktivite belirlenmesi ve yapı tayini gibi işlemler dizisi özel düzeneklerle ve hızla gerçekleştirilir. Kombinatoriyal biyokatalizde ise aynı düzenekler doğal biyosentetik yolları kullanarak ve maddelerin oluşumundaki doğal reaksiyonlar dizisini taklit ederek daha aktif moleküllerin sentezine olanak sağlar. Kombinatoriyal biyokatalizin, kombinatoriyal kimyaya karşı avantajı daha uygun koşullar altında, stereoselektif reaksiyonları gerçekleştirebilmesidir. Yeni bir yöntemdir ve yakın gelecekte bu konuda ki gelişmelerin çok daha hızlı olacağı tahmin edilmektedir [39-43].

1.1.3. Biyokatalizörler

Genel tariflerde kısaca mikroorganizmalar ve enzimlerin kullanıldığı söylenmekle birlikte, biyotransformasyon reaksiyonlarının biyokatalizörleri şu şekilde sıralanabilmektedir:

A) Bütün hücre sistemleri

- a) Mikroorganizmalar,
- b) Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri,
- c) Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri,
- d) İnsan metabolizması,

B) Hücresiz preparatlar (enzimler)

İki ana grup altında sınıflandırılabilen biyokatalizörler ile ilgili daha geniş bilgi ve karşılaştırmalar aşağıda verilmektedir:

A) Bütün hücre sistemleri

a) Mikroorganizmalar

Hayat formları, 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 biyoçeşitlikte önemli rol oynamaktadır. Hayat zincirinin ilk halkalarını, evrimsel boyut da dahil 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. 17. yy'da mikroskobun keşfi ve 19. yy'dan sonraki gelişimi sayesinde bu konuda geniş çalışmalar yapan araştırmacılar milyonlarca mikroorganizmanın yaşadığını tahmin etmektedir. Günümüzde, yaklaşık 4200 bakteri ve 72000 fungus türünün insanoğlu tarafından keşfedilip isimlendirilmiş olmasına rağmen, sadece fungus türlerinin sayısı 1.6 milyon civarında olduğu tahmin edilmekte, çok daha büyük bir grup olan bakterilerin sadece % 0.1-1'inin tanındığı bildirilmektedir. Bitki kimyası ile yapılan araştırmalarla karşılaştırıldığı zaman mikroorganizmalarla çok daha az araştırma yapılmıştır. Buna rağmen mikrobiyolojik kökenli bir çok yeni madde tanımlanmıştır ve bunların bir çoğunda önemli biyolojik aktivitelere sahip ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır [11, 12, 44-49].

Mikroorganizmaların ürettikleri maddeler antibakteriyal, antifungal, insektisit, nematosit, sitotoksik, immünosupresan, antidiyabetik, antihiperkolesterolemik, hormon antagonistleri, antikanserojenik, kardiyotonik, vb. olarak ilaç sanayii tarafından büyük ilgi görmekte ve hâlen bir çoğu tedavide kullanılmaktadır [9, 12, 17, 24, 32, 46, 47, 50-53]. Penisilin G, 1928'de Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum* adlı mikroorganizmadan elde edilmiş ve 1941/42 yıllarında antibakteriyal terapötik madde olarak yaygın kullanım bulmuştur. Kısa süre önce bulunmuş olan klavulanik asit şu anda güçlü bir β -laktamaz grubu mikrobiyal kaynaklı bir doğal madde olarak tedavide kullanılmaktadır. *Trichoderma* türlerinin ürettikleri maddeler, bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadelede kullanılmaktadır. Ergosterol (provitamin-D2), *Saccharomyces cerevisiae* (bira mayası) ve birçok fungusun ürettiği bir steroid olup gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca birçok mikroorganizmanın vitamin-C üretebildiği bilinmektedir. Hâlen birçok amino asit, değişik mikroorganizmalar yardımıyla üretilmektedir [11, 12, 32, 52-58]. Mikroorganizmalar, ilaç etken maddelerinin elde edilmesi yanında çok farklı amaçlar için de kullanıldıkları (biyodegradasyon-çevre, koku-

gıda, ve kimya sanayi vb.) bilinmektedir. Bakteriler [10, 59, 60], mayalar [10, 60-63], filamentli funguslar [10, 60, 64-67] koku ve tat maddeleri üretiminde kullanılmışlardır. Biyotransformasyon araştırmalarındaki hızlı gelişim, doğal koku ve tat üretiminde bu büyük biyokatalizör grubun önemini daha da arttırmıştır [68-87].

Dünyada biyoçeşitliliği koruma ve artırma amacıyla, özellikle mikroorganizmaların ve hücre koleksiyonlarının çeşitli amaçlara hizmet verebilmesi, bu konuda ortak ve hızla gelişen bilgi ağlarının kurulmasını sağlamıştır [88, 89]. Farklı ülkelere ait olan ve yaygın olarak kullanılan mikroorganizma ve hücre kültür koleksiyonlarından bazıları Çizelge 1.1.'de verilmektedir.

Çizelge 1.1. Yaygın olarak kullanılan Mikroorganizma Kültür Koleksiyonlarından bazıları

	Açık İsmi	Ülke	Sayı	İnternet Adresi*
ATCC	American Type Culture Collection	ABD	45000	www.atcc.org
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures	Hollanda	35000	www.cbs.knaw.nl
CCFC	Canadian Collection of Fungus Cultures	Kanada	10500	res.agr.ca/brd/ccc
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Almanya	11000	www.dsmz.de
IFO	Institute for Fermentation	Japonya	16000	wwwsoc.nacsis.ac.jp/ifo
IMI (CMI)	International Mycological Institute (Commonwealth-CAB) -	İngiltere	12500	hwww.ukncc.co.uk
UKNCC	UK National Culture Collection			
NRRL	Northern Regional Research Lab. Agricultural Res. Service C.C. (USDA)	ABD	80000	nrri.ncaur.usda.gov

*Kasım 2000

Biyokatalizör olarak mikroorganizmaların kullanım üstünlükleri aşağıdaki bölümlerde karşılaştırılmalı olarak verilmektedir.

b) Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri

Tüm canlı bitki, doku kültürü laboratuvarlarında üretilmiş dokular ve hücreler, biyotransformasyonlarda kullanılabilir [90, 91]. Tüm canlı bitkinin biyokatalizör olarak kullanımında dönüşümü araştırılacak olan materyal, toprağa veya suya ilâve edilebileceği gibi, bitkinin iletim sistemine doğrudan da verilebilir. Doku ve hücre kültürlerinde, materyalin besi yerlerine ilâvesi şeklinde gerçekleştirilir. Bu uygulamaların tümünde canlı bitkide bulunan enzimler transformasyonları etkilemektedir. Bitki hücrelerindeki enzimlerin çeşitliliği göz önüne alınırsa bu tip reaksiyonların stabil ve tutarlı olmaması, dolayısıyla

reaksiyonların kontrolünün zorluğu kolaylıkla anlaşılır. Diğer olumsuzlukları, mikrobiyal transformasyonlarla karşılaştırmalı olarak şu şekilde sıralayabiliriz [85, 90-100]:

- Mikroorganizmaların hacimce eşit oranlarda çoğalması 20-40 dakika sürerken bitki hücreleri 20-200 saat sonra ancak iki katına çıkabilmekte, dolayısıyla biyotransformasyon reaksiyonları 15 günden 2-3 aya kadar sürebilmektedir. Bu süre içinde devamlılığın ve steril koşulların sağlanması oldukça güçtür,
- Bitki hücreleriyle yapılan biyotransformasyon çalışmalarında, genel olarak mikrobiyal sistemlere kıyasla düşük verimler elde edilmektedir,
- Bitkilerde biyosentetik yollar ve mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir, bitki hücrelerinin optimum şartlarda gelişmiş olmaları sekonder metabolitlerin de maksimum oranda olacağını garanti etmez,
- Hücre farklılaşması sonucu birçok sekonder metabolit oluşmakta ve bunun etkisiyle kimyasal farklılaşma da gerçekleşmektedir. Bunların ayrımı günümüz teknikleriyle henüz tam olarak mümkün değildir, yani metabolitlerin morfolojik farklılaşmayla mı yoksa kimyasal bir reaksiyon sonucu mu oluştuğu kesin olarak belirlenememektedir,
- Bitkisel hücrelerin kolaylıkla kontamine olabilmesi, bu tip biyotransformasyonun endüstriyel boyutta gelişimini ciddi olarak engellemektedir.

b) Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri

Bitkilerde olduğu gibi tüm canlı hayvan, doku ve hücre kültürleri biyotransformasyon amacıyla kullanılmaktadır. Canlı hayvan çalışmalarına örnek olarak solucan, fare, rat, ve tavşan ile yapılan transformasyon araştırmaları verilebilir [9, 101-110]. Bitki başlığı altında verilen tüm olumsuzluklar hayvansal biyokatalizörlerin kullanımında da geçerlidir.

Ayrıca tüm hayvanlarla yapılan deneylerde sonuçların kan, idrar gibi vücut sıvılarında aranması daha spesifik laboratuvar şartlarını gerektirmektedir.

c) İnsan metabolizması

Biyotransformasyon reaksiyonları insan vücudunda sürekli gerçekleşmektedir. Bundan dolayı, insanda bu tip reaksiyonlar çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [111-113]. Oluşan ürünler, yani metabolitler vücut sıvılarında aranır. Bitki ve hayvanların kullanımındaki tüm dezavantajlarının yanında etik kurallar da bu tür deneylerin azaltılmış olmasında önemli bir faktördür.

B) Hüresiz preparatlar (enzimler):

Bu çalışmalarda doğal kaynaklardan izole edilen veya ticâri olarak elde edilebilen saf veya yarı saf enzimler kullanılır [5, 6, 33, 50, 87, 114-119]. İzole enzimlerle yapılan çalışmalarda hedeflenen dönüşümler gerçekleştirilebilir, ancak pahalı oluşu, özel reaksiyon koşulları ve kofaktör gerektirmesi dezavantaj olarak belirmektedir. Ancak belli reaksiyon basamakları için kullanımları daha yaygındır. Yöntemleri ve uygulamaları sürekli gelişmekte olup reaksiyon ürününün genellikle kolay elde edilebilmesi en büyük avantajlarındanıdır.

Bütün hücre sistemleriyle hüresiz preparatların biyokatalizör olarak kullanımları Çizelge 1.2. ve 1.3.' de karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

Çizelge 1.2. Biyokatalizörlerin karşılaştırılması

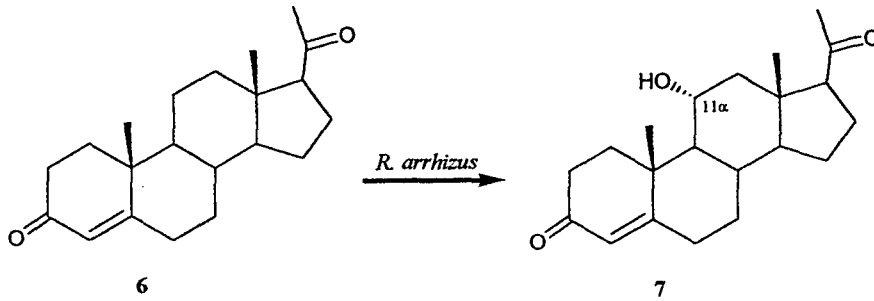
A) Bütün hücre sistemleri	B) Hüresiz Preparatlar
<i>Tipleri</i>	
▫ Büyüyen kültürler	▫ Hüresiz ekstreler
▫ Stasyonere hücreler	▫ Saflaştırılmış enzimler
▫ Liyofilize hücreler	▫ Modifiye edilmiş enzimler
▫ Multi enzim sistemleri	▫ Modifiye edilmiş hücreler
<i>Formları</i>	
▫ Canlı organizma, doku veya hücre	▫ Serbest halde
▫ Mikrokapsül/ mikroemülsiyon halinde	▫ Mikrokapsül/ mikroemülsiyon halinde
▫ İmmobilize hücre sistemleri	▫ İmmobilize sistem
<i>Ortam</i>	
▫ Sulu çözeltiler	▫ Sulu çözeltiler
▫ Organik çözücü içeren sulu çözeltiler	▫ Organik çözücü içeren sulu çözeltiler
▫ Su-organik faz bifazik sistemler	▫ Su-organik faz bifazik sistemler
▫ Organik çözücü içinde hücre içeren preparasyonlar	▫ Susuz organik çözücüler

Cizelge 1.3. Her iki yöntemin karşılaştırılması, avantaj (+) ve dezavantajları (-)

A) Bütün hücre sistemleri		B) İzole enzim sistemleri	
Ucuz	+	Pahalı	-
Çok cam malzeme ve özel düzenekler	-	Basit düzenekler	+
Ekstraksiyon ve izolasyon işlemleri karışık	-	Ekstraksiyon ve izolasyon işlemleri kolay	+
Yan reaksiyonlar, yan ürünler ve etkileşimler	+/-	Seçici ve özel	+
Çözücüler ve enzimler ile etkileşebilir	-	Çözücüler iyi tolere edilir	+
Enzim kofaktörleri mevcuttur	+	Enzim kofaktörlerinin ayrıca ilâvesi gereklidir	-

1.1.4. Kısa Tarihçesi

Biyotransformasyon, biyoteknoloji ile iç içe düşünüldüğü zaman, M.Ö. 3000 yılına, ilk ekmek mayasının ve ilk alkollü içeceğin yapıldığı dönemlere kadar gidilebilir. Pasteur 1858 de, *Penicillium glaucum* fungusu yardımıyla DL-amonyum tartarattan L-enantiyomerini elde etmiştir. Bu çalışma, rasematların kinetik ayırımının ve modern biyotransformasyon çalışmalarının ilk örneğidir. Yine Pasteur'un 1864'de, *Acetobacter aceti* ile etil alkolün oksidasyonu sonucu asetik asit (sirke) elde etmesi bilimsel literatüre geçmiş ilk biyotransformasyon reaksiyonudur. Ancak modern uygulamaların temelini steroidlerin mikrobiyal transformasyonu oluşturmuştur. Bunun en iyi örneği 1937'de Mamoli ve Vercellone'nin mayalar yardımıyla androstrendion'u testesteron'a indirgemesidir. 1952'de Peterson ve Murray, *Rhizopus arrhizus* adlı fungus ile progesteronun (6) 11 α -pozisyonuna hidroksil grubu ekleyebilmişler ve ürün (7) seçici olarak elde edilmiştir (Şekil 1.1.). Yıllar geçtikçe bu konu üzerindeki yoğun çalışmalar büyük bir veri ve bilgi birikimiyle sonuçlanmıştır. Verimli endüstriyel uygulamalar zaman içinde bu teknolojinin gelişimini hızlandırmıştır [4, 13, 14, 17, 29, 56-58].



Şekil 1.1. Progesteron'un biyotransformasyonu

1.1.5. Biyotransformasyon ve Farmakognozi

Biyolojik kökenli ve biyoaktif maddeler, farmakognozinin temel konusudur. Sadece biyoaktif maddeler değil, gıda katkı maddeleri (tat ve renk), parfümeri ve kozmetik ürünlerde kullanılan koku bileşikleri de doğal maddeler sınıfında olup önemli bir ekonomik değer taşımaktadır. Ayrıca doğal ürünler, model molekül olarak sağladıkları çeşitlilik ve biyolojik aktiviteleri ile sentetik kimyacılar model oluşturmaktadır. Doğal madde olarak nitelendirilen mikrobiyal biyotransformasyon ürünleri, farmakognozi içindeki yerini hızla almaktadır. Bu teknikte mikrobiyoloji biliminin hızlı gelişimi ve katkıları önemli bir yer tutmaktadır. Sadece farmakognozik açıdan değil, sosyolojik ve ekonomik açıdan da doğal maddeler gelişmiş ve modern toplumlarda “sağlıklı ve doğal yaşam” felsefesini benimseyen tüketicilerin, gıda katkı maddeleri, ilâç, parfümeri ve kozmetik ürünler de ilk tercihi olmaktadır [8, 60, 69, 79, 120, 121-123].

Doğal maddelerin gerek farmakognozik açıdan gerekse yukarıda kısaca bahsedilen diğer alanlardaki önemlerinden dolayı biyotransformasyon daha da önem kazanmaktadır. Biyotransformasyon ürünleri ön çalışmalarla belirlenen mikroorganizma ve optimum şartların korunmasıyla elde edilebilme olanağı vardır. Ayrıca bazı değişikliklerle, endüstriyel üretime geçmek de mümkündür [20, 33, 87, 114, 124-128]. Doğal zenginliklerin ve çeşitliliğin korunması da önemli bir avantaj olarak dikkat çekmektedir. Bu durumlarda mikrobiyal biyotransformasyon yöntemleri ilâç ve gıda endüstrisine verimli ve kaliteli hammaddeler sağlayan daha ucuz endüstriyel çözümler getirebilmektedir. Eğer biyoteknolojik yöntemler klâsik yöntemlerden daha ekonomik ürünler ortaya koyabilirse endüstri bu yönde daha çok yatırım ve üretim yapmayı tercih edecektir [20, 69, 78, 85, 122, 125].

Biyotransformasyon uygulamalarının avantajları şu şekilde özetlenebilir:

- İlâç etken maddeleri, gıda katkı maddeleri ve koku hammaddeleri gibi özel kimyasalların dönüşümü ve üretiminin sağlanması (antibiyotik ve steroidlerin ucuz ve kolay üretimi),
- Yapı etki ilişkilerinin araştırılması için türevlerin kolaylıkla yapılabilmesi,

- Seçilmiş kimyasal türevlerin (enantyospesifik, stereospesifik vb) üretimi,
- Rasemik karışımların seçici olarak ayrımı,
- Biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanabilmesi,
- Biosentez çalışmaları ve biyolojik sistemlerin taklit edilebilmesi,
- Biyodegradasyon (çevre, ekoloji, geri dönüşüm, biyokütle, biyoenerji konularında).

1.1.6. Biyotransformasyon ve Fermantasyon

Fermantasyon, mikrobiyal transformasyondan prensip olarak farklılık gösterir. Fermantasyon işleminde mikroorganizmalar tarafından üretilen madde, kültür vasatını oluşturan karbon, hidrojen, azot ve inorganik maddelerinin kullanımıyla ve mikroorganizmanın enzimlerinin katalizörlüğünde oluşan doğal bir maddedir. Gıda maddelerinin üretiminde de geniş bir şekilde kullanılır. Ham veya pişirilmiş gıdalara kendine has özellikler verir (tat, koku, görünüş, dayanıklılık, istikrarlılık, hijyenik güvenlik). Fermantasyon işlemi günümüzde sadece gıdalarda değil, antibiyotik, ilaç etken maddesi, amino asit, enzim, koku maddesi, kimyasal madde ve çözücü üretiminde laboratuvar ölçekten endüstriyel ölçeğe kadar yaygın olarak kullanılmaktadır [54, 74, 86, 129].

Biyotransformasyonda ise canlı veya izole biyokatalizörler besi yerine ilâve edilen materyali dönüştürmektedir. Biyotransformasyon ile üretimlerde süre fermantasyona göre daha kısa, verimler daha yüksek, reaksiyonlar daha basittir.

1.1.7. Başlıca biyotransformasyon Reaksiyonları

Burada sıralanacak olan reaksiyonlar biyotransformasyonların neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir. Geniş bir çeşitliliğe sahip biyotransformasyon reaksiyonlarının bir özelliği de sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek reaksiyonları gerçekleştirebilme olanağıdır. Günümüzde kimyasal maddeler nasıl kolaylıkla temin edilebiliyorsa biyokatalizörlerin de temini kolaydır. Birçok kimyacı biyokatalitik reaksiyonlara zaman zaman başvurmaktadır. Ancak biyotransformasyonların daha yaygın olarak

kullanılması için bu alanda yapılacak bir çok çalışma ve derlemeye ihtiyaç duyulmaktadır [5, 14, 16, 19, 29, 30, 52, 130-136].

Reaksiyon tipleri şu şekilde gruplandırılabilir:

1. Oksidasyon (Hidroksilasyon, Epoksidasyon, Dehidrojenasyon, Baeyer Villiger Oksidasyonu, Kısmi oksidatif degradasyon),
2. Redüksiyon (Ketonların, Aldehitlerin, Karboksilik asitlerin, Heteroatomların indirgenmesi, Çifte bağların hidrojenuasyonu),
3. Hidrolitik Reaksiyonlar (Esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlarına su girişi, N-demetilasyon),
4. Katılım ve Kondensasyon (Ester ve amit bağlarının oluşumu, Asikloin kondensasyonu, C=C bağlarına amonyak ilâvesi, kupling reaksiyonları),
5. İzomerizasyon,
6. Yeni C-C bağlarının oluşumu,
7. Yeni heteroatomların ilâvesi.

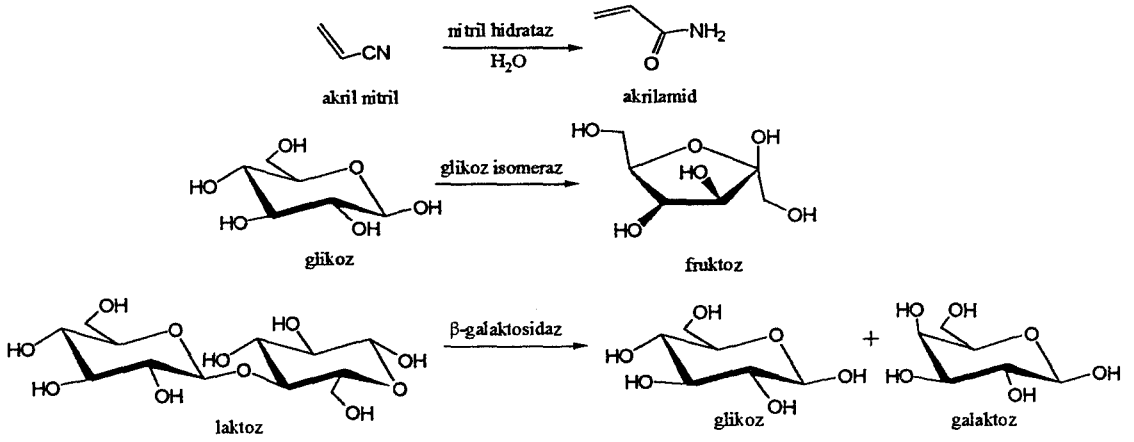
1.1.8. Klâsik Kimyasal Reaksiyonlara Üstünlükleri

Biyotransformasyon reaksiyonlarının klâsik kimyasal reaksiyonlara üstünlükleri şu şekilde özetlenebilir:

- Kimyasal olarak inert veya inaktif karbon atomlarına fonksiyonel grupların ilâvesi (Örn.: Terpenoitlerin regioselektif hidroksilasyonları) mümkündür,
- Birden fazla fonksiyonel gruba sahip moleküllerin seçici olarak türevlerini hazırlanması mümkündür,
- Şiral türev oluşturulur, proşiral karbon atomları kullanıldığında biyotransformasyon sonucu şiral türevler, rasemik ürün vermeden, kolaylıkla oluşturulabilir.
- Rasemik maddelerin ayrımı gerçekleştirilebilir. Bu yöntem endüstriyel olarak da kullanılmaktadır (Örn.: Amino asitler).

Tüm bunlar dikkate alınıp ve uygun şekilde kullanıldığında, aynı zamanda verimler iyi, ürünlerin ayrımı ve izolasyonu kolay ise biyotransformasyonlar zamanla klâsik üretim ve elde yöntemlerinin yerini almaya adaydır [6, 17, 20, 51, 57, 79, 125, 126].

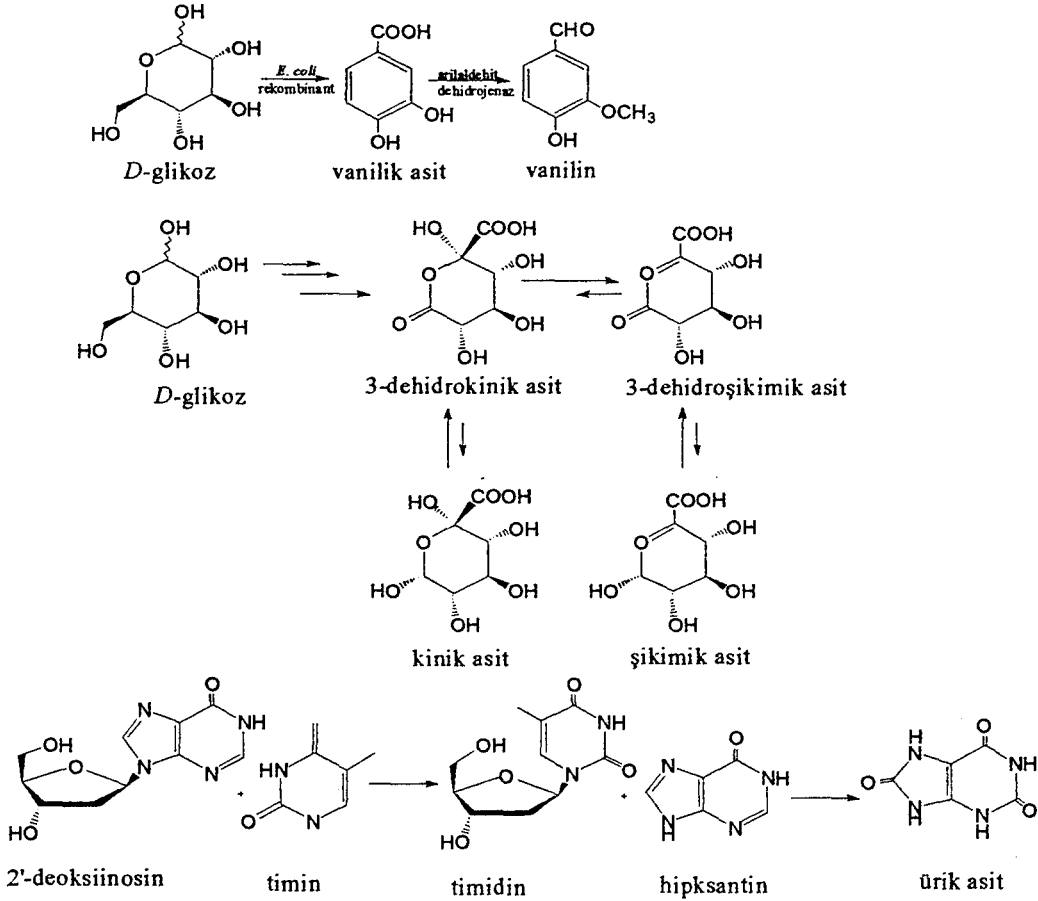
Endüstride biyotransformasyon teknolojisi kimyasal sentezlerin yerine kullanılmaktadır. Bunun en iyi örneği polimer kimyasının ana bileşiklerinden akrilamid üretimidir. Akrilamid, akrilnitril'den *Rhodococcus rhodochrous* adlı mikroorganizmanın nitril hidrataz enzimi ile biyotransformasyonu sonucu elde edilir. 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. Şekil 1.2.'de formülleri verilen bu işlemler, endüstriyel üretime başarıyla uygulanmış örneklerdir [125].



Şekil 1.2. Endüstriyel biyotransformasyonlar

Vanilin, şimik asit/kinik asit ve timidin endüstriyel üretim için potansiyel ürünlerdir. Bu ürünler üzerinde araştırma-geliştirme çalışmaları hâlen sürmektedir. Vanilin, taze *Vanilla planifolia* meyvalarında glikovanilin olarak bulunmaktadır. Meyvelerin fermantasyonu sırasında oksidasyonla glikovanilik alkole ve hidrolizle glükos ve vanilik alkole dönüşür. Vanilik aldehit'in oksidasyonu ile son ürün olan vanilin'i verir. Yıllık talep 120 ton olmasına rağmen sadece 2 ton miktarında üretilebilmektedir. Sentetik olarak ise fenolden elde edilmektedir. Ancak biyokatalitik olarak elde edilecek vanilin alternatif bir yöntem olarak klâsik reaksiyonlarla rekabet edebilir. Şimik 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 (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Potansiyel endüstriyel biyotransformasyonlar

1.1.9. Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörleri canlılar ve enzimler olduğundan reaksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli şartlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha çeşitli ve daha hassas olabilmektedir. Besi yerinin bileşimi, materyalin toksisitesi ve konsantrasyonu (tolerans aralığı % 0.1-10>), ortamın sıcaklığı (değişim limiti $\pm 2^\circ\text{C}$), çalkalama hızı (rpm), zaman (saat- ay), oksijen miktarı, pH (genellikle nötr) ve mikrobiyal biyokatalizde mikroorganizma suşunun kökeni önemli faktörlerdir. Yine mikrobiyal transformasyonda materyalin antimikrobiyal etkisi ve bu etkinin görüldüğü konsantrasyon önemle göz önünde tutulması gereken bir özelliktir.

1.1.10. Biyotransformasyon ve Enzimler

Temelde tüm biyotransformasyon reaksiyonları enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu enzim gurupları hakkındaki bilgiler tüm biyokatalizörlerle uygulanan reaksiyonların mekanizmaları hakkında fikir vermektedir [5, 6, 14, 15, 17, 50, 56, 87]. Enzimler, IUB (International Union of Biochemistry) İsimlendirme Komitesi tarafından, katalizledikleri reaksiyon çeşitlerine göre birçok alt gurupları olmakla birlikte başlıca 6 ana gruba ayrılmışlardır:

EC-1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarını katalizler. Örn.: $C-H \leftrightarrow CH-OH$, $CH-OH \leftrightarrow C=O$, $CH-CH \leftrightarrow C=C$ vb.

EC-2. Transferazlar: Fonksiyonel gurupların transferini katalizler. Örn.: Fosfat, asetat, glikosil, açil gibi fonksiyonel gurupların bir substrattan başkasına eklenmesini sağlar.

EC-3. Hidrolazlar: Esterlerin, glikozitlerin, amitlerin ve peptitlerin hidrolizlerini katalize eder.

EC-4. Liyazlar: Genelde H-X tipinde fonksiyonların $C=C$, $C=O$ ve $C=N$ çifte bağlarına katılımlarını veya çıkışını sağlayan reaksiyonları katalizler.

EC-5. İzomerazlar: Bu tip enzimler çifte bağ yer değişimi, *Z/E* ve *cis/trans* izomerizasyon, rasemizasyon ve epimerizasyonlarını katalizler.

EC-6. Ligazlar: ATP enerjisi sayesinde C-O, C-S, C-N ve C-C gibi katılımları katalizler.

1.2. Doğal Koku ve Tat Maddeleri

“Doğal koku ve tat maddelerin” tanımı Amerikan Federal İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) yönetmeliklerine göre: uçucu yağ; oleorezin; esans veya ekstre; hidrolize protein; gıda değerinden çok gıdalarda koku ve tat fonksiyonu olan kavrulmuş, ısıtılmış, enzimatik faaliyet sonucu elde edilmiş veya türetilmiş baharat, meyve, meyve suyu, yenilebilir mantar/maya, ot, kabuk, tomurcuk, kök, yaprak veya benzer bir bitkisel materyal; et, deniz ürünü, kümes hayvanı, yumurta, süt ürünü veya bunların fermantasyon ürünleri olarak verilmektedir [60, 79, 81, 84, 85, 93]

Bu tanım hayvansal ve bitkisel ürünlerin yanında enzimatik ve fermentasyon ürünlerini de kapsamaktadır. Bir bileşiğin doğal kabul edilebilmesi için doğal bir başlangıç maddesinden üretilmesi ve üretimde hiçbir sentetik maddenin rol almamış olması gerekir. Dolayısıyla kimyasal reaksiyonla elde edilen madde doğal olarak nitelendirilemezken biyotransformasyon ile elde edilen madde yönetmeliklere göre olarak doğal kabul edilebilir. Sentezler ile elde edilen ürünler ise “suni tatlandırıcılar” olarak adlandırılır. Bu uygulama benzer bir şekilde Avrupa da kabul görmektedir [10, 85, 120, 137]. Ancak aynı tanım bitkisel doku hücreleriyle yapılan biyotransformasyon ve ürünleri için henüz tam açık değildir.

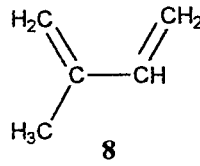
Tat ve gıda katkı maddeleri kadar büyük bir ekonomik potansiyele sahip olan kozmetik amaçlı koku maddeleri de biyoteknolojinin ilgi alanına girmektedir. Farklı doğal kaynaklardan yeni koku bileşiklerinin elde edilmesi her zaman ilgi ve araştırma konusu olmuştur [81, 93, 138-140]. Doğal ürünlere olan aşırı talepten dolayı, doğal ürün olarak koku bileşiklerinin biyotransformasyon ile üretilmesi, son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı alanlardan olmuştur [10, 75, 77, 79, 122, 137]. Aroma biyoteknoloji adı altında yeni bir terim ve araştırma alanı gelişmiştir [10, 81, 137]. Henüz verimler ve ürün çeşitleri istenen boyutlara ulaşmamıştır, ancak vanilin gibi ekonomik değeri yüksek moleküller üzerinde optimizasyon çalışmaları ve bir çok terpenik madde ile de araştırmalar sürmektedir [125, 141, 142].

Doğal koku ve tat maddesi olarak uçucu yağların yoğun olarak kullanıldığı bilinmektedir. Uçucu yağların bileşimleri ise monoterpen ve seskiterpen, kısmen de diterpenlerden oluşmaktadır. Bu tezin konusu monoterpenlerden oluşmakta, bu nedenle de sadece monoterpenlerle ilgili daha geniş bilgiye yer verilmektedir.

1.2.1. Monoterpenler

Monoterpenler, izopren türevleridir. İzopren türevleri ile ilgili ilk çalışmalar 19. yy'da başlamıştır. 1818'de Labillardière terementi ile araştırmalar yaparken karbon:hidrojen oranı 5:8 olan bir bileşiğe erişmiştir. 1826'da Faraday kauçuk ile terementi arasındaki benzerliği araştırırken kauçuğun formülünü, C_5H_8 olarak vermiştir. 1860'da Williams kauçuğun 300-350°C'de pirolizi sonucu elde ettiği

aynı üniteye “izopren” adını vermiştir. 1868’de Hlasiwetz ve Hinterberger, terementi buharından elde ettikleri sıvı ürünün formülünü C_5H_8 olarak bildirmişler, 1884’de Tilden, kauçuğun kuru distilasyonu ile elde edilen ürünle terementiden elde edilenin aynı izopren olduğunu açıklamıştır. 1884-1887 yılları arasında bu konuda araştırmalarını sürdüren Otto Wallach “izopren kuralı”nı açıklamaya çalışmış, C_5H_8 ünitelerine hemiterpen, $C_{10}H_{16}$ ünitelerine de gerçek “terpen”, $(C_5H_8)_x$ ünitelerine de politerpen demiştir. Diğer alt guruplar (seskiterpen, diterpen vb.) daha sonra açıklanmış ve $(C_{10}H_{16})_x$ formülüne uyanlar politerpen sınıfına dahil edilmiştir. İzopren kuralı, daha sonraki yıllarda yapılan ve yapılmakta olan araştırmalara ışık tutmuştur. 1920’de Ruzicka, Wallach’ın hipotezi doğrultusunda izopren’in (8) açık formülü çizerek konuya katkıda bulunmuştur [143-147].



“Terpen” terimi ilk defa Kekule tarafından terementi yağındaki $C_{10}H_{18}$ formülüne uyan hidrokarbonlar için, “terpenoit” terimi ise 1955’lerde izopren ünitesi taşıyan sekonder metabolitlerin tarifinde kullanılmıştır [145].

Çizelge 1.4. Terpenoitlerin sınıflandırılması

Sınıf	C Atomu Sayısı	İzopren Ünitesi sayısı
Hemiterpen	5	1
Monoterpen	10	2
Seskiterpen	15	3
Diterpen	20	4
Sesterterpen	25	5
Triterpen	30	6
Tetraterpen	40	8
Politerpen	40>	8>

Monoterpenler, iki izopren ünitesinden oluşan 10 karbonlu terpenlerdir. Uçucu yağların ve oleozinlerin karakteristik bileşenleridir. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin salgı sistemlerinde depolanırlar, diğer bitkilerde ise minör metabolitler olarak bulunurlar. Günümüzde yapısı tayin edilmiş 740 kadar monoterpen bilinmektedir. İki izopren ünitesinin çok farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi, 40 ayrı iskelete sahip olduklarını ortaya koyar. Ayrıca alkol, ester, keton

ve aldehit gibi grupları da taşırlar. [148-150]. Monoterpenleri konu alan bir çok derleme mevcuttur [144, 151-156].

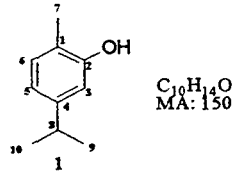
Monoterpenler bitkiler aleminde Asteraceae, Burseraceae, Asteraceae (Compositae), Cupressaceae, Gramineae, Hypericaceae, Lamiaceae (Labiatae), Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Orchidaceae, Pinaceae, Pittosporaceae, Podocarpaceae, Rosaceae, Rutaceae, Taxodiaceae, Umbelliferae (Apiaceae), Valerianaceae, Violaceae ve Zingiberaceae gibi familyalarda yaygın olarak bulunurlar. Ayrıca Bryophyta (ciğerotu), bakteri, fungus, deniz canlıları (alg, yosun, yumuşakçalar vb.), böcek ve benzeri eklembacaklılarda bulunurlar. Ayrıca timsah ve kunduz gibi gelişmiş canlıların glandüler salgılarında ise gıdalardan absorpsiyon sonucu birikmiş olduğu düşünülen monoterpen ve türevleri bildirilmiştir [36, 146, 148, 157, 158].

Bu çalışmada kullanılan monoterpenlerle ilgili bilgiler bu bölümde verilmektedir:

1.2.1.1. Karvakrol

Sinonimleri: 5-izopropil-2-metilfenol; hidroksi-4-izopropil-1-metilbenzen; *p*-menta-1,3,5-trien-2-ol; 2-hidroksisimen; simofenol; *p*-simen-2-ol; 5-izopropil-*o*-kresol

Formülü:



CAS No: 499-75-2

FEMA: 2245

Fiziko Kimyasal ve KN: 237°C; d: 0.976; n_D: 1.5235

Spektral Veriler:

¹H NMR (400 MHz): δ 1.24 (s, H-9), 1.26 (s, H-10), 2.26 (s, H-7), 2.85 (m, H-8) 6.7-6.77 (m, Ar-H).

¹³C NMR (100 MHz): δ 15.9 (C-7), 24.5 (C-9,10), 34.2 (C-8), 113.8 (C-3), 119.4 (C-5), 121.8 (C-1), 131.5 (C-6), 148.9 (C-4), 154.0 (C-2).

MS *m/z* : 150, 135 (100), 115, 107, 91, 77, 66, 51, 39.

GC-FT/IR: 3648, 2969, 1583, 1512, 1424, 1225, 1176, 1111, 808 cm⁻¹.

Bulunuşu:

Familya: Agavaceae, Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Ericaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Meliaceae, Paeoniaceae, Sapindaceae, Trichocoleaceae, Verbenaceae, vb.

Fiyatı: 36-42 \$/kg

Kaynak:

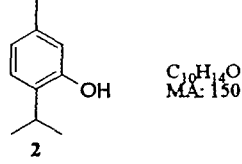
[Napralert, Frutarom], [22, 149]

1.2.1.2. Timol

Sinonimleri:

2-izopropil-5-metilfenol; 5-metil-2-(1-metiletil)fenol;
p-menta-1,3,5-trien-3-ol; *p*-simen-3-ol; 6-izopropil-*m*-kresol; 3-hidroksi-
4-izopropiltoluen; 3-hidroksi-*p*-simen; timianik asit; timianik kâfur ; *m*-
timol

Formülü:



CAS No:

89-83-8

FEMA: 3066

Fiziko Kimyasal ve Spektral Veriler:

EN: 50-51°C; KN: 232°C; d: 0.965; n_D : 1.5227

1H NMR (400 MHz): δ 1.25 (s, H-9), 1.27 (s, H-10), 2.29 (s, H-7), 3.18 (m, H-8) 6.59-6.76 (m, Ar-H).

^{13}C NMR (100 MHz): δ 21.3 (C-7), 23.3 (C-9,10), 27.2 (C-8), 116.7 (C-2), 122.3 (C-6), 126.8 (C-5), 132.1 (C-4), 137.1 (C-1), 153.0 (C-3).

MS m/z :150, 135 (100), 115, 91, 77, 66, 51, 39.

GC-FT/IR: 3649, 2970, 2882, 1510, 1426, 1289, 1218, 1151, 807 cm^{-1} .

Bulunuşu:

Familya: Annonaceae, Apiaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Burseraceae, Cappariaceae, Chenopodiaceae, Cistaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Malvaceae, Menispermaceae, Myrtaceae, Paeoniaceae, Polygalaceae, Rutaceae, Saururaceae, Scrophulariaceae, Simaroubaceae, Theaceae, Verbenaceae, Zingiberaceae, vb.

Fiyatı:

15 \$/kg

Kaynak:

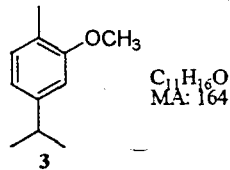
[Napralert, Frutarom] [149]

1.2.1.3. Karvakrol Metil Eter

Sinonimleri:

4-izopropil-2-metoksi-1-metilbenzen; karvakril metil eter;
2-metoksi-karvakrol; metil karvakrol

Formülü:



CAS No:

6379-73-3

FEMA: -

Fiziko Kimyasal ve Spektral Veriler:

KN: 216°C

1H NMR (90 MHz): δ 1.44 (s, H-9,10), 1.42 (s, H-7), 3.1 (m, H-8), 4.06 (s, OCH₃), 6.92-6.99 (m, Ar-H).

^{13}C NMR (22.5 MHz): δ 15.7 (C-7), 24.1 (C-9,10), 34.2 (C-8), 55.2 (OCH₃), 108.5 (C-3), 118.0 (C-5), 123.9 (C-1), 130.4 (C-6), 147.9 (C-4) 157.7 (C-2).

MS m/z :164, 149 (100) 134, 117, 105, 91, 77, 65, 51, 39.

FT/IR: 2959, 1612, 1585, 1512, 1464, 1413, 1253, 1170, 1134, 814 cm^{-1} .

Bulunuşu:

Familya: Annonaceae, Apiaceae, Cistaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Zingiberaceae, vb.

Fiyatı:

55-60 \$/kg

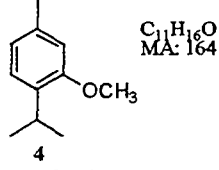
Kaynak:

[Napralert, Frutarom] [149]

1.2.1.4. Timol Metil Eter:

Sinonimleri: 1-izopropil-2-metoksi-4-metilbenzen;
2-izopropil-5-metilanisol; timil metil eter; 3-metoksi-timol;

Formülü:



CAS: 1076-56-8

FEMA: 3436

Fiziko Kimyasal ve KN: 211-212°C

Spektral Veriler:

¹H NMR (90 MHz): δ 1.15 (s, H-9), 1.23 (s, H-10), 2.32 (s, H-7), 3.28 (m, H-8), 3.08 (s, OCH₃), 6.67-7.13 (m, Ar-H).

¹³C NMR (22.5 MHz): δ 21.3 (C-7), 22.8 (C-9,10), 26.5 (C-8), 55.3 (OCH₃), 111.5 (C-2), 121.1 (C-6), 125.8 (C-5), 134.1 (C-4), 136.3 (C-1) 156.7 (C-3).

MS *m/z* : 164, 149 (100) 134, 119, 105, 91, 77, 65, 51, 39.

Bulunuşu:

Familiya: Asteraceae, Annonaceae, Aristolochiaceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Scrophulariaceae, Pinaceae, Poaceae, Rutaceae Verbenaceae, Zingiberaceae, vb.

Fiyatı:

49-65 \$/kg

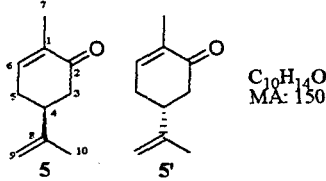
Kaynak:

[Napralert, Frutarom] [149]

1.2.1.5. Karvon

Sinonimleri: *p*-menta-6,8-dien-2-on; 6,8(9)-*p*-mentadien-2-on; karvol;
2-metil-5-(1-metiletlenil)-2-sikloheksen-1-on; 5-izopropenil-2-metil-2-sikloheksen-1-on; 1-metil-4-izopropenil-6-sikloheksen-2-on

Formülü:



CAS: 2244-16-8 (5), 6485-40-1 (5')

FEMA: 2249

Fiziko Kimyasal ve (5) KN: 230°C; d: 0.965; n_D: 1.4989 [α]_D + 61.2°

Spektral Veriler: (5') KN: 230-231°C; d: 0.9652; n_D: 1.4988 [α]_D - 62.46°

¹H NMR (400 MHz): δ 1.61 (s, H-9), 2.14 (s, H-7), 4.6- 4.64 (H-10), 6.6 (H-6).

¹³C NMR (100 MHz): δ 15.9 (C-7), 20.7 (C-9), 31.5 (C-5), 42.7 (C-4), 43.4 (C-3), 110.7 (C-10), 135.6 (C-6), 144.8 (C-1), 146.9 (C-8), 199.7 (C-2).

MS *m/z* : 150, 135, 108, 93, 82 (100), 54.

(5) GC-FT/IR: 3377, 3087, 2979, 2935, 2902, 1698, 1370, 1109, 898 cm⁻¹.

(5') GC-FT/IR: 3377, 3086, 2978, 2930, 1696, 1370, 1108, 898 cm⁻¹.

Bulunuşu:

Familiya: Anacardiaceae, Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, İridaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Parmeliaceae, Passifloraceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Valerianaceae, Verbenaceae, vb.

