

**BAZI DOĞAL AROMATİK MADDELERİN MİKROBİYAL
TRANSFORMASYONU ve BİYOLOJİK ETKİLERİ**

Gökalp İşcan

Doktora Tezi

**BAZI DOĞAL AROMATİK MADDELERİN
MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU
ve BİYOLOJİK ETKİLERİ**

Gökalp İşcan

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Ocak 2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

Jüri ve Enstitü Onayı

Gökalp İşcan'ın "Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri" başlıklı, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 08.01.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Neş'e Kırımer Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Fatih Demirci Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Kadriye Benkli Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. İsmail Kıran Osmangazi Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Yasemin Yazan

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Gökalp İşcan
Doğum tarihi ve yeri :1979, Eskişehir
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir
0222 3350580 (3709 dahili)
giscan@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Cumhuriyet İlkokulu (Eskişehir, 1989)
Ortaokul : Atatürk Ortaokulu (Eskişehir, 1991)
Lise : Cumhuriyet Lisesi (Eskişehir, 1995)
Lisans : Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (1999)
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Genel Biyoloji-Mikrobiyoloji (2002)
Yabancı dil : İngilizce
Mesleki Deneyim : Araştırma Görevlisi (1999-)

Yayınlar

Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1) Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z.A., Demirci, F., İşcan, G., Studies on Hydrazone Derivatives as Antifungal Agents, J. Enzyme Inhib. Med. Ch., 23, 470-475 (2008).
- 2) Özek, G., Özek, T., İşcan, G., Başer, K.H.C. Duran, A., Hamzaoğlu E., Composition and Antimicrobial Activity of the Oils of *Ferula szowitsiana* DC. from Turkey, J. Essent. Oil Res., 20, 186-190 (2008).
- 3) Kırimer, N., Demirci, B., İşcan, G., Başer, K.H.C., Duman, H., Composition of the Essential Oils of two *Sideritis* Species from Turkey and Antimicrobial Activity, Chem. Nat. Comp., 44, 121-123 (2008).

- 4) Özek, G., Özek, T., İşcan, G., Başer, K.H.C., Hamzaoğlu, E., Duran, A. Comparison of Hydrodistillation and Microdistillation Methods for the Analysis of Fruit Volatiles of *Prangos pabularia* Lindl., and Evaluation of its Antimicrobial Activity, *S. Afr. J. Bot.*, 73, 563-569 (2007).
- 5) Kse, Y.B., İşcan, G., elik, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Centaurea aladagensis* Wagenitz, *Fitoterapia*, 78, 253-254 (2007).
- 6) Özek, G., Özek, T., İşcan, G., Başer, K.H.C., Hamzaoğlu, E., Duran, A., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) Heywood subsp. *orientale* Grierson, *J. Essent. Oil Res.*, 19, 392-395 (2007).
- 7) Krkuoğlu, M., İşcan, G., Özek, T., Başer, K.H.C., Alan, S., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Calamintha betulifolia* Boiss. et Bal., *J. Essent. Oil Res.*, 19, 285-287 (2007).
- 8) İşcan, G., Kırimer, N., Krkuoğlu, M., Arabacı, T., Kpeli, E., K.H.C. Başer, Biological Activity and Composition of the Essential Oils of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. subsp. *aleppica*, *J. Agri. Food Chem.*, 54, 170-173 (2006).
- 9) Başer, K. H. C., Demirci, B., İşcan, G., Asakawa, Y., Hashimoto, T., Noma, Y., Isofaurione, a New Constituent in the Essential Oil of *Anthemis aciphylla* Boiss. var. *discoidea* Boiss., *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2), 222-225 (2006).
- 10) Krkuoğlu, M., Başer, K.H.C., İşcan, G., Malyer, H., Kaynak, G., Composition and Anticandidal Activity of the Essential oil of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss., *Flavour Fragr. J.*, 21, 68-71 (2006).
- 11) İşcan, G., Kırimer, N., Krkuoğlu, M., Başer, K.H.C., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* Boiss. & Bal. and *Sideritis bilgerana* P.H. Davis" *Chem. Nat. Comp.*, 6, 679 (2005).
- 12) İşcan, G., Özek, T., Özek, G., Duran, A., Başer, K.H.C., Anticandidal Activity of Three *Heracleum* Essential Oils, *Chem. Nat. Comp.*, 40 (6) 544-547 (2004).
- 13) Kaplancıklı Z.A., Turan-Zitouni G., Ravial G., İşcan G., "Synthesis of some Dithiocarbamate Derivatives and their Antimicrobial Activity", *Phosphorus Sulfur*. 179 (7): 1449-1454 (2004).
- 14) Benkli K, Demirayak S, Gndoğdu-Karaburun D, Kiraz N, İşcan G, Uucu ; Synthesis and Antimicrobial Activities of some Imidazole Substituted Indoles *Indian J. Chem. B*, 43 (1), 174-179 (2004).
- 15) İşcan, G., Demirci, F., Krkuoğlu, M., Kıvan, M., Başer, K.H.C., The Bioactive Essential Oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt, *Z. Naturforsch [C]*, 58, 195-200 (2003).
- 16) İşcan G., Kırimer N., Krkuoğlu M., Başer K.H.C., Demirci F., Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3943-3946 (2002)

17) Demirci F., İşcan G., Güven K., Kırımer N., Demirci B., Başer K.H.C., Antimicrobial Activities of *Ferulago* Essential Oils, Z. Naturforsch. 55c, 886-889 (2000).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster ve Sözlü Bildiriler

1) Kaplancıklı, Z.A., Turan-Zitouni, G., Özdemir, A., Revial, G., Demirci, F., İşcan, G., Synthesis and Anticandidal Activity of Some Imidazopyridine Derivatives, Drugs of the Future, 32, A, 125, 2007.

2) Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z.A., Demirci, F., İşcan, G., Synthesis and Antifungal Activity of Some Thiazolyhydrazone Derivatives, Drugs of the Future, 32, A, 125, 2007.

3) Demirci, F., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Anticandidal Activity of Essential Oils from Commercial Herbal Spices from Turkey, International Symposium. 7th Plant Life of South West Asia (7th PLoSWA), 25-27 June 2007, Eskişehir, Türkiye.

4) Özek, G. Özek, T., İşcan, G., Başer, K.H.C., Hamzaoğlu, E., Duran, A., Comparison of Hydrodistillation and Microdistillation Methods for the Analysis of Fruit Volatiles of *Prangos pabularia* Lindl. from Turkey and Evaluation of its Antimicrobial Activity, 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 2-6 September 2007, Graz, Austria

5) Kürkçüoğlu M., İşcan, G., Demirci, F., Malyer, H., Erdoğan, E., Başer, K.H.C. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Ferulago confusa* 38th International Symposium on Essential Oils (38th ISEO), 9-12 September 2007, Graz, Austria

6) İşcan G., Demirci, F., Kürkçüoğlu, M., T. Arabacı, K.H.C. Başer, Essential oil Composition and Antimicrobial Activities of three *Achillea* species, 38th International Symposium on Essential Oils (38th ISEO), 9-12 September 2007, Graz, Austria.

7) Demirci, F., İşcan, G., Kırımer, N., Başer, K.H.C., Microbial Transformation of Aromatic Compounds, 7 th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (7th SCNC), 16-18 October 2007, Tashkent, Uzbekistan.

8) Altıntaş, A. İşcan, G., Koşar M., Kırımer, N., Başer, K.H.C., Biological Activities of *Lycium barbarum* and *L. ruthenicum* (Solanaceae) Fruits, 7 th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (7th SCNC), 16-18 October 2007, Tashkent, Uzbekistan.