Fiyatı:

56.5-60 \$/kg (5), 17-20 \$/kg (5')

Kaynak:

[Napralert, Frutarom] [149]

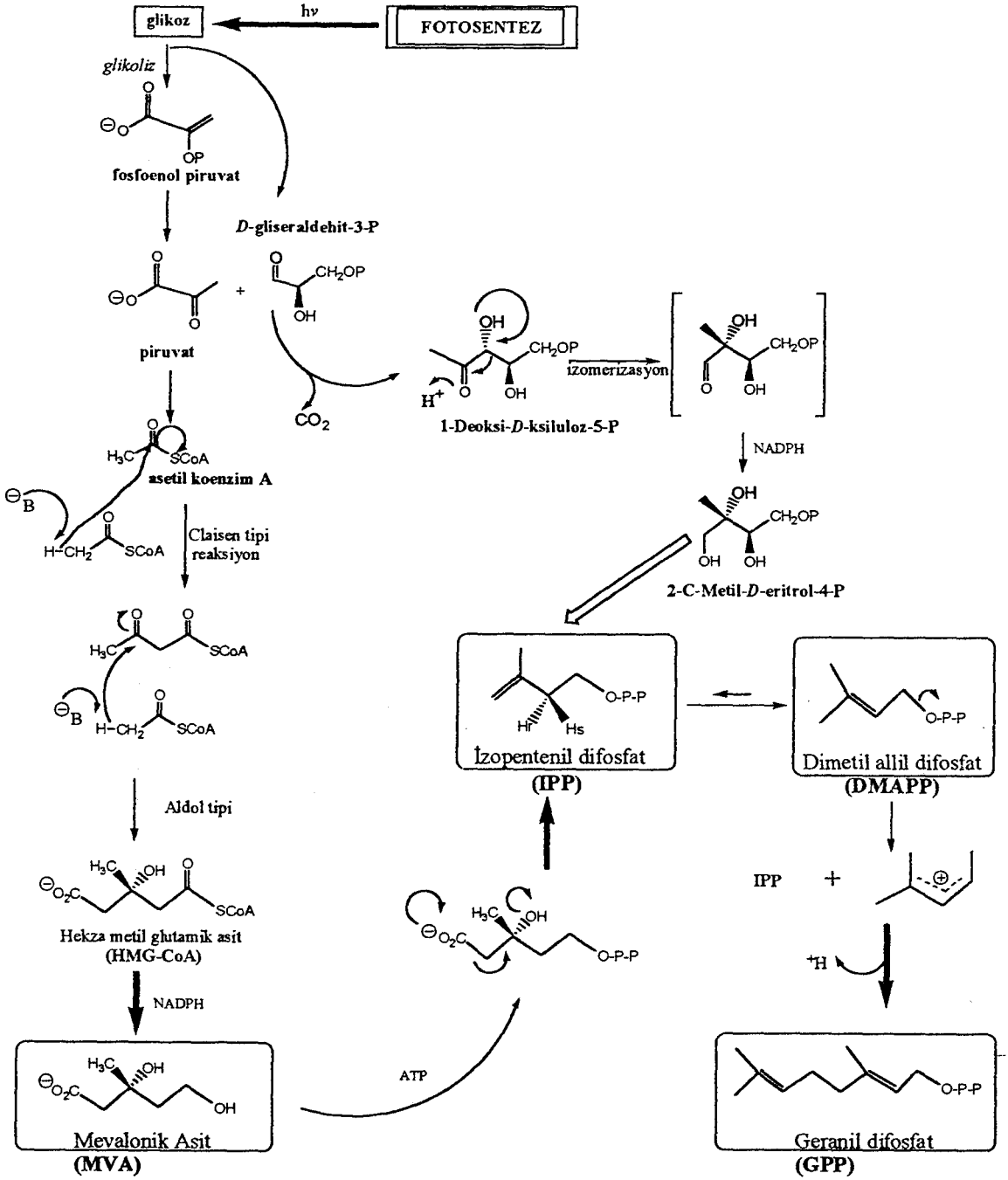
1.2.2. Monoterpenlerin Biyosentezleri

Biyosentez reaksiyonları doğanın tercihidir düşüncesi, biyosentezin mükemmelliğini de açıklamaktadır. Bu reaksiyonların aynı şekilde mikroorganizmaların da tercihi olabileceği düşünülmektedir. Biyosentez bilgilerinin biyotransformasyon reaksiyonlarının açıklanmasına yardımcı olacağı göz önüne alınarak monoterpenlerin biyosentezleri kısaca açıklanmıştır.

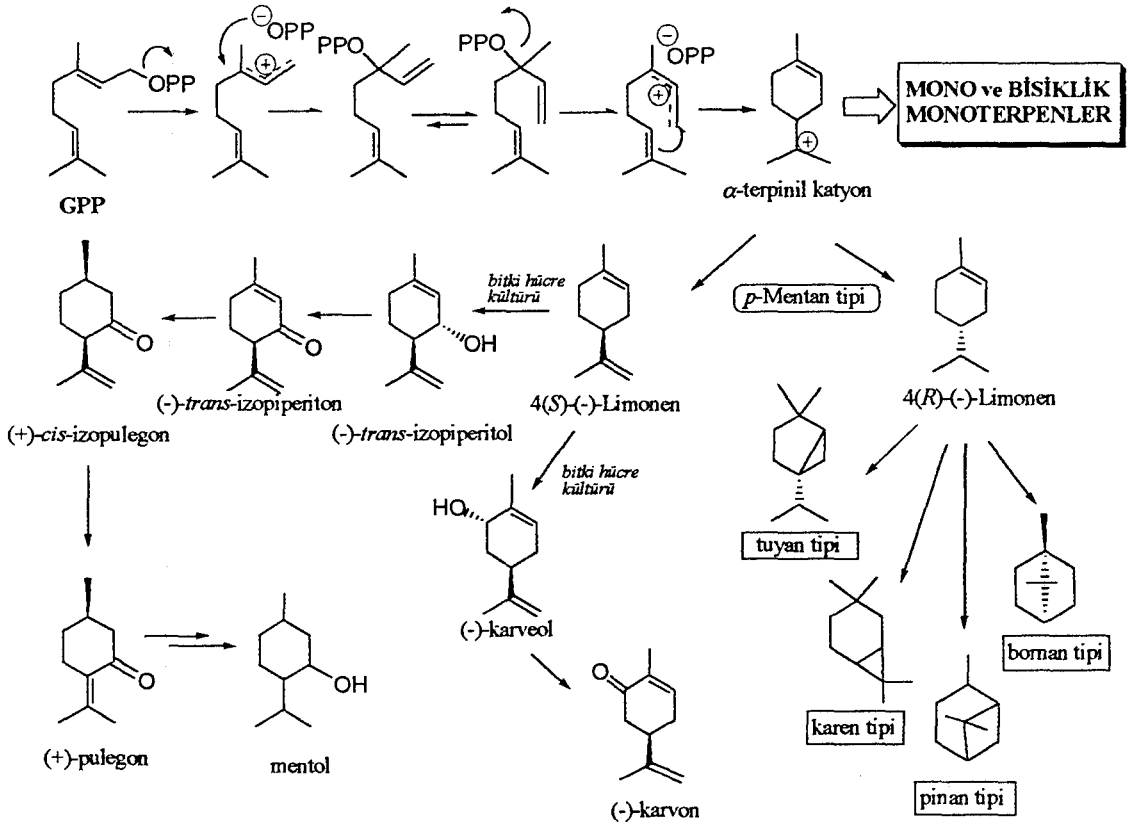
İzopren türevlerinin biyosentezi bitki hücrelerinde sitoplazma, mitokondri ve plastitlerde, özellikle monoterpenlerin biyosentezi ise salgı sistemi, idiyoplast hücreleri ve plastitlerde gerçekleşmektedir [144, 152, 158]. Monoterpenlerin biyosentezleri ile ilgili bilgiler, 1920'li yıllarda elde edilmiştir. Bu ilk teorilere göre, fotosentez ürünü glikozdan başlayan bu basamaklarda glikoz ile fosfofenol piruvat ve piruvat oluşmaktadır. Asetik koenzim-A'nın katılımı ve iki molekülün hekza-metil-glutamik asit (HMG-CoA) vermesi ve mevalonik asit ve izopentenil difosfat (IPP) oluşumuyla biyosentez devam etmektedir. Bu yol, klâsik asetat/mevanolat yolu olarak bilinmektedir.

Son yıllarda piruvat ve *D*-gliseraldehit-3-fosfat'ın 1-deoksi-*D*-ksiluloz-5-fosfatı ilk ara ürün olarak verdiği ve bunun izopentenil difosfata dönüştüğü teorisi savunulmaktadır. Bu yeni yol, piruvat/gliseraldehit-3-fosfat yolu olarak adlandırılmaktadır [159, 160].

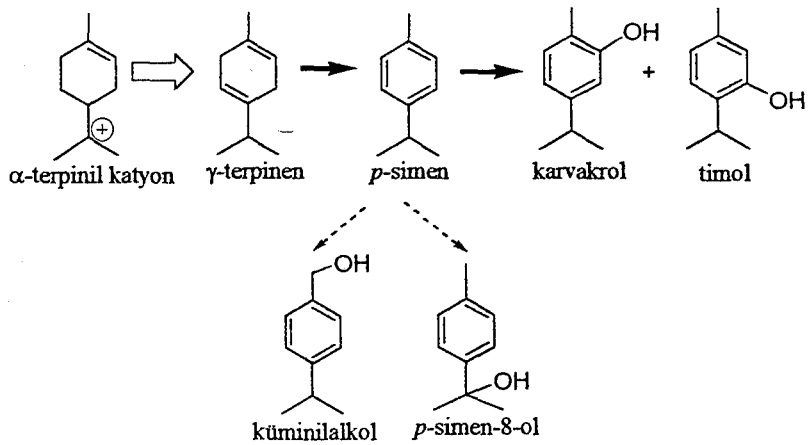
Her iki yolda da oluşan izopentenil difosfat, dimetil allil difosfata (DMAPP) ve geranil difosfata (GPP) dönüşmektedir. Geranil difosfat, monoterpen sentetaz (sentaz ve siklaz) enzimleri ile monoterpenlere dönüşür. Monoterpen biyosentezinin ön aşamaları Şekil 1.4.'de verilmiştir. Bu çalışmanın materyallerini oluşturan karvakrol, timol ve karvon'un biyosentezleri de kısaca verilmiştir (Şekil 1.5. ve 1.6.) [156, 159, 160].



Şekil 1.4. Terpenlerin biyosentezi



Şekil 1.5. Monoterpenlerin biyosentezi



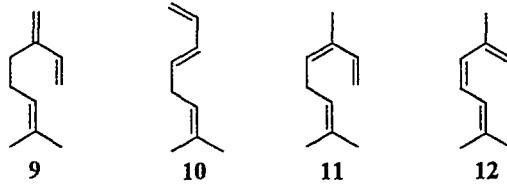
Şekil 1.6. Aromatik monoterpenlerin biyosentezi

1.2.3. Monoterpenlerin Sınıflandırılması

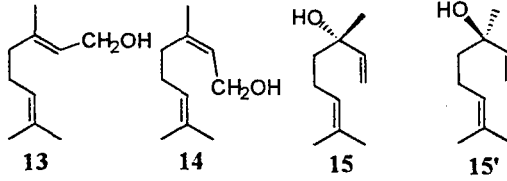
Farklı kaynaklarda çeşitli sınıflandırmalar olmasına rağmen [145, 148, 149, 154] monoterpenleri yapılarına göre en basit olarak şu şekilde sınıflandırabilir:

A) Asiklik monoterpenler:

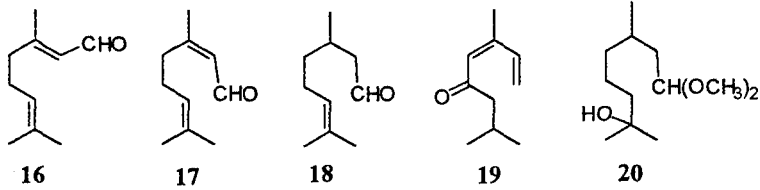
a) Hidrokarbonlar [β -mirsen (9), (*E*)- β -osimen (10), (*Z*)- β -osimen (11), allo-osimen (12)]



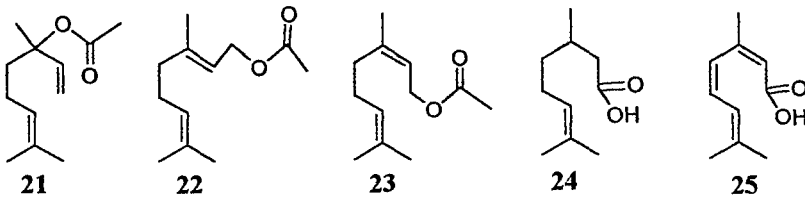
b) Alkoller [geraniol (13), nerol (14), (+)-linalool (15), (-)-linalool (15')]



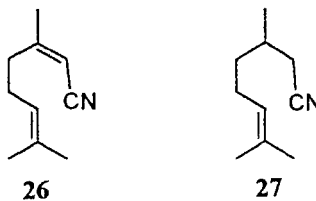
c) Aldehitler, ketonlar ve asetaller [geranial (16), neral (17), sitronellal (18), tageton (19), hidroksi-dihidrositronellal dimetil asetal (20)]



d) Esterler ve Asitler [linalil asetat (21), geranil asetat (22), neril asetat (23) sitronellik asit (24), dehidrogeranik asit (25)]



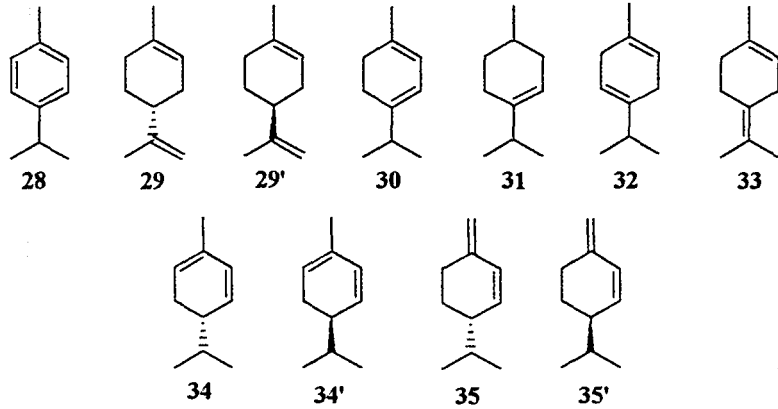
e) Diğer [geranik asit nitril (26), sitronellik asit nitril (27)]



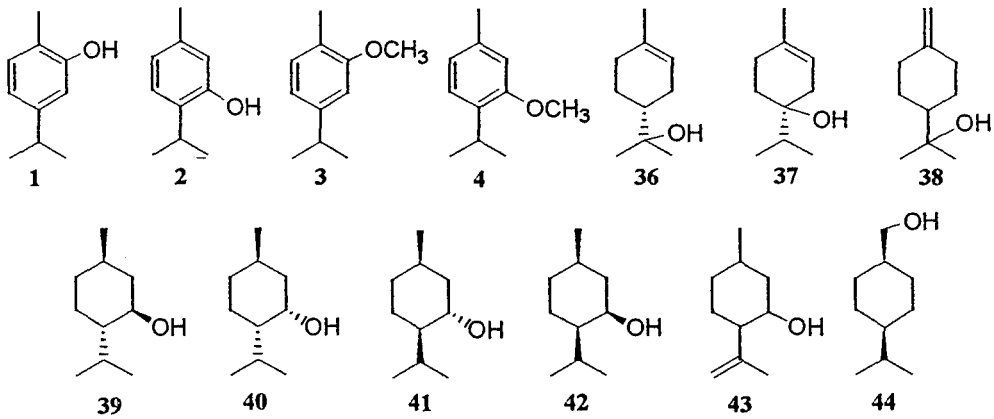
B) Monosiklik monotерpenler

p-Mentan grubundaki monotерpenler 1-metil-4-izopropil sikloheksan iskeletine sahip olup en geniş grubu teşkil eder.

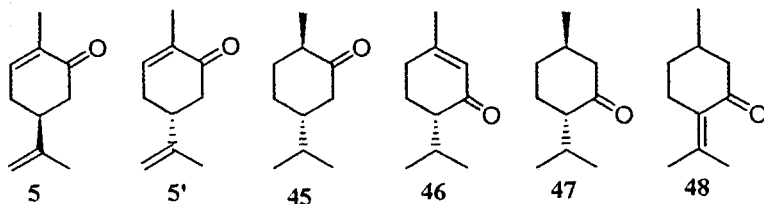
a) Hidrokarbonlar [*p*-simen (28), (+)-4*R*-limonen (29), (-)-4*S*-limonen (29'), α -terpinen (30), β -terpinen (31), γ -terpinen (32), terpinolen (33), (+)- α -fellandren (34), (-)- α -fellandren (34'), (+)- β -fellandren (35), (-)- β -fellandren (35')]



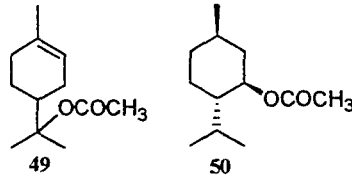
b) Alkoller ve eterler [karvakrol (1), timol (2), karvakrol metil eter (3), timol metil eter (4), (+)- α -terpineol (36), (+)-terpinen-4-ol (37), (+)- δ -terpineol (38), (-)-mentol (39), (+)-neomentol (40), (-)-izomentol (41), (+)-neoizomentol (42), *dl*-izopulegol (43), *cis*-heksahidro kuminil alkol (44)]



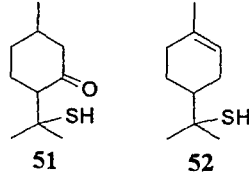
c) Aldehitler [(+)-karvon (5), (-)-karvon (5'), (-)-dihidrokarvon (45), (+)-piperiton (46), (+)-izomenton (47), pulegon (48)]



d) Esterler [α -terpenil asetat (49), (-)-mentil asetat (50)]

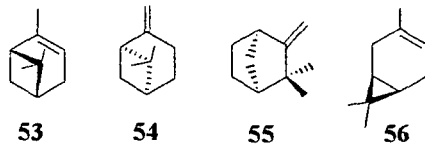


e) Diğer [8-merkapto-*p*-mentan-3-on (51), 1-*p*-menten-8-tiol (52)]

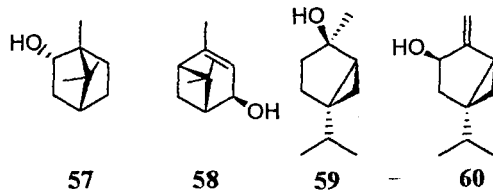


C) Bisiklik monoterenler:

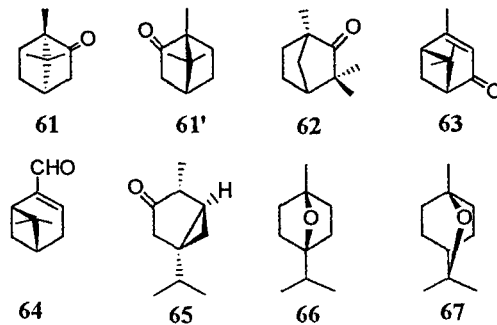
a) Hidrokarbonlar [(+)- α -pinen (53), (-)- β -pinen (54), (-)-kamfen (55), (+)- δ -3-karen (56)]



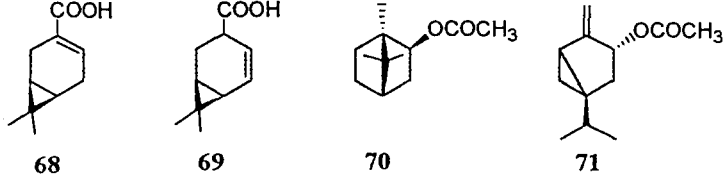
b) Alkoller [(+)-borneol (57), (+)-*cis*-verbenol (58), (+)-izotuyanol (59), (+)-*cis*-sabinol (60)]



c) Aldehitler, ketonlar [(+)- α -kâfur (61), (-)- α -kâfur (61'), (+)-fenkon (62), (+)-*cis*-verbenon (63), (+)-mirtenal (64), (-)-tuyon (65), 1,4-sineol (66), 1,8-sineol (67)]

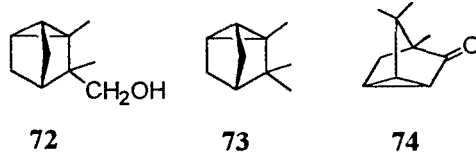


d) Asitler ve esterler [(+)-kamik asit (68), (+)-kaminik asit (69), (+)-izobornil asetat (70), sabinil asetat (71)]



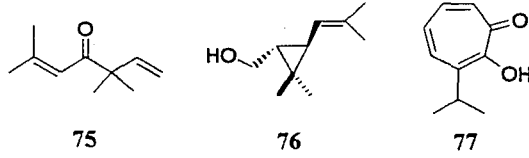
D) Trisiklik monoterpener:

[teresantalol (72), trisiklen (73), perisiklokâfur (74)]



E) Diğerleri:

[artemisia keton (75), (+)-transkrizantemik alkol (76), α -tuyaplisin (77)]



1.2.4. Monoterpenlerin Önem ve Kullanımları

Uçucu yağların bileşimlerindeki terpenlerin oranları göz önüne alındığında, genelde monoterpenerin daha bol bulunduğu görülmektedir.

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

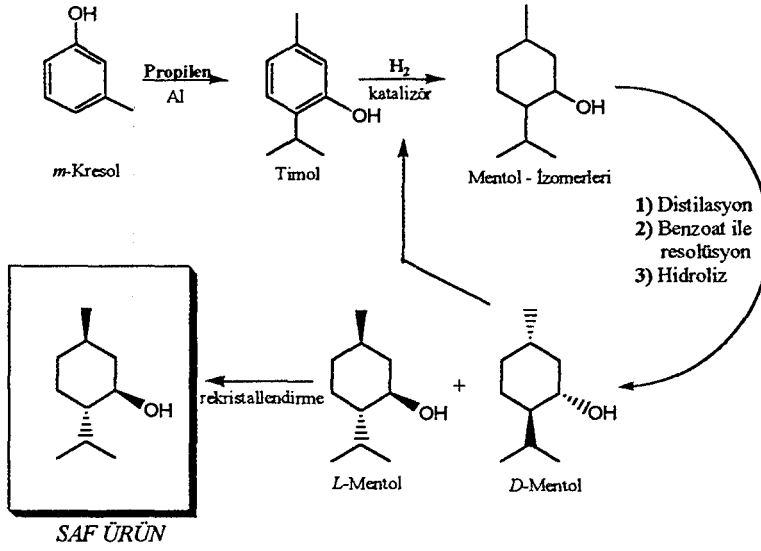
Monoterpenler diğer kokulu maddeler ile karşılaştırıldığında koku değerleri düşük, hidrofobik, polimerleşme ve otooksidasyona yatkındır. Rektifikasyon

işlemi ile uçucu yağdan öncelikle ayrılırlar. Bu şekilde monoterpenler kolay ve ucuz maliyetlerde elde edilebilir. Buna iyi bir örnek olarak α -pinen ve limonen elde edilmesi verilebilir. Türkiye uçucu yağlarının terpen kaynağı olarak değerlendirilmesi konusunda potansiyel uygulamalar hakkında bir derleme mevcuttur [161]. Bu konuda ayrıca TBAM'daki araştırmalar, projeler kapsamında devam etmektedir [162, 163]. Türkiye'de yetişen, karvakrolce zengin bitkilerin ekonomik olarak taşıdığı yüksek değer de, bu tez çalışmasının planlanmasında önemli bir etken olmuştur [22].

Monoterpenler, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi gibi temel fonksiyonlarında rol almadıkları düşünüldüğü için sekonder metabolit sınıfına sokulmuştur. Ancak son zamanlarda ortaya atılan fikirlere göre bitkilerin kimyasal ekolojilerinde patojenlere karşı savunma, polinasyon için böcek çekici (feromon) ve allelopatik madde (Örn.: Kompetitif fitotoksin) gibi fonksiyonlara sahiptirler. İnsektisit (piretrinler), pestisit (bornil asetat), böcek kovucu (sitronello, pulegon) özelliklerinden dolayı zirai mücadelede etkin olarak kullanılmaktadırlar [143-150, 156-158].

Monoterpenler, özellikle koku ve aroma maddelerinin sentezlerinde tercih edilen başlangıç maddeleridir. En çok kullanılan asiklik (özellikle: geraniol, nerol, linalool ve esterleri), monosiklik (*L*-mentol, (-)-karvon, α -terpineol ve esterleri) ve bisiklik (pinen, kâfur, borneol) monoterpenler bol miktarda ve ucuz olarak kolaylıkla bulunabilir [138, 139, 164].

Ayrıca, monoterpenler (pulegon, karvon, α -terpineol, vb.) bir çok biyoaktif ve doğal maddenin total 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 (Şekil 1.7.) [164].



Şekil 1.7. Sentetik yolla mentol üretimi

1.2.5. Monoterpenlerin Biyolojik Aktiviteleri

Monoterpenler küçük moleküller olmalarına rağmen çok eski zamanlardan bu yana bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. En yaygın kullanımları; antibakteriyal, antifungal, antiviral, rubefiyen (terementi yağı), kaşıntı (mentol), acı tonik, iştah açıcı, gastrointestinal rahatsızlıklarda, ekspektoran, sedatif, anestetik (öjenol), analjezik, antioksidan, antitussif, antiakne, antiinflamatuvar vb. etkilerinden dolayıdır [144, 148-150, 152, 156, 165-167]. Monoterpenlerin hücre düzeyinde enerji metabolizmalarına etki ettikleri bilinmektedir [168], 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 etkin oldukları bildirilmiştir [25, 109, 156, 169-178]

Bu bölümde çalışma materyali olarak kullanılan karvakrol, timol, karvakrol metil eter, timol metil eter ve karvon hakkında kaynak taramaları ve NAPRALERT, MEDLINE gibi bilgi bankalarının taranması sonucu elde edilen biyolojik aktivite bilgileri derlenmiştir. Bu bilgiler konuların başında özetlendikten sonra çizelgeler halinde verilmiştir.

1.2.5.1. Karvakrol

Karvakrol'un antimikrobiyal etkileri ile ilgili pek çok araştırma bulunmaktadır. Antimikrobiyal etkili bulunduğu mikroorganizmalar: *Aphanomyces cochlioides*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Botrytis cinerea*, *Branhamella catarrhalis*, *Candida albicans*, *C. vaginalis*, *Cladosporium werneckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *Geotrichum candidum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *M. racemosus*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. roquefortii*, *Phytophthora capsici*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. vulgaris*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus arrhizus*, *R. circinans*, *R. japonicus*, *R. kazanensis*, *R. oryzae*, *R. pygmaeus*, *R. stolonifer*, *R. tritici*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Salmonella typhimurium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Staphylococcus albus*, *S. aureus*, *Stemphylium versicarium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Trichoderma viride*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Vibrio cholera*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* olup % 0.025-10 konsantrasyon aralığında, LC₁₀₀ 5-100 µl ve MIC 0.5-500 µg/ml değerleri tespit edilmiştir.

Karvakrol *Aspergillus aegyptiacus*, *Pseudomonas aeruginosa* (500 µg/ml) ve *Rhizopus trici* (LC₁₀₀ > 100 ml) üzerinde etkisiz bulunmuştur.

Antiviral, antiparaziter, antioksidan, hipotansif, antispazmodik etkileri yanında asetilkolinesteraz ve lipitperoksidaz enzimlerini, bitki büyümesini, tümör gelişimini ve prostoglandin sentezini inhibe edici özellikleri bildirilmiştir.

İnsektisit etkisi *Drosophila melanogaster* ile araştırılmış LD₅₀ 1.6 µl bulunmuştur. Timol ile karışımları hazırlanarak deneyler tekrarlandığında LD₅₀ dozunun yükseldiği belirlenmiştir. *Biomphalaria glabrata* adlı yumuşakça üzerinde 50-100 ppm konsantrasyonda etkili bulunmuştur.

Farklı deney hayvanları üzerinde toksik etki aralığı 0.01- 1 g/kg ; LD₅₀ 0.81 g/kg ve MLD ise 2.7 g/kg olarak tespit edilmiştir.

Bu bulgular ile ilgili daha açıklayıcı bilgiler Çizlege 1.5.'te verilmiştir.

Çizelge 1.5. Karvakrol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

Aktivite	Yöntem	Doz	Sonuç	Kay.
Antimikrobiyal	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>Aphanomyces cochlioides</i>				
<i>Aspergillus aegyptiacus</i>	Agar Plak	x	-	180
<i>A. flavus</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 10 µl	+	179
	"	% 0.025	+	181
<i>A. niger</i>	"	x	+	182
	"	% 0.025	+	181
<i>Bacillus cereus</i>	"	3 mmol	+	183
	"	x	-	180
<i>Bacillus subtilis</i>	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	125 mmol	+/-	185
<i>Botrytis cinerea</i>	"	MIC 250 ppm	+	186
<i>Branhamella catarrhalis</i>	"	MIC 62.5 µg/ml	+	187
<i>Candida albicans</i>	"	200 mg/ml	+	188
	"	x	+	189
<i>C. vaginalis</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 5µl/disk	+	179
<i>Cladosporium werneckii</i>	"	LC ₁₀₀ 10 µl	+	179
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Agar Plak	MIC 50 µl/l	+	190
<i>Enterobacter aerogenes</i>	"	125 mmol	+/-	185
<i>Escherichia coli</i>	"	MIC 0.5 µg/ml	+	191
	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	200 mg/ml	+	188
	"	MIC 0.15 mg/ml	+	192
	"	125 mmol	+/-	185
	"	MIC 125 µg/ml	+	187
	Sıvı Kültür	MIC 500 µg/ml	Z	193
	Agar Plak	IC ₅₀ 3 mmol	+	194
	"	x	-	180
	"	8 µl	+	195
<i>Fusarium graminearum</i>	"	200 µg/ml	+	196
<i>F. moniliforme</i>	"	100 µl	+	197
	"	200 µg/ml	+	196
	"	> 0.1 mg/ml	Z	198
<i>F. poae</i>	"	200 µg/ml	+	196
<i>Geotrichum candidum</i>	"	% 0.025	+	181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	"	200 mg/ml	+	188
	"	MIC 250 µg/ml	Z	187
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sıvı Kültür	MIC 500 µg/ml	Z	193
<i>Micrococcus luteus</i>	Agar Plak	125 mmol	+/-	185
<i>Monilinia laxa</i>	"	MIC 125 ppm	+	186
<i>Mucor piriformis</i>	"	125 ppm	+	186
	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
	Agar Plak	MIC 62.5 ppm	+	186
<i>M. racemosus</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 10 µl	+	179
<i>Penicillium cyclopium</i>	Agar Plak	x	-	180
<i>P. digitatum</i>	"	MIC 250	+	186
<i>P. expansum</i>	"	MIC 250 ppm	+	186
<i>P. italicum</i>	"	MIC 250 ppm	+	186
<i>P. roquefortii</i>	"	% 0.025	+	181
<i>Phytophthora capsici</i>	"	100 µl	+	197

[#] + = aktif , - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.5. (Devam) Karvakrol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

<i>Proteus vulgaris</i>	Agar Plak	125 mmol	+/-	185
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+/-	184
	Agar Plak	200 mg/ml	+	188
	“	MIC 500 µg/ml	-	187
	“	x	-	180
	“	8 µl	-	195
<i>P. vulgaris</i>	“	200 mg/ml	+	188
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+	184
<i>Rhizoctonia solani</i>	Agar Plak	100 µl	+	197
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>R. circinans</i>	“	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>R. japonicus</i>	“	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>R. kazanensis</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>R. oryzae</i>	“	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>R. pygmaeus</i>	“	LC ₁₀₀ 5 µl	+	179
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ > 100 µl	-	179
	Agar Plak	MIC 125 ppm	+	186
<i>R. tritici</i>	Agar Plak disk	LC ₁₀₀ > 100 µl	-	179
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	Agar Plak	125 mmol	+/-	185
<i>Salmonella typhimurium</i>	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+	184
	Sıvı Kültür	MIC 250 µg/ml	Z	193
	Agar Plak	100 µg/ml	+	199
	“	% 10	+	200
	“	IC ₅₀ 1 mmol	+	194
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	“	100 µl	+	197
	“	> 0.1 mg/ml	Z	198
<i>Staphylococcus albus</i>	“	MIC 125 µg/ml	+	187
<i>S. aureus</i>	“	MIC 0.5 µg/ml	+	191
	Agar Plak/disk difüzyon	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	200 mg/ml	+	188
	“	MIC 0.15 mg/ml	+	192
	“	125 mmol	+/-	185
	“	x	-	180
	“	8 µl	+	195
<i>Stemphylium versicarium</i>	“	x	+	182
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	“	MIC 125 µg/ml	+	187
<i>Trichoderma viride</i>	“	x	-	180
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	“	x	+	201
<i>Vibrio cholera</i>	“	125 µg/ml	+	202
<i>V. parahemolyticus</i>	“	125 µg/ml	+	202
<i>V. vulnificus</i>	Sıvı Kültür	MIC 250 µg/ml	Z	193
Antiviral	<i>Haemophilus influenzae</i> Agar Plak	MIC 62.5 µg/ml	+	187
Ankilostomiaz (parazit)	İnsan (P.O.)	4 g	+	203
Antioksidan	Linoleik Asit Oksidasyonu	IC ₅₀ 17.1 µg/ml	+	204
	Rat Karaciğer Mitokondrisi	IC ₅₀ 6.5 µg/ml	+	204
	Rat Karaciğer Mikrozomu	IC ₅₀ 4.0 µg/ml	+	204

[#] + = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z = zayıf etki, +/- = değişken X = bilgi yok

Çizelge 1.5. (Devam) Karvakrol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

Antioksidan	Difenil pikril hidrazil	IC ₅₀ 30 µg/ml	z	204
	“	% 0.05	+	205
Antispazmodik	Kobay İleumu	0.2 mmol	+	206
	Erkek Rat Midesi	0.2 mmol	+	206
	Kobay İleumu	ED ₅₀ 0.1 mmol	+	207
	Asetil kolin ile uyarılmış Rat Duodenumu	IC ₅₀ 6.67 mmol	+	208
	BaCl ₂ ile uyarılmış Rat Duodenumu	IC ₅₀ 7.73 mmol	+	208
Asetilkolinesteraz inhibitörü	ELISA	1 mmol	+	209
Bitki germinasyon inhibitörü	Bitkilerde	x	+	210
Böcek kovucu	<i>Aedes aegypti</i> üzerinde kağıt filtre yöntemi ile	1.2 mg/cm ²	+	211
Hipotansif	Tavşan (İ.V.)	x	+	191
İnsektisit	<i>Drosophila melanogaster</i>	LD ₅₀ 1.6 µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (105:1)	LD ₅₀ 1.98 µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (55:1)	LD ₅₀ 3.07µl	+	212
Kardiyak depresan	Kurbağa kalbi	x	+	191
LDL oksidatif değişim inhibisyonu	Endotelial/Aortik Hücre Kültürü	IC ₅₀ 5.53 µmol	+	213
Lipit peroksidaz inhibitörü	x	0.067 mmol	+	205
Metastaz inhibitörü	<i>Rhizoctonia solani</i> Agar Plak	> 0.1 mg/ml	z	198
	<i>Phytophthora capsici</i> Agar Plak	> 0.1 mg/ml	z	198
Mollusidal aktivite	<i>Biomphalaria glabrata</i>	50-100 ppm	+	214
Prostaglandin inhibitörü	x	IC ₅₀ 4 µmol	+	215
Sitotoksik	Leuk-P388 Hücre Kültürü (Lösemi)	IC ₅₀ 4 µg/ml	+	216
Solunum depresanı	Köpek (İ.V.)	0.1 g/kg	+	217
Solunum inhibitörü	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> , Agar Plak	5 mmol	+	185
Spasmolitik aktivite	Kobay Trakesi	Değişik konstr.	+	218
Toksik etki (genel)	Tavşan Gastrik İntubasyon	1 g/kg	+	217
	Kobay (S.C.)	0.5 g/kg	+	217
	Kobay (İ.P.)	0.01 g/kg	+	217
Toksosite (kantitatif)	Rat (P.O.) (EX= 1 saat-3 gün)	LD ₅₀ 0.810 g/kg	x	219
	Tavşan (P.O.)	MLD 2.7 g/kg	x	220
	Tavşan (P.O.)	LD ₅₀ 810 mg/kg	x	220

[#] + = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Ayrıca, allerjik, anestezik, antialzenheimer, antiarteriosklerotik (IC₅₀= 5.53 µM), antikolinesteraz, antidiüretik, antienflamatuar (IC₅₀= 4 µM), antimelanomik (IC₅₀=120 µM/l), antitussif, karminatif, enterorelaksan, ekspektoran, iritan, pestisit, prostaglandin inhibitörü, trake relaksanı, trikonomosit (LD₁₀₀= 150 µg/ml), vermifuj etkileri de bilinmektedir [166].

Bağırsak kurtlarından *Entamoeba hartmanni*, *Blastocystis hominis*, *Endolimax nana* ve *Entamoeba histolytica*'ya karşı patent alınmıştır [221]. Yeni çalışmalarda gıda yoluyla alınan karvakrol ve diğer monoterpenlerin kansere karşı koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmektedir [25, 166, 168, 170-174].

1.2.5.2. Timol

Timolün antimikrobiyal etkili bulunduğu mikroorganizmalar şunlardır: *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Bacillus alvei*, *B. larvae*, *B. subtilis*, *Branhamella catarrhalis*, *Candida albicans*, *Capnocytophaga ochracea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Fusarium moniliforme*, *F. sambucinum*, *F. nucleatum*, *Geotrichum candidum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium* sp., *Penicillium roquefortii*, *Phytophthora capsici*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. vulgaris*, *Pythium irregulare*, *P. ultimum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Salmonella* sp., *Salmonella typhimurium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Selenomonas artemidis*, *Shigella schmitzii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus albus*, *S. aureus*, *Stemphylium versicarium*, *Streptococcus mutans* ve *S. pneumoniae*. Etkili olduğu konsantrasyon 6.5-250 µg/ml'dir. Ayrıca MIC değerleri 0.3-6.25 µg/ml arasında tespit edilmiştir.

Etkisiz olduğu mikroorganizmalar ise *Actinomyces viscosus*, *Bacillus larvae*, *Capnocytophaga ochracea*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *Pseudomonas aeruginosa* (500 µg/ml), *Salmonella typhimurium* (0.2 mmol), *Streptococcus sobrinus*'dur (200 µg/ml).

Antiviral, antiparaziter, anthelmintik, antinematot, balık zehiri, insektisit (LD₅₀ 1.98-4.27 µl), mollusidal, spermisit ve gebelik önleyici özelliklerinin yanında anestezi, Antikonvülzan, antioksidan (IC₅₀ 3.8-30 µg/ml), antispazmotik, antisitotoksik, sitotoksik (ED₅₀ 7.04-19.2 µg/ml), antitümör, asetilkolinesteraz (ACH), adenosin nükleotit releaz, ATP sentetaz, elastaz, kimotripsin, tripsin, kollajenaz, lipit peroksidaz, lipit peroksit, hemoliz, prostaglandin ve bitki germinasyon inhibitörü, düz kas gevşetici, ekspektoran, hipotermik, histaminik, negatif inotropik ve kronotropik etki, iskelet kası

stimülanı, kardiyak depresan, uterin gevşeme sağladığı ayrıca SSS üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Teratojenik etkisi ve genotoksitesisi belirlenmiş, genel toksisitesi 0.1–1.1 g/kg'dir. LD₅₀ 380 mg/kg olarak bulunmuştur.

Bu bulgular ile ilgili açıklayıcı bilgiler Çizelge 1.6.'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Timol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

Aktivite	Yöntem	Doz	Sonuç	Kay.
Antimikrobiyal	Sıvı Kültür	200 µg/ml	-	222
<i>Actinomyces viscosus</i>				
<i>Ascosphaera apis</i>	Agar Plak	MIC 10 ppm	+/-	223
<i>Aspergillus flavus</i>	x	1000 ppm	+	224
	Agar Plak	% 0.025	+	181
<i>A. niger</i>	"	x	+	182
	x	1000 ppm	+	224
<i>Bacillus alvei</i>	Agar Plak	MIC 10 ppm	+	223
<i>B. larvae</i>	"	MIC 10 ppm	-	223
<i>B. subtilis</i>	"	x	+	225
	Agar Plak disk	5 µl/disk	+	184
	"	125 mmol	+/-	185
<i>Branhamella catarrhalis</i>	"	62.5 µg/ml	+	187
<i>Candida albicans</i>	"	200 µg/ml	+	188
	Agar Plak disk	MIC 10µg/disk	+	226
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Sıvı Kültür	100 µg/ml	-	222
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Agar Plak-disk	10 µg/disk	+	226
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Agar Plak	50 µl/l	+	190
<i>Enterobacter aerogenes</i>	"	125 mmol	+/-	185
<i>Escherichia coli</i>	"	x	+	225
	Agar Plak disk	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	200 µg/ml	+	188
	"	125 mmol	+/-	185
	"	250 µg/ml	Z	187
	"	IC ₅₀ 3 mmol	+	194
	"	x	+	227
<i>Fusarium moniliforme</i>	"	100 µl	+	197
	"	> 0.1 g/ml	Z	198
<i>F. sambucinum</i>	"	% 0.1	+	228
<i>F. nucleatum</i>	Sıvı Kültür	50 µg/ml	Z	222
<i>Geotrichum candidum</i>	Agar Plak	% 0.025	+	181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	"	200 µg/ml	+	188
	"	500 µg/ml	Z	187
<i>Micrococcus luteus</i>	"	x	+	225
	"	125 mmol	+/-	185
<i>Mycobacterium sp.</i>	"	MIC 6.25 µg/ml	+	229
<i>Penicillium roquefortii</i>	"	% 0.025	+	181
<i>Phytophthora capsici</i>	"	100 µl	+	197
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Sıvı Kültür	200 µg/ml	-	222
	Agar Plak	100 µg/ml	-	230

[#] + = aktif , - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.6. (Devam) Timol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Agar Plak	100 µg/ml	z	231
	“	MIC 2 mmol	+	232
<i>Prevotella intermedia</i>	Sıvı Kültür	200 µg/ml	-	222
<i>P. melaninogenica</i>	“	200 µg/ml	-	222
<i>Propionibacterium acnes</i>	Agar Plak	200 µg/ml	z	233
<i>Proteus vulgaris</i>	“	125 mmol	+/-	185
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Plak disk	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	200 µg/ml	+	188
		500 µg/ml	-	187
		x	+/-	227
<i>P. vulgaris</i>	“	200 µg/ml	+	188
<i>Pythium irregulare</i>	“	0.02 mg/ml	+	234
<i>P. ultimum</i>	“	0.02 mg/ml	+	234
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Agar Plak disk	5 µl/disk	+	184
<i>Rhizoctonia solani</i>	Agar Plak	100 µl	+	197
		> 0.1 g/ml	z	198
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	“	5 mmol	+/-	185
<i>Salmonella sp.</i>	“	x	+	227
<i>S. typhimurium</i>	Agar Plak disk	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	140 µg/ml	+	199
	“	IC ₅₀ 1 mmol	+	194
<i>S. typhimurium</i> TA98	Agar Plak -AMES testi	0.2 mmol	-	235
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Agar Plak	100 µl	+	197
	“	> 0.1 g/ml	z	198
<i>Selenomonas artemidis</i>	“	MIC 2 mmol	+	232
<i>Shigella schmitzii</i>	“	x	+	227
<i>S. sonnei</i>	“	x	+	227
<i>Staphylococcus albus</i>	“	250 µg/ml	z	187
<i>S. aureus</i>	Metisilin dirençli tür	Değişik konstr.	+	236
	Agar Plak			
	Agar Plak/disk	5 µl/disk	+	184
	Agar Plak	200 µg/ml	+	188
	“	125 mmol	+/-	185
	“	175 µg/ml	+	199
“	x	+	227	
<i>Stemphylium versicarium</i>	“	x	+	182
<i>Streptococcus mutans</i>	“	100µg/ml	-	230
	Sıvı Kültür	400 µg/ml	-	222
	Agar Plak	200 µg/ml	z	231
	Sıvı Kültür	200 µg/ml	z	237
<i>S. mutans</i> Ingritt (c)	“	400 µg/ml	-	222
<i>S. pneumoniae</i>	Agar Plak	125 µg/ml	+	187
<i>S. sobrinus</i>	“	200 µg/ml	-	230
	Sıvı Kültür	200 µg/ml	-	222
	Agar Plak	50 µg/ml	+	231
	“	MIC 2.7 mmol	+	232
Antiviral	<i>Haemophilus influenzae</i>	125 µg/ml	+	187
	Agar Plak			

[#] + = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.6. (Devam) Timol'un biyolojik aktiviteleri[#]

Akarisit (parazit)	Tavşan <i>Psoroptes cuniculi</i>	0.125 µg/ml	+	238
Adenosin nükleotit releaz inhibitörü	Endotelium/Aortik Hücre Kültürü	60 µg/ml	x	239
Allerjik	İnsan (haricen)	% 1	-	240
	İnsan (haricen) dışı	% 1	+	241
Anestezik aktivite (lokal)	Rat Randal-Selitto testi	x	+	242
Antihelmintik	İnsan (P.O.), kancalı kurt	3 g/kişi	+	203
	İnsan (P.O.), kancalı kurt	x	+	243
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	x	+	244
	<i>Hirudo medicinalis</i>	x	+	244
Antisitotoksik	Polimorfo-Nükleer Lökosit Hücre Kültürü	x	-	174
Antikonvülzan	Fare (İ.P.)	x	-	245
	Fare (P.O.)	x	-	245
Antiinflamatuvar	Rat Pedal ödem	x	+	242
Antimutajenik	Agar Plak , AMES Testi <i>Salmonella typhimurium</i>	0.2 mmol	+/-	235
Antinematot	<i>Meloidogyne incognita</i>	x	+	246
Antioksidan	Linoleik asit Oksidasyonu	IC ₅₀ 16.7 µg/ml	+	204
	Rat Karaciğer Mitokondrisi	IC ₅₀ 6.9 µg/ml	+	204
	Rat Karaciğer Mikrozomu	IC ₅₀ 3.8 µg/ml	+	204
	Difenil pikril hidrazil	IC ₅₀ 30 µg/ml	z	204
	"	% 0.05	+	205
Antispazmodik	Kobay İnce Barsağı	ID ₅₀ 0.002 mol	+	247
	Köpek (incebarsak)	1-5 x	+	248
	Kobay İleumu	0.1 mmol	+	206
	Astilkolin ile uyarılmış Kobay İleumu	ED ₅₀ 0.86 mmol	+	207
	Astilkolin ile uyarılmış Rat Duodenumu	IC ₅₀ 4.88 mmol	+	208
	BaCl ₂ ile uyarılmış Rat Duodenumu	IC ₅₀ 7.25 mmol	+	208
Antitümör	<i>Artemia salina</i> larva	LC ₅₀ 12 µg/ml	z	249
	"	LC ₅₀ 56.3 mmol	+	250
	"	LD ₅₀ 514 µg/ml	+	251
Antiviral	Tatarcık Virüsü Hücre Kültürü	ED ₅₀ 8 µg/ml	z	252
	HIV-1 Virüsü Hücre Kültürü	IC ₅₀ 400 mmol	-	253
	<i>Herpes simplex 2</i> Hücre Kültürü	IC ₅₀ 0.8 µg/ml	+	254
	<i>Herpes simplex 2</i> Fare (haricen)	100 µg/ml	-	254
	<i>Haemophilus influenzae</i> Agar Plak	125 µg/ml	+	243
	Hepatitis A virüsü Hücre Kültürü	ED ₅₀ >10 µg/ml	+	255
Asetilkolinesteraz (ACH) inhibitörü	x	1 mmol	+	209
ATP sentezi inhibitörü	Protein	IC ₅₀ 0.021 mmol	+	249
Balık zehiri	<i>Oryzias latipes</i>	10µg/ml	+	256

[#] += aktif , -= inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.6. (Devam) Timol'ün biyolojik aktiviteleri[#]

Bitki germinasyon inhibitörü	Bitkilerde	x	+	210
Ekspektoran	Tavşan (P.O.)	1 g/kg	+/-	257
Elastaz inhibitörü	-	150 mmol	-	258
Gebelik önleyici (gonadotropin aktivite)	Olgunlaşmamış Dişi Rat (S.C.)	1 mg	+	259
Genotoksisite	<i>Drosophila melanogaster</i> Kanat Somatik Mutasyon Rekombinasyon Testi	2.9 µl	+	212
Hemoliz inhibitörü	RBC Hücre Kültürü	1 mmol	+	260
Hipotermik	Fare (İ.P.)	x	-	245
	Fare (P.O.)	x	-	245
Histaminik etki	Kobay Karaciğeri	% 0.2	+	261
İnotropik etki (negatif)	Kobay Atriumu	IC ₅₀ 100 µg/ml	+	262
İnsekt kovucu	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	x	-	263
İnsektisit	<i>Culex quinquefasciatus</i>	x	+	264
	<i>Aeges aegyptii</i> larvae	LC ₅₀ 0.79 ppm	+	249
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (1:11)	LD ₅₀ 4.27µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i>	LD ₅₀ 2.6 µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (105:1)	LD ₅₀ 1.98µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (55:1)	LD ₅₀ 3.07µl	+	212
	<i>Drosophila melanogaster</i> Karvakrol:Timol (1:11)	LD ₅₀ 4.27µl	+	212
	İskelet kası stimulanı	Kurbağa kası	25 µg/ml	+
Kardiyak depresan	Rat Atriumu	25 µg/ml	+	265
Kimotripsin inhibitörü	x	150 mmol	-	258
Kollajenaz inhibitörü	Rat Tubülleri	1.5 mmol	-	266
Kronotropik etki (negatif)	Kobay Atriumu	IC ₅₀ 100 µg/ml	+	262
LDL oksidatif değişim inhibisyonu	Endotelial-Aortik Hücre Kültürü	IC ₅₀ 4.02 mmol	+	213
Lipit peroksidaz inhibitörü	x	0.067 mmol	+	205
	Gamma-Radyasyonlu Metil Lineolat (180meq/kg)	% 1	+	267
	x	2.13 mmol	+	268
	Fare (İ.G.) CCl ₄ -indüksiyonu ile Hepatotoksisite	300 mg/kg	+	269
Mollusidal aktivite	<i>Biomphalaria glabrata</i>	50 ppm	+	214
Nitrik oksit supresyonu	Astrosit Hücre Kültürü	2.1 mmol	+	270
Perkutan absorpsiyon (5-floro-urasil)	Domuz epidermisi	% 5	+	271
Perkutan absorpsiyon (diklofenak sodyum)	Rat cildi	% 1	z	272
Profaj indüksiyonu	Agar Plak <i>Escherichia coli</i> br 513	1 µl	-	273
Prostaglandin inhibitörü	x	37 mmol	+	215
Psikotropik aktivite	Fare (İ.P.)	300 mg/kg	-	245
	Fare (P.O.)	400 mg/kg	-	245
Sitotoksik	Kobay Nötrofil Hücre Kültürü	5 mmol	+	274
	Leuk-P388 Hücre Kültürü	IC ₅₀ 0.80 µg/ml	+	216

[#] + = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.6. (Devam) Timol'ün biyolojik aktiviteleri

Sitotoksik	Vero Hücre Kültürü	8 µg/ml	z	252
	Ca-A549 Hücre Kültürü	ED ₅₀ 15.34 µg/ml	z	249
	Ca-Meme-MCF-7 Hücre Kültürü	ED ₅₀ 7.04 µg/ml	z	249
	İnsan Kolon Kanseri HT29, Hücre Kültürü	ED ₅₀ 9.34 µg/ml	z	249
	Ca-A498 Hücre Kültürü	ED ₅₀ 9.59 µg/ml	z	249
	Ca-PC3 Prostat Hücre Kültürü	ED ₅₀ 14.06 µg/ml	z	249
	Ca-Pankreas-PACA-2 Hücre Kültürü	ED ₅₀ 19.20 µg/ml	z	249
	Ca-Meme-MM2 Hücre Kültürü	x	-	245
	C8166 Hücre Kültürü	LC ₅₀ 400 mmol	-	253
	Kolon Kanseri Hücre Kültürü	4 mmol	-	260
	Solunum depresanı	Dişi köpek (İ.V.)	0.1 gm/kg	+
Solunum inhibisyonu	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> Agar Plak	5 mmol	+	185
Spazmolitik	Tavşan aortu	IC ₅₀ 100µg/ml	+	262
	Rat duodenumu	25µg/ml	+	265
	Kobay trakesi	Değişik konst.	+	218
Spermisit	Kobay spermi	1:3x	+	275
SSS depresanı	Fare (İ.P.)	x	-	245
	Fare (P.O.)	x	-	245
SSS stimülanı	Fare (inhalasyon)	saf	+	276
Superoksit stimülasyonu	Kobay nötrofil Hücre Kültürü	5 mmol	+	274
Teratojenik	Hamile insan (P.O.)	x	+	277
Toksik etki (genel)	Tavşan (G.I.)	x	+	217
	Tavşan (İ.V.)	0.1 g/kg	+	217
	Tavşan (İ.P.)	0.3 g/kg	+	217
	Kobay (S.C.)	1.10 g/kg	+	217
	Fare	0.8 g/kg	+	217
	Kobay (İ.P.)	>2 g/kg	+	217
	Toksosite (kantitatif)	Fare (İ.P.)	LD ₅₀ 380 mg/kg	x
Fare (P.O.)		480 mg/kg	x	245
Tripsin inhibitörü	x	150 mmol	x	258
Tümör inhibitörü	Bitkilerde	x	z	249
Uterus gevşetici	Asetilkolin ile uyarılmış Rat uterusu	25µg/ml	x	265

+ = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Ayrıca allerjik, anestejik, antihelmintik, antiakne, antiagregan (IC₅₀= 0.75 µM), antialzheimer, antiarteriosklerotik (IC₅₀= 4 µM), antikolinesteraz, antihalisotik, antinörotik, antiperodontik (MIC=50-200 µg/ml), antiromatizmal, antitussif, karminatif, deodorant, enterorelaksan, enterotoksik, ekspektoran, gastroirritant, larvisit (10 ppm), miyorelaksan, pestisit, üriner antiseptik, vermisit ve bronşite karşı kullanımı bildirilmiştir [166].