9) İşcan, G., Demirci, F., Kırımer, N., Kürkçüoğlu, M., Arabacı, T., Başer, K.H.C., Essential Oil Composition and Biological Activities of some *Achillea* Species Growing in Turkey, 7 th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (7th SCNC), 16-18 October 2007, Tashkent, Uzbekistan.

10) Kırımer, N., Demirci, B., İşcan, G., Başer, K.H.C., Duman, H., Antimicrobial Activity and Composition of the Essential Oils of two *Sideritis* Species from Turkey, 37th International Symposium on Essential Oils (37th ISEO), September 10-13, 2006, Grasse-Opio, France.

- 11) Kürkçüoğlu, M., Alan, S., İşcan, G., Özek, T., Başer, K.H.C., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Calamintha betulifolia* Boiss. & Bal. 37th International Symposium on Essential Oils (37th ISEO), September 10-13, 2006, Grasse-Opio, France.
- 12) Köse, Y.B., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Çelik, S., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Centaurea aladagensis* Wagenitz (37th ISEO), September 10-13, 2006, Grasse-Opio, France.
- 13) Özek, G., Özek, T., İşcan G., Başer, K.H.C., Hamzaoğlu, E., Duran, A., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) Heywood subsp. orientale Grierson(37th ISEO), September 10-13, 2006, Grasse-Opio, France.
- 14) İşcan, G., Kırımer, N., Kürkçüoğlu, M. and Başer, K.H.C., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* Boiss. & Bal. and *Sideritis bilgerana* P.H. Davis" 36th International Symposium on Essential Oils 36.ISEO, 4-7 Eylül 2005, Budapest, Hungary.
- 15) İşcan, G., Kırımer, N., Kürkçüoğlu, M., Küpeli, E., Arabacı, T., Başer, K.H.C., Biological Activity and Composition of the Essential Oils of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. subsp. *aleppica*, 6th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC-2005), 28-29 June 2005, Gazi Üniversitesi, Ankara, Turkey.
- 16) İşcan, G., Özek, T., Özek, G., Duran, A., Başer, K.H.C., Essential Oils of three Species of *Heracleum*. Anticandidal activity, 35.ISEO, 29 Eylül-2 Ekim 2004, Giardini Naxos, Messina, Italy.
- 17) Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., İşcan, G., Malyer, H., Kaynak, G., Composition and Anticandidal Activity of the Essential Oil of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss, 35th International Symposium on Essential Oils (35. ISEO), September 29-Ekim 2, 2004, Giardini Naxos, Messina, Italya.
- 18) İşcan, G., Demirci, F., Kürkçüoğlu, M., Kıvanç, M., Başer, K.H.C., The Bioactive Essential Oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt, 33.ISEO, 4-7 Eylül 2002, Lizbon, Portekiz.
- 19) İşcan G., Kırımer N., Kürkçüoğlu M., Başer K.H.C., Demirci F., Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* essential oils, 9. International Symposium of Microbial Ecology (ISME-9), 26-31 Ağustos 2001, Amsterdam, Hollanda.
- 20) Demirci, F., İşcan, G., Güven, K., Kırımer, N., Demirci, B., Başer, K.H.C., Antimicrobial Activities of *Ferulago* Essential Oils, 6th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-6), 27-29 June 2000, Ankara, Turkey.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Kıvanç M., Yılmaz N. ve İşcan G., "Eskişehir'de Tüketime Sunulan Bazı Çikolatalı Gofretlerin Halk Sağlığı Yönünden Değerlendirilmesi" Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. 1, 191-196., 01/06/2001.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiriler

1) Berber, H., Demirci, F., İşcan, G., Başer, K.H.C., *p*-Simen, Timol ve Karvakrol'un Klorofil Türevi Katalizörler ile Timokinona Dönüşümü (*Transformation of p-cymene, Thymol and Carvacrol to Thymoquinone via Chlorophyl Based Catalysts*) 17. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (17. BİHAT), 26-29 Ekim 2007, Kuşadası.

2) Kırimer N., İşcan, G., Demirci, F., Demirci, B., Başer, K.H.C., Limonen-1,2-diol'un Mikrobiyal Transformasyonla Üretimi ve Antimikrobiyal Etkileri (*Production of limonen-1,2-diol by Microbial Transformation and its Antimicrobial Activities*) 17. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (17.BİHAT), 26-29 Ekim 2007, Kuşadası.

3) İşcan, G., Demirci, B., Demirci, F., Başer, K.H.C., *Geotrichum fragrans*'ın Tepe Boşluğu-Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi ile Uçucu Bileşiklerinin Belirlenmesi (*Determination of the volatiles of Geotrichum fragrans by head-space solid phase microextraction technique*) 17. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (17. BİHAT), 26-29 Ekim 2007, Kuşadası.

4) Özek, G., Özek T., İşcan, G., Başer, K.H.C., Duran, A., Hamzaoglu, E., *Anthriscus kotschy* Fenzl ex Boiss. et Bal. Uçucu Yağının Bileşimi ve Antimikrobiyal Aktivitesi, 16. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (XVI. BİHAT), 28-30.06.2006, Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Erzurum.

5) Özek, G., Koşar, M., İşcan, G., Tabanca, N., Wedge, D.E., Khan, S.I., Özek, T., Demirci, F., Hamzaoglu, E., Duran, A., Başer, K.H.C., *Achillea teretifolia* Willd. Uçucu Yağının Kompozisyonu ve Biyolojik Aktiviteleri (*Composition and biological activities of the essential oil of Achillea teretifolia Willd.*) 17. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (17. BİHAT), 26-29 Ekim 2007, Kuşadası.

6) İşcan, G., Demirci F., Kırimer, N., Kürkcüoğlu, M., Arabacı, T., Güven, K., Başer, K.H.C., *Achillea vermicularis* Trin. Uçucu Yağının Kompozisyonu ve Antimikrobiyal Etkileri, (XVI. BİHAT), 28-30.06.2006, Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2006, Erzurum.

7) İşcan, G., Kırimer, N., Kıvanç, M., Başer, K.H.C. *Echinophora tenuifolia* L. subsp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin Uçucu Yağının Antimikrobiyal Etkili Bileşiklerinin Belirlenmesi, 15. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 6-9 Ekim 2004, Belek, Antalya.

8) İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, F., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C., Kıvanç, M., Bazı Umbelliferae Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri, 14. Bihat, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.

9) Kıvanç M., Kaplan M., İşcan G., Hasenekoğlu İ., "Peyniraltı Suyu Kullanılarak, Fungi ile Mikrobiyal Yağ Üretimi" Ege Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Sanayi Sempozyumu, 6-9 Mart 2000, İzmir.

10) Kırırmer N., Güven K., Demirci F., İşcan G., Başer K.H.C., "TBAM'da Doğal ve Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu" Ege Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Sanayi Sempozyumu, 6-9 Mart 2000, İzmir.

11) Kırırmer, N., İşcan, G., Demirci, F., Kürkçüoğlu, M., Başer, KHC., *Mentha piperita* Uçucu Yağının Farklı Yöntemler Kullanılarak Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması, 13. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 20-22 Eylül, 2000, İstanbul.

12) Kıvanç M., Kaplan M., İşcan G., "Peyniraltı Suyundan İzole Edilen *Penicillium brevicompactum* ve *Geotrichum candidum* Kullanılarak Fungal Protein Üretimi", VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Ed. Demirci M., 2000, Tekirdağ.

Projeler

1. Doğal Kaynaklı Stilben Ve Türevlerinden Biyokataliz İle Yeni Metabolitlerin Üretimi ve Biyoaktiviteleri, 060325, AÜBAP (2006-2008).