1.2.5.3. Karvakrol Metil Eter

Karvakrol metil eter ile daha önce yapılmış bir biyolojik aktivite araştırmasına rastlanmamıştır.

1.2.5.4. Timol Metil Eter

Timol metil eter ile daha önce yapılmış bir biyolojik aktivite araştırmasına rastlanmamıştır.

1.2.5.5. Karvon

Karvon'un antimikrobiyal etki gösterdiği mikroorganizmalar: *Candida albicans*, *Chaetomium olivaceum*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Penicillium cyclopium*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium leguminosarum* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antibakteriyal etki MIC 2.5-12.5 mg/ml'de gözlenirken daha düşük konsantrasyonlarda *Aspergillus aegyptiacus*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium asperum*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus gasseri*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* ve *Trichoderma viride*'ye karşı etkisiz görülmüştür.

Ayrıca antikonvülzan, antioksidan, antispazmodik, psikotropik, SSS depresanı, trankilizan hiperkolesterolemik, hiperlipidemik, hipotermik ve insektisit, feromon, fitotoksik, bitki germinasyon inhibitörü, bitki kök büyüme inhibitörü, izoprenilasyon ve sitokrom P-450 inhibitörü, bitki sürgün stimülanı (1 mmol) özellikleri yanında zayıflatıcı ve saçlarda stimülan etkisi bulunmuştur.

Mutajenik etkisi olmadığı ve toksisite değerlerinin LD₅₀ 0.44-2.675 g/kg olduğu tesbit edilmiştir

Bu bulgular ile ilgili daha açıklayıcı bilgiler Çizelge 1.7.'de verilmiştir.

Çizelge 1.7. Karvon'un biyolojik aktiviteleri[#]

Aktivite	Yöntem	Doz	Sonuç	Kay.
Antibakteriyal	Agar Plak	-	-	180
<i>Aspergillus aegyptiacus</i>				
<i>Bacillus cereus</i>	"	-	-	180
<i>B. subtilis</i>	"	125 mmol	+/-	185
	Agar Plak disk	5 µg/disk	z	278
<i>Candida albicans</i>	Agar Plak	MIC 200 µl/l	+	190
	"	MIC 700 ppm	+/-	279
<i>Chaetomium olivaceum</i>	"	MIC 12.5 mg/ml	z	280
<i>Corynebacterium asperum</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>Enterobacter aerogenes</i>	"	125 mmol	+/-	185
<i>Escherichia coli</i>	"	125 mmol	+/-	185
	Agar Plak disk	5 µg/disk	z	278
	Agar Plak	-	-	180
	"	8 µl	-	195
<i>Gardnerella vaginalis</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>Lactobacillus gasseri</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>L. plantarum</i>	"	1600 ppm	+/-	279
<i>Micrococcus luteus</i>	"	125 mmol	+/-	185
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>Penicillium cyclopium</i>	"	-	-	180
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>Proteus vulgaris</i>	"	125 mmol	+/-	185
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Plak disk	5µg/disk	-	278
	Agar Plak	-	-	180
	"	8 µl	-	195
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Agar Plak disk	5µg/disk	z	278
<i>Salmonella typhimurium</i>	"	5µg/disk	z	278
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29523	Agar Plak	MIC 2.5 mg/ml	z	280
<i>S. aureus</i>	"	125 mmol	+/-	185
	Agar Plak disk	5 µg/disk	z	278
	Agar Plak	-	-	180
	"	8 µl	+	195
<i>S. epidermidis</i>	"	3000 ppm	-	279
<i>Trichoderma viride</i>	"	-	-	180
Antikonvülzan	Fare (İ.P.)	-	-	245
	Fare (P.O.)	-	-	245
Antioksidan	Difenil pikril hidrazil	ED ₅₀ 11.7 mg/ml	z	281
Antispazmodik aktivite	Kobay ince barsağı	ID ₅₀ 0.011 mol	+	247
Bitki germinasyon inhibitörü	Bitki	-	+	210
Bitki kök büyüme inhibitörü	"	1 mmol	z	282
Bitki kök büyümesi stimulanı	<i>Phaseolus aureus</i> Bitki hipokotilleri	10 ppm	-	283
Bitki sürgün stimulanı	Bitki	1 mmol	+	282
Feromon (böcek çekici)	<i>Musca domestica</i> , erk.	Saf	+	284
Feromon (sinyalleme)	"	Saf	+	284
Fitotoksik	Bitki	% 2	+	285
Gıda tüketimi azalması	Rat, 14 gün süre ile	% 1	+	286

[#] += aktif, -= inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/-= değişken X= bilgi yok

Çizelge 1.7. (Devam) Karvon'un biyolojik aktiviteleri

Glutasyon-s-transferaz induksiyonu	Fare İntragastrik	20 mg/gün	+	175
GRAS (FDA) (Sect.582.60) 1976	Koku ve tat verici	x	x	287
Hiperkolesterolemik	Rat (diyet)	% 1	+	286
Hiperlipidemik	"	% 1	+	286
Hipotermik	Fare (İ.P.)	-	-	245
İnsent kovucu	<i>Sitophilus granarius</i>	-	+	288
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	-	+	263
İnsentisit	<i>Musca domestica</i> erkek	Saf	-	284
	<i>Metopolophium dirhodum</i>	% 2	+	285
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> Larva	% 2	+	285
İsoprenilasyon inhibitörü	NIH-3T3 Hücre Kült.	1 mmol	Z	171
Kilo kaybı	Rat (14 gün)	% 1	+	286
Konvulzan	Fare (S.C.)	2.675 g/kg	+	245
Mutajenik	Plasenta, Agar Plak	100 µl	-	289
	Domuz böbrek LLC-PK-1	100 µl	-	289
Perkutan absorpsiyon	Domuz	% 5	+/-	271
Psikotropik	Fare (İ.P.)	ED ₅₀ 50 mg/kg	+	245
	Fare (P.O.)	ED ₅₀ 750 mg/kg	+	245
Saç stimulan etkisi	İnsan (haricen)	% 0.2	+	290
Sitokrom P-450 inhibisyonu	Hücre Kültürü Mikrozom-Rat-Karaciğer	10 mmol	+	291
SSS depresanı	Fare (İ.P.)	ED ₅₀ 330 mg/kg	+	245
Toksosite (kantitatif)	Fare (İ.P.)	LD ₅₀ 440 mg/kg	x	245
	Fare (P.O.)	LD ₅₀ 1.30 g/kg	x	245
	Fare (S.C.)	LD ₅₀ 2.675 g/kg	x	245
	Rat (P.O.)	LD ₅₀ 1.64 g/kg	x	219
	Kobay (P.O.)	LD ₅₀ 0.766 g/kg	x	219
	Rat (P.O.)	LD ₅₀ 1.64 g/kg	x	220
	Kobay (P.O.)	LD ₅₀ 766 mg/kg	x	220
Tranklizan	Farede, İnhalasyon ile	Saf	+/-	276

+ = aktif, - = inaktif (etkisiz), Z= zayıf etki, +/- değişken X= bilgi yok

Ayrıca antiasetilkolinesteraz (IC₅₀=1.4-1.8 mM), SSS-stimulanı, kanser önleyici, karminatif, insektisit, motor depresan, nematosit (1 mg) olarak kullanılmıştır [166]. Karvon ile ilgili önemli bir nokta, rasemik karvonun biyolojik etkileriyle enantiyomerlerinin etkilerinin bazı durumlarda farklılık gösterebilmesidir. Fizikokimyasal bakımdan da farklı (koku, optik çevirme) olan bu iki madde biyolojik aktiviteleriyle tekrar gündeme gelmiştir. Örn.: (-)-Karvon bitki germinasyon inhibisyonu özelliği gösterirken diğer enantiyomeri bu etkiyi göstermemektedir [10, 138, 147, 164].

1.3. Monoterpenlerin Biyotransformasyonu

Bu kısımda monoterpenlerin biyotransformasyonu konusunda daha önce yapılan çalışmalar *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki başlık altında özetlenmektedir:

1.3.1. *In vivo*: Metabolize olma veya diğer bir ifade ile biyotransformasyon terimlerinin, yabancı maddelerin (ksenobiyotik) vücuttaki yapısal dönüşümünü (transformasyon) açıklamak için kullanıldığını biliyoruz. Bu işlem vücutta özellikle karaciğerde gerçekleşir, ancak barsaklar, böbrekler, safra salgıları, kaslar, deri ve kan da önemli katıda bulunur. Bu süreçte membranlara bağlı veya serbest halde bulunan enzimler de önemli rol oynamaktadır. Metabolik enzimler ksenobiyotiklere özel olmayıp birçok maddeyi metabolize edebilecek niteliktedir. Bu enzimler ayrıca vücuttaki endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Örn.: Steroit hormonları, safra asitleri, hemoglobin). İntestinal florada bulunan mikroorganizmalar da özellikle indirgenme ve hidroliz gibi reaksiyonları gerçekleştirmektedir. Herhangi bir ksenobiyotiğin vücuttaki biyotransformasyonu ise Faz I ve Faz II olmak üzere iki aşamalı olarak incelenmektedir:

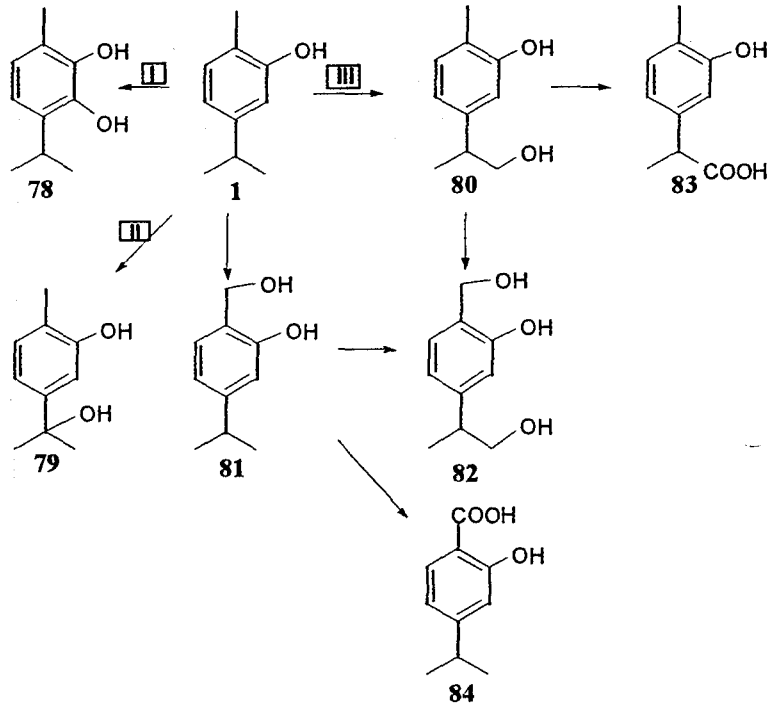
Faz I: Oksidasyon [oksidaz, monooksijenaz (Sitokrom P-450), dioksijenaz ile], indirgenme (dehidrojenaz, redüktaz ile), dekarboksilasyon (dekarboksilaz ile) ve hidroliz (esteraz/amidaz, hidrataz/hidrolaz, glikozidaz ile) gibi reaksiyonlarla metabolit veya metabolitler oluşturulur.

Faz II: Faz I'de oluşan metabolitin endojen bir madde ile birleşme (konjugasyon) reaksiyonları (Örn.: Sülfat, glukuronik ve asetik asit konjugatları) sonucu absorpsiyon ve atılımını kolaylaştırır.

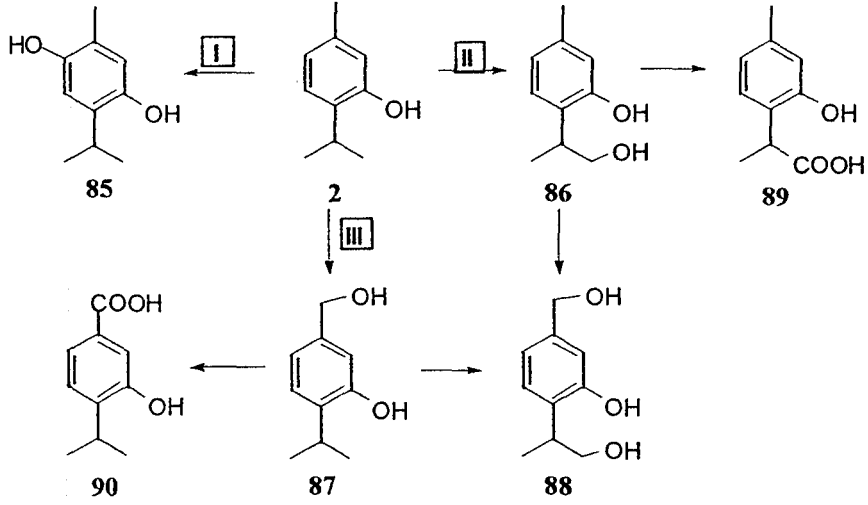
Biyotransformasyon reaksiyonları *in vivo* olarak değerlendirildiğinde farklı ürünler ortaya çıkabilmektedir. İlâcın metabolizması, ilâç etken maddesinin veya metabolitin aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleşir. Yani başka bir deyişle etken maddenin metabolitleri daha düşük etkili ve daha az toksik olabileceği gibi, daha etkili ve toksik olabilir [111, 113]. Tüm bu faktörler, ilâçların *in vivo*

metabolizasyonunu incelemeyi gerektirmektedir. Bu çalışmalar hayvanlarda ve daha sonra klinik deneylerle insanlarda yapılmaktadır. Son yıllarda ilâç etken maddelerinin vücuttaki biyotransformasyon reaksiyonlarını *in vitro* yöntemlerle de gerçekleştirmek mümkün olmuştur. Bu amaçla *in vivo* metabolizasyonu taklit eden *in vitro* mikrobiyal transformasyon modelleri geliştirilmiş ve bir çok ilâç ve ilâç adayı madde ve oluşan metabolitler üzerinde toksisite ve farmakolojik çalışmalar denenmiştir [38, 292-299].

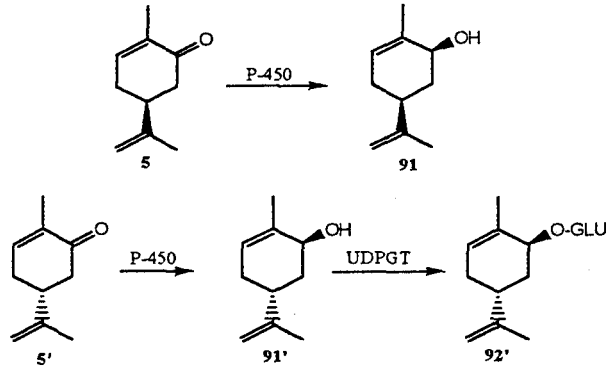
Bu kısımda karvakrol (Şekil 1.8.) [106], timol (Şekil 1.9.) [27] ve karvon enantiyomerlerinin (Şekil 1.10.) *in vivo* biyotransformasyon çalışmalarından bahsedilmektedir [105]. Ancak başka monotерpenler (*p*-simen, β -iyonon, (-)-mentol, 1,8-sineol, terpineol vb.) ile yapılan çalışmalar da mevcuttur [105, 106, 108, 300-302].



Şekil 1.8. Karvakrol'ün (1) *in vivo* biyotransformasyonu



Şekil 1.9. Timol'ün (2) *in vivo* biyotransformasyonu

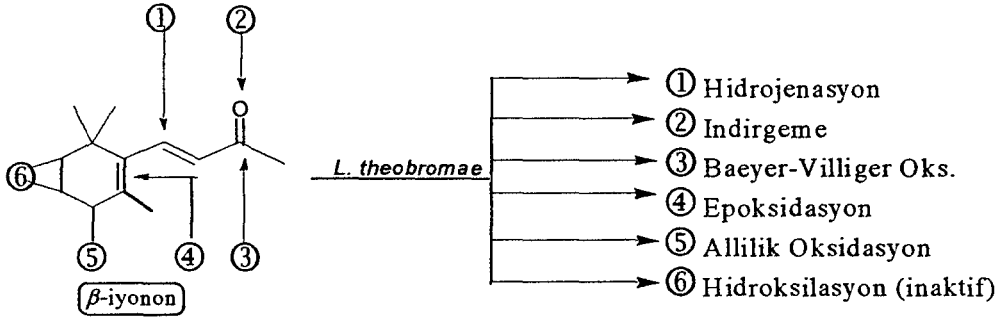


Şekil 1.10. Karvon enantiyomerlerinin (5 ve 5') *in vivo* biyotransformasyonu

1.3.2. *In vitro*: *In vivo* koşullarda biyotransformasyonu araştırılmayan maddeler alternatif *in vitro* modeller ile deneme şansına sahiptir. Bu tip çalışmalar çok sayıda monoterpen ile de yapılmıştır. Endojenik ve ksenobiyotik maddeler izole hepatik monooksijenazların (sitokrom P-450) aktivitesine etki ederek, bazı maddelerin vücuttaki atılımı ve toksisitesini artırıcı veya azaltıcı etki gösterebilmektedir. Örn.: Karaciğere etkisi olan ksenobiyotik maddeler ve bunların biyotransformasyonları üzerine monoterpenlerin (β -iyonon, (-)-mentol, 1,8-sineol, terpineol) etkili olduğu tespit edilmiştir [111, 300].

Bitki hücre ve doku kültürleri ile monoterpenlerin biyotransformasyonu ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır [90, 94-96, 98-100, 303-306]. Ancak daha önce Bölüm 1.1.3.'de ayrıntılarıyla açıklanan bu tip bir teknikle yapılan biyotransformasyonların dezavantajları göz önünde bulundurulacak olursa mikrobiyal transformasyonlar her zaman yerini ve ağırlığını korumuştur. Örnek

olarak Şekil 1.11.'de monoterpen yapısındaki iyonon molekülünün potansiyel biyotransformasyon reaksiyonları ve pozisyonları verilmiştir [4, 10, 300, 307]. Geçmişten günümüze yapılan çalışmaları aşağıda verilen bazı örneklerle özetlemek mümkündür:



Şekil 1.11. β -İyonon'da mikrobiyal biyotransformasyon

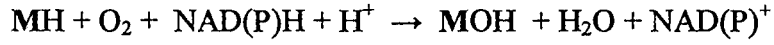
Monoterpenlerin biyotransformasyonlarına ilk örnek olarak 1915'lerde (+)-sitronellal'in (+)-sitronellol'e maya ile dönüşümü verilebilir [4, 29, 308, 309]. Monoterpenlerin biyotransformasyonu çoğunlukla parçalanma ürünlerini vermektedir. Ancak başarılı dönüşümler de çok sayıdadır, önemli bazı örnekler: mentol ve asetatları, α/β -pinen, sitral, citronellal, limonen, 1,8-sineol gibi monoterpenlerin biyotransformasyonlarıdır.

1.3.3. Enzimler ve Reaksiyonları

Monoterpenlerin biyotransformasyonunda rol oynayan enzimler yeni incelenmeye başlamıştır. Hâlen bir çok dönüşümün, hangi enzim ve hangi tip reaksiyonlar ile meydana geldiği bilinmemektedir. Ancak şimdiye kadar elde edilen bilgiler doğrultusunda monoterpenlerin biyotransformasyon reaksiyonları şu şekilde sınıflandırılabilir [308]:

A) Oksido-redüktazlar: Ticari açıdan, biyotransformasyonları katalize eden en önemli enzim grubunu oluştururlar. Ancak en büyük olumsuzlukları pahalı kofaktörlere ihtiyaç duymaları ve özellikle monooksijenazların stabiliteilerinin az oluşudur.

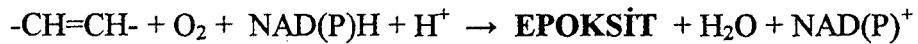
1) Hidroksilasyonları katalizleyen monooksijenazlar: Di-oksijenin bir atomunun materyale katılımını sağlar:



Membranlara bağı olan bu enzimler oldukça düşük konsantrasyonlarda etkin olabilmektedir. Aktivitelerinin belirlenmesi bundan dolayı zordur. Genel olarak hidroksilazlardan farkları, su molekülündeki -OH grubunun katılıma katkısı olmamasıdır. Sitokrom P-450 sistemlerine bağı olmaları, spektrometrik kontrollerde, fark spektrumlarında karbonmonoksit görülmesi ile açıklanmaktadır.

Bugüne kadar ancak üç tane terpen monooksijenaz izole edilip tanımlanabilmiştir. Bunlardan birisi *Pseudomonas putida*'dan elde edilen ve (+)-kâfur 'u (+)-eksohidroksi-kâfur 'a dönüştüren enzim, diğeri linalool'ün 8 ve α -terpineol'ün 7 pozisyonuna oksijen katılımını sağlayan monooksijenazlardır. Bu grup enzimlerin çözünürlüklerinin iyi olması izolasyonlarını kolaylaştırmıştır. Spesifik olmadıklarından sentezlerden başka, atıkların temizlenmesinde de kullanım bulmuşlardır.

2) Epoksit oluşumunu katalizleyen monooksijenazlar: Alkenlerden epoksit oluşumunu sağlarlar:



Diollerin üretiminde faydalı olabilecekleri düşünülmüştür. Ancak şu ana kadar sadece bir tane epoksidaz tanımlanabilmiş, α -pinen'i α -pinenoksit'e dönüştürmüştür. Ayrıca limonenin 1,2-çifte bağıının epoksitini oluşturabilmiştir.

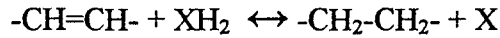
3) Alkol dehidrojenazlar: Alkol, aldehit ve keton dönüşümlerini kataliz ederler.



Tersinir bir reaksiyondur ve pH değişimi ile dönüşümün yönü değişir. pH 9'da aldehit yönünü tercih eden reaksiyon nötr pH'da alkol oluşumunu tercih etmektedir. Sitronellal ve sitral'in, koku değeri daha yüksek olan sitronellol ve

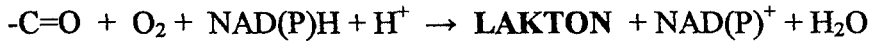
geraniol'e transformasyonu bu tür reaksiyonlara iyi bir örnektir. Menton'un *L*-mentol'e dönüşümü ticari potansiyeli olabilecek bir biyotransformasyondur. *Mentha piperita* bitkisinde çiçeklenme öncesinde *L*-menton oranı % 95'lere ulaşabilmektedir, ancak çiçeklenme ile birlikte menton'un sade % 40'ı *L*-mentol'e, kalan kısmı ise *D*-neometil- β -*D*-glikozit'e dönüşmektedir. *Cellulomonas turubata* adlı mikroorganizmadan elde edilen ve oldukça stabil bir enzim olan 3- α -hidroksi-steroid-dehidrojenaz ile metilizobutilkarbinol'den *L*-mentol'e % 6.5 oranında dönüşüm sağlanabilmiştir.

4) Redüktazlar: Doymamış çifte bağların katalizörlerle hidrojenasyonu büyük potansiyele sahip dönüşümlerdir.



Bugüne kadar bu grup enzimlerle bir çok monoterpenin indirgenmesi ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir. Özellikle *Aspergillus niger* ve *Pseudomonas ovalis*'in karvon ve karvotanaseton enantiyomerlerini stereospesifik olarak indirgemesi bilinmesine rağmen ilgili enzimlerin yapısı henüz aydınlatılamamıştır [310, 311].

5) Laktonazlar (Baeyer Villiger Monooksijenazları): Halka açılma reaksiyonları sonucu, lakton halkasının önce açılmasını daha sonra da ketona komşu atoma oksijen girişini sağlarlar.



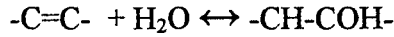
Transformasyonun ürünü laktonlar, koku değeri yüksek ve gıda endüstrisinde kullanımları olan maddelerdir. Bu grupta yer alan ve izole edilmiş enzimler flavoprotein yapısında, genelde stabil ve kofaktöre ihtiyaç duyan enzimlerdir. Kofaktör kullanımı enzimin kullanımını sınırlandırmaktadır. Ancak buna rağmen bazı sentezlerde kullanıldıkları bilinmektedir.

B) Hidrolazlar, lipazlar ve esterazlar: Geniş kullanım alanlarına sahip biyokatalizörlerdir. Özellikle stereoselektif reaksiyonlar sonucu enantiyomerlerin saf halde izolasyonlarına imkân verirler. Su ve organik çözücülerde aktif olan bu enzimler monoterpenlerin biyotransformasyonunda kolaylık sağlar. Bitkisel

kaynaklardan monoterpen esterlerin ekstraksiyon yoluyla endüstriyel boyutta üretimleri zor olmasına karşın, hidrolazlar katalizörlüğünde verimli bir şekilde geranil asetat, sitronellil asetat gibi değerli maddeler üretilebilir. *L*-Mentol üretimi içinde bir çok deneme gerçekleştirilmiş ve bazı patentler alınmıştır. Timol'den elde edilen rasemik mentol, hidrolazlar yardımıyla % 4.4 verimle *L*-mentol'ü vermiştir. Bu grupta yer alan glikozidazlar düşük verimli uçucu yağlara uygulanmakta ve bu yöntemle bir çok terpenik madde elde edilmektedir.

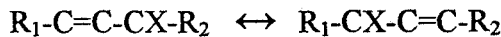
C) Halka kapama ve açma reaksiyonları: Asiklik monoterpenlerden sitronellal'in *Penicillium digitatum* adlı mikroorganizma katalizörlüğünde pulegol ve izopulegol'e biyotransformasyonu; bisiklik monoterpenlerden α -pinen'in limonen'e ve sobrerol'e dönüşümü bu tür reaksiyonlara örneklerdir. Bu tip reaksiyonları gerçekleştiren enzimler izole edilip ticari hale getirilmektedir.

D) Hidrasyon reaksiyonları: Hidratazlar, doymamış çifte bağlara su katılımını katalize ederler.



Örnek, (+)-limonen'in (+)- α -terpineol'e biyotransformasyonu ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu tip reaksiyonların avantajı oksijene ve kofaktöre ihtiyaç göstermemelerinden dolayı endüstriyel boyutta birçok biyotransformasyonda kullanılabilirlerdir.

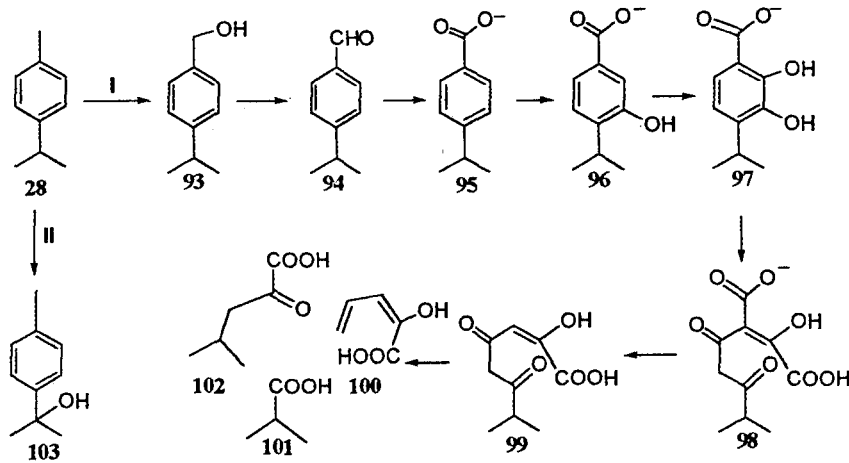
E) Allilik yer değiştirme: Bu tip transformasyonlar bazı monoterpenler ile sürdürülen araştırmalar sırasında ortaya çıkmıştır. *Pseudomonas* NOF-5 adlı mikroorganizma ile piperitol hem primer hem de tersiyer alkol dönüşümleriyle ilgi çekmiştir. Ancak hangi enzimlerin bu biyotransformasyonlardan sorumlu olduğu henüz bilinmemektedir.



F) Rasemizasyon: Epimerazlar, birden çok şiral karbon atomu bulunan monoterpenlerde bu tip reaksiyonları gerçekleştirebilmektedir. Japon araştırmacılar

Pseudomonas fragi ile (-)-izodihidrokarvon'u (+)-dihidrokarvon'a dönüştürmüştür. Bu dönüşümü yapan enzim daha sonra izole edilmiş ve oldukça stabil olduğu belirlenmiştir.

Aromatik monoterpenlerin biyotransformasyonlarına örnek olarak, *p*-simen'den bahsedilmesi bu tez materyallerinin dönüşümüne ışık tutacaktır (Şekil 1.12.). *p*-Simen ile ilgili ilk çalışmalar 1924'de başlamış, bazı toprak bakterilerinin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabileceğini belirtilmiştir. Bir *Nocardia* türü ile *p*-simen'in oksidasyonu sonucu kuminik asit oluşumu bildirilmiştir [312]. Başka bir çalışmada ise bir *Pseudomonas* türü ile % 40'a varan oranlarda kuminik asit dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *Pseudomonas* PL türü ile bir seri biyotransformasyon reaksiyonunu araştırılmıştır [313].



Şekil 1.12. *p*-Simen'in biyotransformasyonu

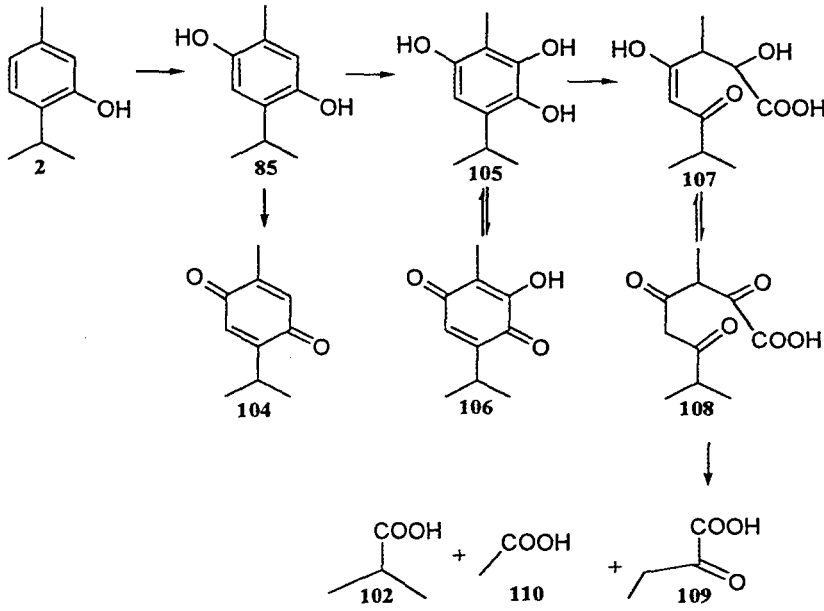
1.3.3.1. Karvakrol

Kimyasal yolla türevlerinin hazırlanmasına ait çalışmalar [314] mevcut olmasına rağmen karvakrol ve türevlerinin mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları ile ilgili bir araştırmaya kaynak taramaları sırasında rastlanmamıştır.

1.3.3.2. Timol

Kuvvetli antimikrobiyal etkilerine rağmen, bahçe toprağından timol'ün biyotransformasyonunu gerçekleştirebilen bir bakteri izole edilebilmiştir [27]. *Pseudomonas putida* NCIB10014 olarak daha sonra tanımlanan bu

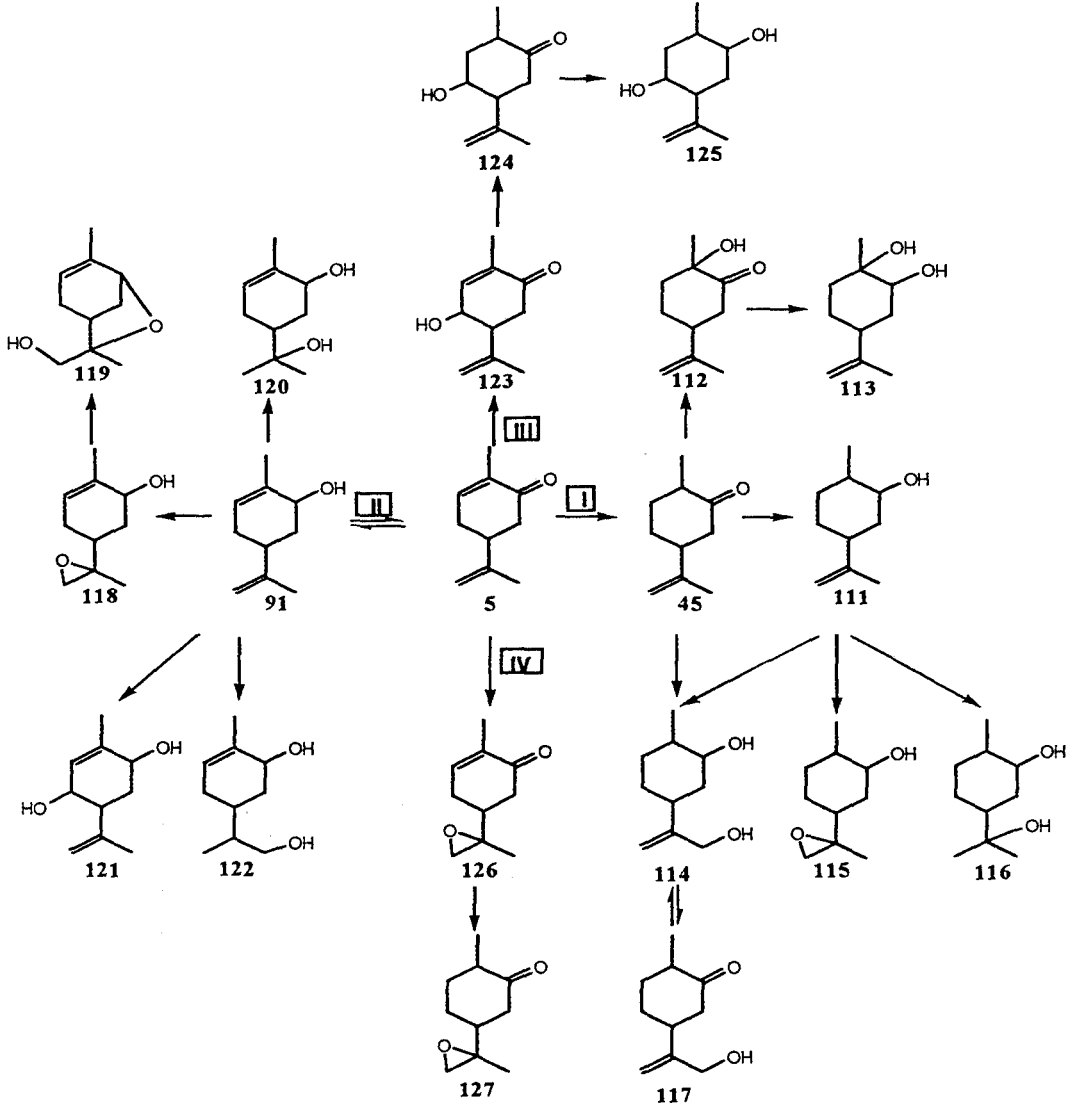
mikroorganizma ile timolün 2-hidroksi-timo-3,6-kinon'a dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılmış enzim ekstresi ve NADH (=indirgenmiş nikotin adenin dinükleotit) ilâvesiyle 2-metil-propanoik asit, asetik asit ve 2-oksobutanoik asite yıkılmıştır. NADH miktarı artırıldığında ise 2-hidroksi-butanoik asit üretilmiştir. Mekanizma olarak ara ürün 2,6-dihidroksitimol üzerinden kinon'a enzimatik olmayan oksidasyon şeklinde önerilmektedir. Bu yol düşük verimli olup daha stabil kateşollerin oluşum yollarına benzemektedir (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. Timol'ün mikrobiyal transformasyonu ve metabolitleri

1.3.3.3. Karvon

Karvon, gıda ve koku sanayinde ayrıca sentetik reaksiyonlarda büyük miktarlarda kullanılan önemli bir monoterpendir. Gerek (+), gerekse (-)-karvon ile bir çok çalışma yapılmış ve başarı ile gerçekleştirilmiş biyotransformasyon sonuçları yayımlanmıştır [315-322]. Gerçekleştirilen çalışmalar aşağıdaki şekilde (Şekil 1.14.) özetlenmiştir.



Şekil 1.14. Karvon'un biyotransformasyon ürünleri

1.3.4. Monoterpen Biotransformasyonlarında Karşılaşılan Sorunlar

Monoterpenler ile çalışmak, diğer madde gruplarına oranla, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı biraz daha problemlidir. Bunları, şu şekilde sıralayabiliriz [69, 308]:

- Materyal ve metabolitin oldukça uçucu olması,
- Materyal ve metabolitin toksik olması,
- Sudaki çözünürlüklerinin az olması,
- Transformasyon verimlerinin düşük olması,
- Materyal ve metabolitin stabil olmaması.

1.3.5. Monoterpen Biyotransformasyonunun Avantajları

Bir çok araştırmaya konu olan monoterpenler ticârî olarak ilâç, gıda, koku ve kozmetik endüstrisinin ilgisini çekmekte ve büyük bir ekonomik potansiyel olarak görülmektedir [4, 308, 309]. Monoterpenlerin biyotransformasyonlarda tercih sebepleri şu şekilde sıralanabilir:

- Doğal koku ve tatların üretilmesi,
- Yeni doğal koku ve tat moleküllerinin üretimi,
- Tek adımda ürünlerin elde edilebilmesi,
- Tehlikesiz ve zararsız reaksiyonların gerçekleştirilebilmesi,
- Bir çok maddeye uygulanabilir olması,
- Biyokatalizörlerin belli konumlarda ve stereospesifik olarak katılımı sağlaması.

1.4. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) Tekniği

Katı faz mikro ekstraksiyon tekniği, çözelti halindeki organik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılan oldukça yeni bir tekniktir. Çözücü, cihaz ve özel bir düzenek kullanılmadan, hızlı ve hassas olarak ekstraksiyonu yapılabilen karışımların gaz kromatografisi, gaz kromatografisi/kütle spektrometresine veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisine doğrudan uygulanmasını sağlar. Minör maddelerin (ppm seviyesi) hem kalitatif hemde kantitatif tayinleri gerçekleştirilebilir [323].

SPME ucu, 1 cm uzunluğunda, 5 mm çapında, iç çeperi adsorbanla kaplı kapiler bir elyaf uç ve etrafında paslanmaz bir çelik koruyucudan oluşmaktadır. Burada kullanılan adsorbanlar çok çeşitlidir, ekstre edilmek istenen gruplara göre uygun olanı seçilebilir [324]. Bu uçlar ile sıvı ortama daldırılarak ekstraksiyon yapılabileceği gibi, uçucu bileşiklerin bulunduğu ekstrelerde buhar fazında (headspace) bulunan uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda da kullanılabilir. İkinci şekilde kullanma tekniğine headspace-SPME adı verilmektedir [325-331]. Doğru kullanıldığı zaman bir uçun 50-100 kez tekrar kullanılabilme özelliği vardır.

Yıkama ve çözücüye ihtiyaç duyulmaz. Hızlı işlem ve analiz yapmaya imkân verir.

1996 yılından itibaren yaygın olarak kullanılan bu yeni teknik, gelişme aşamasında olmasına rağmen birçok uygulama alanı bulmuştur. Özellikle sulu ortamlardan polar veya apolar maddelerin seçici ekstraksiyonunda klâsik ekstraksiyon yöntemlerine oranla büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Gıda analizlerinden klorlu atıklara kadar uzanan geniş bir alanda ve biyolojik sıvılardan hücre düzeyine kadar uygulanabilir olması büyük bir üstünlüktür. Bitkilerdeki uçucu bileşiklerin teşhisi ve biyosistemik çalışmaları, böcek feromonları, allelokimyasal maddelerin belirlenmesi gibi birçok biyolojik maddelerin araştırılmasında kullanım bulmuştur [332-334].

Kaynak taramalarında, headspace-SPME yönteminin mikroorganizmaların tür tayinleri için kullanıldığı kayıtlıdır. Bu yöntem kullanılarak mikroorganizmaların kendilerine özgü uçucu bileşikleri ürettikleri tespit edilmiş ve bu sayede *Penicillium* ve *Staphylococcus* türleri ayırt edilebilmiştir. Ancak biyotransformasyonun gerçekleştiği besi yerlerinden ürünlerin ekstraksiyonu ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır [330, 331].

Biyotransformasyon çalışmalarında metabolitlerin ekstraksiyonu önemli bir sorun olduğundan [54, 335-337]. özellikle uçucu bileşiklerde headspace-SPME tekniği ile yapılan denemeler olumlu sonuçlar vermiştir. İlk defa bu çalışmada, monoterenlerin biyotransformasyon ürünleri headspace-SPME-GC/MS ve GC/FTIR yöntemleriyle izlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde biyotransformasyon ve biyolojik aktivite araştırmalarında kullanılan materyaller, mikroorganizmalar, kimyasal maddeler, çözücüler, aletler ve deneysel çalışmalarla ilgili genel bilgiler verilmiştir.

Araştırmalarının büyük bir kısmı başta biyotransformasyon laboratuvarı olmak üzere TBAM'ın olanaklarıyla gerçekleştirilmiştir. Adı geçen bölümün kuruluşu aşamasında ilk biyotransformasyon denemelerine Pakistan Karaçi Üniversitesi, HEJ Kimya Araştırma Enstitüsü'nde başlanmıştır. Daha sonra üç aylık bir dönemde Amerika Mississippi Üniversitesi, Farmakognozi Anabilim Dalı'nda çalışma olanağı doğmuş ve bazı NMR analizleri burada yapılmıştır. Japonya, Tokushima Bunri Üniversitesinden danışman ve teknik yardım desteği sağlanmıştır. Biyolojik aktivite testlerinde antiviral etki için Ankara Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı imkanlarından yararlanılmıştır.

2.1. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar

2.1.1. Materyaller

Aşağıda kaynaklarıyla birlikte sıralanan monoterpenler bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır:

- Karvakrol (TBAM)
- Timol (TBAM ve Riedel De Haen 16254, Almanya)
- (+)-Karvon (Nippon Terpene Chem. Co. Ltd., Japonya)
- (-)-Karvon (Aldrich 12493-1, Amerika)
- Karvakrol metil eter (NipponTerpene Chemical Co. Ltd., Japonya)
- Timol metil eter (Nippon Terpene Chemical Co. Ltd. Japonya)

2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler*

- *n*-Hekzan
- Aseton
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- Sodyum Hidroksit (NaOH)
- Vanilin
- Glikoz
- Sakkaroz
- Potasyum hidroksit (KOH)
- Sodyum hipofosfat (Na₂HPO₄)
- Yeast Extract (Acumedia)
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Acumedia/Oxoid)
- Patato Dextrose Agar (PDA) (Acumedia/Oxoid)
- Benomil (antifungal)
- Ornidazol (antifungal)
- Silikajel 60G (Merck 7731, 4-40 mesh)
- Dietileter
- Diklorometan (CH₂Cl₂)
- Metanol (MeOH)
- Sülfürik asit
- Hidroklorik asit (HCl)
- Pepton
- Nişasta (Oxoid)
- Potasyum klorür (KCl)
- Magnezyum sülfat (MgSO₄)
- İyot (I₂)
- Susuz Sodyum Sülfat (Na₂SO₄)
- Müller Hinton Broth (Acumedia/Oxoid)
- Penkonazol (antifungal)
- Asiklovir (antiviral)
- Silikajel 60G (Merck 7734, 63-200 mesh)
- Etilasetat (EtOAc)
- Kloroform (CHCl₃)
- Etanol (EtOH)
- Benzen
- Potasyum karbonat
- Sodyum klorür (NaCl)
- Amonyum klorür
- Demir sülfat (FeSO₄)
- Sodyum Nitrat (NaNO₃)
- Anisaldehit
- Potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄)
- Müller Hinton Agar (MHA) (Acumedia/Oxoid)
- Ketokonazol (antifungal)
- Kloramfenikol (antibakteriyal)
- Hazır İTK plakları (Silikajel) (can destek, Machery Nagel, 0.25 mm G-25; alüminyum, Allied 0.2 mm, 60)

2.1.3. Aletler

- Gaz Kromatografisi / Fourier Transform İnfrared Spektrofotometresi (GC/FT-IR), [Perkin Elmer Spektrum 2000]
- Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GC/MS), [Hewlett Packard GC/MSD 5890] ve [Shimadzu GC/MSD QP5050]
- Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi Sistemi (NMR), [JEOL JNM-EX90A, FT-NMR]; [Bruker AM-400, FT- NMR], ve [Varian Mercury 300, FT-NMR]
- Polarimetre [Oriol POL S-2]
- Ultraviyole Spektrofotometre (UV-VIS) [Shimadzu UV-160A]
- Fourier Transform İnfrared [Jasco FT-IR-5300]
- X-Işınları Difraktometresi [Mac Science MXC 18]

* Başka bir şekilde belirtilmedikçe Aldrich/Sigma/Merck firmalarından temin edilmiştir.

- Ultra Viyole Lambası (254-366 nm), [Camag]
- Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (Solid Phase Microextraction= SPME)Düzenegi, [Supelco]
- Otoklav [Hirayama HV-50]
- Mikro-insineratör (= Öze Sterilizatörü), [PBI International]
- Laminar Akış Kabini [Nuair NU-425, BioII]
- Masa Üstü Çalkalayıcı İnkübatör [GFL 3032]
- Masa Üstü Çalkalayıcı [Gerhardt LS5 - RO5]
- İnkübatör [Nüve EN400]

2.1.4. Mikroorganizmalar

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere oluşturulan TBAM Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu (TCC) listesi Çizelge 2.1.'de verilmektedir.

Çizelge 2.1. TBAM Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu (TCC)

TCC	Mikroorganizma	Kaynak
1	<i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 15125	a
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	a
4	<i>Gliocladium deliquescens</i> ATCC 10097	a
5	<i>Caldariomyces fumago</i> ATCC 11925	a
6	<i>Cladosporium resinae</i> ATCC 22712	a
7	<i>Ramichloridium anceps</i> ATCC 15672	a
8	<i>Cylindrocephalum aureum</i> ATCC 12720	a
9	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	a
10	<i>Lodderomyces elongisporus</i> ATCC 22688	a
12	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385	a
13	<i>Torulopsis petrophilum</i> ATCC 20225	a
15	<i>Pichia membranaefaciens</i> ATCC 2254	a
16	<i>Saccharomyces lipolytica</i> ATCC 8661	a
17	<i>Rhodotorula rubra</i> ATCC 20129	a
19	<i>Absidia glauca</i> ATCC 22752	a
20	<i>Mucor ramannianus</i> (Sih) ATCC 1839	a
21	<i>Chaetomium cochliodes</i> NRRL 10195	a
22	<i>Thamnidium elegans</i> ATCC 18191	a
23	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348	a
24	<i>Dactylaria haptotyla</i> ATCC 28924	a
25	<i>Dacrymyces delinquescens</i> var. <i>delinquescens</i> ATCC 13292	a
27	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	a
28	<i>Penicillium frequentans</i> ATCC 10444	a
30	<i>Aspergillus foetidus</i> NRRL 337	a
31	<i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 9245	a

a= Mississippi Üniversitesi, Oxford, Amerika

b= HEJ Kimya Araştırma Enstitüsü, Karaçi, Pakistan

c= Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

d= Tokushima Bunri Üniversitesi, Tokushima, Japonya

t= Anadolu Üniversitesi, TBAM Kültür Koleksiyonu

Çizelge 2.1. (Devam) TBAM Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu (TCC)

32	<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	a
33	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 23137	a
34	<i>Fusarium solani</i> ATCC 12820	a
35	<i>Cunningheamella echninulata</i> ATCC 9244	a
36	<i>Nocardia corallina</i> ATCC 19148	a
37	<i>Cellulomonas flavigena</i> ATCC 482	a
38	<i>Streptomyces floecaulus</i> ATCC 25453	a
39	<i>Gongronella butleri</i> ATCC 22822	a
40	<i>Cephalosporium aphidicola</i> IMI 68981	b
42	<i>Giberella fujikoroii</i>	b
44	<i>Rhizopus stolonifer</i>	b
45	<i>Trichothecium roseum</i> CMI 50600	b
46	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	b
47	<i>Aspergillus quadrilineatus</i> ATCC 76503	b
48	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9807	b
49	<i>Penicillium spinulosum</i>	c
50	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	c
51	<i>Rhizopus stolonifer</i> NRRL 2710	c
52	<i>Mucor mucedo</i> NRRL 3654	c
53	<i>Mucor mucedo</i> NRRL 1425	c
54	<i>Cladosporium cladosporioides</i> NRRL 3182	c
55	<i>Alternaria alternata</i> NRRL 20593	c
56	<i>Fusarium culmorum</i>	c
57	<i>Fusarium solani</i>	c
58	<i>Trichoderma harzianum</i> A15	c
59	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	c
60	<i>Digitalum sorokinianse</i>	c
61	<i>Pseudomonas putida</i> NRRLB-13	c
62	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NRRLB-775	c
63	<i>Pseudomonas syringae</i> N52	c
64	<i>Aspergillus niger</i>	d
65	<i>Cephalosporium</i> sp.	c
67	<i>Fusarium solani</i>	b
80	<i>Cladosporium</i> sp. TCC 2.2.1	t
81	<i>Cladosporium</i> sp. TCC P-2	t
82	<i>Aspergillus niger</i> TCC-3	t

a= Mississippi Üniversitesi, Oxford, Amerika

b= HEJ Kimya Araştırma Enstitüsü, Karaçi, Pakistan

c= Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

d= Tokushima Bunri Üniversitesi, Tokushima, Japonya

t= Anadolu Üniversitesi, TBAM Kültür Koleksiyonu

2.2. METOT

2.2.1. Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması

Mikroorganizmalar Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), Müller Hinton Agar (MHA) katı besi yerlerinde eğik tüp, petri ya da liyofilize halde orijinal kültür koleksiyonlarından (ATCC/ NRRL/ IMI) temin edilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca toprak, su, bitki numunelerinden özel teknikler ile izole edilen mikroorganizmalar birkaç pasajlama işleminden sonra saflaştırılarak koleksiyona kazandırılmıştır. 1 ml %10'luk gliserol içeren kapaklı Eppendorf tüpler içine aktarılan stok mikroorganizmalar ise -70°C'de muhafaza edilmiştir. Eğik besi yerlerinde saklanan mikroorganizmalar 6 aylık periotlarla canlandırılmıştır.

2.2.2. Mikroorganizma İnokülasyonu

Oda sıcaklığına getirilmiş mikroorganizmalar canlandırılmak üzere genellikle Sabouraud Dextrose Agar (SDA) katı eğik besi yerine steril koşullar altında bir öze ucu miktarında inoküle edilmiş, 3-7 gün oda ısısında bekletilerek yeterli olgunluğa gelmesi sağlanmıştır. Sonra mikroorganizma, steril, zenginleştirilmiş uygun sıvı besi yerine (Bkz. 2.2.3.a-e) aktarılmıştır.

2.2.3. Sıvı Besi Yerleri

Mikroorganizmalar yeterli büyüklüğe ulaştığında, biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, agarlı katı besi yerinden, özelliklerine göre farklı sıvı besi yerlerine transfer edilmiştir. Kullanılan sıvı besi yerleri:

a) α -Medyum Besi Yeri

20 g Glikoz, 5 g pepton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl ve 5 g Na₂HPO₄ 1000 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH 7.0 olacak şekilde 0.1 N HCl veya KOH ilave edilmiştir [38, 299].

b) Czakpek Pepton Besi Yeri

15 g Glikoz, 15 g sakkaroz, 5 g pepton, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KCl, 1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ve 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1000 ml'ye distile su ile tamamlanıp, pH 7 olacak şekilde 0.1 N HCl veya KOH ilave edilmiştir [315].

c) Genel Besi Yeri

15 g Sakkaroz, 0.1 g $NaNO_3$, 0.025 g KCl, 0.002 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ ve 10.1 $CaSO_4$ 1000 ml'ye distile su ile tamamlanıp, pH 6 olacak şekilde 0.04 N HCl veya NaOH ilave edilmiştir [338].

d) Aktinomiset Besi Yeri

1 g Suda çözünür nişasta, 0.05 g K_2HPO_4 ve 0.05 g NH_4Cl 100 ml'ye distile suyla tamamlanmış, pH 7 olacak şekilde 0.1 N HCl veya KOH ilave edilmiştir [339].

e) Mineral Besi Yeri

Yukarıda sıralanan sıvı besi yerlerinde sadece mineral maddeler kullanılarak, pepton, şeker gibi karbon ve azot kaynakları kullanılmadan hazırlanmıştır. Mikroorganizmaların hammaddeleri daha hızlı metabolize etmeleri sağlanmıştır [339].

Sterilizasyon

Besi yeri, mikroorganizmalar ile inoküle edilmeden önce, erlenlerde pamuk veya sterilizasyona dayanıklı özel süngerle kapatılmış şekilde $121^\circ C$ 'de ve 1.1 atmosfer basınç altında, 20 dakika sterilize edilmiştir.

Mikroorganizmaların İmhası

Arta kalan canlı mikroorganizmalar eğer çözücüler ile muamele edilmemiş ise atılmadan önce $121^\circ C$ 'de ve 1.1 atmosfer basınç altında 60 dakika sterilize edilmiştir. Bu şekilde öldürülmüş olan mikroorganizmalar biyolojik atık kaplarına aktarılmıştır.

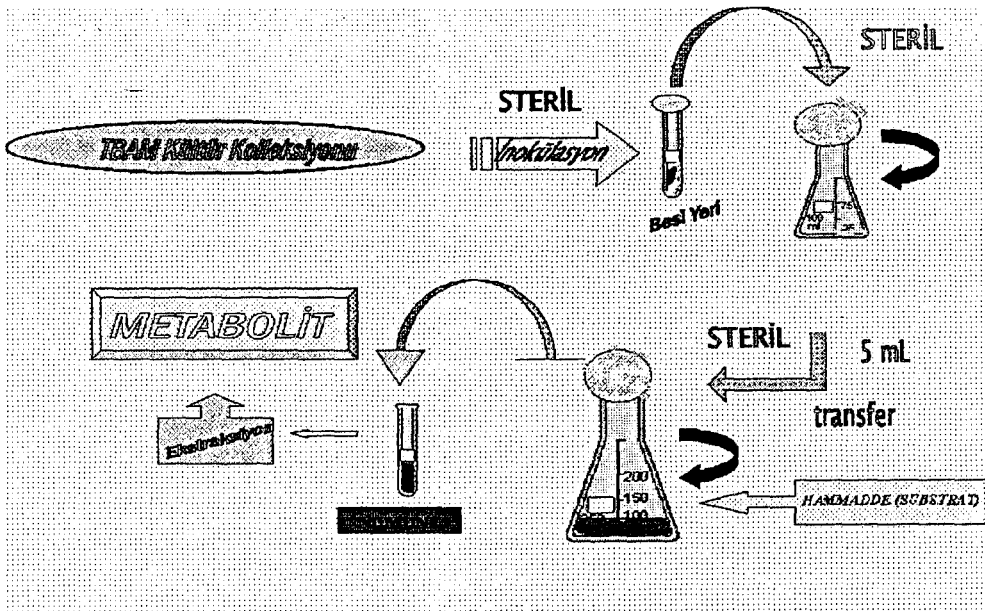
2.2.4. Biyotransformasyon Ön Çalışmaları

Bu aşamada, materyaller çeşitli mikroorganizmalarla küçük miktarlarda (mg düzeyinde) etkileştirilmiş ve belirli koşullar altında dönüşüm olup olmadığı incelenmiştir.

2.2.4.1. İki Aşamalı Yöntem [38, 299]

α -Medyum, 100 ml'lik erlenlerde 25 ml hacimlerde, ağzı pamukla kapatılmış şekilde 121°C'de ve 1.1 atmosfer basınç altında, 20 dakika bekletilerek sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına getirildikten sonra, önceden canlandırılmış ve yeterli olgunluğa ulaşması sağlanmış (1-10 günlük) mikroorganizmalar bir öze ucu dolusu miktarda, aseptik koşullarda, besi yerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında (24°C), 120 rpm hızda, 72 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir (1. aşama).

İkinci aşamada ise gelişmiş mikroorganizmalardan bir öze ucu dolusu veya 1 ml miktarda alınıp, 25 ml α -medyum içeren erlene aktarılıp aynı koşullar altında 24-48 saat arasında adaptasyonu gerçekleştirilmiştir. Materyaller toksik konsantrasyonundan daha düşük oranlarda, uygun bir çözücüde (su, aseton, EtOH, MeOH, DMSO) % 1-20 konsantrasyonda çözülerek besi yerine ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında (24°C), 140 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır (Bkz. Şekil 2.1.).



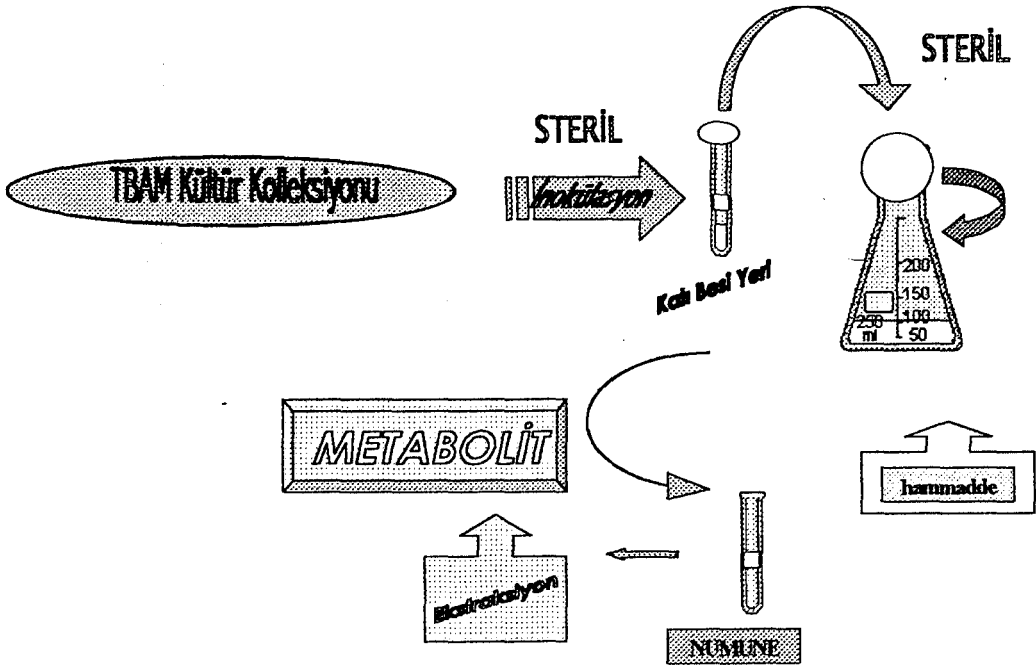
Şekil 2.1. İki aşamalı yöntem

2.2.4.2. Tek Aşamalı Yöntem [315]

250 ml'lik erlenlerde bulunan 100 ml steril sıvı besi yerine, laminar akış kabininde, oda sıcaklığında, tazelenmiş mikroorganizma öze ucu dolusu miktarda inoküle edilmiştir. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümesi sağladıktan sonra (24-48 saat) bu besi yeri üzerine materyal, besi yeri miktarına bağlı olarak %1-10 oranlarında ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında (24°C), 140 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Metabolizasyon devam ettirilmiş ve materyaller tüketildikçe üzerine ilave edilmiştir (Bkz. Şekil 2.2.)

Kontrol

Tüm biyotransformasyon çalışmalarında kontrol olarak, aynı koşullarda hazırlanmış ve saklanmış besi yeri, besi yeri + hammadde ve besi yeri + mikroorganizma bulunduran üç erlen kontrol olarak kullanılmıştır. Bu üç kontrol ile transformasyonun gerçekleştirildiği besi yeri karşılaştırılarak metabolitlerin gerçek mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 2.2. Tek aşamalı yöntem

2.2.5. Preparatif Biyotransformasyon

Metabolitlerin izolasyonu için, üç şekilde gerçekleştirilmiştir:

a) Mikroorganizmalar iki aşamalı yöntem (Bkz. 2.2.4.1.) göre uygun oranlarda 1 veya 2 l'lik erlenlerde, 200-600 ml besi yerlerine inoküle edilmiş, 300-1000 mg materyal ilave edilerek oda sıcaklığında ve 120 rpm'de, uygun sürelerde çalkalanmıştır.

b) İki aşamalı yöntemin farklı ölçekteki uygulanması 250 ml lik erlenler içerisinde 100 ml steril besi yeri olacak şekilde 20-30 erlen hazırlanmıştır. İkinci aşamada mikroorganizma belirli bir büyüklüğe gelince materyal eşit olarak tüm erlenlere dağıtılmıştır. Oda sıcaklığında ve 140 rpm'de, uygun sürelerde çalkalanmıştır.

c) Tek aşamalı yöntem (Bkz. 2.2.4.2.) göre 4 veya 5 adet 250 ml'lik erlende 100 ml steril besi yerinde mikroorganizma geliştirilmiş ve materyal erlenlere dağıtılmış ve tüketildikçe ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve 140 rpm'de çalkalanmış, 3 veya 4. ilaveden sonra materyallerin tüketildiği tespit edildiğinde biyotransformasyon durdurulmuştur.

Her üç yöntemde de biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve dönüşümlerin maksimumuna ulaştığı İTK ve/veya GC/MS sistemi ile tespit edildiğinde numuneler üzerine EtOAc ilave edilerek mikroorganizmaların canlılığına son verilmiş biyotransformasyon durdurulmuş, ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarına geçilmiştir.

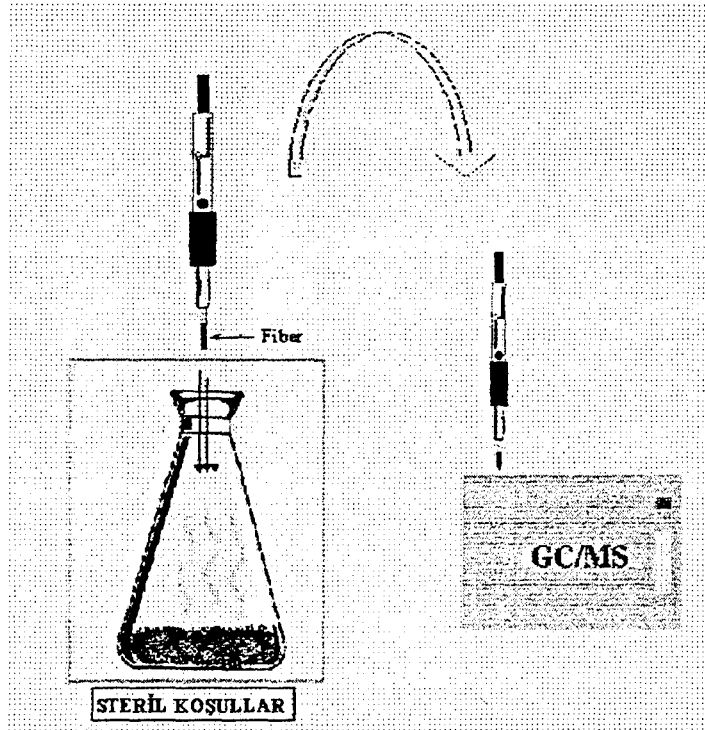
2.2.6. Metabolitlerin Ekstraksiyonu

2.2.6.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Metabolit oluşumunu izlemek amacıyla yapılan işlemdir. Steril koşullar altında, önceden 3-5 ml EtOAc ilave edilmiş deney tüplerine steril uçlu pipetörler ile biyotransformasyon besi ortamından eşit miktarda aktarılmış, 1 dakika vorteks kullanarak karıştırılmıştır. EtOAc'lı üst faz, başka bir pipet ile susuz Na₂SO₄'tan geçirilerek bir numune kabına aktarılıp 40-50°C'de veya azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır. İTK veya GC/MS sistemi ile kontrol edilmiştir.

2.2.6.2. Headspace-Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME)

100 μm kalınlığında PDMS (polidimetilsiloksan) ile kaplı uçlardan oluşan SPME ünitesi, çalkalanmış biyotransformasyon numunesine 15 dakika headspace yöntemiyle (Bkz. 1.4. ve Şekil 2.3.) uygulanmıştır. SPME ucunun adsorbladığı uçucu bileşikler gaz kromatografisinin enjeksiyon portunda 5 dakika bekletilerek kolona verilmiştir. SPME çalışmaları her bir biyotransformasyon deneyi için 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 2.3. Headspace-SPME-GC/MS yöntemi ile biyotransformasyon metabolitlerinin analizi

2.2.7. İzolasyon

Preparatif amaçla gerçekleştirilmiş biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besi yerlerine $\frac{1}{4}$ oranında EtOAc ilave edilmiştir. İyice çalkaladıktan sonra, Buchner hunisinden süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar ayırma hunilerinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstre edilmiştir. Toplanan ekstreler susuz Na_2SO_4 tan geçirilerek 40-60°C'de alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır.

2.2.7.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

a) Analitik İTK

Cam veya alüminyum destek üzerine, 0.2/0.25 mm kalınlığındaki silikajel 40/60 GF₂₅₄ kaplanmış, 5x20 cm veya 20x20 cm ebatlarında hazır plaklar kullanılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında, nemsiz ve karanlık özel muhafazalı kutularında saklanmıştır. Uygun bir çözücü sisteminde sürüklenen numuneler kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak % 5 H₂SO₄ + % 1 Vanilin reaktifi + ısı (120°C de 3-5 dakika), anisaldehit/H₂SO₄ + ısı veya I₂ buharı kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri

Sistem	Çözücüler	Oranları
A	Hekzan : EtOAc	8:1
B	Hekzan : EtOAc	3:1
C	Hekzan : EtOAc	1:1
D	Hekzan : Aseton	6:1.5
E	Hekzan : Aseton	1:1
F	Hekzan : Dietileter	9:1
G	Hekzan : Dietileter	1:1
H	Hekzan : EtOAc: Benzen	6:2:0.5

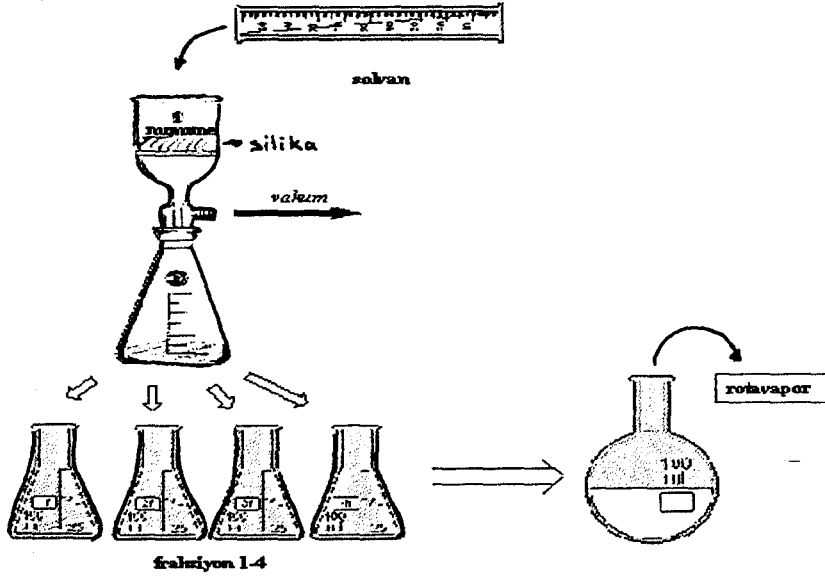
b) Preparatif İTK

0.25 mm kalınlıkta 20x20 cm ebadında, hazır cam veya alüminyum plaklar kullanılmıştır. Sürüklenme işlemi, içerisine süzgeç kağıdı yerleştirilmiş cam kromatografi tanklarında çözücü sistemi ile doyurulduktan sonra gerçekleştirilmiştir. Plaklar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde yukarıda belirtilen renk reaktifleri plakların bir kenarına püskürtülerek bantlar belirlenmiştir.

İzole edilmek istenen maddeler ayrı bantlar halinde kazınarak $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (4:1) karışımı ile 3 kez ekstre edilmiş, daha sonra 3 no'lu poröz cam süzgeçlerden yıkanarak alınmış ve düşük sıcaklıkta vakum altında yoğunlaştırılmıştır.

2.2.7.2. Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK)

Ekstrelerin fraksiyonlanması için kullanılan bu yöntemde, silikajel (7731) ekstre miktarının 40 – 100 katı miktarında tartılmış kuru olarak kolona konmuştur. Ekstre az miktarda adsorbana emdirilerek veya doğrudan üzerine yerleştirilmiştir. Elüsyona apolar çözücülerle başlanmış ve gradient çözücü sistemleriyle devam edilmiştir. Ayrımlar tamamlandıktan sonra kolon MeOH ile yıkanmıştır. Toplanan fraksiyonlar yoğunlaştırılarak İTK ile incelenerek benzer olanlar birleştirilmiştir (Bkz. Şekil 2.4.) [340, 341].



Şekil 2.4. Vakum sıvı kromatografisi (VSK) sistemi

2.2.7.3. Kolon Kromatografisi (KK)

1:40-50 Oranında silikajel (7734) ve hekzan ile yaş hazırlanmış kolon 5 x 40 cm, 10 x 70 cm vb. ebatlarında olup ekstre silikajele emdirilmiş olarak veya doğrudan uygulanmıştır. Hekzandan başlamak üzere, hekzan-dietileter, dietileter, aseton ve EtOAc ile 10 ml'lik fraksiyonlar toplanmış ve son olarak da kolon MeOH ile yıkanmıştır.

2.2.8. Yapı Tayini

2.2.8.1. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi (GC/MS)

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ürünlerin kütle spektrumlarının alınması için bu sistem kullanılmıştır. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi analizlerinde Hewlett-Packard G1800A GCD sistemi, polar özellikteki Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm *i.d.* 0.25 μ m film kalınlığı) ve taşıyıcı gaz olarak Helyum (1 ml/dakika) kullanılmıştır. İki farklı sıcaklık programı (A= kısa program, B= standart program) uygulanmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C, split oranı 50:1 dir.* 70 eV Enerjide ve *m/z* 35-425 kütle aralığında maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme işlemlerinde öncelikle "TBAM Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesinden" yararlanılmıştır. Ayrıca Wiley ve Adams-LIBR(TP) Kütüphane Tarama Yazılımlarının yanında "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data", ilgili kaynaklar ve standart madde örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

Sıcaklık Programları:

A= 100°C'de 5 dak, 220°C'ye 20°C/dak, 220°C'de 11.5 dak*

B= 60°C'de 10 dak, 220°C'ye 4°C/dak, 220°C' de 10 dak, 240°C'ye 1°C/dak

2.2.8.2. Fourier Transform İnfrared Spektrofotometrisi (FT/IR)

Bazı çalışmalarda, Jasco FT-IR-5300 model spektrofotometre kullanılmıştır.

2.2.8.3. Gaz Kromatografisi / Fourier Transform İnfrared Spektrofotometrisi (GC/FTIR)

Metabolitler gaz kromatografisi kolonunda ayrıldıktan sonra, sisteme doğrudan bağlı Fourier Transform-İnfrared Spektrofotometrisi ile gaz fazında spektrumları alınmıştır. Özellikle SPME ile ekstre edilen gaz fazı metabolitleri bu sistem kullanılarak tayin edilebilmiştir.

* SPME çalışmaları splitsiz uygulanmıştır

GC/FT-IR Analiz Koşulları:

<i>Cihaz</i>	: Perkin Elmer, AutoSystem XL Gaz Kromatografisi
<i>Kaynak</i>	: 2000 GC-IR System, Spectrum 2000 FT-IR Spektrofotometrisi
<i>Dedektör</i>	: MCT : GCIR
<i>Ölçüm Aralığı</i>	: 4600-600 cm ⁻¹
<i>Sıcaklık Programı</i>	: B: (60°C'de 10 dak, 220°C'ye 4°C/dak, 220°C' de 10 dak, 240°C'ye 1°C/dak)

2.2.8.4. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

TBAM'da yapılan çalışmalarda metabolitlerin ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları 90 MHz ve 22.4 MHz'de incelenmiştir. İnternal standart olarak TMS eklenmiş CDCl₃ ile çözülmüştür.

Mississippi Üniversitesi ve Tokuşima Bunri Üniversitesinde ¹H NMR ölçümleri 400 MHz ve 500 MHz'lik Bruker AM-400 ve AM-500 sistemlerinde alınmıştır. Çözücü olarak CDCl₃ kullanılmıştır, referans piki çözücülere göre otomatik olarak ayarlanmıştır. Kimyasal kayma değerleri (δ) ppm olarak, *J* değerleri ise Hz cinsinden verilmiştir.

2.2.8.5. X-Işınlari Difraksiyonu

Kristal yapısındaki maddenin üç boyutlu yapısı "maXus SIR92 bilgisayar programı" kullanılarak ortaya konmuştur [342]. Cihazla ilgili parametereler ve teknik detaylar bu kısımda verilmiştir.

Parametreler:

a= 10.204000 (0) Å
b = 8.921000 (0) Å
c = 11.419000 (0) Å
 β = 87.802002 (0)°
V = 1038.699951 (0) Å³
Z = 4

X-Işınlari Radyasyonu

λ = 0.71073 Å
130 refleksiyonun hücre parametreleri
 θ = 1-20°
 μ = 0.73 mm⁻¹
T = 293 K
Küp = 0.35 x 0.2 x 0.15 mm

küresel

2005 adet ölçülen refleksiyon	$h= 0 \rightarrow 12$
2000 adet bağımsız refleksiyon	$k= 0 \rightarrow 10$
1442 adet gözlenen refleksiyon	$l= -13 \rightarrow 13$

F için	$(\Delta/\sigma)_{\max}= 0.4147$
$\omega R= 0.054$	$\Delta\rho_{\max} = 0.13 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
$R= 0.138$	$\Delta\rho_{\min} = -0.18 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
$S= 1.343$	Ekstinksiyon düzeltmesi (yok)

1442 refleksiyon ve 228 parametre (Atomik saçılma faktörü)

$$D_x= 1.230 \text{ mg/m}^3, D_m= 1.200 \text{ mg/m}^3$$

DIP (Image plate diffractometer) [$I > 3.00$ sigma (I)]

Absorpsiyon düzeltme $\theta_{\max}= 25.73^\circ$

2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biyotransformasyonlarda kullanılan materyaller ve elde edilen metabolitlerin bir kısmının biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır

2.3.1. Antibakteriyal Aktivite

Mikro dilüsyon yöntemi [343] ile belirlenmiştir. 2 mg saf madde 2 ml steril DMSO veya MeOH kullanılarak stok çözeltisi hazırlanmıştır. İlk çukura stok çözeltiden 200 μl ilave edilmiştir. Diğer çukurların tamamına 100'er μl distile su konmuştur. Daha sonra ilk çukurdan başlayarak tüm çukurlara \log_{10} 'a göre seyreltme uygulanmıştır. İşlem sonunda 11 çukurdaki konsantrasyon aralığı 1000 - 0.97 $\mu\text{g/ml}$ olmuştur. 24 saat Müller Hinton Broth'da 37° C'de çoğaltılmış mikroorganizmalar önce 10^8 CFU/ml olacak şekilde çift kuvvet sıvı besi yerinde seyreltilmiştir. Daha sonra çukurlara 100 μl ilave edilip 24 saat 37° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı ilk çukurdaki konsantrasyon, minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) olarak $\mu\text{g/ml}$ cinsinden belirlenmiştir. Pozitif ve negatif kontroller de dikkate alınarak deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Çizelge 2.3.'de kullanılan mikroorganizmalar temin edildikleri kaynaklarıyla birlikte verilmiştir.

Standart Madde: Bakteriler için Kloramfenikol süksinat, bir maya olan *Candida albicans* için Ketokonazol kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Mikrodilüsyon yönteminde kullanılan patojen mikroorganizmalar

TCC	Mikroorganizma	Kaynak	Patojenitesi
70	<i>Escherichia coli</i> , Gr (-)*	ATCC 25922	yara, üriner ve gastro intestinal sistem enf., dizanteri, septisemi
71	<i>Staphylococcus aureus</i> , Gr (+)	ATCC 6538	gıda zehirlenmesi, üst solunum yolu enfeksiyonları, yara enf.
72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gr (-)	ATCC 27853	septisemi, yara, göz ve üriner enf.
73	<i>Enterobacter aerogenes</i> , Gr (-)	NRRL 3567	gastro intestinal sistem ve üriner sistem enfeksiyonları
74	<i>Proteus vulgaris</i> , Gr (-)*	NRRLB-123	diyare, üriner sistem ve cilt enfeksiyonları ve yara iltihabı
75	<i>Salmonella typhimurium</i> , Gr (-)	NRRLB-4420	Salmonellosiz, diyare, gıda zehirlenmesi
76	<i>Candida albicans</i> , Maya	O. G. Ü. Tıp	Kandidiaz, intestinal ve üriner sistem enf., cilt ve yara enf.

*anerobik

2.3.2. Antifungal Aktivite

Agar tüp dilüsyon yöntemi [344] kullanılarak antifungal aktivite tayin edilmiştir. Materyalden 20 mg tam tartılıp 1000 µl DMSO'de çözünerek stok çözelti hazırlanmıştır. 200 µg/ml Konsantrasyonda olacak şekilde, soğutulmuş steril Sabouraud Dekstroz Agar besiyeri bulunan (4 ml) deney tüpleri içine ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak oda sıcaklığında katılaşması için eğik bir şekilde bekletilmiştir. 4 mm çapında 7 günlük fungus kültürü besiyerinin merkezine transfer edilmiştir. 27-29°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Standart olarak antifungal ve DMSO kullanılarak; % inhibisyon değeri besiyerinde mm cinsinden büyüme çapı, antifungal mm büyüme çapı farkı olarak belirtilmiştir. Kullanılan funguslar; (Bkz. Çizelge 2.4.) bitki patojeni olup Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

Standart Maddeler: Benomil [metil-1-(butilkarbomil)-2-benzimidazol-karbamat], Penkonazol [1(2-(2,4-diklorofenil)-*n*-pentil)-1-H,1,2,4 -triazol], Ornidazol [1-(3-kloro-2-hidroksipropil)-2-metil-5-nitroimidazol] ve Ketokonazol {(±)-1-asetil-4-[*p*-[[*(2R,4S)*-2-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-il-metil)-1,3-dioksolan-4-il]metoksi]fenil]piperazin} antifungal standart olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Agar tüp dilüsyon yönteminde kullanılan patojen funguslar

TCC	Mikroorganizma	Kaynak	Patojenitesi
55	<i>Alternaria alternata</i>	NRRL 20593	Domates zararlısı
48	<i>Aspergillus flavus</i>	HEJ Pakistan	Gıda küfülenmesi Aspergillozis
46	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC-10549	Kök çürükleri, Aspergillozis
92	<i>Drechslera sorokiniana</i>	Fen Fakültesi	Tahıllarda çürüme
50	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374	Domates ve sebze
90	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Anadolu Tarım	Tahıllarda çürüme
59	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Fen Fakültesi	Tahıl kök çürümesi
51	<i>Rhizophus stolonifer</i>	NRRL 2710	Sebze ve meyve zararlısı
91	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Anadolu Tarım	Tahıl çürümesi
45	<i>Trichothecium roseum</i>	CMI 50600	Elma ve diğer meyva-larda çürüme

2.3.3. Antiviral Aktivite

Ankara Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi'nce büyükbaş hayvanlardan izole edilmiş Bovine Herpes Virüsü (BHV-1) kullanılmıştır. Antiviral aktivite iki aşamada değerlendirilmiştir [344-346]. İlk aşamada maddelerin hücreler karşısında göstermiş oldukları sitotoksik konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda, yani maddelerin sitotoksik olmadığı konsantrasyonlarda, antiviral etki sitopatolojik etki türünden incelenmiştir.

Numune hazırlanması:

10 mg Civarında materyal tam olarak tartılmış ve 2 ml % 5 EAGLE MEM medyumda çözülmüş, vorteks ile 1 dak karıştırılmış ve 0.4 µm filtrelerden geçirilerek deneylerde kullanılmıştır.

a) *In vitro* sitotoksik aktivite

1. Tüm gözlere 50 µl EAGLE MEM medyum koyulmuştur,
2. 1. Sıraya 50 µl numune ilave edilmiştir,
3. 50 şer µl aktarılacak log₁₀'a göre seyreltme yapıp, son sıra "hücre kontrol" (HK) olarak bırakılmıştır,
4. Tüm çukurlara 50 µl %10 FDS'lu EMEM ilave edilmiştir,
5. Tüm çukurlara 50 µl 300000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK (%10 FDS'lu EAGLE MEM) hücre süspansiyonu dropper ile ilave edilmiştir
6. 37°Cde %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Bu deney potansiyel antiviral etkili maddelerin *in vitro* koşullarda (MDBK hücre kültürü) meydana getirebilecekleri sitotoksik etki ve bu etkinin minimum dozunun tespiti için hazırlanmıştır.

b) *In vitro* antiviral aktivite

1. Tüm çukurlara 50 μ l EAGLE MEM medyum koyulmuştur,
2. Stok tüpler içine 100 μ l BHV1 (1/500000) virüsü ve 50 μ l numune ilave edilip, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. 1. sıraya 50 μ l virüs + numune karışımı konulmuştur (1/2 seyreltme)
4. log₁₀'a göre seyreltme yapılmıştır,
5. Son iki sıra hücre kontrol (HK) ve virüs kontrol (VK) olarak numune ilave edilmeden bırakılmıştır,
6. Tüm çukurlara 50 μ l %10 FDS'lu EMEM ilave edilmiştir.
7. Tüm çukurlara 50 μ l 300000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK (%10 FDS'lu EAGLE MEM) hücre süspansiyonu dropper ile ilave edilmiştir.
8. 37°Cde %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır

Standart madde: Antiviral madde olarak tüm denemelerde Asiklovir kullanılmıştır.

Bu deney ise potansiyel antiviral etkili maddelerin tüp içerisinde 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış virüs ile 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyonu sonucu antiviral etkinin tespiti ve varsa hangi konsantrasyonlarda etkili olduğunu bulmak için yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi: Mikroskopik olarak hücresel düzeyde virüs tarafından oluşturulan CPE'nin görülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Antiviral etkili konsantrasyonlarda CPE görülmemektedir.

100 DKID₅₀ = Enfekte edilen doku ya da hücre kültürü veya deneme hayvanlarının en az yarısında enfeksiyon oluşturan virüs seyreltmesi
HK= 100 μ l %10 FDS'lu EAGLE MEM + 50 μ l 300000 hücre/ml hücre süspansiyonu
VK= 50 μ l %10 FDS'lu EAGLE MEM + 50 μ l virüs + 50 μ l hücre süspansiyonu
FDS= Fötal dana serumu (Paesel GmbH and Co., Frankfurt Germany)
EAGLE MEM= Eagle's Minimum Essential Medium (Biochrom KG., Berlin, Germany)
MDBK= Modin Darby Bovine Kidney Hücre Kültürü
BHV-1= Bovine Virus Type - 1
CPE (cytopathologic effect= sitopatolojik etki)

3. BULGULAR

3.1. Biyotransformasyon Ön Çalışması Sonuçları

Materyaller, 55 mikroorganizma ile Bölüm 2.2.4.'te açıklanan metotlar kullanılarak biyotransformasyona bırakılmış, dönüşümlerin gerçekleşip gerçekleşmediği İTK ile kontrol edilmiştir. Daha fazla sayıda türev oluşturan mikroorganizmalar ile yarı preparatif ve preparatif ölçekte (Bkz. 2.2.5.) çalışmalara devam edilmiştir. Mikroorganizmaların isimleri ve ön çalışmaların sonuçları Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Materyallerin biyotransformasyonları için kullanılan mikroorganizmalar ve ön çalışmaların sonuçları

TCC	Mikroorganizma	1	2	3	4	5	5'
19	<i>Absidia glauca</i>	1/2	1/2	x	x	x	5/3
55	<i>Alternaria alternata</i>	y	y	-	-	-	-
48	<i>Aspergillus flavus</i>	y	y	-	-	-	-
30	<i>Aspergillus foetidus</i>	1/2	y	-	-	-	3/3
46	<i>Aspergillus niger</i>	y	y	x	x	x	x
64	<i>Aspergillus niger</i>	y	y	x	x	x	x
47	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	y	y	-	-	-	-
23	<i>Aureobasidium pullulans</i>	3/6	y	-	-	-	1/3
5	<i>Caldariomyces fumago</i>	y	y	-	-	-	3/2
40	<i>Cephalosporium aphidicola</i>	-	y	-	-	-	-
21	<i>Chaetomium cochliodes</i>	5/2	y	-	-	-	3/2
54	<i>Cladosporium cladosporiodes</i>	y	y	-	-	-	-
6	<i>Cladosporium resinae</i>	2/0	2/0	-	-	-	y/5
80	<i>Cladosporium sp.</i>	x	y	-	-	-	-
81	<i>Cladosporium sp.</i>	x	y	-	-	-	-
31	<i>Cunninghamella elegans</i>	2/2	1/3	x	x	x	5/4
35	<i>Cunninghamella echinulata</i>	-	-	x	x	x	x
41	<i>Curvularia lunata</i>	-	y	-	-	-	-
8	<i>Cylindrocephalum aureum</i>	y/2	1/3	-	-	-	2/7
25	<i>Dacrymyces delinquescens</i> var. <i>delinquescens</i>	y/3	1/3	-	-	-	2/2
24	<i>Dactylaria haptotyla</i>	2/2	y	-	-	-	y/2
60	<i>Digitalum sorokinianse</i>	y	y	-	-	-	-
56	<i>Fusarium culmorum</i>	y	y	-	-	-	-
50	<i>Fusarium moniliforme</i>	x	x	-	-	-	-
34	<i>Fusarium solani</i>	-	y	-	-	-	-

1= karvakrol, 2= timol, 3= karvakrol metil eter, 4= timol metil eter, 5= (+)-karvon, 5'= (-)-karvon,

x = transformasyon mevcut, metabolit oluşumu (İTK'ne göre) var, y = transformasyon yok,

- = denenmemiştir, o = yıkılım,

/ ile ayrılan sayılar 4. ve 10. gün sonundaki metabolit sayılarını belirtir.

TCC =TBAM Kültür Koleksiyonu

Çizelge 3.1. (Devam) Materyallerin biyotransformasyonları için kullanılan mikroorganizmalar ve ön çalışmaların sonuçları

TCC	Mikroorganizma	1	2	3	4	5	5'
57	<i>Fusarium solani</i>	y	y	-	-	-	-
4	<i>Gliocladium deliquescens</i>	4/3	1/3	-	-	-	3/3
9	<i>Hansenula anomala</i>	4/5	3/3	-	-	-	3/6
10	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	3/4	y/3	-	-	-	2/2
52	<i>Mucor mucedo</i>	y	y	-	-	-	-
53	<i>Mucor mucedo</i>	y	y	-	-	-	-
20	<i>Mucor ramannianus</i>	3/3	3/5	x	x	x	2/3
27	<i>Penicillium claviforme</i>	3/3	1/0	x	x	x	4/3
28	<i>Penicillium frequentans</i>	1/1	y	-	-	-	2/3
49	<i>Penicillium spinulosum</i>	x	x	-	-	-	-
15	<i>Pichia membranaefaciens</i>	y	2/0	-	-	-	3/2
61	<i>Pseudomonas putida</i>	y	y	x	x	x	x
62	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	y	y	-	-	x	x
63	<i>Pseudomonas syringae</i>	y	y	-	-	-	-
7	<i>Ramichloridium anceps</i>	y/1	1/0	-	-	-	y/2
59	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	y	y	-	-	-	-
32	<i>Rhizopus arrhizus</i>	x	y	-	-	-	-
44	<i>Rhizopus stolonifer</i>	x	x	-	-	-	-
51	<i>Rhizopus stolonifer</i>	y	y	-	-	-	-
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	y	y/1	-	-	-	2/4
17	<i>Rhodotorula rubra</i>	2/6	2/2	-	-	-	5/7
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4/2	2/3	x	x	x	2/2
16	<i>Saccharomyces lipolytica</i>	2/3	2/4	-	-	-	2/2
12	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	2/4	y/2	-	-	-	1/2
38	<i>Streptomyces floecaulus</i>	y	y	-	-	-	-
33	<i>Streptomyces griseus</i>	x	x	-	-	x	x
22	<i>Thamnidium elegans</i>	1/4	2/4	-	-	-	5/1
13	<i>Torulopsis petrophilum</i>	5/3	2/0	-	-	-	1/5
58	<i>Trichoderma harzianum</i>	y	y	-	-	-	-
45	<i>Trichothecium roseum</i>	x	y	x	x	x	x

1= karvakrol, 2= timol, 3= karvakrol metil eter, 4= timol metil eter, 5= (+)-karvon, 5'= (-)-karvon, x = transformasyon mevcut, metabolit oluşumu (İTK'ne göre) var, y = transformasyon yok,

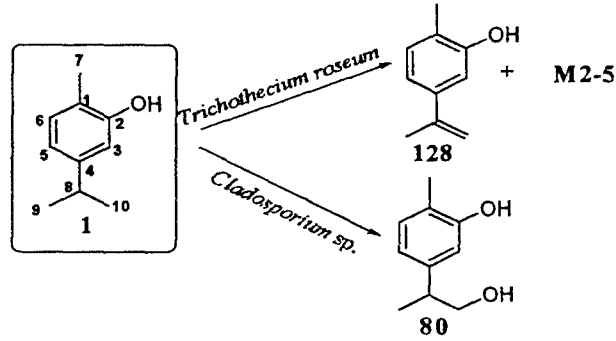
- = denenmemiştir, o = yıkılım,

/ ile ayrılan sayılar 4. ve 10. gün sonundaki metabolit sayılarını belirtir.