2. Biyokatalizörler Yardımıyla Simenden Timokinon ve Benzeri Biyoaktif Metabolitlerin Üretimi, TÜBİTAK Projesi, 106T117, (2006-2008).

3. Farmakope Kalitesinde Bitkisel Drog Monograflarının Hazırlanması, 070301, AÜBAP, (2007- 2009).

4. Bitkisel Kökenli Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Biyotransformasyonla Yeni Doğal Maddelere Dönüştürülmesi 070317, AÜBAP, (2007-2009).

5. Umbelliferae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, AÜAF, Proje No: 00 10 48, (Şubat 2002).

Organizasyonunda Bulunulan Toplantılar

6th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC-2005), 28-29 June 2005, Gazi Üniversitesi, Ankara, Turkey.

Katılan Kurslar ve Eğitim Programları

1) Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler, Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 27 Ağustos-3 Eylül 2000.

2) Enzim Saflaştırılmasında Temel Yöntemler X. Uygulamalı Lisans Üstü Eğitim Kursu, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Tubitak-MAM Yerleşkesi, 13-17 Ağustos 2007.

3) UNIDO-ICS, Uçucu Yağların Üretim ve Teknolojileri, Kalite Kontrolü ve Kullanımı Eğitim Kursu (eğitmen), Eskişehir, Türkiye, 21-25 Temmuz 2008.

ÖNSÖZ

Günümüzde, ilaç, koku ve tat maddesi olarak kullanılabilen doğal bileşikler her gün biraz daha önem kazanmaktadır. Bu bileşiklerin çoğunluğunu terpen yapısında olanlar ve özellikle de monoterpenler oluşturmaktadır.

Doğal monoterpenlerden biyotransformasyonlarla oluşturulan doğal türevler de bu anlamda önemlidir. Monoterpen yapısındaki bu doğal bileşiklerden biyotransformasyonla elde edilen türevler de doğal kabul edilmekte, çok daha etkin biyolojik aktiviteye, farklı koku ve tat özelliklerine sahip olabilmektedir. Çalışmamızda doğada bol bulunan bazı monoterpenlerden hareketle oluşturulan yeni türevlerin biyolojik etkileri incelenerek ilaç olma potansiyellerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde TUBİTAK-106T117 ve BAP-060325 numaralı projelerin altyapısından yararlanılmıştır.

Tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zaman yol gösterici olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Engin tecrübe ve bilgisiyle her konuda yardımcı olan hocam Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e,

Tezin her aşamasında tecrübelerini benimle paylaşarak, bu çalışmaya büyük katkılar sağlayan Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Deneyisel çalışmalarım esnasında her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, Doç. Dr. Müberra KOŞAR'a ve Uzm. Bio. Fatih GÖGER'e,

Spektroskopik analiz çalışmalarının gerçekleşmesinde yardımcı bulunan Prof. Dr. Yoshiaki NOMA ve Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi personeli Uzm. Kim. Güner SAKA'ya,

Mikroorganizma sağlayarak katkıda bulunan Prof. Dr. Wolf-Rainer Abraham'a (Helmholtz Center for Infection Research Braunschweig, Almanya),

Çalışmalarım esnasında her zaman manevi desteklerini hissettiğim Farmakognozi Anabilim Dalı üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, eğitim hayatım süresince maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan anne ve babama, çoğu gecelerini ve hafta sonlarını bensiz geçiren sevgili eşim ve değerli kızıma desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Doğal aromatik maddelerin biyotransformasyonla oluşan türevleri doğal ilaç, koku ve tat maddeleri olarak önem taşımaktadır. Bu çalışmada α -felandren ve bu monoterpeni ana madde olarak taşıyan *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) uçucu yağı substrat olarak, 22 farklı mikroorganizma (bakteri, fungus ve maya) ile biyotransformasyona tabi tutulmuştur.