TCC =TBAM Kültür Koleksiyonu

3.2. Karvakrol'ün (1) Mikrobiyal Transformasyonu

Çizelge 3.1.'de özetlenen ön çalışmaların sonuçlarına göre 12 kadar mikroorganizma ile preparatif denemeler gerçekleştirilmiş, ancak 2 mikroorganizma ile metabolit elde edilmesi başarılı olmuştur. Biotransformasyon sonucu oluşan metabolitlerin kimyasal yapısı Şekil 3.1.'de, metabolitler hakkında özet bilgiler Çizelge 3.2.'de ve bu çalışmalarla ilgili açıklayıcı bilgiler alt başlıklar halinde verilmiştir.



Şekil 3.1. Karvakrol'ün (1) mikrobiyal transformasyonu

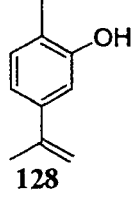
Çizelge 3.2. Karvakrol'ün mikrobiyal transformasyon metabolitleri

Mikroorganizma	TCC	Metabolitler	Formül No	Teşhis
<i>Trichothecium roseum</i>	45	M1	128	GC/MS
		M2	-	GC/MS
		M3	-	GC/MS
		M4	-	GC/MS
		M5	-	GC/MS
<i>Cladosporium sp.</i>	80 81	M6	80	İTK, GC/MS, ¹ H, ¹³ C-NMR

3.2.1. Metabolit 1-5

Trichothecium roseum filamentli fungusu kullanılarak karvakrol'ün (1) biotransformasyonu denenmiştir. Bölüm 2.2.3.'te belirtilen genel besi yeri (c) kullanılarak ve 2.2.5.'deki iki aşamalı yöntem ile 29 adet 250 ml'lik erlene 1.0 g materyal eşit olarak paylaştırılmıştır (~35 mg/erlen). 12 günlük inkübasyon sonunda, ekstraksiyon işlemi bölüm 2.2.7.'de belirtildiği gibi EtOAc ile gerçekleştirilmiş ve 1.09 g metabolit ekstresi elde edilmiştir. GC ve GC/MS analizleri 2.2.8.1.'de verilen B programı ile gerçekleştirilmiştir. Aynı analizde,

karvakrolün (1), relatif olarak % 95 oranında dönüşmeden yapısını koruduğu belirlenmiştir.



Metabolit M1

Dehidrokarvakrol (128), {sin.: 2-Metil-5-(1-metilvinil)-fenol; 3-Hidroksi- α ,4-dimetilstiren}, [C₁₀H₁₂O],

GC/MS analizinden elde edilen bilgiler doğrultusunda, karvakrolden iki hidrojen (H₂) çıkışı belirlenmiştir. Kaynak taramaları sonucu, karvakrol'ün izopropil grubunda dehidrojenasyonun gerçekleşmesiyle ortaya çıkan 2-metil-5-(1-metilvinil)-fenol yapısıyla kütle spekturumu değerlerinin tamamen benzer olduğu görülmüş ve aynı yapıya sahip olduğu kanaatine varılmıştır. Bu bileşik ilk kez *Lavandula gibsonii*'den izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Ayrıca kimyasal sentezlerle elde edildiğinde bilinmektedir [347, 348].

EI/MS m/z : 148 (M⁺,100) 133, 115, 108, 91, 77, 65, 63, 51, 39.

Metabolit M2

EI/MS m/z : 180 (M⁺), 165 (100), 149, 135, 121, 109, 88, 77, 69, 43.

Metabolit M3

EI/MS m/z : 168 (M⁺), 167, 149 (100), 132, 113, 104, 83, 71, 57, 43.

Metabolit M4

EI/MS m/z :166 (M⁺), 151, 135, 133, 121, 107, 91, 77, 59, 51, 43 (100).

Metabolit M5

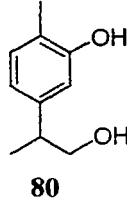
EI/MS m/z :152 (M⁺), 137, 119, 109 (100), 91, 77, 65, 43, 39.

M2, M3, M4 ve M5 kodlu metabolitler düşük miktarlarda olmaları nedeniyle izole edilememişlerdir. Ancak izolasyonları ile ilgili çalışmalar halen sürmektedir.

3.2.2. Metabolit 6

Balıkesir: Ayvalık, Cunda Adası'ndan temin edilen *Coridothymus capitatus* (L.)Reichb. fil. (Labiatae) bitkisi ve toprağından izole edilen [339] 2 adet mikroorganizma karvakrolü α -medyumda 5. günden itibaren metabolit M6'ye

dönüştürmüştür. Kromatografik teknikler kullanılarak (Bkz. 2.2.7. VSK, KK ve prep İTK, Çizelge 2.2. E) metabolit **M6** elde edilmiştir. İTK'da karvakrole göre daha polar olan **M6**, GC/MS analizi sonucu M^+ 166 piki ile karvakrol'de (1) bir hidroksilasyon olabileceğini göstermiş ve kapalı formül olarak $C_{10}H_{14}O_2$ belirlenmiştir. ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarında 4 adet $-CH$, 1 adet $-CH_2$, 2 adet $-CH_3$, 3 adet $-CH_4$, ile toplam 10 karbon tespit edilmiştir. 1H NMR spektrumunda, δ 1.23'de, 3 H integrasyonunda dublet H-10'daki; 2.22 ppm'de ki singlet ise H-7'deki $-CH_3$ göstermektedir. Karvakrolün spektrumundan farklı olarak H-9 pozisyonunda $-CH_3$ grubu yerine $-CH_2$ grubuna ait δ 3.64 ve 3.71'de iki adet singlet $-OH$ grubunun H-9 pozisyonunda olduğunu desteklemiştir. Ayrıca δ 4.8'de bulunan ve 2H'a karşılık gelen yayvan (br) singlet, karvakrole bir $-OH$ grubu daha katılmış olduğunu belirtmiştir. Kaynak taramalarında ratlarda karvakrol ile yapılan bir *in vivo* çalışmada, metabolit olarak açık formülünün çizildiği ve TMS türevi olarak kütle spektrumunun verildiği görülmüştür [106]. **M6**'nın özellikler ve spektral verileri burada ilk kez bildirilmektedir (Şekil 3.2.).



Metabolit **M6**

9-Hidroksi karvakrol (**80**) {sin.: 3-Hidroksi- β -4-dimetil-benzenmetanol; 5-(2-Hidroksi-izopropil)-2-metilfenol; 5-(2-Hidroksi-1-metiletil)-2-metilfenol}, [$C_{10}H_{14}O_2$], kokulu, açık sarı renkte, yağimsı (12 mg), R_f : 0.1 (sistem B);

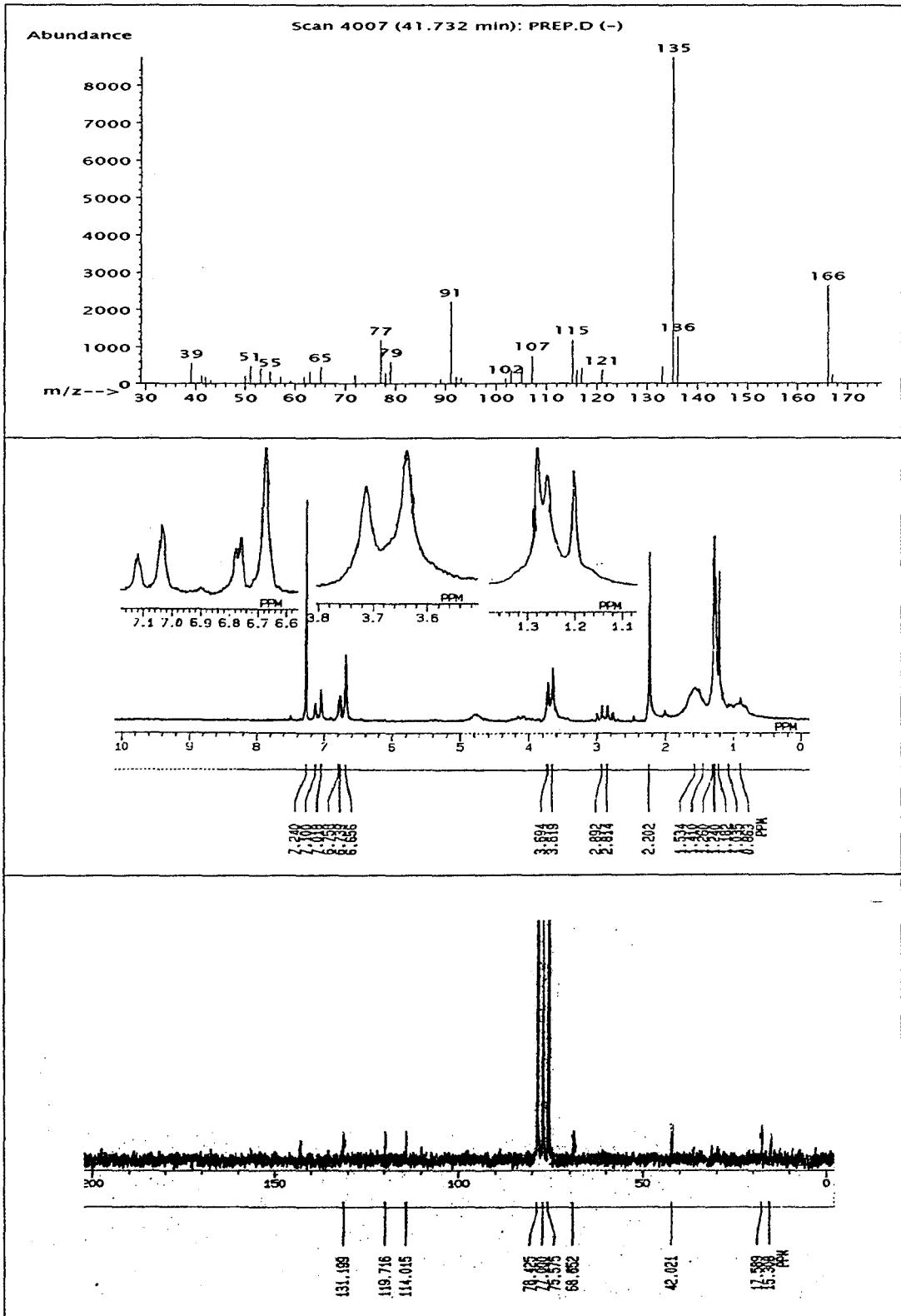
$[\alpha]_D^{28}$: + 122.2° (*c* 0.09, MeOH), UV (λ_{max}): 231, 275 nm (*c* 0.09, MeOH);

GC-FT/IR (ν_{max}) 3652 (OH), 3030, 2970, 1584, 1426, 1225, 1036, 809 cm^{-1} ;

1H NMR (90 MHz): δ 1.23 (3H, d, *J* 5.2, H-10), 2.22 (3H, s, H-7), 2.87 (1H, sept, *J* 7.0, H-8), 3.64 (1H, s, H-9b), 3.71 (1H, s, H-9a), 4.8 (2H, OH), 6.68 (1H, s, H-3), 6.77 (1H, d, *J* 1.7, H-5), 7.08 (1H, d, *J* 7.4, H-6) (Şekil 3.2.);

^{13}C NMR (22.5 MHz): δ 15.3 (C-7, CH_3), 17.5 (C-10, CH_3), 42.0 (C-8, CH), 68.7 (C-9, CH_2), 114.0 (C-3, CH), 119.7 (C-5, CH), 122.0 (C-1, CH_4), 131.2 (C-6, CH), 143.0 (C-4, CH_4), 160.2 (C-2, CH_4) (Şekil 3.2.);

EL/MS m/z : 166 (M^+ , 24), 136 (13), 135 (100), 133 (4), 121 (5), 115 (10), 107 (8), 105 (5), 91 (25), 79 (7), 77 (10), 65 (4), 51 (4), 39 (6) (Şekil 3.2.).



Şekil.3.2. 9-Hidroksi karvakrol'ün (80) spektral verileri (MS, 1H ve ^{13}C NMR)

3.2.3. Diğer Denemeler

Daha verimli dönüşümleri belirlemek amacıyla, Çizelge 2.1.'deki ilk 25 mikroorganizma ile α -medyum (2.2.3.a) ve 2.2.4.1.'deki yöntem kullanılarak 4 ve 10 günlük dönüşümler incelenmiş, İTK ile metabolitler tespit edilmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurularak *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans* ve *Penicillium claviforme* mikroorganizmaları ile 4 günlük preparatif çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2.2.5.a'daki yöntem ve 2.2.6.1.'deki ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve şu veriler elde edilmiştir:

Saccharomyces cerevisiae ile: 10 adet 2 l'lik erlene 600 ml sıvı besi yeri hazırlanıp her birine 60 mg karvakrol asetonda çözülerek ilave edilmiştir. 4 günlük inkübasyon sonucu 2.19 g ekstre elde edilmiştir.

Aureobasidium pullulans ile: 10 adet 1 l'lik erlene 350 ml sıvı besi yeri hazırlanıp 350 mg karvakrol eşit olarak paylaştırılmış ve 0.64 g ekstre elde edilmiştir.

Penicillium claviforme ile: 10 adet 1 l'lik erlene 350 ml sıvı besi yeri hazırlanıp 350 mg karvakrol eşit olarak paylaştırılmış ve 1.0 g ekstre elde edilmiştir.

Her üç ekstre İTK ile incelenmiş (2.2.7.1. ve Çizelge 2.2.'deki sistem A, C, H) ve metabolitlerin eldesi için öncelikle vakum sıvı kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır (2.2.7.2.). Ancak miktarları çok düşük olan bu metabolitler hakkında yeterli veriye ulaşılamamıştır.

Mucor ramannianus, *Rhizopus arrhizus*, *Streptomyces griseus* ve *Trichothecium roseum* mikroorganizmaları ile 2.2.4.2. yöntemi ve Czakpek Pepton (2.2.3.b.) sıvı besi yeri kullanılarak 15 gün süreyle biyotransformasyon izlenmiştir. Ancak burada metabolit oluşumu görülmemiştir.

Kaynak taramasında (1.3.3.2.) açıklandığı gibi, timol'ün, *Pseudomonas putida* adlı mikroorganizma ile biyotransformasyonu sonucu metabolitler elde edildiği görülmüştür [27]. Bu veriler doğrultusunda *Pseudomonas putida* ile (Çizelge 2.1. ve 3.1) α -medyum ve Czakpek Pepton (2.2.3. a ve b) sıvı besi yerleri kullanılarak, 2.2.4.2.'deki yöntem ile karvakrol'ün biyotransformasyonu amaçlanmıştır. Elde edilen ekstratlar 24 saat ara ile İTK ve GC/MS analizleri ile

incelenmiş kayda değer bir dönüşüm tespit edilememiştir. *Pseudomonas*'ın farklı bir türü, *P. stutzeri* ile de benzer sonuç elde edilmiştir.

Cladosporium cladosporioides ve *Trichoderma harzianum* fungusları ile α -medyum kullanılarak, 2.2.4.2.'deki yöntemle 15 gün boyunca biyotransformasyon İTK ile incelenmiş, kontrollerle karşılaştırıldığında karvakrol'ün değişmeden kaldığı belirlenmiş herhangi bir metabolite ait leke tespit edilememiştir.

Japonya'dan temin edilen ve özellikle monoterpenlerin biyotransformasyonunda etkili ve verimli olduğu bilinen [315, 339] *Aspergillus niger* ile Czapek Pepton besi yerinde 15 gün biyotransformasyona bırakılmıştır. Biyotransformasyon işlemi sonucunda herhangi bir metabolit elde edilmemesi üzerine kolleksiyondaki diğer *A. niger* (TCC 46) ile karvakrol farklı iki sıvı besi yerinde incelenmiştir. Elde edilen ekstraların İTK ve GC/MS analizlerinde yine karvakrol'ün herhangi bir metabolitine rastlanmamıştır.

Toprak ve su numuneleri, konsantrasyon yaklaşık % 10 olacak şekilde karvakrol ilave edilmiş katı besi ortamlarında inkübasyona bırakılmış ve gelişebilecek mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen Aktinomiset grubu mikroorganizmalar özel besi yerlerinde (2.2.3.d) karvakrol'ün biyotransformasyonunda kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar da karvakrol'ü dönüştürememiştir. Topraktan izole edilen bir mikroorganizma karışımının karvakrol'ü metabolize ederek tamamen parçaladığı İTK çalışmasıyla belirlenmiştir.

3.3. Timol'ün (2) Mikrobiyal Transformasyonu

Daha önce de belirtildiği gibi kaynak taramasında, 1968 yılında yapılan bir mikrobiyal transformasyon çalışmasının haricinde timol (2) ile yapılan bir çalışmaya rastlanmıştır [27]. Buradan hareketle timol'ün biyotransformasyon çalışmaları karvakrol ile paralel yürütülmüştür. Timol, karvakrol'ün biyotransformasyonun denendiği tüm mikroorganizmalar ile aynı koşullarda denenmiştir. Ancak bu molekülden hiçbir türev elde edilememiştir. İTK ile belirlenen metabolit görünümündeki maddelerin ise GC/MS analizleri sonucu başka tip aromatik maddeler olduğu tespit edilmiştir. Aşağıda özetlenen çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

Cylindrocephalum aureum ile: 10 adet 1 l'lik erlende (350 ml sıvı besi yeri, Bkz. 2.2.3.a.) ve 350 mg materyal (2) eşit olarak dağıtılmıştır.

Mucor ramannianus ile: 10 adet 2 l'lik erlende (600 ml sıvı besi yeri Bkz. 2.2.3.a.) ve 600 mg materyal (2) eşit olarak dağıtılmıştır.

4 günlük inkübasyon sonunda ekstraksiyon (2.2.6.) ve izolasyon çalışmaları (VSK, preparatif İTK, Bkz. 2.2.7.) yapılmış, ancak herhangi bir metabolit elde edilememiştir.

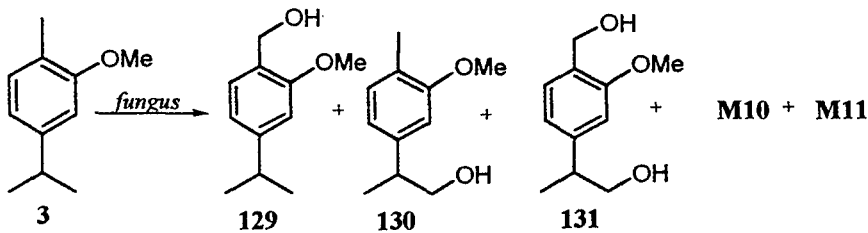
Fusarium moniliforme adlı fungus kullanarak, timol (50 mg) ile yapılan biyotransformasyon çalışması 2.2.4.1.'deki yöntem ve 2.2.3.1. sıvı besi yeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 10. günün sonunda ekstraksiyon (2.2.6.1), İTK (2.2.7. ve Çizge 2.2.'deki sistem A, B ve D), preparatif İTK (2.2.7.1. sistem - D) ve GC/MS analizleri sonucunda sadece çok düşük oranda karvakrolün varlığı tespit edilmiştir.

Timol, *A. niger* (TCC 46 ve 64) ile 2.2.4.'deki her iki yöntemle, farklı iki sıvı besi yeri (Bkz. 2.2.3.'de a ve b) kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmiş ancak yine timolün dönüşümü gözlenememiştir.

Çizelge 3.1.'e göre dönüşüm yaptığı tespit edilen, ancak preparatif düzeyde denemeleri yapılmamış mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalar halen sürmektedir.

3.4. Karvakrol metil eter'in (3) Mikrobiyal Transformasyonu

Karvakrol ile verimli dönüşümler meydana gelmemesi üzerine metil türevi (3) ile de denemeler yapılmaya karar verilmiştir. Yapılan kaynak taraması sonucu karvakrol metil eteri ile ilgili hiç bir biyotransformasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen ve yapıları aydınlatılan karvakrol metil eter metabolitleri Şekil 3.3. ve Çizelge 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Karvakrol metil eter'in (3) mikrobiyal transformasyonu

Çizelge 3.3. Karvakrol metil eter'in metabolitleri

Mikroorganizma	TCC	Metabolitler	Formül No	Teşhis
<i>Aspergillus niger</i>	64	M7	129	İTK, GC/MS, ¹ H, ¹³ C-NMR
	46	M8	130	“
		M9	131	“
		M10	132	İTK, GC/MS,
		M11	133	İTK, GC/MS,
<i>Mucor ramannianus</i>	20	M7	129	İTK
		M8	130	“
<i>Rhizopus arrhizus</i>	32	M7	129	“
<i>Trichothecium roseum</i>	45	M7	129	“
		M8	130	“

3.4.1. Metabolit 7

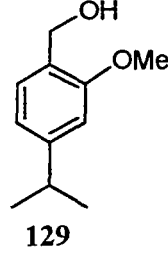
Aspergillus niger (TCC 64) ile 2.2.3.'deki Czakpek Pepton sıvı besi yeri ve tek aşamalı 2.2.4.2. yöntem ile 24 saat gibi kısa bir sürede farklı ve daha polar özellikte metabolitler vermiştir (Bkz. 2.2.6.1. ve 2.2.7.1, sistem B, C ve G). Ekstrelerin GC/MS analizleri sonucunda ilk 2 gün içinde değişik pozisyonlardan hidroksillenmiş metabolitlerin (M^+ 180, temel pikler ise sırasıyla 137 ve 149) bir birine çok yakın yapısal izomerlerin olabileceği kaydedilmiştir.

Karvakrol metil eter (3), *A. niger* ile ayrı ayrı etkileştirilip metabolitler elde edilebilmiştir. Her iki fungusun, tek aşamalı preparatif yöntemle (Bkz. 2.2.5.a.) ve 200 mg (4x 50 mg) karvakrol metil eter (3) ile 10 gün biyotransformasyon sonucu 2.2.6.1.'deki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstratlar (250 mg) daha sonra kolon kromatografisi ile (Bkz. 2.2.7.) ayrılmıştır. 70:30 hekzan:aseton elüsyonu ile metabolitler 30 mg'lık karışım halinde izole edilmiş ve preparatif İTK ile saflaştırılmıştır.

Metabolit 7'in GC/MS analizi sonunda M^+ 180 ile 7, 9 veya 10. pozisyonların birine, karvakrol metil eter'den farklı olarak, -OH katılımını göstermektedir. IR spektrumunda 3342 cm^{-1} de gözlenen yayvan (br) pik, karakteristik bir -OH piki olup, hidroksilasyonu doğrulamaktadır. ¹H NMR spektrumunda 7. konumdaki metil'in yerine düşük alanda (δ 4.65) 2H

integrasyonunda -CH₂ singletinin olması metabolitin 7-hidroksi olduğunu desteklemiştir. Daha önce sentezlenmiş olan hidroksi karvakrol metil eter (129) [349] ilk kez doğal yöntemlerle elde edilmiştir.

Ayrıca *M. ramannianus* ve *T. roseum* fungusları tarafından da oluşturulan bu metabolitin spektrumları, Şekil 3.4.a ve b’de verilmiştir.

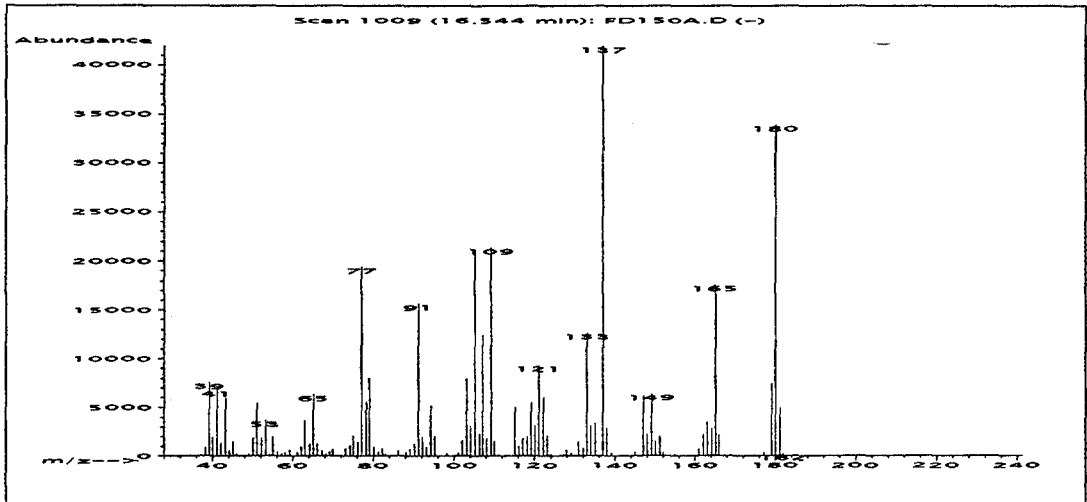


Metabolit M7

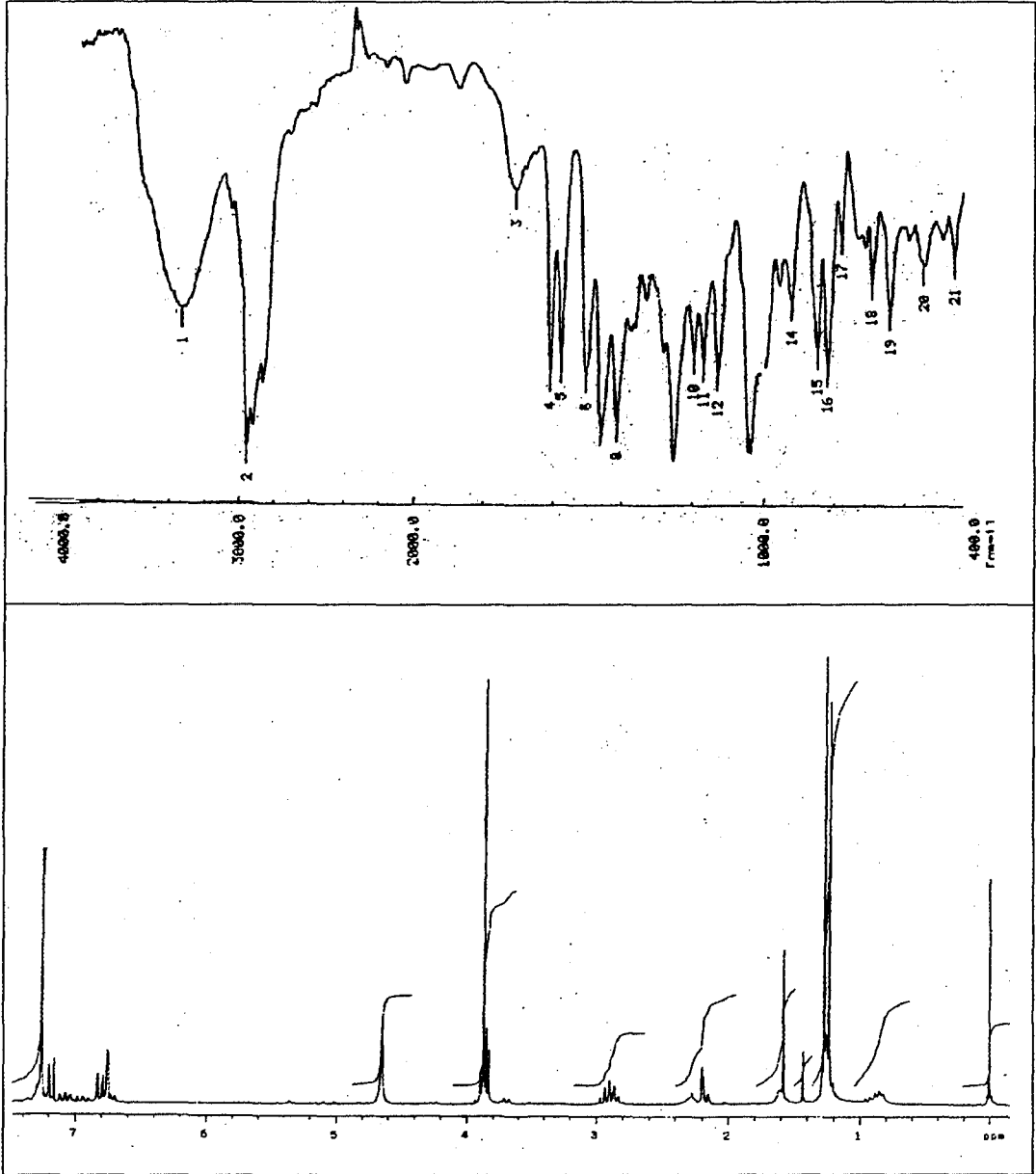
7-Hidroksi karvakrol metil eter (129), {sin.: 2-Metoksi-4-(1-metiletil)-benzen metanol; 2-Metoksi-*p*-simen-7-ol; (4-İzopropil-2-metoksi-fenol)-metanol}, [C₁₁H₁₆O₂], kokulu, renksiz ve yağimsı (14.5 mg) R_f: 0.28 (Çizelge 2.2. sistem B); IR (ν_{max}): 3342 (br, OH), 2959, 1716, 1612, 1581, 1401, 1200, 1172 cm⁻¹ (Şekil 3.4.b.);

¹H NMR (300 MHz): δ 1.29 (3H, s, H-9), 1.43 (3H, s, H-10), 2.94 (1H, m, H-8), 3.9 (3H, s, OCH₃), 4.65 (2H, s, H-7), 6.75 (1H, d, *J* 1.3, H-3), 6.80 (1H, dd, *J* 2.1, 9.3, H-5) 7.23 (1H, d, *J* 11.4, H-6) (Şekil 3.4.b.);

ELMS *m/z*: 180 (M⁺, 85), 165 (38), 149 (20), 137 (100), 133 (24), 121 (17), 109 (38), 105 (35), 91 (28), 77 (32), 66 (11), 43 (15) (Şekil 3.4.a.).



Şekil.3.4.a. 7-Hidroksi karvakrol metil eter'in (129) kütle spektrumu



Şekil.3.4.b. 7-Hidroksi karvakrol metil eter'in (129) spektral verileri (IR ve ¹H NMR)

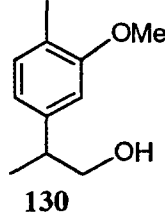
3.4.2. Metabolit 8

A. niger (TCC 46)'ten elde edilmiş ana metabolitin kütle spektrumu M7'den farklı olduğu görülmüştür. Temel piki 149 olan metabolit M8, M7'den İTK ve GC ile ayrılmamıştır. Sadece M8'i üreten mikroorganizma seçilip yarı preparatif olarak tek aşamalı yöntemle çalışılmış ve ekstraksiyon sonucu KK (2.2.7.3.) ile elde edilmiştir.

Karvakrol metil eterden ve M7 den farklı olarak 9. pozisyonda -CH₃ pikinin yerine -CH₂ grubunun varlığı, ¹H NMR spektrumunda belirgin olarak göze

çarpmıştır (δ 3.7 dublet J 5.8 ve 2 H). 7. ve 10. Pozisyonlardaki metil'ler herhangi bir değişikliğe uğramamıştır (Şekil 3.5.a. ve b.). Kaynaklarda, (-)-ksantorizol adlı seskiterpenin total sentezinde ara ürün olarak açık formülüne rastlanmıştır [350]. Özellikleri ve spektral verileri ilk kez burada bildirilmektedir.

M. ramannianus, *R. arrhizus* ve *T. roseum* adlı fungusların da karvakrol metil eter'i **M8**'e dönüştürebildikleri İTK ile belirlenmiştir.

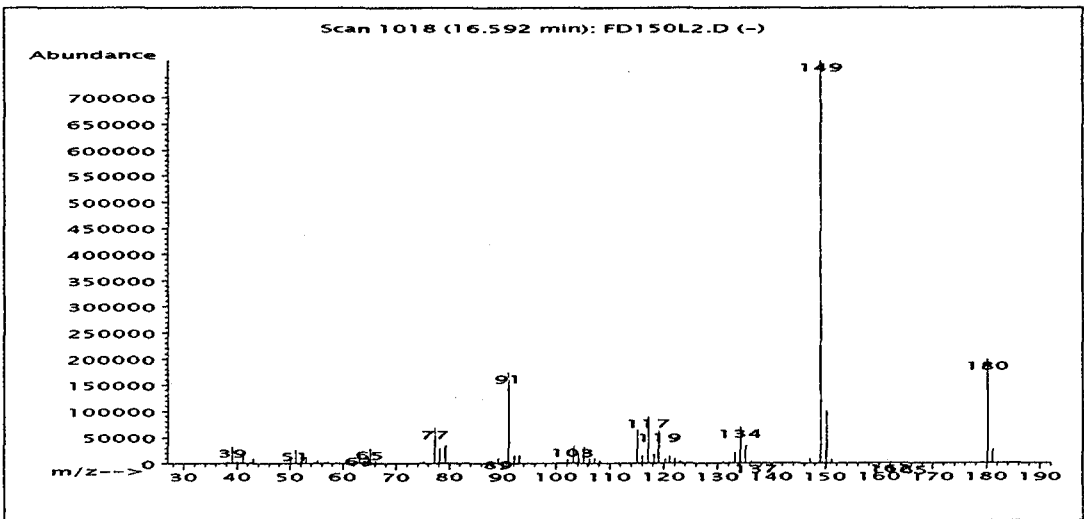


Metabolit M8

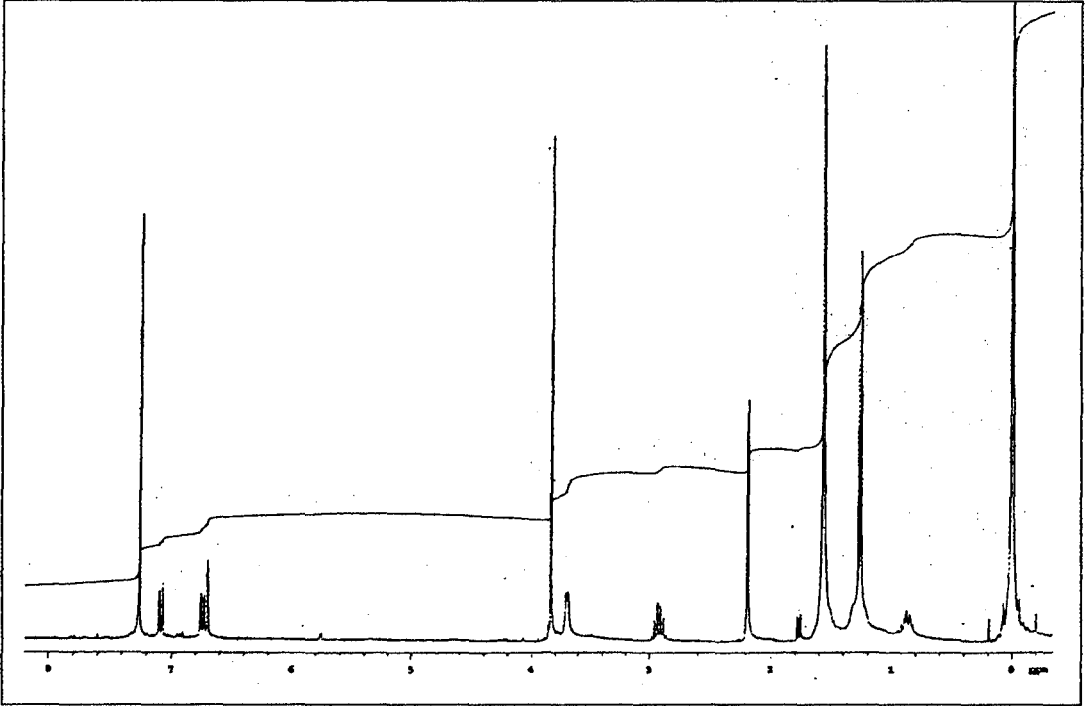
9-Hidroksi karvakrol metil eter (**130**) {sin.: 3-metoksi- β -4-dimetil-benzen etanol; 2-metoksi-*p*-simen-9-ol; 2-(3-metoksi-4-fenil)-propan-1-ol}, [C₁₁H₁₆O₂], kokulu, renksiz yağimsı (10 mg); R_f 0.2 (Çizelge 2.2. sistem C); $[\alpha]_D^{28}$: + 52° (c 0.2, MeOH); UV (λ_{max}): 213, 223 nm (c 0.02, MeOH);

¹H NMR (300 MHz): δ 1.27 (3H, d, J 7.1, H-10), 2.19 (3H, s, H-7), 2.92 (1H, m, H-8), 3.70 (2H, d, J 5.8, H-9), 3.84 (3H, s, OCH₃), 6.70 (1H, d, J 1.4, H-3), 6.75 (1H, dd, J 1.4, 7.4, H-5), 7.04 (1H, d, J 7.5, H-6) (Şekil 3.5.b.);

EI/MS m/z : 180 (M⁺, 24), 149 (100), 134 (10), 117 (12), 115 (9), 103 (5), 91 (25), 77 (10), 65 (5), 51 (4) (Şekil 3.5.a.).



Şekil.3.5.a. 9-Hidroksi karvakrol metil eter'in (**130**) kütle spektrumu

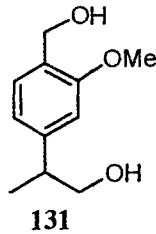


Şekil.3.5.b. 9-Hidroksi karvakrol metil eter'in (130) ^1H NMR spektrumu

3.4.3 Metabolit 9

A. niger (TCC 46) ile biyotransformasyonunda M^+ 196 piki veren metabolit kolon kromatografisinden sonra preparatif İTK ile saflaştırılmıştır (2.2.7.2.b sistem H). Kapalı formül $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ olarak belirlenen **M9**'un, ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarında toplam 11 adet karbon tespit edilmiştir. ^1H NMR spektrumu 7. ve 9. pozisyonlardaki metil gruplarının metilen gruplarına dönüştüğünü göstermiştir δ 4.65 ve 3.70 pikleri iki adet hidroksil grubunun bu konumlara bağlandığını göstermiş ve yapıyı aydınlatmıştır (Şekil 3.6.a. ve b). Kaynak taramaları sonucunda benzer bir yapıya rastlanmamıştır, böyle bir bileşiğin doğal varlığı ilk kez bildirilmektedir.

T. roseum da karvakrol metil eteri (3) metabolit **M9**'a dönüştürmüştür.



Metabolit M9

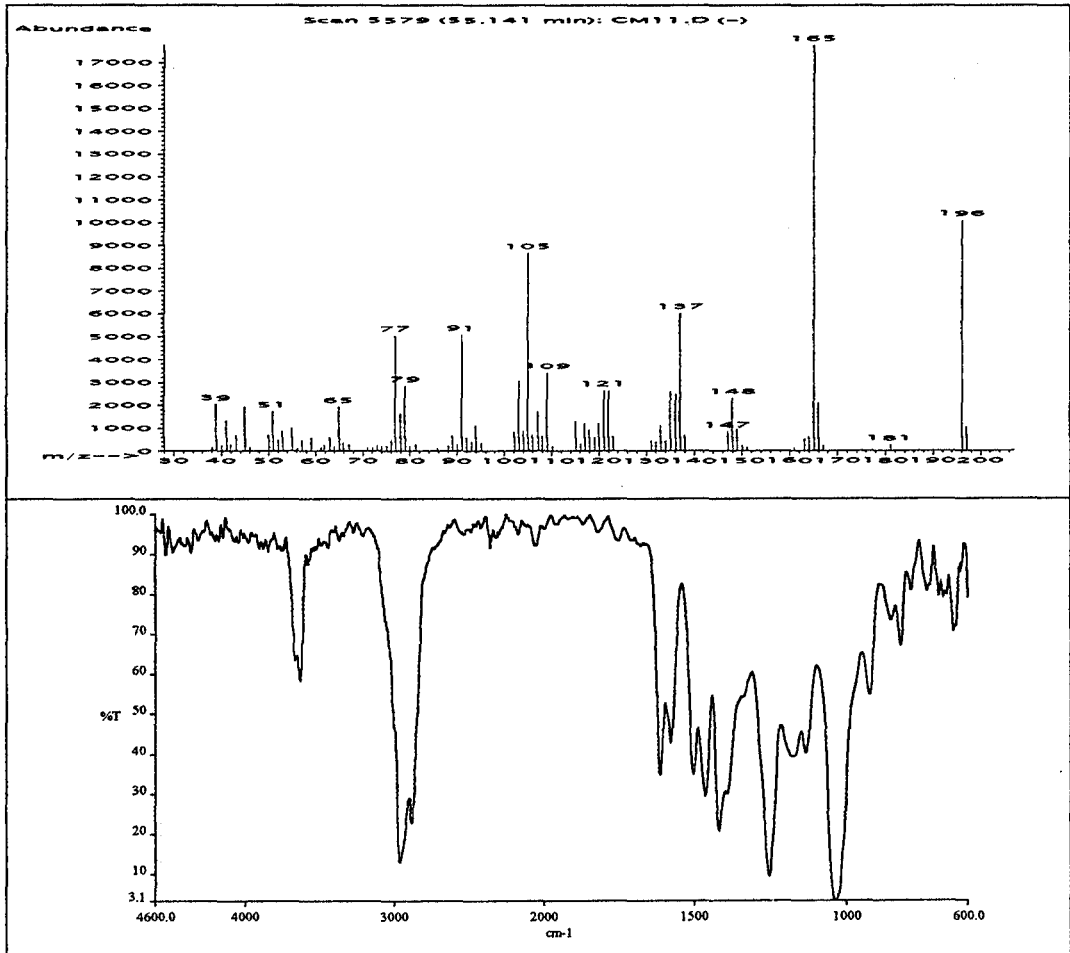
Karvakrol metil eter-7,9-diol (131) {sin.: 2-[4-(Hidroksimetil)-3-metoksifenil]-propan-1-ol; 2-Metoksi-*p*-simen-7,9-diol} [C₁₁H₁₆O₃], kokulu, renksiz yağ (11mg) R_f 0.4 (Çizelge 2.2. sistem H); [α]²⁸_D: + 107° (c 0.14, MeOH); UV (λ_{max}): 207, 215, 224, 274 nm (c 0.014, MeOH);

GC-FT/IR (ν_{max}) 3632 (OH), 2965, 1613, 1467, 1419, 1253, 1034, 822 cm⁻¹ (Şekil 3.6.a.);

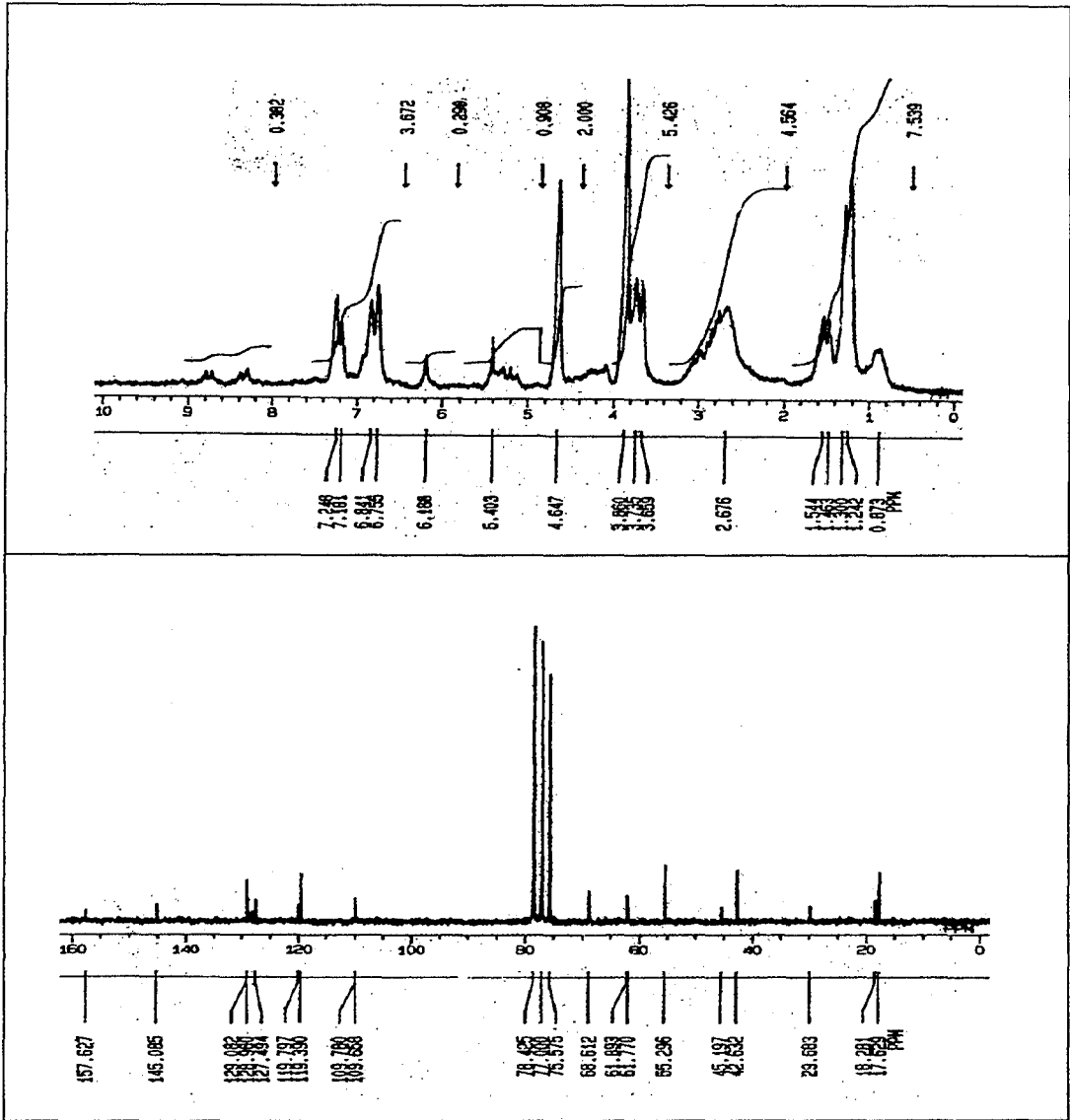
¹H NMR (90 MHz): δ 1.24 (3H, s, H-10), 3.70 (2H, d, *J* 6.8, H-9), 3.86 (3H, s, OCH₃), 4.65 (2H, s, H-7), 6.76 - 6.84 (m, Ar-H-3,5,6) (Şekil 3.6.b.);

¹³C NMR (22.5 MHz): δ 17.6 (C-10, CH₃), 42.6 (C-8, CH), 55.3 (OCH₃), 61.7 (C-7, CH₃), 68.6 (C-9, CH₂), 109.8 (C-3, CH), 119.4 (C-5, CH), 128.2 (C-1, CH₄), 129.1 (C-6, CH), 145.1 (C-4, CH₄), 157.2 (C-2, CH₄) (Şekil 3.6.b.);

EI/MS *m/z* : 196 (M⁺,56), 165 (100), 148 (16), 137 (33), 121 (14), 109 (20), 105 (39), 103 (15), 91 (22), 77 (24), 65 (12), 45 (20), 39 (12) (Şekil 3.6.a.).



Şekil.3.6.a. Karvakrol metil eter 7,9-diol'ün (131) spektral verileri (MS ve IR)



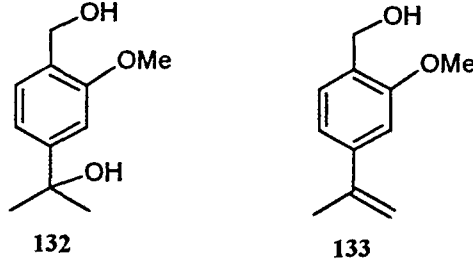
Şekil.3.6.b. Karvakrol metil eter 7,9-diol'ün (131) spektral verileri (^1H ve ^{13}C NMR)

3.4.4. Metabolit 10-11

Çok küçük miktarlarda karışım halinde elde edilebilen *A. niger* (TCC 46) metabolitleri, M10 ve M11'nin kesin yapı tayini çalışmaları tamamlanamamıştır. Daha büyük miktarlarda metabolit elde etmek üzere preparatif olarak biyotransformasyonları tekrarlanacaktır. Ancak yapıları elde edilen diğer metabolitler (M7-9) gözönünde bulundurularak aşağıdaki gibi 8. pozisyondan hidrosillendiği düşünülmüştür. Benzer yapılarıdaki kütle fragmentasyonu hidrosil grubunun pozisyonuna bağlı olarak incelenmiştir. Kütle spektrumu

değerlerinden başka bir ihtimal olmadığı düşünülerek metabolit **M10**, karvakrol metil eter 7,8-diol (**132**) olarak isimlendirilmiştir.

7-Hidroksi karvakrol metil eterin (**129**) kütle spektrumu değerleri ile **M11**'deki fragmantasyon karşılaştırılmış molekülden bir hidrojenin ayrılmasıyla 7-hidroksi-dehidrokarvakrol metil eter (**133**) yapısının ortaya çıktığı görülmüştür. Yapılan kaynak taramasında bu yapılar rastlanmamıştır. Bu da her iki metabolitin yeni doğal maddeler olduğunu göstermektedir.



Metabolit M10

Karvakrol metil eter 7,8-diol (**132**) {sin.: 2-[4-(Hidroksimetil)-3-metoksifenil]-propan-2-ol; 2-Metoksi-*p*-simen-7,8-diol} [C₁₁H₁₆O₃];

EI/MS *m/z*: 196 (M⁺, 24), 181 (58), 165(10), 151 (16), 137 (9),121 (42), 107 (10), 103 (9), 91 (22), 77 (16), 59 (16), 43 (100).

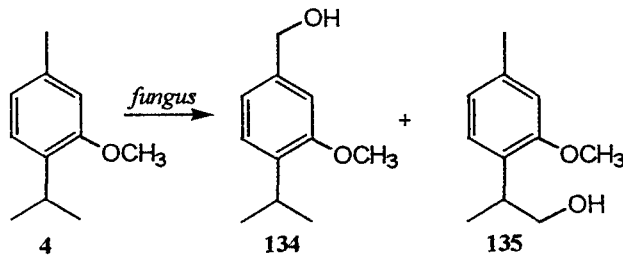
Metabolit M11

7-Hidroksi dehidrokarvakrol metil eter (**133**) {sin.: [2-metoksi-4-(metilvinil)fenil]metan-1-ol} [C₁₁H₁₄O₂];

EI/MS *m/z*: 178 (M⁺, 100), 163 (29), 149 (33), 145 (44), 137 (43), 121 (14), 117 (17), 115 (46), 107 (22), 105 (40), 91 (24), 77 (26), 65 (18), 51 (18), 39 (27).

3.5. Timol metil eter'in (4) Mikrobiyal Transformasyonu

Karvakrol ve timol biyotransformasyon denemeleri gibi, karvakrol metil eter (**3**) ve timol metil eter (**4**)'de aynı koşullar altında paralel olarak çalışılmıştır. Şekil 3.7. ve Çizelge 3.4.'de elde edilen veriler özetlenmiştir:



Şekil 3.7. Timol metil eter'in (4) mikrobiyal transformasyonu

Çizelge 3.4. Timol metil eter'in (4) mikrobiyal transformasyon metabolitleri

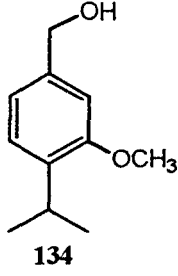
Mikroorganizma	TCC	Metabolitler	Formül No	Teşhis
		M12	134	İTK, GC/MS, ¹ H, ¹³ C NMR
	64	M13	135	İTK, GC/MS
<i>Mucor ramannianus</i>	20	M12	134	“
		M13	135	“
<i>Rhizopus arrhizus</i>	32	M12	134	“
		M13	135	“
<i>Trichothecium roseum</i>	45	M12	134	“
		M13	135	“

3.5.1. Metabolit 12

Tek aşamalı yöntem ile yarı preparatif ölçekte (2.2.5.a) yaklaşık 250 mg timol metil eter'in, *A. niger* ile biyotransformasyonu, ekstraksiyonu ve kromatografik ayrımları ile (2.2.7. VSK, KK ve prep İTK ayrıca Çizelge 2.2. sistem H) sırasıyla M12 ve M13 elde edilmiştir.

Karvakrol metil eter ile benzerlik gösteren dönüşümler, hidroksilasyon ürünleri ile sonuçlanmıştır. Daha önce doğada *Inula* (Compositae) türlerinde varlığı bildirilen [351] timol türevi, sentez ile de elde edilmiştir [352, 353]. NMR ve kütle spektrumlarının karşılaştırılması sonucu 7. pozisyondaki metil gurubunun yerine metilen gurubu olması buraya bir OH bağlanma ihtimalini arttırmıştır. δ 4.67'de 2 H'lik singlet veren pik, -OH bağlantısının yeri olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 9. ve 10. pozisyonlardaki metillerin integrasyonu ve karakteristik ppm'leri -OH grubunun yerini doğrulamıştır. Bu bulgular kaynak verileriyle de uyumluluk göstermiştir [351-353].

Metabolit M12'in ayrıca *M. ramannianus*, *R. arrhizus* ve *T. roseum* tarafından da oluşturulabileceği İTK ve GC/MS analizleri ile belirlenmiştir. Şekil 3.8.'de ise spektrumları verilmiştir.

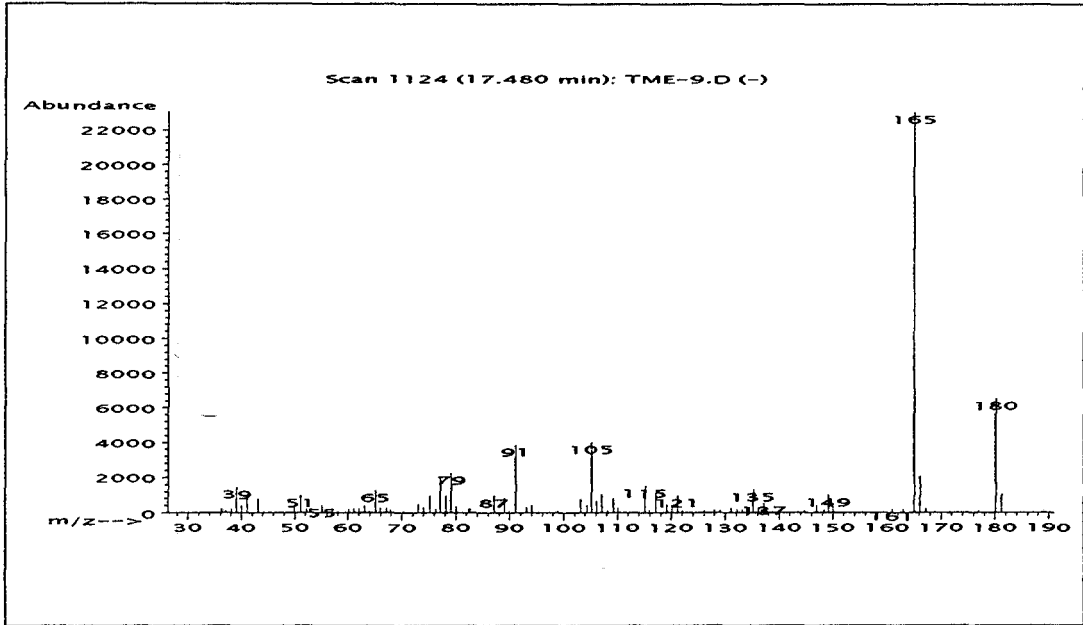


Metabolit 12

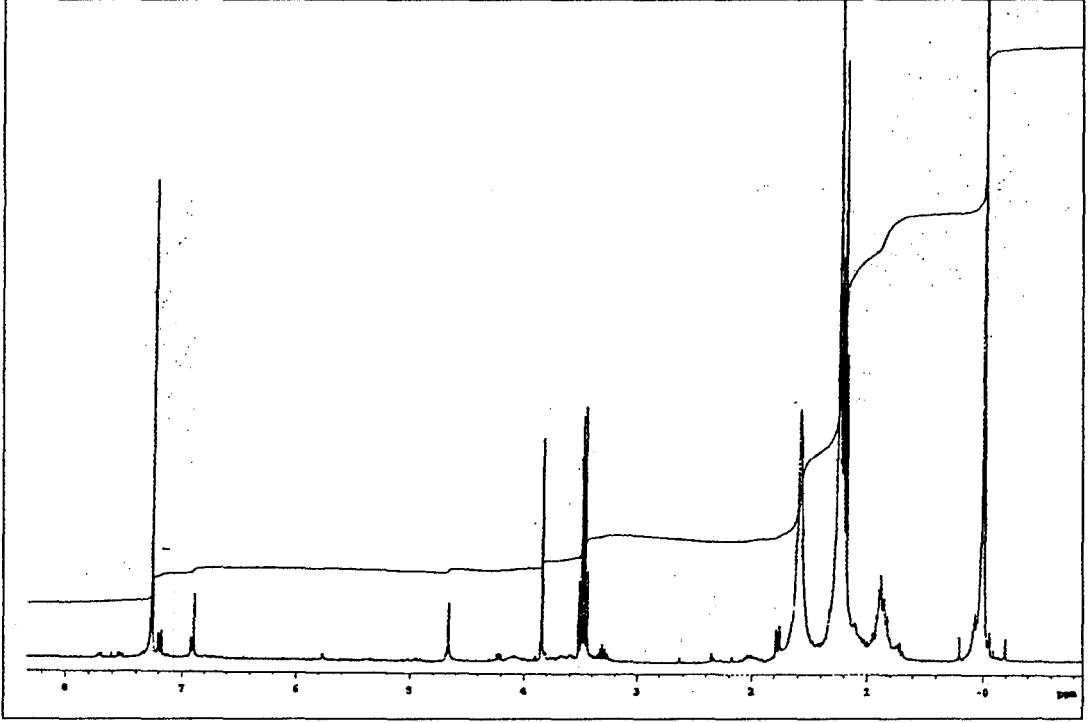
7-Hidroksi timol metil eter (**134**), {sin.: 3-Metoksi-4-(1-metiletil)-benzenmetanol, 3-Metoksi-*p*-simen-7-ol; (4-İzopropil-3-metoksi-fenol)-metanol}, [C₁₁H₁₆O₂]; kokulu, renksiz yağ (3 mg) R_f 0.6 (Çizelge 2.2. sistem H);

¹H NMR (300 MHz): δ 1.25 (3H, s, H-9), 1.32 (3H, s, H-10), 3.52 (1H, m, H-8), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.67 (2H, s, H-7), 6.89-7.21 (m, Ar-H-3,5,6) (Şekil 3.8.b.);

EI/MS *m/z* : 180 (M⁺, 29), 165 (100), 149 (5), 135 (6), 121 (4), 115 (6), 105 (19), 91 (17), 79 (10), 77 (9), 65 (6), 51 (3), 39 (7) (Şekil 3.8.a.).



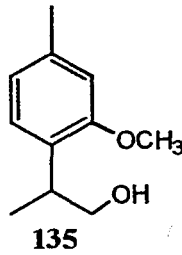
Şekil.3.8.a. 7-Hidroksi timol metil eter'in (134) kütle spektrumu



Şekil.3.8.b. 7-Hidroksi timol metil eter'in (134) ^1H NMR spektrumu

3.5.2. Metabolit 13

Metabolit M12'nin elde edildiği çalışmada M13'de elde edilmiştir. M^+ 180 olan ancak temel piki 149 olan timol türevi madde M12'ten farklılığı ^1H NMR spektrumu incelendiğinde ortaya çıkmıştır. 7. Pozisyonda metil grubunun varlığı, en büyük farklılık olmakla birlikte sadece 10. pozisyondaki metil grubunun piklerinin gözlenmesi bunun yanında 9. pozisyonda 2H integrasyonunda δ 3.52'de septet yarılanması, -OH fonksiyonel grubunun buraya bağlandığını ortaya koymuştur. Şekil 3.9.'da spektrumları verilmiştir. Kaynak taramaları sonucu benzer bir yapıya rastlanmamıştır. Bu durum yeni bir doğal bileşik olduğunu ortaya koymaktadır.

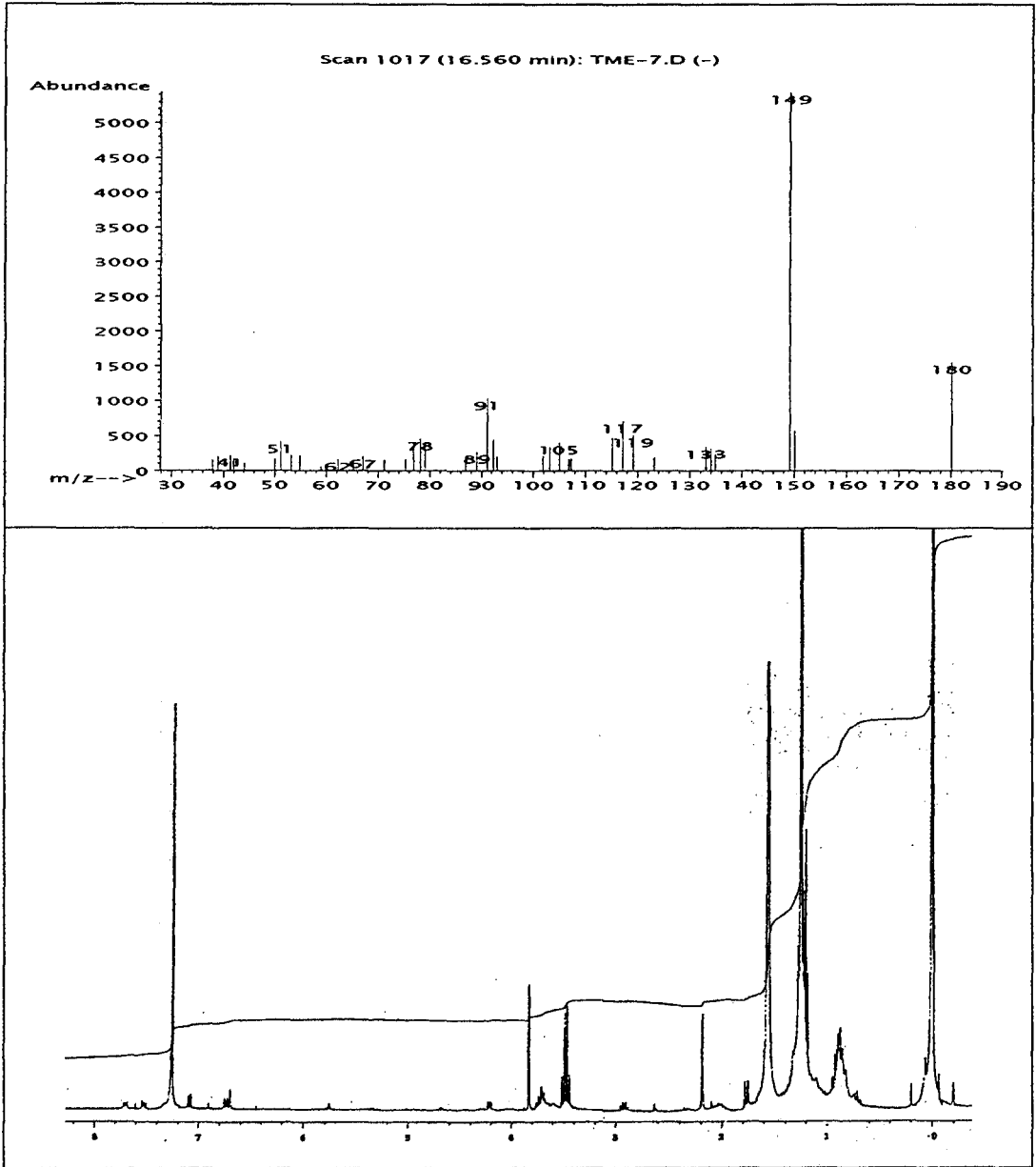


Metabolit M13

9-Hidroksi timol metil eter (135), {sin.: 2-(3-Metoksi- β -4-fenil)-propan-1-ol; 3-Metoksi-4-dimetil-benzen etanol, 2-Metoksi-*p*-simen-9-ol}, [C₁₁H₁₆O₂]; kokulu, renksiz yağ (11mg) R_f: 0.5 (Çizelge 2.2. sistem H); [α]²⁸_D: + 186° (c 0.9, MeOH), UV (λ_{max}): 214, 225, 274 nm (c 0.09, MeOH);

¹H NMR (δ , 300 MHz): 1.32 (3H, s, H-10), 2.19 (3H, s, H-7), 2.9 (1H, m, H-8), 3.52 (2H, sept, H-9), 3.84 (3H, s, OCH₃), 6.7- 7.1 (m, Ar-H-3,5,6) (Şekil 3.9.);

EI/MS *m/z*: 180 (M⁺, 29), 149 (100), 133 (6), 119 (9), 117 (13), 115 (9), 105 (8), 91 (19), 78 (9), 73 (5), 67 (4), 51 (8), 39 (4) (Şekil 3.9.).

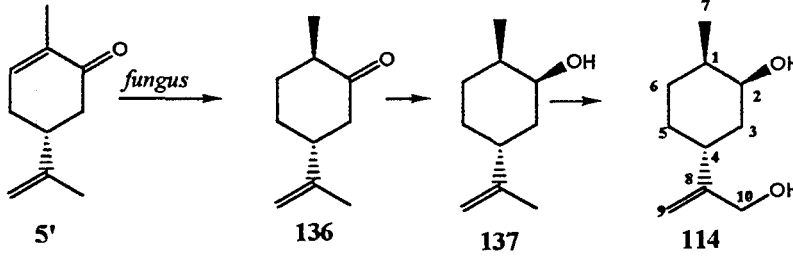


Şekil.3.9. 9-Hidroksi timol metil eter'in (135) spektral verileri (MS ve ¹H NMR)

3.6. Karvon (5 ve 5') Mikrobiyal Transformasyonu

Karvon ile yapılan araştırmalar giriş bölümünde açıklandığı gibi preparatif biyotransformasyon ve SPME çalışmaları olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Preparatif çalışmaların sonuçları metabolit sıralamasına göre alt başlıklar halinde verilmiş, SPME çalışmaları ise tek bir bölümde toplanmıştır.

Karvon enantiyomerlerinden elde edilen mikrobiyal transformasyon metabolitleri Çizelge 3.5.'de özetlenmiş ve Şekil 3.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. (-)-Karvon'un biyotransformasyonu ve metabolitleri

Çizelge 3.5. (-)-Karvonun'un preparatif mikrobiyal transformasyonu ve metabolitleri

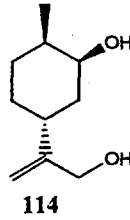
Mikroorganizma	TCC	Metabolitler	Formül No	Teşhis
<i>Absidia glauca</i>	19	M14	114	X-ray, GC/MS, ¹ H NMR
		M15	136	İTK, GC/MS
		M16	137	"
<i>Penicillium claviforme</i>	27	M15	136	"
		M16	137	"

3.6.1. Metabolit 14

(-)-Karvon *Absida glauca* ve *Penicillium claviforme* ile yarı preparatif miktarda (175 mg) 2.2.6.1. yöntemiyle 4 gün boyunca biyotransformasyona bırakılmıştır. Ekstrenin kromatografisi sonucu (Bölüm 2.2.7. VSK, KK ve prep İTK ayrıca Çizelge 2.2. sistem G) M14 elde edilmiştir.

GC/MS analizi sonucu moleküler iyon piki tam olarak görülmemekle birlikte, bir H₂O çıkışı ile oluşan 152 piki ve karakteristik karveol iskeleti gözlenmiştir. Kaynak taraması sonucu 10-hidroksi-dihidrokarveol olabileceği düşünülmüştür [354]. Karvon'un 4 konumundaki enantiyomer yapısının korunduğu düşüncesiyle, bu yapı 10-hidroksi-(+)-neodihidrokarveol (114) şeklinde isimlendirilmiştir [355]. ¹H NMR spektrumunda δ 1.03'de gelen pik 1.

pozisyonundaki metil grubunun değişmediğini, ancak 10. pozisyonundaki metil grubunun metilene dönüştüğü göstermiştir. δ 4.13'de 2 H'a karşı gelen singlet molekülde iki -OH grubunun varlığını MS verileriyle uyumlu olarak desteklemektedir. Bu hidroksillerden birinin karvon'un 10. pozisyonundaki metilene dönüşen metil grubunda yer aldığı, diğerinin karvon'un keton grubunun indirgenmesi sonucu 2. pozisyonda bulunduğu görülmüştür. Kristalize halde olan bu bileşiğin stereokimyasal yapısı X-ışınları analizi ile incelenmiştir. Analiz sonucunda: monosiklik; uzaysal grup *P2*, $a= 7.642$ (1), $b= 18.353$ (8), $c= 10.688$ (5) Å, $\beta= 92.50$ (5)°, $V= 1497.65$ (1) Å³, $Z= 4$, ve $\mu(\text{Cu K-}\alpha)= 5.765$ mm⁻¹ değerleri elde edilmiştir. 1741 Yansıma için R değeri 0.067 belirlenmiştir [342] (Şekil 3.11.a.). Kaynak taramaları sırasında bir sentez çalışmasında bu bileşiğe rastlanmıştır [355]. Doğal olarak varlığı ve X-ışınları analizi ilk kez bildirilmektedir.



Metabolit M14

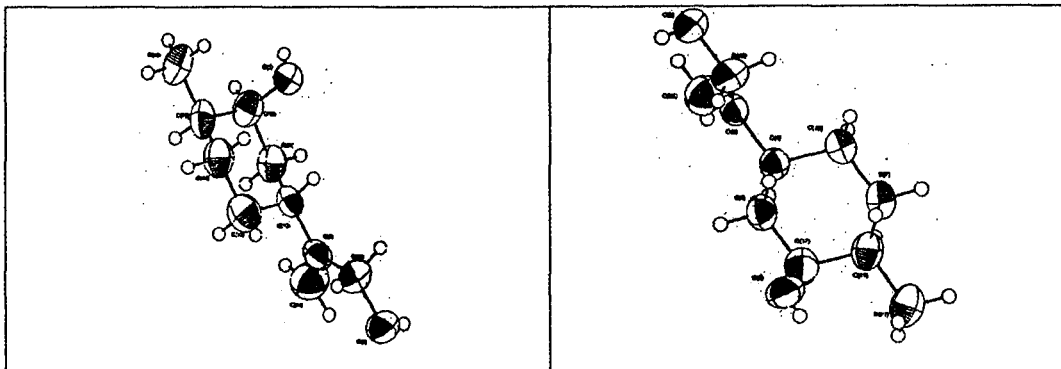
10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol (114), {sin.: 8(9)-*p*-menten-2,10-diol};

[C₁₀H₁₈O₂]; kokulu, renksiz kristal (10 mg); $[\alpha]_D^{27} = +25.8$ (*c* 0.356, CHCl₃);

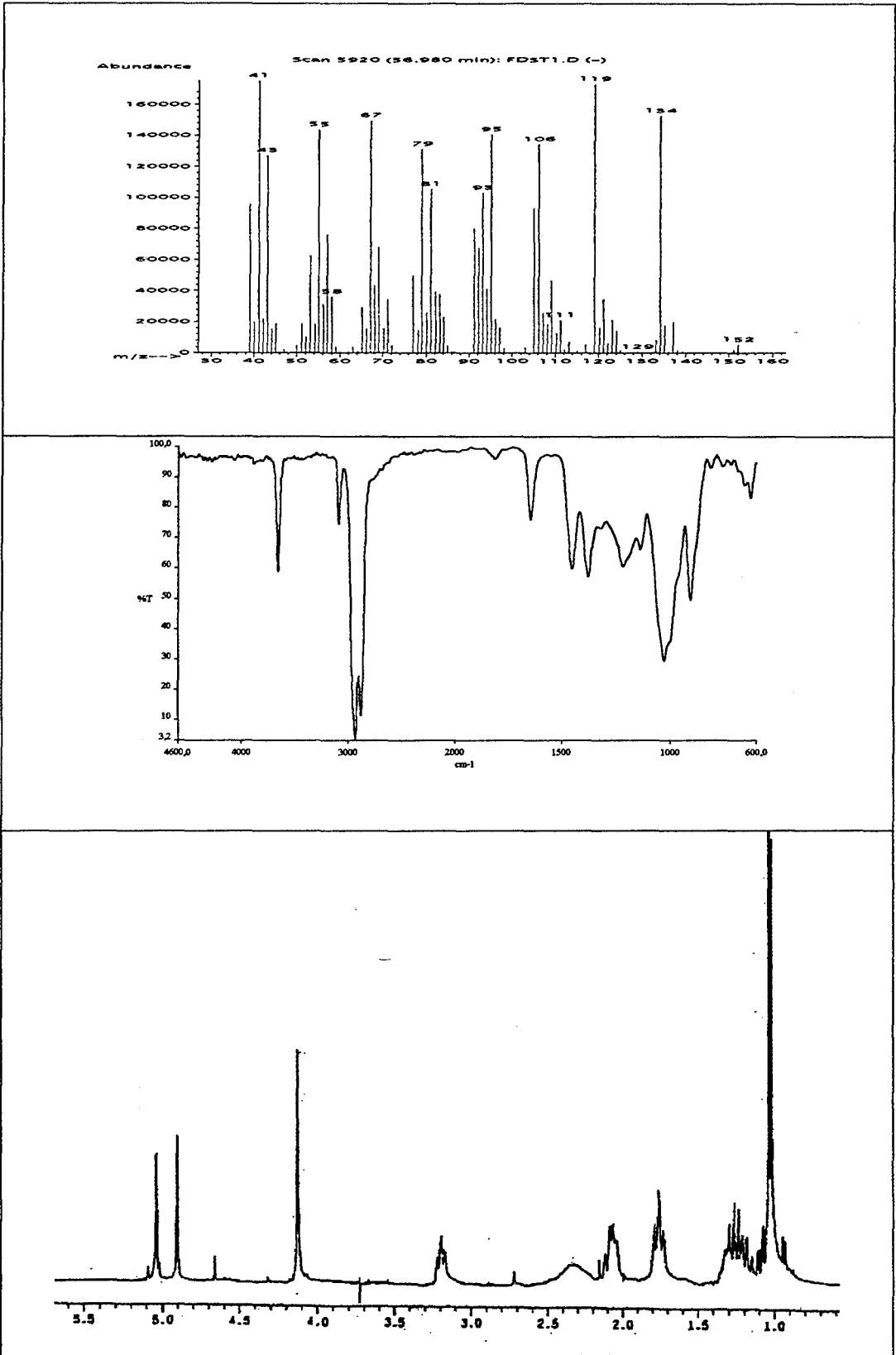
GC-FT/IR (ν_{max}) 3659 (OH), 3037, 2934, 2880, 1645, 1454, 1377, 1026 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz): δ 1.03 (3H, d, *J* 6.4, H-7), 3.2 (2H, m, H-2), 4.13 (2H, s, H-10), 4.91 ve 5.04 (2H, 2s, H-9) (Şekil 3.11.b.);

ELMS *m/z*: 170, 152 (M⁺-H₂O, 3), 134 (87), 119 (100), 106 (77), 105 (55), 95 (82), 93 (60), 81 (61), 79 (74), 67 (87), 55 (82), 41 (98) (Şekil 3.11.b.).



Şekil.3.11.a. 10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol'ün (114) X-ışını spektral verileri

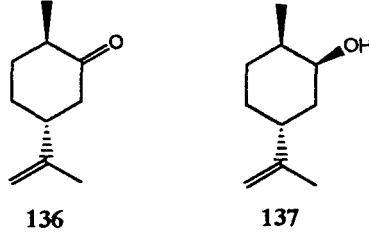


Şekil.3.11.b. 10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol'ün (114) spektral verileri (MS, IR ve ¹H NMR)

3.6.2. Metabolit 15 ve 16

A. glauca ve *P. claviforme* ile elde edilen M14'ün yanında preparatif İTK ile M15 ve M16 metabolitleri de izole edilmiştir.

GC/MS analizi ile elde edilen metabolitlerin kütle spektrumlarının kütüphane bilgileriyle karşılaştırılması sonucu (-)-karvon'un indirgenme ürünleri olan (+)-*trans*-dihidrokarvon (136) ve (+)-neodihidrokarveol (137) oldukları tespit edilmiştir.



Metabolit M15

(+)-*trans*-Dihidrokarvon (136), [C₁₀H₁₆O];

EL/MS *m/z*: 152 (M⁺, 17), 137 (14), 123 (5), 109 (36), 95 (69), 82 (42), 81 (43), 68 (50), 67 (100), 55 (31), 41 (57).

GC-FT/IR (ν_{\max}) 3342, 3085, 2941, 2879, 1729, 1648, 1451, 1375, 1210 cm⁻¹.

Metabolit M16

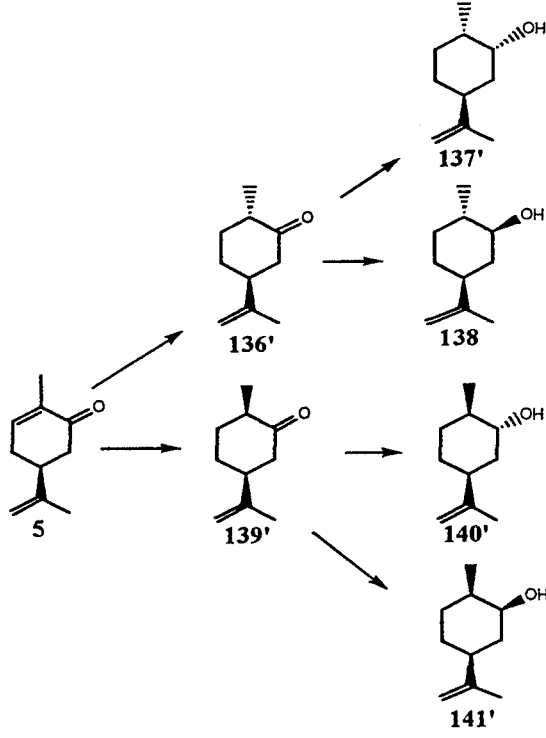
(+)-Neodihidrokarveol (137), [C₁₀H₁₈O];

EL/MS *m/z*: 154 (M⁺, 1), 136 (73), 121 (86), 107 (100), 93 (87), 79 (98), 68 (39), 67 (58), 55 (48), 41 (75).

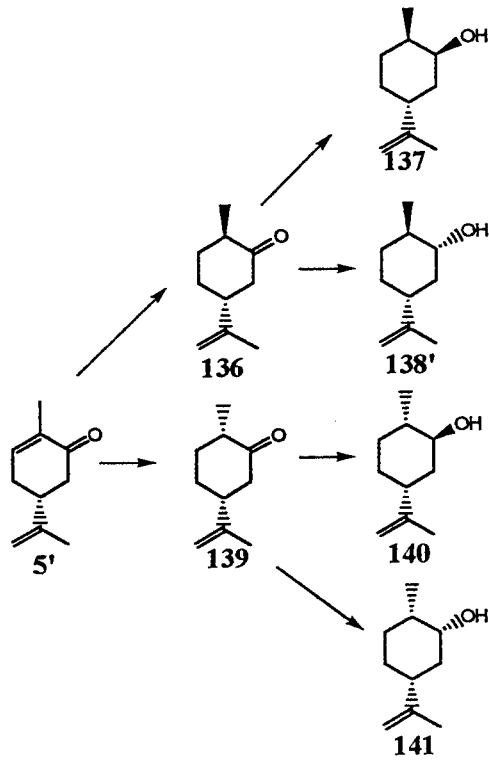
GC-FT/IR (ν_{\max}) 3660 (OH), 3083, 2935, 2878, 1644, 1454, 1377, 1222, 993 cm⁻¹

3.7. Headspace-SPME-GC/MS Sonuçları

Bu çalışma esnasında her iki karvon enantiyomeri eş zamanlı olarak aynı mikroorganizmalar ile biyotransformasyona bırakılmıştır. Headspace-SPME tekniği ilk defa, tarafımızca, mikrobiyal transformasyon metabolitlerinin, klasik yöntemlerin (Bkz. 2.2.5.) dışında farklı bir yöntemle ekstraksiyon ve teşhisinde kullanılmıştır [356]. Besi yerlerine steril koşullar altında, biraz çalkalandıktan sonra 15 dakikalık headspace (buhar fazı) uygulaması yapılmış, karvon türevi maddelerin 7 gün süresince izledikleri biyotransformasyon yolları GC/MS analizleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar özet halinde Çizelge 3.6.'da, Şekil 3.12.a. ve 3.12.b.'de, metabolitlerinin relatif yüzdeleri ise Çizelge 3.7-3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.12.a. (+)-Karvon metabolitleri



Şekil 3.12.b. (-)-Karvon metabolitleri

Çizelge 3.6. Karvon enantiyomerlerinden headspace-SPME yöntemi ile tanımlanan metabolitler

Mikroorganizma	TCC	(+) - Karvon		(-) - Karvon		Teşhis
<i>Absidia glauca</i>	19	M15b	136'	M15a	136	GC/MS
		M16b	137'	M16a	137	“
		M17a	138	M17b	138'	“
		M18b	139'	M18a	139	“
		M19b	140'	-	-	“
		M20b	141'	M20a	141	“
<i>Cunninghamella echinulata</i>	35	M15b	136'	M15a	136	“
		M16b	137'	M16a	137	“
		M17a	138	M17b	138'	“
		M18b	139'	M18a	139	“
		M19b	140'	-	-	“
		M20b	141'	M20a	141	“
<i>Penicillium claviforme</i>	27	M15b	136'	M15a	136	“
		M16b	137'	M16a	137	“
		-	-	M17b	138'	“
		M18b	139'	M18a	139	“
		M19b	140'	M19a	140	“
		M20b	141'	M20a	141	“
<i>Pseudomonas putida</i>	61	M15b	136'	M15a	136	“
		M18b	139'	M16a	137	“
		M19b	140'	M17b	138'	“
		M20b	141'	M18a	139	“
<i>Pseudomonas stutzerii</i>	62	M15b	136'	M15a	136	“
		M18b	139'	M16a	137	“
		M19b	140'	M17b	138'	“
		M20b	141'	M18a	139	“

3.7.1. Metabolit M15a ve M15b

(+)-*trans*-Dihidrokarvon (136), (-)-*trans*-Dihidrokarvon (136'), [C₁₀H₁₆O];

3.7.2. Metabolit M16a ve M16b

(+)-Neodihidrokarveol (137), (-)-Neodihidrokarveol (137'), [C₁₀H₁₈O];

3.7.3. Metabolit M17a ve M17b

(+)-Dihidrokarveol (138), (-)-Dihidrokarveol (138'), [C₁₀H₁₈O];

EI/MS *m/z*: 154 (M⁺, 2), 136 (56), 121 (80), 107 (79), 97 (35), 94 (47), 93 (100), 81 (71), 79 (70), 69 (53), 67 (71), 55 (64), 41 (97).

GC-FT/IR (ν_{\max} cm⁻¹) 3656, 3084, 2935, 2870, 1646, 1456, 1378, 1050.

3.7.4. Metabolit M18a ve M18b

(+)-*cis*-İzodihidrokarvon (139), (-)-*cis*-İzodihidrokarvon (139'), [C₁₀H₁₆O];

EI/MS *m/z*: 152 (M⁺, 29), 137 (19), 123 (4), 109 (19), 95 (75), 82 (41), 81 (30), 68 (50), 67 (100), 55 (31), 41 (54).

GC-FT/IR (ν_{\max} cm⁻¹) 3342, 3087, 2941, 2881, 1727, 1646, 1455, 1231.

3.7.5. Metabolit M19a ve M19b

(+)-İzodihidrokarveol (140), (-)-İzodihidrokarveol (140'), [C₁₀H₁₈O];

EI/MS *m/z*: 154 (M⁺, 9), 136 (56), 121 (74), 107 (89), 93 (80), 82 (77), 79 (100), 72 (39), 67 (76), 55 (61), 41 (95).

GC-FT/IR (ν_{\max} cm⁻¹) 3655, 3087, 2937, 2879, 1644, 1457, 1381, 1019.

3.7.6. Metabolit M20a ve M20b

(+)-Neoizodihidrokarveol (141), (-)-Neoizodihidrokarveol (141'), [C₁₀H₁₈O];

EI/MS *m/z*: 154 (M⁺, 1), 136 (29), 121 (73), 107 (80), 93 (100), 81 (64), 79 (71), 68 (58), 67 (69), 55 (61), 41 (93).

GC-FT/IR (ν_{\max} cm⁻¹) 3652, 3084, 2939, 2873, 1645, 1457, 1385, 1067, 1015.

3.7.7. Metabolit M21a ve M21b

(+)-*trans*-Karveol (142), (-)-*trans*-Karveol (142'), [C₁₀H₁₆O];

EI/MS *m/z*: 152 (M⁺, 8), 137 (11), 119 (14), 109 (100), 95 (18), 91 (26), 84 (60), 69 (26), 55 (34), 41 (37).

3.7.8. Metabolit M22a M22b

(+)-*cis*-Karveol (143), (-)-*cis*-Karveol (143'), [C₁₀H₁₆O];

EI/MS *m/z*: 152 (M⁺, 1), 137 (12), 134 (51), 119 (30), 109 (60), 95 (27), 91 (31), 84 (100), 83 (48), 69 (46), 55 (52), 41 (56).

Çizelge 3.7.a. (+)-Karvon'un *Absidia glauca* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5	(+)-Karvon	0.31	-	-	-	0.09	0.09	-
136'	(-)-Dihidrokarvon	8.87	12.91	18.29	18.92	22.87	24.64	26.05
137'	(-)-Neodihidrokarveol	1.69	1.56	1.96	2.08	2.52	2.58	2.72
138	(+)-Dihidrokarveol	-	0.11	0.24	0.27	0.39	0.46	0.51
139'	(-)-İzodihidrokarvon	86.5	81.11	73.43	70.80	65.12	62.34	61.25
140'	(-)-İzodihidrokarveol	1.81	3.06	4.22	5.57	5.94	6.89	6.31
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	0.82	1.26	1.86	2.36	3.09	3.01	3.17

Çizelge 3.7.b. (-)-Karvon'un *Absidia glauca* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5'	(-)-Karvon	45.05	24.2	9.71	2.54	0.40	0.34	0.37
136	(+)-Dihidrokarvon	44.42	55.96	60.86	62.80	51.46	40.96	32.63
137	(+)-Neodihidrokarveol	9.23	17.64	25.93	30.38	43.31	52.64	61.29
138'	(-)-Dihidrokarveol	0.45	0.81	1.31	1.39	1.93	2.45	2.67
139	(+)-İzodihidrokarvon	0.74	1.31	2.05	2.75	2.79	3.42	3.04
141	(+)-Neoizodihidrokarveol	-	-	-	0.05	0.10	0.09	-

Çizelge 3.8.a. (+)-Karvon'un *Cunninghamella echinulata* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5	(+)-Karvon	3.48	0.38	0.16	-	-	-	-
136'	(-)-Dihidrokarvon	7.55	11.26	14.19	14.90	18.66	19.64	19.98
137'	(-)-Neodihidrokarveol	1.29	1.48	1.56	1.58	1.66	1.80	2.14
138	(+)-Dihidrokarveol	-	-	e	0.32	0.77	1.54	2.06
139'	(-)-İzodihidrokarvon	87.22	86.20	82.29	80.57	74.97	70.20	67.08
140'	(-)-İzodihidrokarveol	0.16	0.24	0.54	0.78	1.14	1.78	2.18
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	0.29	0.45	1.30	1.86	2.81	5.04	6.56

Çizelge 3.8.b. (-)-Karvon'un *Cunninghamella echinulata* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5'	(-)-Karvon	0.34	0.12	-	-	-	-	-
136	(+)-Dihidrokarvon	81.57	78.89	77.88	76.84	76.23	73.75	70.97
137	(+)-Neodihidrokarveol	14.90	17.48	18.71	20.16	19.84	21.78	23.74
138'	(-)-Dihidrokarveol	0.07	0.12	0.10	0.11	0.12	0.14	0.21
139	(+)-İzodihidrokarvon	2.95	3.27	3.11	2.65	3.55	4.02	4.78
141	(+)-Neoizodihidrokarveol	-	-	0.19	0.24	0.25	0.31	0.31

Çizelge 3.9.a. (+)-Karvon'un *Penicillium claviforme* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5	(+)-Karvon	44.28	39.74	18.0	11.40	5.02	4.12	4.29
136'	(-)-Dihidrokarvon	1.53	2.63	5.78	8.97	13.87	14.40	14.83
137'	(-)-Neodihidrokarveol	0.76	0.79	0.90	0.96	1.09	0.99	1.01
139'	(-)-İzodihidrokarvon	50.38	52.96	70.83	73.69	74.59	75.46	74.49
140'	(-)-İzodihidrokarveol	1.19	1.78	2.20	2.42	2.67	2.51	2.59
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	1.87	2.11	2.30	2.56	2.76	2.52	2.80

Çizelge 3.9.b. (-)-Karvon'un *Penicillium claviforme* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5'	(-)-Karvon	17.24	10.81	2.40	2.04	1.86	1.76	1.74
136	(+)-Dihidrokarvon	53.52	48.04	49.92	46.22	39.91	41.81	38.65
137	(+)-Neodihidrokarveol	27.93	39.47	45.49	49.14	55.50	53.59	56.62
138'	(-)-Dihidrokarveol	0.22	0.43	0.42	0.50	0.60	0.56	0.60
139	(+)-İzodihidrokarvon	1.00	1.13	1.41	1.66	1.77	1.85	2.00
140	(+)-İzodihidrokarveol	-	0.12	0.14	0.18	0.15	0.25	0.18
141	(+)-Neoizodihidrokarveol	-	-	0.08	0.10	0.09	0.10	0.11

Çizelge 3.10.a. (+)-Karvon'un *Pseudomonas putida* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5	(+)-Karvon	100	98.43	8.51	6.80	6.44	6.45	6.02
136'	(-)-Dihidrokarvon	-	-	4.05	4.80	5.69	5.86	5.80
139'	(-)-İzodihidrokarvon	-	1.57	87.44	87.67	87.28	87.10	87.59
140'	(-)-İzodihidrokarveol	-	-	-	0.20	0.15	0.18	0.17
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	-	-	-	0.53	0.45	0.42	0.43

Çizelge 3.10.b. (-)-Karvon'un *Pseudomonas putida* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5'	(-)-Karvon	100	98.67	41.25	41.22	41.54	41.58	44.12
136	(+)-Dihidrokarvon	-	1.33	57.15	57.11	56.74	56.77	54.14
137	(+)-Neodihidrokarveol	-	-	0.34	0.38	0.41	0.35	0.37
138'	(-)-Dihidrokarveol	-	-	0.18	0.17	0.26	0.21	0.28
139	(+)-İzodihidrokarvon	-	-	1.01	1.04	0.99	1.04	1.02

Çizelge 3.11.a. (+)-Karvon'un *Pseudomonas stutzerii* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5	(+)-Karvon	50.40	49.80	47.22	49.50	51.20	52.4	52.71
136'	(-)-Dihidrokarvon	3.66	3.86	4.55	3.90	3.80	3.70	4.38
139'	(-)-İzodihidrokarvon	45.47	49.3	47.70	46.12	44.80	43.9	42.46
140'	(-)-İzodihidrokarveol	0.10	0.10	0.18	0.10	-	-	-
141'	(-)-Neoizodihidrokarveol	0.34	0.30	0.34	0.37	0.35	0.35	0.45

Çizelge 3.11.b. (-)-Karvon'un *Pseudomonas stutzerii* ile SPME analiz sonuçları

No	Bileşik	1. Gün (%)	2. Gün (%)	3. Gün (%)	4. Gün (%)	5. Gün (%)	6. Gün (%)	7. Gün (%)
5'	(-)-Karvon	59.36	59.08	58.61	59.34	62.85	63.87	71.6
136	(+)-Dihidrokarvon	39.97	39.78	39.9	39.64	35.88	34.83	27.4
137	(+)-Neodihidrokarveol	-	0.32	0.37	0.35	0.31	0.39	0.32
138'	(-)-Dihidrokarveol	0.25	0.32	0.37	0.30	0.37	0.54	0.35
139	(+)-İzodihidrokarvon	0.43	0.51	0.67	0.67	0.58	0.56	0.57

Değerler relatif % olarak verilmiştir, e :Eser (0.01<)

3.8. Biyolojik Aktivite Çalışmaları Sonuçları

Öncelikle materyallerle gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmaları daha sonraki aşamalarda biyotransformasyon metabolitleriyle gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

3.8.1. Antibakteriyel Aktivite

Altı Gram (+) ve Gram (-) bakteri ve bir maya ile mikrodilüsyon yöntemi (Bkz. 2.4.1.) kullanılarak materyallerin ve elde edilen metabolitlerin minimum inhibisyon konstrasyonları $\mu\text{g/ml}$ cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.12. ve 3.13.'de verilmiştir:

Çizelge 3.12. Materyallerin mikrodilüsyon yöntemi ile MIC değerinin tayini

TCC	Mikroorganizma	1	2	3	4	5	5'	St.
70	<i>Escherichia coli</i>	125	125	125	62.5	62.5	62.5	62.5
71	<i>Staphylococcus aureus</i>	62.5	31.25	15.62	31.75	62.5	250	15.62
72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.5	125	62.5	31.75	250	250	250
73	<i>Enterobacter aerogenes</i>	31.25	62.5	31.25	62.5	125	250	125
74	<i>Proteus vulgaris</i>	31.25	62.5	62.5	125	125	125	31.25
75	<i>Salmonella typhimurium</i>	31.25	125	31.25	125	125	125	62.5
76	<i>Candida albicans</i>	31.25	125	62.5	125	125	62.5	125*

Sonuçlar ($\mu\text{g/ml}$) olarak verilmiştir
St: Kloramfenikol * Ketokonazol

Çizelge 3.13. Metabolitlerin mikrodilüsyon yöntemi ile MIC değerlerinin tayini

TCC	Mikroorganizma	80	129	130	131	134	135	114	136	137'
		M6	M7	M8	M9	M12	M13	M14	M15	M16
70	<i>Escherichia coli</i>	15.62	62.5	15.62	31.25	15.62	15.62	250	15.62	15.62
71	<i>Staphylococcus aureus</i>	31.25	15.62	15.62	31.25	7.81	62.5	125	15.62	15.62
72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31.25	62.5	31.25	62.5	31.25	62.5	250	31.25	31.25
73	<i>Enterobacter aerogenes</i>	7.81	31.25	7.81	62.5	7.81	15.62	250	15.62	7.81
74	<i>Proteus vulgaris</i>	3.9	62.5	7.81	31.25	7.81	7.81	250	7.81	7.81
75	<i>Salmonella typhimurium</i>	15.62	31.25	15.62	62.5	15.62	15.62	250	15.62	15.62
76	<i>Candida albicans</i>	31.25	62.5	31.25	62.5	31.25	31.25	250	31.25	31.25

3.8.2. Antifungal Aktivite

Tüp dilüsyon yöntemi kullanılarak sadece biyotransformasyonlarda kullanılan materyallerin aktiviteleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bitki patojeni fungusların standartlara karşı % inhibisyonu şeklinde verilmiştir (Çizelge 3.14.).

Çizelge 3.14. Antifungal Aktivite (% inhibisyon)

TCC	FUNGUS	DMSO	1	2	3	4	5	5'
55	<i>Alternaria alternata</i>	50	100	100	0	0	0	0
48	<i>Aspergillus flavus</i>	-	100	100	0	0	0	0
46	<i>Aspergillus niger</i>	-	25	10	0	0	0	0
92	<i>Drechslera sorokiniana</i>	10	100	100	0	0	0	0
50	<i>Fusarium moniliforme</i>	-	100	100	0	0	30	0
90	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	25	100	100	10	20	20	10
59	<i>Rhizoctonia cereolus</i>	35	100	100	10	10	25	20
51	<i>Rhizophus stolonifer</i>	-	100	100	0	0	0	0
91	<i>Sclerotium rolfsii</i>	-	100	100	0	0	0	0
45	<i>Trichothecium roseum</i>	-	90	10	0	0	0	0

3.8.3. Antiviral Aktivite

Sitotoksosite ve antiviral etki (sitopatolojik etki) olmak üzere iki aşamadan oluşan antiviral aktivite çalışmaları materyallerde ve 114 nolu madde ile denenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.15. ve 3.16'te verilmektedir.

Çizelge 3.15. *In vitro* sitotoksik aktivite (T= toksik)

	Konst.	1	2	3	4	5	5'	114	St
1	1	T	T	T	T	T	T	T	T
2	½	T	T	T	T	T	T	T	T
3	1/4	-	T	-	-	-	-	-	T
4	1/8	-	-	-	-	-	-	-	T
5	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1/32	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1/64	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1/128	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1/256	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1/512	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1/1024	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1/2048	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.16. *In vitro* antiviral aktivite (V= antiviral)

	Konst.	1	2	3	4	5	5'	114	St
1	1	-	-	-	-	-	-	-	V
2	½	-	-	-	-	-	-	-	V
3	1/4	-	-	-	-	-	-	-	V
4	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1/32	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1/64	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1/128	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1/256	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1/512	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1/1024	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1/2048	-	-	-	-	-	-	-	-

St: Asiklovir

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon, çağımızın hızla gelişen bilim kollarından biri olarak ilk bölümde tanımlanmış, tarihçesinden uygulama şekilleri ve alanlarına kadar birçok bilgiye yer verilmiştir. Bu bilgiler derlenirken yurdumuzda benzeri çalışmaların henüz yeterli düzeyde olmadığı açıkça ortaya çıkmıştır. Biyotransformasyon, uygulama alanlarının çeşitliliği nedeniyle çok geniş ve multidisipliner bir bilim dalıdır. Burada ele alınan konu, doğal hammaddelerden başlanarak oluşturulabilecek ürünlerin yapılarının ortaya konmasıdır. Daha sonraki aşamalarda bu ürünlerin ilaç, koku ve tat hammaddesi olarak kullanılabilirliğinin kullanılan hammaddelere üstünlükleri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. TBAM'ın gelişmiş alt yapısı ve büyük bilgi birikimi öncelikle monoterpenleri ele almamızın gerekliliğini ortaya koymuştur.

Monoterpenlerin biyotransformasyonu ile ilgili araştırmalar yurdumuzda ilk kez bu çalışma ile tarafımızdan başlatılmıştır. Bu konuda diğer ülkelerde araştırmalarını sürdüren grupların sayısı da kısıtlıdır. Ancak bu gruplarla bilgi alışverişi hızlı ve verimli bir şekilde sürdürülmektedir.

Giriş bölümünde özetlenen bilgiler, monoterpenlerin bol temin edilebilmeleri yanında önemli biyolojik özellik ve aktivitelere sahip bileşikler olduğunu bir kez daha hatırlatmaktadır. TBAM'ın, Türk Kekikleri ile ilgili yoğun çalışmaları [357-359] ve etken bileşik olan karvakrol'ün biyolojik aktiviteleri üzerinde devam eden araştırmalarının bir uzantısı olarak, karvakrol (1) materyal olarak seçilmiştir. Yapı benzerliğinden dolayı timol (2) ile de paralel çalışmalara başlanmıştır. Burada her iki materyalin antimikrobiyal etkilerinin yüksek oluşu ilk akla gelen olumsuzluk olmaktadır. Timol ile hiç metabolit elde edilemezken karvakrol'ün sadece 6 metabolite dönüştüğü belirlenmiştir.

Karvakrol, *Trichothecium roseum* ile dehidrokarvakrol'e (128) dönüşmüştür. Daha önce *Lavandula gibsonii*'den (Labiatae) izole edildiği bildirilen bu bileşik GC/MS verileri ile tanımlanmıştır. Aynı mikroorganizma ile elde edilen M2 ila M5 kodlu dört metabolitin sadece kütle spektrum verileri elde edilebilmiş, miktarları az olduğu için tanımlanmaları mümkün olmamıştır.

Karvakrol miktarı açısından zengin bir bitki olan *Coridothymus capitatus* (L.) Reichb. fil. (Labiatae) bitkisinin yetiştiği topraktan izole edilen [339] mikroorganizmalarla karvakrol dönüşümlerinin incelenmesi düşünülmüş ve gerçekleştirilmiştir. Bu topraktan izole edilen mikroorganizmaların *Cladosporium* cinsi (genus) oldukları düşünülmele birlikte henüz tanımlanmaları mümkün olmamıştır. Her iki mikroorganizma ile oluşan metabolit, spektral verilere göre 9-hidroksi karvakrol (80) olarak tanımlanmıştır. Bu bileşiğin izolasyonu ve yapı tayini ile ilgili bilgiler ilk kez burada verilmektedir.

Karvakrol ve timol ile çok sayıda metabolit elde edilememesi üzerine, her iki maddenin piyasadan temin edilen metil eterleri, daha reaktif olabilecekleri düşüncesiyle materyal olarak kullanılmıştır. Doğal ürünler olan ve uçucu yağların kompozisyonlarında bulunan karvakrol metil eter ve timol metil eter kimyasal yolla karvakrol ve timol'ün metillenmesi sonucu elde edilmektedir.

Karvakrol metil eterin (3) dört farklı mikroorganizma ile oluşan metaboliti, 7-hidroksikarvakrol metil eter (129) olarak tayin edilmiştir. Bu bileşik daha önce sentez ile elde edilmiştir [349]. Üç ayrı mikroorganizma ile oluşan metabolit, 9-hidroksikarvakrol metil eter'in (130) varlığına literatürde sadece formül olarak rastlanmaktadır. İlgili yayında bu bileşiğin sentez ara ürünü olabileceği belirtilmiş olmakla birlikte, izolasyonu ve yapı tayini ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır [350]. *Aspergillus niger* ile elde edilen diğer bir yeni metabolit, izolasyon ve yapı aydınlatma çalışmaları sonunda karvakrol metil eter 7,9-diol (131) olarak isimlendirilmiştir. Bu üç metabolit doğada ilk kez bulunmuştur. Bu materyalden elde edilen diğer iki metabolit M10 ve M11'in izole edilen miktarlarının azlığı nedeniyle NMR spektrumları alınamamış, ancak GC/MS analizleri sonucu yapıları aydınlatılabilmiştir. Buna göre M10 karvakrol metil eter 7,8-diol (132), M11 ise 7-hidroksi dehidrokarvakrol metil eter (133) dir. Diğer olasılıklara yakın bileşikler çalışma sırasında elde edilmiş olduğundan, başka bir olasılık mümkün değildir.

Timol metil eter'in (4) biyotransformasyonu yine dört mikroorganizma ile yapılmış ve iki metabolit izole edilerek yapı tayinleri gerçekleştirilmiştir. 7-hidroksi timol metil eter'in (134) daha önce *Inula* (Compositae) türlerinde varlığı

bildirilmiştir [351]. 9-Hidroksi timol metil eter'in (135) doğada bulunuşu ilk kez burada bildirilmektedir.

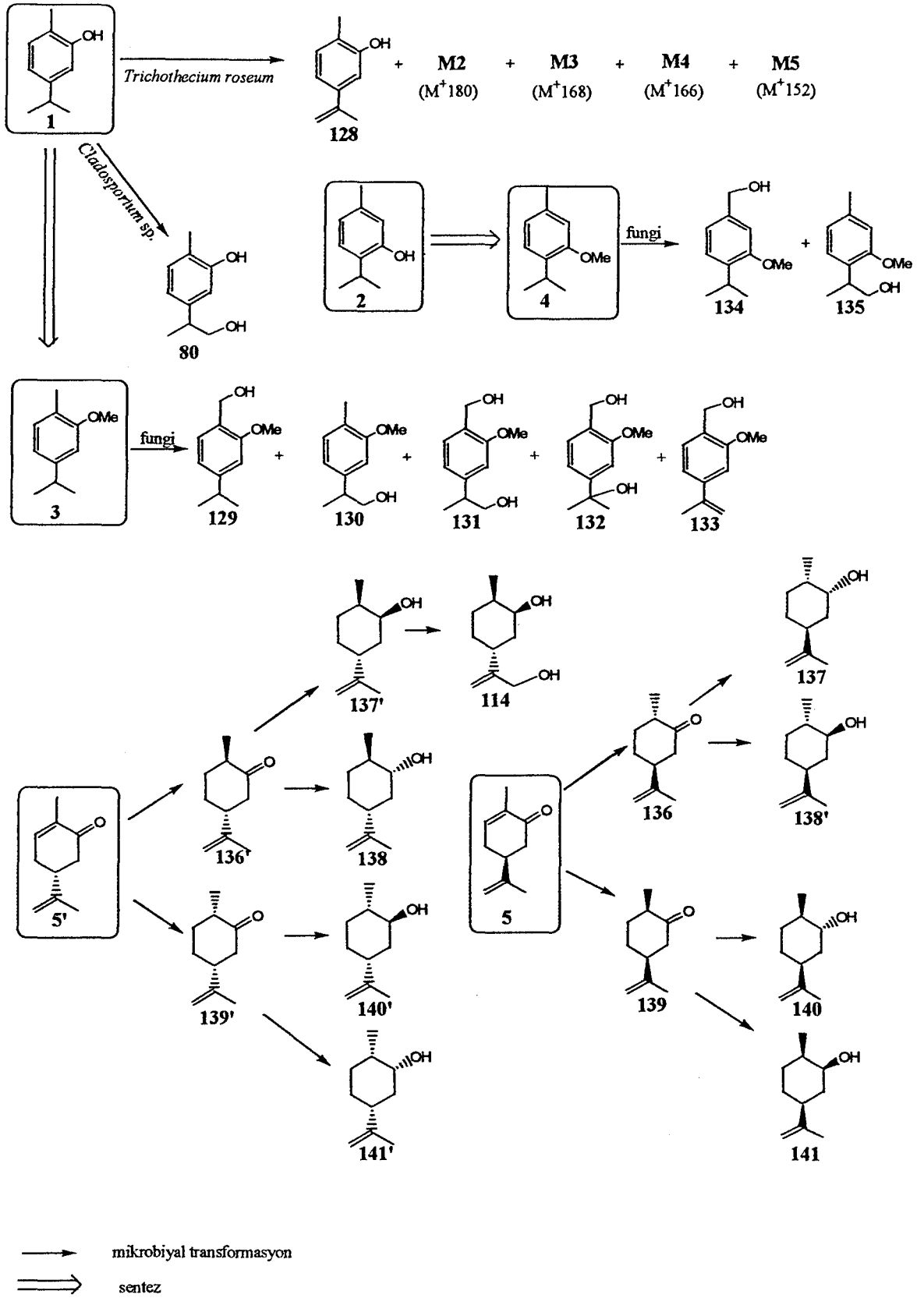
Karvon'un materyal olarak kullanımı, bu bileşiğin bol ve kolay bulunan bir monoterpen olmasından kaynaklanmıştır. Karvon enantiyomerlerinin organik sentezlerde önemli birer şiral başlangıç maddesi olarak kullanımı çok yaygındır [360]. Her iki enantiomer (5, 5') ile yapılan biyotransformasyon araştırmalarına (kaynak taramaları sırasında) rastlanmış olmasına rağmen, bu çalışmada farklı mikroorganizmalar denenmiştir. Preparatif amaçlı çalışmalarda, (-)-karvon ve iki farklı mikroorganizma ile gerçekleşen dönüşümlerle 3 bilinen metabolit elde edilmiştir. 10-Hidroksi-(+)-neodihidrokarveol (114) daha önce sentetik olarak elde edilmiş bir bileşik olmakla birlikte doğada bulunuşu ilk kez bildirilmektedir [355]. Diğer iki metabolit, (+)-*trans*-dihidrokarvon (136) ve (+)-neodihidrokarveol (137) sıkça rastlanan monoterpenlerdir. Bu çalışmalar sonucu elde edilen tüm metabolitler Şekil 4.1.'de şematik olarak verilmiştir.

(+) ve (-) karvon'un 5 farklı mikroorganizma ile dönüşümleri yedi günlük periyotlarla incelenmiştir. *Pseudomonas putida* ile bu dönüşümler daha önce denenmiş, ancak diğer dört mikroorganizma ilk defa kullanılmıştır [63, 321, 355]. SPME tekniği ile dönüşümler günlük olarak izlenebilmiştir. Kaynak taramalarında da açıklandığı gibi, genelde (+)-karvon'un dönüşümlerinin hızlı, (-)-karvon'un dönüşümlerinin yavaş olduğu görülmüştür.

Cunninghamella echinulata ise (-)-karvonu aynı hızla dönüştüren, (+) ve (-) enantiyomerleri 3 günde tamamen tüketen bir mikroorganizma olarak belirlenmiştir.

(+)-Karvon (5), (-)-*trans*-dihidrokarvon (136') ve *cis*-izodihidrokarvon (139')'u ana metabolit olarak vermektedir [355]. Aynı şekilde (-) enantiyomer (5'), bu türevlerin (+) olan enantiyomerlerine (136-139) dönüşmektedir. Çizelge 3.7.-3.11.'de özetlendiği şekilde bazı metabolitlerin dönüşümünün, ilk gün maksimum düzeye ulaştığı görülmektedir. Bu bulgular daha sonraki denemelerin planlanmasında kullanılabilecek önemli bilgilerlerdir.

Katı faz mikroekstraksiyon (SPME), günümüzde yaygın olarak kullanılan etkin bir ekstraksiyon tekniğidir. Koku ve tat maddelerin ekstraksiyonunda sıkça kullanılmaktadır [140, 324, 327, 328]. Mikroorganizmalar tarafından üretilmiş



Şekil 4.1. Monoterpenlerle gerçekleştirilen mikrobiyal transformasyon çalışmalarının özeti

kokulu metabolitlerin analizinde de kullanılmıştır [330, 331, 334]. Kokulu maddelerin biyotransformasyon ürünü olan uçucu maddelerin kontrolünde, kullanımına dair daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mikrobiyal transformasyon metabolitlerinin, özellikle de uçucu olanların, ekstraksiyonunda çıkan problemler de göz önünde bulundurularak [308, 335, 336] bu yeni uygulamanın faydalı olabileceği düşünülmüştür. Headspace-SPME deneyleri ile bilinen metabolitlerin kısa sürede ve etkin şekilde izlenmesi mümkün olmuştur. Bu teknik alternatif bir ekstraksiyon yöntemi olarak ilk defa bu çalışmada önerilmiştir. Bu yöntemle biyotransformasyon reaksiyonlarının izlenmesi ilk defa kolay ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Özellikle ön çalışmalar sırasında bu yöntemle metabolit oluşumu sık aralıklarla, seri şekilde, çözücü kullanmaksızın, ekonomik olarak gerçekleştirilmektedir. Bu bilgiler ışığında preparatif çalışmaların planlanması çok daha iyi yapılabilecektir [356].

Monoterpenlerin ve özellikle kullanılan materyallerin biyolojik aktiviteleri hakkında geniş bilgiler giriş bölümünde verilmiştir. Çalışma materyallerinin ve metabolitlerin biyolojik etkileri bu kapsamda incelenmiştir. Öncelikle antimikrobiyal aktiviteye bakılmıştır. Kaynak bilgileri doğrultusunda etkileri bilinen karvakrol, timol ve karvon enantiyomerleri ile daha önce aktiviteleri konusunda bilgi bulunmayan karvakrol ve timol metil eterleri ve metabolitlerin antimikrobiyal etkileri aynı mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. Çalışma materyalleri ile metabolitlerin standart maddeler ile karşılaştırıldığında etkili oldukları gözlenmiştir (Çizelge 3.11. ve 3.12.). Özellikle karvakrol metil eter ve timol metil eter insan patojenleri olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes*'e karşı kuvvetli etki göstermiştir. Karvakrol, *Candida albicans*'ı 31.25 µg/ml konsantrasyonda inhibe etmiştir. Daha önce yapılan benzer bir çalışmada [188] sadece 200 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu bildirilmiştir. Metabolitlerin genelde daha etkili oldukları ortaya çıkmıştır. Özellikle 9-hidroksi karvakrol (80) *Proteus vulgaris*'i 3.9 µg/ml gibi düşük bir konsantrasyonda inhibe etmiştir. 9-Hidroksi karvakrol metil eter (130), 7-hidroksi karvakrol metil eter (129) ve neodihidrokarveol (137) kuvvetli antimikrobiyal etki göstermiştir.

Karvakrol ve timol, tüp dilüsyon tekniği kullanılarak 200 µg/ml konsantrasyonda, *Aspergillus niger* patojeni hariç, diğer mikrofunguslar üzerinde çok kuvvetli antifungal etki göstermiştir. Meyva zararlısı *Trichothecium roseum*, aynı konsantrasyonda karvakrol tarafından %90, timol tarafından ise %10 oranında inhibe edilmiştir. Buna rağmen karvakrol az da olsa bu mikrofungus tarafından türevlerine dönüştürülürken, timol ile hiçbir dönüşüm ürününe rastlanmamıştır. Karvakrol metil eter ve timol metil eter patojen bitki funguslarına karşı ilk kez denenirken aktif olmadıkları görülmüştür. Karvon'un her iki enantiyomerlerinin de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ve *Rhizoctonia cerealis*'e karşı zayıf etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 3.13.). Metabolitlerin miktarları yeterli olmadığından dolayı antifungal etki denemeleri yapılamamıştır.

Monoterpenlerin antiviral etkileri daha önceki çalışmalarda [254, 255] bildirilmiştir. Bu çalışmada antiviral etki açısından incelenen materyaller hücre toksisiteleri düşük olmasına rağmen HBV-1 virüsüne karşı etkisiz bulunmuştur.

Bu tez çalışması süresince TBAM Biyotransformasyon laboratuvarına 78 mikroorganizmadan oluşan kültür koleksiyonu kazandırılmıştır (TCC). Toprak ve benzeri kaynaklardan mikroorganizma izolasyon tekniği kullanılarak bu koleksiyonun genişletilmesi mümkün olacaktır.

Biyotransformasyon çalışmalarımız sonucunda, doğal sekiz yeni madde bilim dünyasına kazandırılırken, toplam otuz bileşiğin doğal yollarla elde edilebilmesi için yeni mikroorganizmalar veya yöntemler önerilmiştir.

Biyolojik aktivite çalışmaları, standart olarak kullanılan bileşiklerden daha etkili, dokuz antimikrobiyal ve altı antifungal doğal maddenin varlığını ortaya çıkarmıştır (Çizelge 3.12.-14.).

Bu çalışmada kullanılan materyaller yanında doğal kaynaklardan rahatlıkla elde edilebilecek diğer birçok monoterpen ile araştırmaların devamı düşünülmektedir. SPME tekniğinin bu sahadaki başarılı kullanımı, bundan sonra yapılacak araştırmaları daha ekonomik hale getirecektir. Bunlara paralel olarak biyolojik aktivite çalışmaları da hızlandırılarak yeni ilaç hammaddelerinin bulunması ümit edilmektedir. Aromatik materyallerle çalışılmasından ötürü yeni koku ve tat maddelerinin bulunması da muhtemel görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. EVANS, W. C., *Microbiological Conversions*, In: *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 13th Ed., pp. 302-307, Bailliere Tindall, London, 1989.
2. WALSH, G., *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
3. ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., and TYLER, V. E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1996.
4. REHM, H. J., and REED, G., *Biotechnology: A Comprehensive Treatise*, Biotransformations, Kieslich K. (Ed.), Vol. 6a, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
5. FORGARTY, W. M., and KELLY, C. T., *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Elsevier Science Publishers Ltd., London, 1990.
6. POPPE, L. and NOVAK, L., *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, VCH, Weinheim, 1992.
7. WRIGLEY, S., HAYES, M., THOMAS, R., and CHRYSTAL, E., *Phytochemical Diversity: A Source of New Industrial Products*, The Royal Society of Chemistry, Bookcraft Ltd., Bath, 1997.
8. NISBET, L. J., and MOORE, M., *Will Natural Products Remain an Important Source of Drug Research for the Future*, *Curr. Op. Biotechnol.* **8**, 708-712 (1997).
9. BOULNOIS, G. J., *Drug Discovery in The New Millennium: The Pivotal Role of Biotechnology*, *Trends in Biotechnol.* **18**, 31-38 (2000).
10. BERGER, R. G., *Aroma Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin, 1995.
11. GRABLEY, S., and THIERICKE, R., *Drug Discovery From Nature*, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
12. HARVEY, A., *Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products*, *Drug Discovery Today* **5**, 94-100 (2000).
13. MOO-YOUNG, M., *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*, Vol. **3**, Pergamon Press, Oxford, 1985.
14. FABER, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1997.
15. ROBERTS, S. M., *Preparative Biotransformations: Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1992.
16. DAVIES, H. G., GREEN, R. H., KELLY, D. R., and ROBERTS, S. M., *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated and Whole Cell Systems in Synthesis*, Academic Press, London, 1989.

17. ROBERTS, S. M., TURNER, N. J., WILLETTS, A. J., and TURNER, M. K., *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
18. HOLLAND, H. L., *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, VCH Publishers Inc., New York, 1992.
19. LOUGHLIN, W.A., *Biotransformations in Organic Synthesis*, Bioresour. Technol. **74**, 49-62 (2000).
20. TRAMPER, J., *Chemical Versus Biochemical Conversion: When and How to use Biocatalysis*, Biotechnol. Bioeng. **52**, 90-295 (1996),
21. KIRIMER, N., ÖZEK, T., DEMİRCİ, F., KÜRKÇÜOĞLU, M., DEMİRCİ, B. ve GÜVEN, K., *Doğal ve Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etki Testleri*, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi No: 980312, 1998.
22. KIRIMER, N., BAŞER, K. H. C., and TÜMEN, G., *Carvacrol Rich Plants in Turkey*, Chem. Nat. Comp. **31**, 37-41 (1995).
23. AYDIN, S., *Kekik (Origanum onites L.) Yağ-altı-suyu'nun Farmakolojik Etkileri*, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1996.
24. AYDIN, S., BAŞER, K. H. C., and ÖZTÜRK, Y., *The Chemistry and Pharmacology of Origanum (Kekik) Water*, In: *Essential Oils: Basic and Applied Research*, Franz, Ch., Máthé, Á., and Buchbauer, G. (Ed.), pp. 52-59, Proceedings of the 27th ISEO, Vienna 1997.
25. ZEYTİNOĞLU, M., AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., and BAŞER, K. H. C., *Inhibitory Effects of Carvacrol on DMBA Induced Pulmonary Tumorigenesis in Rats*, Acta Pharm. Turcica **50**, 93-98 (1998).
26. ZEYTİNOĞLU, H., İNCESU, Z., and BAŞER, K. H. C., *The Inhibition of DNA Synthesis by Carvacrol in Mouse Myoblast Cells Bearing a Human N-Ras Oncogene*, 3. International Congress on Phytomedicine, Munich, 2000.
27. CHAMBERLAIN, E. M., and DAGLEY, S., *The Metabolism of Thymol by a Pseudomonas*, Biochem. J. **110**, 755-763 (1963).
28. TELEFONCU, A. *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 1995.
29. KIESLICH, K., *Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.
30. KIESLICH, K., *Biotransformations In: Fungal Biotechnology*, Anke, T. (Ed.), pp.297-362, Chapman & Hall, Weinheim, 1997.
31. BROCK, D., *Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer Assoc. Inc., Sunderland MA, 1990.

32. HASHIMOTO, S. I., and OZAKI, A., *Whole Microbial Cell Process for Manufacturing Amino Acids, Vitamins or Ribonucleotides*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 604-608 (1999).
33. CABRAL, J. M. S., BEST, D., BOROSS, L., and TRAMPER, J., *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publ., 1994.
34. SPAIN, J. C., *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*, Plenum Press, New York, 1995.
35. ANKE, T., *Fungal Biotechnology*, Chapman & Hall, Weinheim, 1997.
36. SMITH, J. E., *Studies in Biology: Biotechnology*, Edward Arnold Pub. Ltd, London, 1981.
37. MARTIN, A. M., *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, Elsevier Applied Science London, 1991.
38. ABOURASHED, E. A., CLARK, A. M., and HUFFORD, C. D., *Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review*, *Curr. Med. Chem.* **6**, 359-374 (1999).
39. SATTLER, I., GRABLEY, S., and THIERICKE, R. *Structure Modification via Biological Derivatization Methods In: Drug Discovery From Nature*, Grabley, S., and Thiericke, R. (Ed.), pp.191-214, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
40. DIXON, R. A., *Plant Natural Products: The Molecular Genetics of Biosynthetic Diversity*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 192-197 (1999).
41. ALTREUTER, D., H., and CLARK, D. S., *Combinatorial Biocatalysis: Taking the Lead from Nature* *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 130-136 (1999).
42. NIEDLEMAN, S. L., *Enzymes and Microbes as a Source of Chemical Diversity*, In: *The Discovery of Bioactive Substances, High Throughput Screening*, Devlin J. P. (Ed.), pp. 77-98, Marcel Dekker, Inc. New York, 1997.
43. GORDON, E. M., and J. R. KERVIN, J. F., *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*, Wiley – Liss Inc., 1998.
44. KENDRICK, W. B., *Kingdoms, Classification and Biodiversity*, Mycologue Publications, New York, 2000.
45. TIEJDE, J. M., and STEIN, J. L., *Microbial Diversity: Strategies for its Recovery*: In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd Ed.* Demain A. L., and Davies J. E. (Ed.), pp. 682-692, ASM Press, Washington DC, 1999.
46. CHICARELLI-ROBINSON, M. I., GIBBONS, S., McNICHOLAS, C., ROBINSON, N., MOORE, M., FAUTH, U., and WRIGLEY, S., *Plants and Microbes as Complementary Sources of Chemical Diversity for Drug Discovery*, In: *Phytochemical Diversity: A Source of New Industrial Products*, Wrigley, S., Hayes, M., Thomas, R., and Chrystal, E. (Ed.), pp. 30-39, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No: 200, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1997.

47. KUHNT, M., BITSCH, F., FRANCE, J., HOFMANN, H., SANGLIER, J. J., and TRABER, R., *Microbial Biotransformation Products of Cyclosporin A*, J. Antibiot. **49**, 781-7 (1996).
48. ABRAHAM, W. R., and ARFMANN, H. A., *Fusalanipyronone, a Monoterpenoid from Fusarium solani*, Phytochem. **27**, 3310-3311 (1988).
49. VAROĞLU, M., and CREWS, P., *Biosynthetically Diverse Compounds from a Saltwater Culture of Sponge Derived Aspergillus niger*, J. Nat. Prod. **63**, 41-43 (2000).
50. OGAWA, J., and SHIMIZU, S., *Microbial Enzymes: New Industrial Applications from Traditional Screening Methods*, Trends Biotechnol. **17**, 13-20 (1999).
51. DEMAİN, A. L., *Microbial Biotechnology*, Trends Biotechnol. **18**, 26-31 (2000).
52. MAHATO, S. B., and MAJUMDAR, I., *Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation, Review Article Number 84*, Phytochem. **34**, 883-898 (1993).
53. ABATE, D., and ABRAHAM, W. R., *Antimicrobial Metabolites from Lentinus crinitus*, J. Antibiot. **47**, 1348-1350 (1994).
54. CANNEL, R. J. P., *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
55. SINGLETON, P., and SAINSBURY, D., *Dictionary of Microbiology*, John Wiley & Sons, 1978.
56. HANSON, J. R., *An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
57. DORDICK, S. J., KHMELNITSKY, Y. L., and SERGEEVA, M. V., *The Evolution of Biotransformation Technologies*, Curr. Opin. Microbiol. **1**, 311-318 (1998).
58. FONKEN, G. S., and JOHNSON, R. A., *Chemical Oxidations with Microorganisms*, Marcel Dekker Inc., New York, 1972.
59. BIGELIS, R., *Bacteria as Potential Sources Flavour Metabolites*, Food Technol. **11**, 122-126 (1992).
60. BERGER, R. G., DRAWERT, F., and TIEFEL, P., *Naturally Occurring Flavours From Fungi, Yeasts, and Bacteria*, In: *Bioformation of Flavours*, Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod G., and Williams, A. A. (Ed.), pp. 21-32, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Cambridge, 1992.
61. KING, A., and DICKSON, J. R., *Biotransformation of Monoterpene Alcohols by Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii and Kluyveromyces lactis*, Yeast **16**, 499-506 (2000).
62. RICHARD BOWEN., W., LAMBERT, N., PUGH, S. Y. R., and TAYLOR, F., *The Yeast Alcohol Dehydrogenase Catalysed Conversion of Cinnamaldehyde to Cinnamyl Alcohol*, J. Chem. Technol. Biotechnol. **36**, 267-272 (1986).

63. VAN DYK, M. S., VAN RENSBURG, E., RENSBURG, I. P. B., and MOLELEKI, N., *Biotransformation of Monoterpenoid Ketones by Yeasts and Yeast Like Fungi*, J. Mol. Catal. B: Enzym. **5**, 149-154 (1998).
64. ABRAHAM, B. G., and BERGER, R., *Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies*, J. Agr. Food Chem. **42**, 2344-2346 (1994).
65. BIGELIS, R., *Flavour Metabolites and Enzymes from Filamentous Fungi*, Food Technol. **11**, 153-157 (1992).
66. KRINGS, U., ABRAHAM, B. G., and BERGER, R. G., *Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective*, Perfum. Flav. **20**, 79-86(1995).
67. VAN DER WERF, M. J. and DE BONT, J. A. M., *Screening for Microorganisms Converting Limonene into Carvone*, In: *New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts*, Kieslich, K., van der Beek, C. P., de Bont, J. A. M., van den Tweel, W. J. J. (Ed.), pp. 231-234, Studies in Organic Chem. 53, Elsevier Science, Amsterdam, 1998.
68. DOI, M., MATSUI, M., KANAYAMA, T., SHUTO, Y., and KINOSHITA, Y., *Asymmetric Reduction of Acetophenone by Aspergillus Species and their Possible Contribution to Katsuobushi Flavour*, Bioscience, Biotechnol. Biochem. **56**, 958-960 (1992).
69. KRINGS, U., and BERGER, R. G., *Biotechnological Production of Flavours and Fragrances*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**, 1-8 (1998).
70. MUHEIM, A., HAUSLER, A., SCHILLING, B., and LERCH, K., *The Impact of Recombinant DNA Technology on the Flavour and Fragrance Industry*, Perfum. Flav. **23**, 21-27 (1998).
71. GATTFIELD, I.L., *Enzymatic and Microbial Generation of Flavours*, H&R Contact **1**, 4-9 (1996).
72. GATTFIELD, I.L., *Enzymatic and Microbial Generation of Flavours*, Perfum. Flav. **20**, 5-14 (1995).
73. SCHREIBER, W. L., SCHARPF, L. G., and KATZ, I., *Future Needs of Chemistry in Flavors and Fragrances*, Perfum. Flav. **22**, 11-16 (1997)
74. MITZUTANI, S., *The Developments of Aroma Components by Microbial Fermentation*, Perfum. Flav. **15**, 21-25 (1990).
75. KORUKOĞLU, M., *Doğal Aroma Maddeleri Üretiminde Mikroorganizmalar*, Gıda **1**, 48-50 (1998).
76. ONKEN, J., and BERGER, R.G., *Biotransformation of Citronellol by the Basidiomycete Cystoderma carcharias in an Aerated-membrane Bioreactor*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**, 158-163 (1999).

77. BERGER, R.G., BÖKER, A., FISCHER, M., and TAUBERT, J., *Microbial Flavors*, In: *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*, Teranishi R. (Ed.), pp. 229-238, Kluwer Academic/Plenum Pub., New York, 1999.
78. BÖKER, A., LATZA, S., NEUSER, F., TAUBERT, J., and BERGER, R.G., *Mikrobielle Synthese von Schlüsselaromastoffen*, *Lebensm. Chem.* **52**, 155 (1999).
79. SERVI, S., BARBENI, M., and CAELLA, P., *New Avenues in Natural Products: Strategies in the Biogenesis of Flavours*, In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Fungati C., and Rahman, A., (Ed.), pp. 295-345, Vol.13, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1993.
80. PARLIMENT, T. H., and CROTEAU, R., *Biogenesis of Aromas*, ACS Symposium Series No: 317, Washington, 1986.
81. SCHREIER, P., *Bioflavors : An overview* In: *Bioformation of Flavours* , Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod, G., and Williams, A. A. (Ed.), pp. 1-20, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1992.
82. HANSEN, H.-P., *Flavour Improvement Through Microbial Selection*, In: *Bioformation of Flavours* , Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod, G., and Williams, A. A. (Ed.), pp. 65-74, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1992.
83. CHEETHAM, P. S. J., *Novel Specific Pathways for Flavour Production*-In: *Bioformation of Flavours* , Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod, G., and Williams, A. A. (Ed.), pp. 96-108, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1992.
84. KNIGHTS, J., *Application of Natural Product Research in Flavour Creation* -In: *Bioformation of Flavours* , Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod, G., and Williams, A. A. (Ed.), pp. 123-130, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1992.
85. HARLANDER, S., *Biotechnology for the Production of Flavoring Materials*-In: *Source Book of Flavors*, Reineccius, G. (Ed.), Aspen Pub. Inc., 2nd ed. Maryland 6, 155-175, 1999.
86. TAKEOKA, G. R., TERANASHI, R., WILLIAMS, P. J., and KOBAYASHI, A., *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*, ACS Symposium Series 637, Washington DC, 1996.
87. CHEETHAM, P.S.J., *Enzymes for Flavor Production* In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation*, Flickinger, M. C., Drew, S.W. (Ed.), pp.1004-1030, John Wiley & Sons, Inc., 1999.
88. <http://wdcn.nig.ac.jp/> (20.10.2000)
89. <http://www.bacterio.cict.fr/collections.html/> (20.10.2000)

90. BANTHORPE, D. V., *Secondary Metabolism in Plant Tissue Culture: Scope and Limitations*, Nat. Prod. Rep. **11**, 303-328 (1994).
91. RHODES, M. J. C., SPENCER, A., HAMILL, J. D., and ROBINS, R. J., *Flavor Improvement Through Plant Cell Culture-In: Bioformation of Flavours*, Patterson, R. L. S., Charlwood, B. V., MacLeod, G., Williams, A. A. (Ed.), pp. 42-64, Royal Society of Chemistry Special Publication No: 95, Bookcraft (Bath) Ltd., Cambridge, 1992.
92. VANEK, T., VALTERNOVA, I., and VAISAR, T., *Biotransformation of (S)-(-)- and (R)-(+)-Limonene using Solanum aviculare and Dioscorea deltoidea Plant Cells*, Phytochem. **50**, 1347-1351 (1999).
93. PATTERSON, R. L. S., CHARLWOOD, B. V., MACLEOD, G., and WILLIAMS, A. A. (Ed.), *Bioformation of Flavours*, Royal Soc. of Chem., Cambridge, 1992.
94. LAPPIN, G. J., STRIDE, J. D., and TAMPION, J., *Biotransformation of Monoterpenoids by Suspension Cultures of Lavandula angustifolia*, Phytochem. **26**, 995-997 (1987).
95. BANTHORPE, D. V., GREY, T. J., POOTS, J., and FORDHAM, W. D., *Monoterpene Metabolism in Cultures of Rosa Species*, Phytochem. **25**, 2321-2326 (1986).
96. PARK, S. H., and KIM, S. U., *Modified Monoterpenes from Biotransformation of (-)-Isopiperitone by Suspension Cell Culture of Mentha piperita*, J. Natural Products **61**, 354-357 (1998).
97. HANSON, J. R., *Microbiological Transformation of Diterpenoids*, Nat. Prod. Rep. **9**, 139-151 (1992).
98. GALUN, E., AVIV, D., DANTES, A., and FREEMAN, A., *Biotransformation by Plant Cells Immobilized in Cross Linked Polyacrylamide-Hydrazide*, Planta Med. **49**, 9-13 (1983).
99. WITTE, L., BERLIN, J., WRAY, V., SCHUBERT, W., KOHL, W., HÖFFLE, G., and HAMMER, J., *Mono- and Diterpenes from Cell Cultures of Thuja occidentalis*, Planta Med. **49**, 216-221 (1983).
100. AVIV, D., DANTES, A., KROCHMAL, E., and GALUN E., *Biotransformation of Monoterpenes by Metha Cell Lines*, Planta Med. **47**, 7-10 (1983).
101. MIYAZAWA, M., WADA, T., and KAMEOKA, H., *Biotransformation of (+)- and (-)-Limonene by the Larvae of Common Cutworm (Spodoptera litura)*, J. Agr. Food Chem. **46**, 300-303 (1998).
102. MIYAZAWA, M., KASAHARA, H., and KAMEOKA, H., *Biotransformation of Lignans: Metabolism of (+)-Yangabin in Spodoptera litura*, Nat. Prod. Lett. **8**, 88-87 (1996).

103. MIYAZAWA, M., and MURATA, T., *Biotransformation of β -Myrcene by the larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*)*, J. Agr. Food Chem. **48**, 123-125 (2000).
104. ISHIDA, T., ASAKAWA, Y., TAKEMOTO, T., and ARATANI, T., *Terpenoids Biotransformation in Mammals III: Biotransformation of α -Pinene, β -Pinene, Pinane, 3-Carene, Carane, Myrcene and p-Cymene in Rabbits*, J. Pharm. Sci. **70**, 406-415 (1981).
105. JAGER, W., MAYER, M., PLATZER, P., REZNICEK, G., DIETRICH, H., and BUCHBAUER, G., *Stereoselective Metabolism of the Monoterpene Carvone by Rat and Human Liver Microsomes*, J. Pharm. Pharmacol. **52**, 191-197 (2000).
106. AUSTGULEN, L.T., SOLHEIM, E., and SCHELIN, R.R., *Metabolism in Rats of p-Cymene Derivatives: Carvacrol and Thymol*, Pharmacol. Toxicol. **61**, 98-102 (1987).
107. VE WALDE, A. B., SCHELIN, R.R., and MONGE, P., *p-Cymene Metabolism in Rats and Guinea Pigs*, Xenobiotica **13**, 503-512 (1983).
108. MADYASTHA, K. M., and GAIKWAD, N. W., *Metabolic Disposition of a Monoterpene Ketone, Piperitone, in Rats: Evidence for the Formation of a Known Toxin, p-Cresol*, Drug Metab. Dispos. **27**, 74-80 (1999).
109. BOON, P. J. M., VAN DER BOON, D., and MULDER, G. J., *Cytotoxicity and Biotransformation of the Anticancer Drug Perillyl Alcohol in PC12 Cells and in the Rat*, Toxicol. Appl. Pharmacol. **167**, 55-62 (2000).
110. SCHLENK, D., STRESSER, D. M., RIMOLDI, J., ARCAND, L., MCCANTS, J., NIMROD, A. C., BENSON, W. H., *Biotransformation and Estrogenic Activity of Methoxychlor and its Metabolites in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)*, Mar. Environ. Res. **46**, 159-162 (1998).
111. ROLLAS, S., *İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)*, Marmara Üniversitesi Yayınları No:525, Eczacılık Fakültesi No:10, İstanbul, 1992.
112. SMITH, R. V., and ROSAZZA, J. P. N., *Microbial Systems for Study of the Biotransformations of Drugs*, Biotechnol. Bioeng. **17**, 785-814 (1975).
113. DUTCHER, E., and DERENDORF, H., *Biotransformation In: Drug Actions*, pp. 19-31, Medpharm. Sci. Pub., Stuttgart, 1995.
114. MICHELIS, P. C., and ROSAZZA, J. N. P., *Methods for Biocatalysis and Biotransformations Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain, A. L., and Davies, J. E. (Ed.), pp.165-180, 2nd Ed., ASM Press, Washington DC, 1999.
115. ANDERSON, E. M., LARSSON, K. M., and KIRK, O., *One Biocatalyst - Many Applications: The Use of *Candida antarctica* β -lipase in Organic Synthesis*, Biocatal. Biotransform. **16**, 181-204 (1998).

116. UHLIG, H., *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1998.
117. CHEN, R., *A General Strategy for Enzyme Engineering*, Trends Biotechnol. **17**, 344-35 (1999).
118. ÇALIŞ, I., ÖZİPEK, M., ERTAN, M., and RÜEDI, P., *Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Flavonoid Glycosides*, FABAD, J. Pharm. Sci. **20**, 55-59 (1995).
119. KOÇER - SAĞIROĞLU, A., *Enzim Teknolojisi*, Bilim ve Teknik **10**, 74-80 (1999).
120. REINECCIUS, G., *Source Book of Flavors*, Aspen Pub. Inc., Maryland, 1999.
121. LOMASCOLO, A., STENTELAIRE, C., ASTHER, M., and LESANGE-MEESSEN, L., *Basidiomycetes as new biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavours for the Food Industry*, Trends Biotechnol. **17**, 282-289 (1999).
122. MATHEIS, G., *Natural Flavoring in the European Union*, Dragoco Report **1**, 23-33 (2000).
123. CHEETHAM, P. S. J., *Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours*, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **55**, 1-49 (1997).
124. NAGODAWITHANA, T. W., and REED, G., *Nutritional Requirements of Commercially Important Microorganisms*, Esteekey Assoc. Inc, Milwaukee, 1998.
125. LIESE, A., and FILHO, M. V., *Production of Fine Chemicals Using Biocatalysis*, Curr. Opin. Biotechnol. **10**, 595-603 (1999).
126. D'AQUINO, R., *Biocatalysis makes Headway in Chemicals*, Chem. Eng. **3**, 37-43 (1999).
127. ROZELL, J. D., *Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities*, Bioorg. Med. Chem. **7**, 2253-2261 (1999).
128. PATEL, R. N., BANARJEE, A., and SZARKA, L. J., *Synthesis of Four Chiral Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis*, J. Am. Oil Chem. Soc. **72**, 1247-1264 (1995).
129. TAKEOKA, G. R., TERANISHI, R., and GÜNTERT, M. *Flavor Precursors - Thermal and Enzymatic Conversions*, ACS Symposium Series 490, Washington, 1992.
130. KIESLICH, K., *New Examples of Microbial Transformations in Pharmaceutical Industry*, Bull. Soc. Chim. Fr. **1**, 9-17 (1980).
131. ROBERTS, S. M., *Preparative Biotransformations*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**, 1-21 (1999).
132. ROBERTS, S.M., *Preparative Biotransformations*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**, 611-633 (2000).

133. GROGAN, G.J., and HOLLAND, H. L., *The Biocatalytic Reactions of Beauveria spp.*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 9, 1-32 (2000).
134. HOLLAND, H. L., *Microbial Transformations*, Curr. Opin. Biotechnol. 2, 77-84 (1998).
135. HOLLAND, H. L., *C-H Activation* Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 22-27 (1999).
136. ORRU, R. V. A., and FABER, K., *Stereoselectivities of Microbial Epoxide Hydrolases*, Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 16-21 (1999).
137. GABELMAN, A. *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients*, John Wiley & Sons Inc, New York, 1994.
138. BAUER, K., GARBE, D., and SURBURG, H., *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
139. TEISSEIRE, P. J., and CADBY, P., *Chemistry of Fragrant Substances*, VCH Pub. New York, 1994.
140. CRABB, C., *Searching for New Scents*, Chem. Eng. 3, 59 (1999).
141. LESAGE-MEESSEN, L., HAON, M., DELATTRE, M., THIBAUT, J. F., COLONNA CECCALDI, B., and ASTHER, M., *An Attempt to Channel The Transformation of Vanillic Acid into Vanillin by Controlling Methoxyhydroquinone formation in Pycnoporus cinnabarinus with Cellobiose*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 393-397 (1997).
142. ODDOU, J., STENTELAIRE, C., LESAGE-MEESSEN, L., ASTHER, M., and COLONNA CECCALDI, B., *Improvement of Ferulic Acid Bioconversion into Vanillin by use of High-density Cultures of Pycnoporus cinnabarinus*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 1-6 (1999).
143. PORTER, J. W., and SPRUGEON, S. L., *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds: Conversion of Acetyl-Coenzyme A to Isopentenyl Pyrophosphate*, Quereshi, N., and Porter, J. W. (Ed.), pp. 47-94, Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981.
144. CROTEAU, R., CRAKER, L.E., and SIMON, J. E., *Herbs, Spices, and Medicinal Plants, Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology, "Biochemistry of Monoterpenes and Sesquiterpenes of the Essential Oils"*, pp. 81-133, Vol. 1, Food Product Press, New York, 1992.
145. DEV, S., *Isoprenoids*, In: *Natural Products of Woody Plants, Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall*, Rowe, J. W. (Ed.), pp. 691-807, Vol. 2, Springer-Verlag Berlin, 1989.
146. MANITTO, P., and SAMMES P. G. (translation), *Biosynthesis of Natural Products*, Ellis Harwood Ltd. Chichester, 1981.
147. MANN, J., *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Oxford Sci. Publ., Oxford, 1994.

148. WISE, M. L., and CROTEAU, R., *Monoterpene Biosynthesis*, In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Cane, D. E. (Ed.), pp.97-155, Vol. 2, Elsevier Science Ltd., Oxford, 1999.
149. BUCKINGHAM, J., *Dictionary of Natural Products*, Chapman & Hall, London, 2000.
150. MANN, J., DAVIDSON, R. S., HOBBS, J. B., BANTHORPE, D. V., and HARBORNE, J. B., *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, Longmann Sci. & Tech., Essex, 1994.
151. YEATS, B.Y., *Monoterpenoids*, In: *Terpenoids and Steroids*, Hanson, J. R. (Ed.), pp. 3-80, Specialist Periodical Reports, Vol. 9, The Chemical Society, Bristol, 1979.
152. CHARLWOOD, B. V., and CHARLWOOD, K. A., *Monoterpenoids*, In: *Methods in Plant Biochemistry, Terpenoids*, Charlwood, B. V., and Banthorpe, D. V. (Ed.), pp. 43-98, Vol: 7, Academic Press, London, 1991.
153. GRAYSON, D. H., *Monoterpenoids*, Nat. Prod. Rep. **15**, 439-476, (1998).
154. GRAYSON, D. H., *Monoterpenoids*, Nat. Prod. Res. **17**, 385-419 (2000).
155. FERREIRA, M. J. P., EMERENCIANO, V. P., LINIA, G. A. R., ROMOFF, P., MACARI, P. A. T., and RODRIGUES, G. V., ¹³C-NMR Spectroscopy of *Monoterpenoids*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **33**, 153-206 (1998).
156. TAVERA, H. L., *Monoterpenes in Essential Oils: Biosynthesis and Properties*, Adv. Exper. Med. Biol. **464**, 49-62 (1999).
157. TORSELL, K., *Natural Products Chemistry: A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach*, Apotekarsoc. Swedish Pharm Press, Stockholm, Sweden, 1997.
158. SAMUELSSON, G., *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*, 4th Rev. Ed., Apotekarsoc. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 1999.
159. McCASKILL, D., and CROTEAU, R., *Some Caveats for Bioengineering Terpenoid Metabolism in Plants*, Trends Biotechnol. **16**, 349-355 (1998).
160. LANGE, B.M. and CROTEAU, R., *Isoprenoid Biosynthesis via a Mevalonate-Independent Pathway in Plants: Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Peppermint*, Arc. Biochem. Biophys. **365**, 170-174 (1999).
161. SEZİK, E., YEŞİLADA, E., BAŞARAN, A., SARAÇOĞLU, I., ERÖZ, T., ve ÖZİPEK, M., *Türkiye Uçucu Yağ Kaynaklarının Terpen Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi: ŞENER, B. (Ed.) 6. BIHAT, Ankara, 1986, Gazi Üniv. Yay. No: 113, Ecz. Fak. Yay. No: 8, Ankara, 257-259, 1987.*

162. BAŞER, K. H. C., *Aromatik Bitkilerden Uçucu Yağ Üretimi ve Fraksiyonlama Teknolojilerinin Geliştirilmesi*, Tübitak Öncelikli Alan Projesi, TBAG-1330, 1995-96.
163. BAŞER, K. H. C., *Türkiye Florasının Yeni Tat ve Koku Maddeleri Yönünden Taranması*, DPT Projesi , 95K120280, 1995-2001.
164. PYBUS, D. and SELL, C., *The Chemistry of Fragrances*, Royal Society of Chemistry, London, 1999.
165. STICHER, O., WAGNER H., and WOLFF, P., *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity: Plant Mono- Di and Sesquiterpenoids with Pharmacological Activity*, pp. 137-176, Springer Verlag Berlin, 1974.
166. <http://www.ars-grin.gov/duke/chem-activities.html/> (20.10.2000)
167. CUTLER, H. G., and CUTLER, S. J., *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1999.
168. KNOBLOCH, K., WEIGAND, H., WEIS, N., SCHWARM, H.-M., AND VIGENSCHOW, H., *Action of Terpenoids on the Energy Metabolism*, In: *Progress in Essential Oil Research*, Brunke, E. J. (Ed.), pp. 429-447, Walter de Guyter & Co, Berlin, 1986.
169. CROWELL, P. L., *Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes*, J. Nutr. **129**, 775S-778S (1999).
170. HE, L., MO, H., HADISUSILO, S., QURESHI, A. A., and ELSON, C. E., *Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas in Vitro and In Vivo* J. Nutr. **127**, 668-674 (1997).
171. CROWELL, P. L., REN, Z., LIN, S., VEDEJS, E., and GOULD, M. N., *Structure - Activity Relationships Among Monoterpene Inhibitors of Protein Isoprenylation and Cell Proliferation*, Biochem. Pharmacol. **47**, 1405-1415 (1994).
172. ARIAZI, E. A., and GOULD M. N., *Identifying Differential Gene Expression in Monoterpene-treated Mammary Carcinomas Using Subtractive Display*, J. Biol. Chem. **271**, 29286-29294 (1996).
173. REN, Z., and GOULD, M. N., *Modulation of Small G Protein Isoprenylation by Anticancer Monoterpenes in Situ Mammary Gland Epithelial Cells*, Carcinogenesis **19**, 827-832 (1998).
174. KINOSHITA, K., MORIKAWA, K., FUJITA, M., and NATORI, S., *Inhibitory Effects Of Plant Secondary Metabolites On Cytotoxic Activity Of Polymorphonuclear Leucocytes*, Planta Med. **58**, 137-145 (1992).
175. ZHENG, G. Q., KENNEY, P. M., and LAM, L. K. T., *Anethofuran, Carvone, and Limonene, Potential Cancer Chemopreventive Agents From Dill Weed Oil and Caraway Oil*, Planta Med **58**, 338-341 (1992).

176. ELSON, C. E., *Suppression of Mevalonate Pathway Activities by Dietary Isoprenoids: Protective Roles in Cancer and Cardiovascular Disease*, J. Nutr. **125**,1666-73 (1995).
177. MILOS, M., and JERKOVIC, M. I., *Chemical Composition and Antioxidant Effect of Glycosidically Bound Volatile Compounds from Oregano (Origanum vulgare L. ssp. hirtum)*, Food Chem. **71**, 79-83 (2000).
178. YANISHLIEVA, N. V., MARINOVA, E. M., GORDON, M. H., and RANEVA, V. G., *Antioxidant Activity and Mechanism of Action of Thymol and Carvacrol in Two Lipid Systems*, Food Chem. **64**, 59-66 (1999).
179. THOMPSON, D. P., *Fungitoxic Activity Of Essential Oil Components On Food Storage Fungi*, Mycologia **81**, 151-153 (1989).
180. ROSS, S. A., EL-KELTAWI, N. E., and MEGALLA, S. E., *Antimicrobial Activity of Some Egyptian Aromatic Plants*, Fitoterapia **51**, 201-205 (1980).
181. AKGÜL, A., and KIVANÇ, M., *Inhibitory Effects Of Selected Turkish Spices and Oregano Components on Some Foodborne Fungi*, Int. J. Food Microbiol. **6**, 263-268 (1988).
182. CRIPPA, A., and BRUNO, E., *Antifungal Activity In Vitro of Phenols and other Natural Substances*, Eco. Nat. Ecol. **7**, 29-32 (1989).
183. ULTEE, A., KETS, E. P. W., and SMID, E. J., *Mechanisms of Action of Carvacrol On The Food-Borne Pathogen Bacillus cereus*, Appl. Environ. Microbiol. **65** , 4606-4610 (1999).
184. SIVROPOULOU, A., PAPANIKOLAOU, E., NIKOLAOU, C., KOKKINI, S., LANARAS, T., and ARSENAKIS, M., *Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils*, J. Agr. Food Chem. **44**, 1202-1205 (1996).
185. KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, B., WEIGAND, H., and WEIS, N., *Antibacterial and Antifungal Properties Of Essential Oil Components*, J. Essent. Oil Res. **1**, 119-128 (1989).
186. CACCIONI, D. R. L., and GUIZZARDI, M., *Inhibition Of Germination and Growth Of Fruit and Vegetable Postharvest Pathogenic Fungi by Essential Oil Components*, J. Essent. Oil Res. **6**, 173-179 (1994).
187. DIDRY, N., DUBREUIL, L., and PINKAS, M., *Antimicrobial Activity of Thymol, Carvacrol and Cinnamaldehyde Alone or in Combination*, Pharmazie **48**, 301-304 (1993).
188. ALI-SHTAYEH, M. S., AL-NURI, M. A., YAGHMOUR, R. M. R., and FAIDI, Y. R., *Antimicrobial Activity of Micromeria Nervosa From The Palestinian Area*, J. Ethnopharmacol. **58**, 143-147 (1997).
189. TAWIL, G. G., and YOUSEF, R. T., *Activity of Volatile Oil Components Against Candida albicans*, J. Pharm. Sci. **2**, 23-26 (1988).

190. VIOLLON, C., and CHAUMONT, J. P., *Antifungal Properties of Essential Oils and Their Main Components Upon Cryptococcus Neoformans*, Mycopathol. **128**, 151-153 (1994).
191. ITO, H., *Pharmacological Studies on Acidic Oil of Thujopsis dolabrata*, Nippon Yakurigaku Zasshi **53**, 633-655 (1957).
192. CHALCHAT, J. C., GARRY, R. P., BASTIDE, P., FABRE, F., and MALHURET, R., *Chemical Composition Correlation/Antimicrobiol Activity. Comparison of Two Methods For Determining MIC*, Plant Med. Phytother. **25**, 184-193 (1991).
193. KIM, J. M., MARSHALL, M. R., and WEI, C. I., *Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components Against Five Foodborne Pathogens*, J. Agr. Food Chem. **43**, 2839-2845 (1995).
194. HELANDER, I. M., ALAKOMI, H. L., LATVA-KALA, K., MATTILAT-SANDHOLM, T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M., and VON WRIGHT, A., *Characterisation of The Action of Selected Essential Oil Components On Gram-Negative Bacteria*, J. Agr. Food Chem. **46**, 3590-3595 (1998).
195. HINOUE, JB., HARVALA, CE., and HINOUE, EB, *Antimicrobial Activity Screening of 32 Common Constituents of Essential Oils*, Pharmazie **44**, 302-303 (1989).
196. THOMPSON, D. P., *Inhibition of Growth of Mycotoxigenic Fusarium Species by Butylated Hydroxyanisole and/or Carvacrol*, J. Food Prod. **59**, 412-415 (1996).
197. MULLER-RIEBAU, F. J., BERGER, B. M., YEGEN, O., and ÇAKIR, C., *Seasonal Variations in the Chemical Compositions of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey*, J. Agr. Food Chem. **45**, 4821-4825 (1997).
198. MULLER-RIEBAU, F., BERGER, B., and YEGEN, O., *Chemical Composition and Fungitoxic Properties to Phytopathogenic Fungi of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild In Turkey*, J. Agr. Food Chem. **43**, 2262-2266 (1995).
199. JUVEN, BJ., KANNER, J., SCHVED, F., and WEISSLOWICZ, H., *Factors That Interact With the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and its Active Constituents*, J. Appl. Bacteriol. **76**, 626-631 (1994).
200. KIM, J. M., MARSHALL, M. R., CORNELL, J. A., PRESTON, J. F., and WEI, C. J., *Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol Against Salmonella typhimurium in Culture Medium and on Fish Cubes*, J. Food Sci. **60**, 1364-1374 (1995).
201. MENGHINI, A., PAGIOTTI, R., and CAPUCCELLA, M., *In Vitro Antifungal Activity of Satureja montana L. Essential Oil and its Components*, Riv. Ital. Eppos. **3**, 3-7 (1992).

202. GHOSH, A., CHAKRAVARTY, D., and ADHIKARI, P. C., *Action of Isothymol (Carvacrol) on Vibrio Cholerae and Vibrio Parahaemolyticus*, J. Inst. Chem.(India) **55**, 88-90 (1983).
203. CAIUS, J. F., and MHASKAR, K. S., *The Correlation Between the Chemical Composition of Anthelmintics and Their Therapeutic Value in Connection With the Hookworm Inquiry in The Madras Presidency. XIX. Drugs Allied to Thymol*, Indian J. Med. Res. **11**, 337-345 (1923).
204. HARAGUCHI, H., ISHIKAWA, H., SANCHEZ, Y., OGURA, T., KUBO, Y., and KUBO, I., *Antioxidative Constituents in Heterotheca Imuloides*, Bioorg. Med. Chem. **5**, 865-871 (1997).
205. AESCHBACH, R., LOLIGER, J., SCOTT, B. C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., and ARUOMA, O. I., *Antioxidant Actions of Thymol, Carvacrol, 6-Gingerol, Zingerone and Hydroxytyrosol*, Food Chem. Toxicol. **32**, 31-36 (1994).
206. VAN DEN BROUCKE, C. O., and LEMLI, J. A., *Antispasmodic Activity of Origanum compactum, Part 2, Antagonistic Effect of Thymol and Carvacrol*, Planta Med. **45**, 188-190 (1982).
207. VAN DEN BROUCKE, C. O., and LEMLI, J. A., *Antispasmodic Activity of Origanum compactum*, Planta Med. **38**, 317-331 (1980).
208. CABO, J., CRESPO, M. E., JIMENEZ, J., and ZARZUELO, A., *The Spasmolytic Activity of Various Aromatic Plants From The Province of Granada. I. - The Activity of The Major Components of Their Essential Oils*, Plant Med. Phytother. **20**, 213-218 (1986).
209. GRACZA, L., *Molecular Pharmacological Investigation of Medicinal Plant Substances II. Inhibition of Acetylcholinesterase by Monoterpene Derivatives In Vitro*, Z. Naturforsch Ser. C **40**, 151-153 (1985).
210. HELFRICH, O., *The Allelopathic Activity of Essential Oils*, Dtsch. Apoth. Ztg. **102**, 1280-1282 (1962).
211. TUNON, H., THORSELL, W., and BOHLIN, L., *Mosquito Repelling Activity of Compounds Occurring in Achillea millefolium L. (Astraceae)*, Econ. Bot. **48**, 111-120 (1994).
212. KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z. G., and MAVRAGANI-TSIPIDOU, P., *Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils*, J. Agr. Food Chem. **46**, 1111-1115 (1998).
213. PEARSON, D. A., FRANKEL, E. N., AESCHBACH, R., and GERMAN, J. B., *Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics*, J Agr Food Chem **45**, 578-582 (1997).

214. BEZERRA, P., FERNANDES, A. G., CRAVEIRO, A. A., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., MACHADO, M. I. L., VIANA, G. S. B., MATOS, F. F., and ROUQUAYROL, M. Z., *Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of Plants From Northeast Brazil-Genus Lippia*, Cienc. Cult. (Sao Paulo) Suppl. **33**, 1-14 (1981).
215. WAGNER, H., WIERER, M., and BAUER, R., *In Vitro Inhibition of Prostaglandin Biosynthesis by Essential Oils And Phenolic Compounds*, Planta Med. **52**, 184-187 (1986).
216. HIROBE, C., QIAO, ZS., TAKEYA, K., and ITOKAWA, H., *Cytotoxic Principles from Majorana syriaca*, Nat. Med. **52**, 74-77 (1998).
217. CAUJOLLE, F., and FRANCK, C., *Comparative Toxicities of Thymol and Carvacrol*, Soc. Chim. Biol. Bull. **26**, 334-342 (1944).
218. VAN DEN BROUCKE, C. O., and LEMLI, J. A., *Pharmacological and Chemical Investigation of Thyme Liquid Extracts*, Planta Med. **41**, 129-135 (1981).
219. JENNER, P. M., HAGAN, E. C., TAYLOR, J. M., COOK, E. L., and FITZHUGH, O. G., *Food Flavourings and Compounds of Related Structure. I. Acute Oral Toxicity*, Food Cosmet. Toxicol. **2**, 327-345 (1964).
220. DUKE, J. A., *Phytotoxin Tables*, Crc. Crit. Rev. Toxicol. **5**, 189-237 (1977).
221. DeLUCA D. L., DeLUCA D. R., RONZIO R. A., SPARKS W. S., *Oregano for the Treatment of Internal Parasites and Protozoa*, US 5955086, 1999.
222. OSAWA, K., YASUDA, H., MORITA, H., TAKEYA, K., and ITOKAWA, H., *Macrocarpals H, I and J from the Leaves of Eucalyptus globulus*, J. Nat. Prod. **59**, 823-827 (1996).
223. ALVEI CALDERONE, N. W., SHIMANUKI, H., ALLEN and WARDELL, G., *An In Vitro Evaluation of Botanical Compounds for the Control of the Honeybee Pathogens Bacillus Larvae and Ascospaera apis, and the Secondary Invader B.*, J. Essent. Oil Res. **6**, 279-287 (1994).
224. TRIPATHI, S. C., SINGH, S. P., and DUBE, S., *Studies On Antifungal Properties of Essential Oil of Trachyspermum ammi (L.) Sprague*, J. Phytopathol. **116**, 113-120 (1986).
225. KUHNT, M., PROBSTLE, A., RIMPLER, H., BAUER, R., and HEINRICH, M., *Biological and Pharmacological Activities and Further Constituents of Hyptis verticillata*, Planta Med. **61**, 227-232 (1995).
226. RAHALISON, L., HAMBURGER, M., MONOD, M., FRENK, E., and HOSTETTMANN, K., *Antifungal Tests In Phytochemical Investigations, Comparison of Bioautographic Methods Using Phytopathogenic and Human Pathogenic Fungi*, Planta Med. **60**, 41-44 (1994).

227. EL-SAID, F., SOFOWORA, E. A., MALCOLM, S. A., and HOFER, A., *An Investigation Into the Efficacy of Ocimum gratissimum as Used in Nigerian Native Medicine*, *Planta Med.* **17**, 195-200 (1969).
228. VAUGHN, S.F., and SPENCER, G.F., *Antifungal Activity of Natural Compounds Against Thiabendazole-Resistant Fusarium sambucinum Strains*, *J. Agr. Food Chem.* **42**, 200-203 (1994).
229. LIU, G. S., *Studies On Alkannin-Beta-Prime-Dimethylacrylate, A New Naphthoquinone Derivative Isolated from Arnebia euchroma*, *Yao Hsueh Tung Pao* **16**, 14-15 (1981).
230. OSAWA, K., YASUDA, H., MARUYAMA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., and OKUDA, K., *An Investigation of Diterpenes From The Leaves of Rabdosis trichocarpa and their Antibacterial Activity Against Oral Microorganisms*, *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 922-925 (1994).
231. OSAWA, K., YASUDA, H., MARUYAMA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., and ITOKAWA, H., *Antibacterial Trichorabdol Diterpenes from Rabdosis trichocarpa*, *Phytochem.* **36**, 1287-1291 (1994).
232. SHAPIRO, S., and GUGGENHEIM, B., *The Action of Thymol on Oral Bacteria*, *Oral Microbiol. Immunol.* **10**, 241-246 (1995).
233. KUBO, I., MUROI, H., and KUBO, A., *Naturally Occurring Antiacne Agents*, *J. Nat. Prod.* **57**, 9-17 (1994).
234. SUMMERS, N. V., and KENNA, M. A., *Inhibitory Effect of a Plant Secondary Compound (Thymol) on Fungal Growth*, *Amer. J. Bot.* **81**, 63- (1994).
235. OGURI, A., SUDA, M., TOTSUKA, Y., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K., *Inhibitory Effects of Antioxidants On Formation of Heterocyclic Amines*, *Mutat. Res.* **402**, 237-245 (1998).
236. KATSUDA, Y., *Antimicrobial Effects of Essential Oils and Aromatic Components Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, *Aromatopia* **10**, 74-77 (1995).
237. KUBO, I., MUROI, H., and KUBO, A., *Antibacterial Activity of Long-Chain Alcohols Against Streptococcus umtans*, *J. Agr. Food Chem.* **41**, 2447-2450 (1993).
238. PERRUCCI, S., MACCHIONI, G., CIONI, PL., FLAMINI, G., and MORELLI, I., *Structure/Activity Relationship of Some Natural Monoterpenes as Acaricides Against Psoroptes cuniculi*, *J. Nat. Prod.* **58**, 1261-1264 (1995).
239. MELZIG, M., and TEUSCHER, E., *Investigations of The Influence of Essential Oils and their Main Components on the Adenosine Uptake by Cultivated Endothelial Cell*, *Planta Med.* **57**, 41-42 (1991).
240. HAHN, M., LISCHKA, G., PFEIFLE, J., WIRTH, V., *A Case of Contact Dermatitis From Lichens In Southern Germany*, *Contact Dermatitis* **32**, 55-56 (1995).

241. LORENZI, S., PLACUCCI, F., VINCENZI, C., BARDAZZI, F., and TOSTI A, *Allergic Contact Dermatitis Due To Thymol*, *Contact Dermatitis* **33**, 439-440 (1995).
242. AKIMOTO, K., *Studies On Local Anesthetic Effect of Phenol Derivatives. III. Cresatin and Thymol*, *Shigaku* **73**, 1315-1322 (1985).
243. MANALANG, C., *Ankylostomiasis, Comparative Efficiency of Carbon Tetrachloride, Chenopodium and Thymol in the Treatment of Hookworm Infection*, *J. Trop. Med.* **29**, 101-103 (1926).
244. OELKERS, H. A., and RATHIE, W., *The Mode of Action of Anthelmintics*, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **198**, 317-337 (1941).
245. LE BOURHIS, B., and SOENEN, A. M., *Psychotropic Action of Some Aroma Compounds Used in Food*, *Food Cosmet. Toxicol.* **11**, 1-9 (1973).
246. ABIVARDI, C., *Studies On The Effects of Nine Iranian Anthelmintic Plant Extracts On The Root-Knot Nematode Meloidogyne incognita*, *Phytopathol. Z.* **71**, 300-308 (1971).
247. EVANS, B. K., JAMES, K. C., and LUSCOMBE, D. K, *Quantitative Structure-Activity Relationships and Carminative Activity*, *J. Pharm. Sci.* **67**, 277- 283(1978).
248. MUIRHEAD, A. L., and GERALD, H. F, *The Action of Certain Volatile Oils on Isolated Intestinal Segments*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **8**, 253-260 (1916).
249. JOHNSON, H. A., ROGERS, L. L., ALKIRE, M. L., MC CLOUD, T. G., and McLAUGHLIN, J. L., *Bioactive Monoterpenes from Monardia fistulosa (Lamiaceae)*, *Nat. Prod. Lett.* **11**, 241-250 (1998).
250. SOLIS, P. N., WRIGHT, C. W., ANDERSON, M. M., GUPTA, M. P., and PHILLIPSON, J. D, *A Microwell Cytotoxicity Assay Using Artemia salina (Brine Shrimp)*, *Planta Med.* **59**, 250-251 (1993).
251. MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., and McLAUGHLIN, J. L, *Brine Shrimp, A Convenient General Biossay For Active Plant Constituents*, *Planta Med.* **45**, 31-34 (1982).
252. CRANCE, J. M., GRATIER, D., GUIMET, J., and JOUAN, A, *Inhibition of Sandfly Fever Sicilian Virus (Phlebovirus) Replication in vitro by Antiviral Compounds*, *Res. Virol.* **148**, 353-365 (1997).
253. ARUOMA, Q. I, SPENCER, J. P. E., ROSSI, R., AESCHBACH, R., KHAN, A., MAHMOOD, N., MUNOZ, A., MURCIA, A., BUTLER, J., and HALLIWELL, B, *An Evaluation of The Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provincial Herbs*, *Food Chem. Toxicol.* **34**, 449-456 (1996).
254. BOURNE, K., BOURNE, N., REISING, S. F., and STANBERRY, L. R, *Plant Products As Topical Microbicide Candidates., Assessment of In Vitro and In Vivo Activity Against Herpes Simplex Virus Type 2*, *Antiviral Res.* **4**, 219-226 (1999).

255. CRANCE, J. M., BIZIAGOS, E., PASSAGOT, J., VAN CUYCK-GANDRE, H., and DELOINCE, R., *Inhibition of Hepatitis A Virus Replication In Vitro by Antiviral Compounds*, J. Med. Virol. **31**, 155-160 (1990).
256. YOSHIDA, T., MORI, K., and HE, G. X., *Inulavosin, A New Thymol Dimer With Piscicidal Activity From *Imula nervosa**, Heterocycles **41**, 1923-1926 (1995).
257. PERRY, W. F., and BOYD, E. M., *A Method For Studying Expectorant Action in Animals By Direct Measurement of the Output of Respiratory Tract Fluids*, J. Pharmacol. Exp. Ther. **73**, 65-70 (1941).
258. PARELLADA, J., and GUINEA, M., *Search For New Non-Peptidic Serine Proteinase Inhibitors of Plant Origin*, Pharm. Pharmacol. Lett. **5**, 66-69 (1995).
259. KAR, A.B., MUNDLE, M., and ROY, A. C., *Effect of Some Aromatic Compounds On The Response of Genital Organs of Immature Female Rats To Exogenous Gonadotrophic Hormone*, J. Sci. Ind. Res. C **19**, 264-270 (1960).
260. MANABE, A., NAKAYAMA, S., and SAKAMOTO, K., *Effects of Essential Oils on Erythrocytes and Hepatocytes From Rats and Dipalmitoyl Phosphatidylcholine-Liposomes*, Jap. J. Pharmacol. **44**, 77-84 (1987).
261. KAMIMURA, Y., *Quantitative Study of Histamine Release by Chemical Substances, Using Minced Tissue of Guinea Pig Lung*, Nippon Yakurigaku Zasshi **53**, 836-880 (1957).
262. AFTAB, K., ATTA-UR-RAHMAN., and USMANGHANI, K., *Blood Pressure Lowering Action of Active Principle From *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague*, Phytomedicine **2**, 35-40 (1995).
263. SCHEARER, W. R., *Components of Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare*) That Repel Colorado Potato Beetles (*Leptinotarsa decemlineata*)*, J. Nat. Prod. **47**, 964-969 (1984).
264. HARTZELL, A., and WILCOXON, F., *A Survey of Plant Products For Insecticidal Properties*, Contrib. Boyce. Thompson. Inst. **12**, 127-141 (1941).
265. VIANA, G. S. B., MATOS, F. F., MATOS, F. J. A., SILVEIRA, E. R., CRAVEIRO, A. A., and ALENCAR, J. W., *Pharmacological Effects of Thymol and Its Acetate, Butyrate, and Benzoate Esters*, Cienc. Cult. (Sao Paulo) Suppl. **33**, 104-106 (1981).
266. PARELLADA, J., GUINEA, M., *Evaluation of Plant Products As Potential Inhibitors of Collagen Breakdown*, Phytother. Res. **10**, 59-61 (1996).
267. KITAHARA, K., MATSUMOTO, Y., UEDA, H., UEOKA, R., *A Remarkable Antioxidation Effect of Natural Phenol Derivatives on the Autoxidation of Gamma-Irradiated Methyl Linoleate*, Chem. Pharm. Bull. **40**, 2208-2209 (1992).

268. STADLER, R. H., MARKOVIC, J., and TURESKY, R. J., *In Vitro Anti- and Pro-Oxidative Effects of Natural Polyphenols*, Biol. Trace Element. Res. **47**, 299-305 (1995).
269. ALAM, K., NAGI, M. N., BABARY, O. A., AL-SHABANAH, O. A., AL-RIKABI, A. C., and AL-BEKAIRI, A. M., *The Protective Action of Thymol Against Carbon Tetracholide Hepatotoxicity in Mice*, Pharmacol. Res. **40**, 159-163 (1999).
270. SOLIMAN, K. F. A., and MAZZIO, E. A., *In Vitro Attenuation of Nitric Oxide Production In C6 Astrocyte Cell Culture by Various Dietary Compounds*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **218**, 390-397 (1998).
271. GAO, S., and SINGH, J., J., *Mechanism of Transdermal Transport of 5-Fluorouracil by Terpenes, Carvone, 1,8-Cineole and Thymol*, Int. J. Pharmaceut. **154**, 67-77 (1997).
272. ARELLANO, A., SANTOYO, S., MARTIN, C., and YGARTUA, P., *Enhancing Effect of Terpenes on the In Vitro Percutaneous Absorption of Diclofenac Sodium*, Int. J. Pharmaceut. **130**, 141-145 (1996).
273. AKEJU, M. O., McCHESNEY, J. D., and WILLIAMSON, J. S., *Effect of Polyphenolic Compounds On A Lambda-Prophage Induction Assay*, Nat. Prod. Lett. **11**, 201-205 (1998).
274. SUZUKI, Y., SUGIYAMA, K., and FURUTA, H., *Eugenol-Mediated Superoxide Generation and Cytotoxicity in Guinea Pig Neutrophils*, Jap. J. Pharmacol. **39**, 381-386 (1985).
275. GULLAND, J. M., *Spermicidal Activity of Quinones and Quinols*, Biochem. J. **26**, 32-45 (1932).
276. BUCHBAUER, G., JIROVETZ, L., JAGER, W., PLANK, C., and DIETRICH, H., *Fragrance Compounds and Essential Oils With Sedative Effects Upon Inhalation*, J. Pharm. Sci. **82**, 660-664 (1993).
277. SCHENKEL, B., and VORHERR, H., *Non-Prescription Drugs During Pregnancy, Potential Teratogenic and Toxic Effects Upon The Embryo and Fetus*, J. Reprod. Med. **12**, 27-45 (1974).
278. SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS, T., and ARSENAKIS, M., *Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils*, J Agr. Food Chem. **43**, 2384-2388 (1995).
279. VIOLLON, C., LEGER, D., and CHAUMONT, J. P., *In Vitro Antagonist Activities of Natural Volatile Compounds Towards Vaginal Flora*, Plant Med. Phytother. **26** 17-22 (1993).
280. ELA, M. A., EL-SHAER, N. S., and GHANEM, N. B., *Antimicrobial Evaluation and Chromatographic Analysis of Some Essential and Fixed Oils*, Pharmazie **51**, 993-994 (1996).

281. UTRILLA, M. P., NAVARRO, M. C., JIMENEZ, J., MONTILLA, M. P., and MARTIN, A., *Santolindiacetylene, A Polyacetylene Derivative Isolated from the Essential Oil of Santolina canescens*, J. Nat. Prod. **58**, 1749-1752 (1995).
282. INDERJIT, M. M., and NISHIMURA, H., *On The Allelopathic Potential of Certain Terpenoids, Phenolics, and their Mixtures, and their Recovery from Soil*, Can. J. Bot. **75**, 888-891 (1997).
283. KALSI, P. S., CHHABRA, B. R., and SINGH, O. S., *Conjugated Terpenoid Ketones, A New Group of Plant Growth Regulators*, Experientia **35**, 481-482 (1979).
284. SHARMA, R. N., and SAXENA, K. N., *Orientation and Developmental Inhibition In The Housefly By Certain Terpenoids*, J. Med. Entomol. **11**, 617- 622 (1974).
285. BESTMANN, H. J., CLABEN, B., KOBOLD, U., VOSTROWSKY, O., KLINGAUF, F., STROBEL, H., and KNOBLOCH, K., *Herbal Insecticides: The Essential Oil From Leaves Of Chrysanthemum Balsamita L. Insecticidal Activity and Composition*, Z. Naturforsch. Ser. C **39**, 543-547 (1984).
286. IMAIZUMI, K., HANADA, K., MAWATARI, K., and SUGANO, M., *Effect of Essential Oils on the Concentration of Serum Lipids and Apolipoproteins in Rats*, Agr. Biol. Chem. **49**, 2795-2796 (1985).
287. ANON, *Gras Status of Foods and Food Additives*, Fed. Regist. **41**, 38644- (1976).
288. NAWROT, J., *Principles For Grain Weevil (Sitophilus granarius L.) (Coleoptera, Curculionidae) Control With Use of Natural Chemical Compounds Affecting the Behavior of Beetles*, Pr. Nauk. Inst. Ochr. Rosl. **24**, 173-197 (1983).
289. ROCKWELL, P., and RAW, I., *A Mutagenic Screening of Various Herbs, Spices, and Food Additives*, Nutr. Cancer **1**, 10-15 (1979).
290. MINOSASA, Y., and MIYAWAKI, H., *Hair Tonics Containing Piperitenone, Isopiperitenone, and/or Carvone*, Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho-62 273,909, 1988.
291. MADYASTHA, P., MOORTHY, B., VAIDYANATHAN, C. S., and MADYASTHA, K. M., *In Vivo and In Vitro Destruction of Rat Liver Cytochrome P-450 By A Monoterpene Ketone, Pulegone*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **128**, 921-927 (1985).
292. SMITH, R. V., and ROSAZZA, J. P., *Microbial Models of Mammalian Metabolism*, J. Pharm. Sci. **64**, 1737-59 (1975).
293. CLARK, A. M., McCHESNEY, J. D., and HUFFORD, C. D., *The Use of Microorganisms for the Study of Drug Metabolism*, Med. Res. Rev. **5**, 231-253 (1985).
294. AZERAD, R., *Microbial Models for Drug Metabolism*, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **63**, 169-218 (1999).

295. ELMARAKBY, S. A., CLARK, A. M., BAKER, J. K., and HUFFORD, C. D., *Microbial Metabolism of Bornaprine, 3-(Diethylamino)propyl 2-Phenylbicyclo (2.2.1)heptane-2-carboxylate*, J. Pharm. Sci. **75**, 614-618 (1986).
296. MOUSSA, C., HOUZIAUX, P., DANDREE, B., and AZERAD, R., *Microbial Models of Mammalian Metabolism: Fungal Metabolism of Phenolic and Non-phenolic p-Cymene Related Drugs and Prodrugs. I. Metabolites of Thymoxamine*, Drug Met. Dispos. **25**, 301-310 (1997).
297. MOUSSA, C., HOUZIAUX, P., DANDREE, B., and AZERAD, R., *Microbial Models of Mammalian Metabolism: Fungal Metabolism of Phenolic and Non-phenolic p-Cymene Related Drugs and Prodrugs. II. Metabolites of Nonphenolic Derivatives*, Drug Met. Dispos. **25**, 311-316 (1997).
298. ROSAZZA, J. P. N., and SMITH, R. V., *Microbial Models for Drug Metabolism*, Adv. Appl. Microbiol. **25**, 169-208 (1979).
299. LEE, I. S., ELSOHLY, and H. N., HUFFORD, C. D., *Microbial Metabolism Studies of the Antimalarial Drug Arteether*, J. Pharm. Res. **7**, 199-203 (1990).
300. DE-OLIVEIRA, A. C. A. X., FIDALGO-NETO, A. A., and PAUMGARTTEN, F. J. R., *In Vitro Inhibition of Liver Monooxygenases by β -Ionone, 1,8-Cineole, (-)-Menthol and Terpineol*, Toxicol. **135**, 33-41 (1999).
301. KHOJASTEH-BAKHT, S. C., CHEN, L., KOENIGS L. L., PETER, R. M., and NELSON, D. S., *Metabolism of (R)-(+)-Pulegone and (R)-(+)-Menthofuran by Human Liver Cytochrome P-450s: Evidence for Formation of a Furan Epoxide*, Drug Met. Dispos. **27**, 574-580 (1999).
302. ASAKAWA, Y., TOYOTA, M., and ISHIDA, T., *Biotransformation of 1,4-Cineole, a Monoterpene Ether*, Xenobiotica **18**, 1129-1134 (1988).
303. ORIHARA, Y., FURUYA, T., HASHIMOTO, N., DEGUCHI, Y., TOKORO, K., and KANISAWA, T., *Biotransformation of Isoeugenol and Eugenol by Cultured Cells of Eucalyptus perriniana*, Phytochem. **31**, 827-831 (1992).
304. HIRATA, T., MURAKAMI, S., OGIHARA, K., and SUGA, T., *Volatile Monoterpenoid Constituents of The Plantlets of Mentha spicata Produced by Shoot Tip Culture*, Phytochem. **29**, 493-495 (1990).
305. KARP, F., HARRIS, J. L., and CROTEAU, R., *Metabolism of Monoterpenes: Demonstration of the Hydroxylation of (+)-Sabinene or (+)-cis-Sabinol by an Enzyme Preparation from Sage (Salvia officinalis) Leaves*, Arc. Biochem. Biophys. **256**, 179-19 (1998).
306. HAMADA, H., MIYAMOTO, Y., NAKAJIMA, N., and FURUYA, T., *Highly Selective Transformation by Plant Catalysts*, J. Mol. Catal. B: Enzym. **5**, 187-189 (1998).

307. HARTMAN, D. A., PONTONES, M. E., KLOSS, V. F., JR. CURLEY, R.W., and ROBERTSON, L. W., *Models of Retinoid Metabolism: Microbial Biotransformation of α -Inone and β -Inone*, J. Nat. Prod. **51**, 947-953 (1988).
308. VAN DER WERF, M. J., DE BONT, J. A. M., and LEAK, D. J., *Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes*, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **55**, 148-177 (1997).
309. KIESLICH, K., ABRAHAM, W.R., STUMPF, B., THEDE, B., and WASHAUSEN, P., *Transformations of Terpenoids*, In: *Progress in Essential Oil Res., Proceeding of the International Symposium on Essential Oils*, Brunke, E. J., (Ed.), pp. 367-394, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1986.
310. BOUWMEESTER, H. J., KONNINGS M. C. J. M., GERSHENZON, J., KARP, F., and CROTEAU, R., *Cytochrome P-450 Dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in Fruits of Caraway (*Carum carvi*)*, Phytochem. **50**, 243-248 (1999).
311. BOUWMEESTER, H.J., DAVIES, J. A. R., and TOXOPEUS, H., *Enantiomeric Composition of Carvone, Limonene and Carveols in Seeds of Dill and Annual and Biennial Caraway Varieties*, J. Agr. Food Chem. **43**, 3057-3064 (1995).
312. http://umbbd.ahc.umn.edu/pcy/pcy_map.html/ (20.10.2000)
313. EATON, R. W., *p-Cymene Catabolic Pathway in Pseudomonas putida F1: Cloning and Characterization of DNA Encoding Conversion of p-Cymene to p-Cumate*, J. Bacteriol. **179**, 3171-3180 (1997).
314. HOCQUEMILLER, R., CORTES, D., ARAMANGO, G. J., MYINT, S. H., CAVE, A., ANGELO, A., MUNOZ, V., FOURNET, A., *Isolement et Synthèse de L'Espintanol, nouveau Monoterpene Antiparasitaire*, J. Nat. Prod. **54**, 445-452 (1991).
315. NOMA, Y., and ASAKAWA, Y., *Aspergillus ssp.: Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds*, In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants*, Bajaj, Y. P. S., (Ed.), pp. 62-95, Vol. 33, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
316. NOMA, Y., AKEHI, E., MIKI, N., and ASAKAWA, Y., *Biotransformation of Terpene Aldehydes, Aromatic Aldehydes and Related Compounds by Dunaliella tertiolecta*, Phytochem. **31**, 515-517 (1992).
317. NOMA, Y., and ASAKAWA, Y., *Euglena gracilis Z: Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds*, In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants*, Bajaj, Y. P. S. (Ed.), pp.194-237, Vol. 41, Springer-Verlag Berlin, 1998.
318. NOMA, Y. and ASAKAWA, Y., *Dunaliella tertiolecta (Green Microalga): Culture and Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds*, In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants*, Bajaj, Y. P. S. (Ed.), pp.185-202, Vol. 28, Springer-Verlag Berlin, 1994.

319. NISHIMURA, H., HIRAMOTO, S., MIZUTANI, J., NOMA, Y., FURUSAKI, A., and MATSUMOTO, T., *Structure and Biological Activity of Bottonospicatol, A Novel Monoterpene Produced by Microbial Transformation of (-)-cis-Carveol*, Agr. Bio. Chem. **47**, 2697-99 (1983).
320. NOMA, Y., NISHIMURA, H., HIRAMOTO, S., IWAMI, M., and TATSUMI, C., *A New Compound, (4R, 6R)-(+)-6,8-Oxidomenth-1-en-9-ol Produced by Microbial Conversion of (-)-cis-Carveol*, Agr. Bio. Chem. **46**, 2871-72 (1982).
321. NOMA, Y., *Conversion of the Analogues of Carvone and Dihydrocarvone by Pseudomonas ovalis, Strain 6-1*, Agr. Bio. Chem. **51**, 463-470, 1977.
322. NOMA, Y., and ASAKAWA, Y., *Metabolic Pathways of Monoterpenoids by Microorganisms*, Curr. Med. Chem. (baskida).
323. PAWLISZYN, J., *Solid Phase Microextraction- Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
324. NIEDZIELLA, S., RUDKIN, S., and COOKE, M., *Evidence for Selectivity of Absorption of Volatile Organic Compounds by Polydimethylsiloxane Solid-Phase Microextraction Fibre*, J. Chromatogr. A **885**, 457-464 (2000).
325. ABALOS, M., BAYONA, J.M., and PAWLISZYN, J., *Development of Headspace Solid-Phase Microextraction Procedure for the Determination of Free Volatile Fatty acids in Waste Waters*, J. Chromatogr. A **873**, 107-115 (2000).
326. WERKHOFF, P., GÜNKERT, M., KRAMMER, G., SOMMER, H., and KAULEN, J., *Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits*, J. Agr. Food Chem. **46**, 1076-1093 (1998).
327. WAN, X. M., STEVENSON, R. J., CHEN, X. D., and MELTON, D. L., *Application of Headspace-Solid-Phase Microextraction to Volatile Flavour Profile Development During Storage and Ripening of Kiwifruit*, Food Res. Int. **32**, 175-183 (1999).
328. PANIANDY, J. C., CHANE-MING, J., and PIERIBATTESITI, J.-C., *Chemical Composition of the Essential Oil and Headspace Solid-Phase Microextraction of the Guava Fruit (Psidium guajava L.)*, J. Essent. Oil Res. **12**, 153-158 (2000).
329. AUGUSTO, F., VALENTE, A. L. P., TADA, E. D. S., and RIVELLINO, S. R., *Screening of Brazilian Fruit Aromas Using SPME-GC-MS*, J. Chromatogr. A **873**, 117-127 (2000).
330. NILSON, T., LARSEN, T.O., MONTANARELLA, L., and MADSEN, J. O., *Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Volatile Metabolites Emitted by Penicillium Species*, J. Microbiol. Methods **25**, 245-255 (1996).
331. VERGNAIS, L., MASSON, F., MONTEL, M. C., BERDAGUE, J.L., and TALON, R., *Evaluation of Solid-Phase Microextraction for Analysis of Volatile Metabolites Produced by Staphylococci*, J. Agr. Food Chem. **46**, 228-234 (1998).

332. FUCHS, S., GROSS, A., BECK, T., and MOSANDL, A., *Monoterpene biosynthesis in Mentha x piperita L.: Bioconversion of Piperitone and Piperitenone*, Flav. Fragr. J. **15**, 84-90 (2000).
333. MOEDER, M., SCHRADER, S., WINKLER, M., and POPP, P., *Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography-Mass spectrometry of Biologically Active Substances in Water Samples*, J. Chromatogr.: A **873**, 95-106,2000
334. THEODORIDIS, G., KOSTER, E. H. M., and DE JONG, G. J., *Solid Phase Microextraction for the Analysis of Biological Samples*, J. Chromatogr. B: Biomed. **745**, 49-82 (2000).
335. JOB, C., and BLASS, E., *Probleme bei der Flüssig-flüssig Extraktion Extrazellulärer Produkte Direkt Aus der Fermenterbrühe*, Fat Sci. Technol. **92**, 281-287 (1990).
336. LYE, G.J., and WOODLEY, J. M., *Application of in Situ Product Removal Techniques to Biocatalytic Processes*, Trends Biotechnol. **17**, 395-402 (1999).
337. FERREIRA JORGE, R. M., and LIVINGSTON, A. G., *A Novel Method for Characterization of Microbial Growth Kinetics on Volatile Organic Compounds*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**, 174-178 (1999).
338. RAHMAN, A., YAQOUB, M., FAROOQ, A., ANJUM, S., ASIF, F., and CHOUDHARY, M. I., *Fungal Transformation of (1R, 2S, 5R)-(-)-Menthol by Cephalosporium aphidicola*, J. Nat. Prod. **61**, 1340-1342 (1998).
339. NOMA, Y. ile kişisel görüşme (Mayıs 2000)
340. HARWOOD, L. M., and MOODY, C. J., *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1989.
341. HOROWITZ, G., *Undergraduate Separations Utilizing Flash Chromatography*, J. Chem. Educ. **77**, 263-264 (2000).
342. WAASMAIER, D., and KIRFEL, A., *Analytical Scattering-factor Functions for Free Atoms and Ions*, Acta Crystallogr. A **51**, 416-431 (1995).
343. KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN, W. C., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, pp 785-856, Lippincott-Raven Pub., 1997.
344. PAXTON, J. D. *Methods in Plant Biochemistry*, Hostettmann, K. (Ed.), Vol. 6, pp. 37-53, Academic Press, London, 1991.
345. ZUMPE, P., *Isolierung Antiviraler Stoffe*, PhD Thesis, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt, 1979.
346. DHAWAN, B. N., and SRIMAL, R. C., *Laboratory Manual for Pharmacological Evaluation of Natural Products*, UNIDO and ICS Publ., 1998.
347. PATWARDHAN, S. A., and GUPTA, A.S., *Aromatic Monoterpenes from Lavandula gibsonii*, Phytochem. **22**, 2080-2081 (1983).

348. CARMAN, R. M., and VAN DONGEN, J. M. A. M., *The Indans Formed by Dimerization of some Aromatic Terpenoids*, Aust. J. Chem. **39**, 817-20 (1986).
349. BOURGEOIS, G., and LALANDE, R., *Autoxydation de Derivatives du Paracymene Influence de la Substitution en 2 sur la Facilite D'oxydation Respective des Groupes Methyle et Isopropyle*, Bull. Soc. Chim. Fr. **11**, 4324-4334 (1972).
350. SATO, K., BANDO, T., SHINDO, M., and SHISHIDO, K., *Enantiocontrolled Total Synthesis of (-)-Xanthorrhizol*, Heterocycles **50**, 11-15 (1999).
351. BOHLMANN, F., MAHANTA, P. K., JAKUPOVIC, J., RASTOGI, R. C., NATU, A. A., *New Sesquiterpene Lactones from Imula Species*, Phytochem. **17**, 1156-1172 (1978).
352. SANGHVI, Y. S., and RAO, A. S., *Synthesis of Two Naturally Occurring Isobutyrate Related to Thymol*, Indian J. Chem., Sect. B **19**, 952-954 (1980).
353. COLEMAN, E. C., HO, C.-T., and CHANG, S. S., *Isolation and Identification of Volatile Compounds from Baked Potatoes*, J. Agric. Food Chem. **29**, 42-48 (1981).
354. TAHARA, T., and SAKUDA, Y., *NMR, IR and MS Spectra of Fourteen 8-p-Menthene-diols*, Bulletin of Kochi Women's University, Nat. Sci. **24**, 1-14 (1976).
355. NOMA, Y., *On the Formation of Dihydrocarvones, Dihydrocarveols, Carveols and Carvotanacetone, When Carvone is Used as the Substrate*, Agric. Biol. Chem. **42**, 27-50 (1978).
356. DEMİRCİ, F., KIRIMER, N., DEMİRCİ, B., NOMA, Y., and BAŞER, K. H. C., *Screening of Biotransformation Products of Carvone Enantiomers by Headspace-SPME/GC-MS*, Z. Naturforsch. C (baskıda).
357. BAŞER, K. H. C., ÖZEK, T. TÜRMEK, G., and SEZİK, *Composition of the Essential Oils of Turkish Origanum Species with Commercial Importance*, J. Essent. Oil Res. **5**, 619-623 (1993).
358. BAŞER, K. H. C., KIRIMER, N., and TÜRMEK, G., *Essential Oils of the Origanum Species of Turkey*, 30th International Symposium on Essential Oils (ISEO), 5-8 September, Leipzig, 1999.
359. BAŞER, K. H. C., *The Turkish Oregano*, 3rd MEDUSA Workshop, 27-28 April, Coimbra, 1998.
360. HO, T.-L., *Enantioselective Synthesis: Natural Products from Chiral Terpenes*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992.