Oluşan metabolitlerden 10'u spektroskopik yöntemler kullanılarak tanımlanmış, 6-hidroksipiperiton, α -felandren epoksit, *cis-p*-ment-2-en-1-ol ve karvotanaseton'un, (*R*)-(-)- α -felandrenin biyotransformasyonu ile oluştuğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir. Aynı zamanda uçucu yağın ana maddeleri olan limonen ve α -felandrenin ticari numuneleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar sonucu izole edilerek yapısı aydınlatılan, 8-*p*-menten-1,2-diol ve 5-*p*-menten-1,2-diol'ün *in vitro* antibakteriyal, antikandidal, antioksidan özellikleri ve *Vibrio fischeri* biyoluminesan yöntemi ile akut toksisiteleri incelenmiştir. Sonuç olarak limonenden elde edilen 8-*p*-menten-1,2-diol metabolitinin özellikle *Bacillus cereus* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı ampisilinden daha kuvvetli antibakteriyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 5-*p*-menten-1,2-diolün, başlangıç maddesi olan α -felandrenden çok daha kuvvetli antibakteriyal ve antikandidal etkiler kazandığı ve *Vibrio fischeri* biyoluminesan yöntemi ile toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Kaynaklarda pek az örneği olan bir uçucu yağda doğrudan biyotransformasyon araştırması ülkemizde ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Schinus molle*, uçucu yağ, α -felandren, biyotransformasyon, biyolojik aktivite

ABSTRACT

Derivatives of natural and aromatic compounds obtained by biotransformation constitute an important resource for natural pharmaceutical, fragrance and aroma substances. In this present work the monoterpene α -phellandrene and the essential oil of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) containing this constituent as major compound were biotransformed by 22 different microorganisms (bacteria, fungi and yeasts). 10 metabolites were characterized by spectroscopic methods, where 6-hydroxypiperitone, α -phellandrene epoxide, *cis-p*-menth-2-en-1-ol and carvotanacetone originated from (*R*)-(-)- α -phellandrene were reported for the first time in this study. Furthermore, individual biotransformation studies with the major essential oil constituents limonene and α -phellandrene obtained from commercial sources yielded 8-*p*-menthen-1,2-diol and 5-*p*-menthen-1,2-diol. Also substrates and metabolites were subjected to *in vitro* antibacterial, anticandidal and acute toxicity test (bioluminescent *Vibrio fischeri*). The biotransformation metabolite 8-*p*-menthen-1,2-diol from limonene showed inhibitory activity towards the pathogens *Bacillus cereus* and methicilline resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) better than the substrate and the standard antimicrobial ampicilline. The metabolite 5-*p*-menthen-1,2-diol obtained from the substrate α -phellandrene showed also good inhibitory activities against various bacteria and *Candida* species with relatively non-toxic properties detected by the *Vibrio fischeri* bioluminescence assay.

Only a few studies on the biotransformation of essential oils were conducted according to the literature search, where this work is the first example for Turkey.

Key words: *Schinus molle*, essential oil, α -phellandren, biotransformation, bioassays

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Uçucu Yağlar ve Bileşimleri	2
Kullanılan Bitkisel Materyalin Botanik Özellikleri	2
<i>Anacardiaceae</i> familyasının özellikleri	2
<i>Schinus molle</i> L. türünün genel özellikleri	2
<i>Schinus molle</i> Bitkisinin Halk Arasındaki Kullanımı	3
<i>Schinus molle</i> Uçucu Yağının Bileşimi	3
<i>Schinus molle</i> Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Biyolojik Etkileri	4
Monoterpenler	5
<i>Limonen</i>	5
<i>α-Fellandren</i>	6
Monoterpenlerin Biyolojik Etkileri	7
<i>(R)-(+)-Limonen</i> 'in biyolojik etkileri	8
<i>α-Fellandrenin</i> biyolojik etkileri	10
Biyotransformasyon (Mikrobiyal transformasyon)	11
<i>Monoterpenlerin biyotransformasyonu</i>	11
<i>Limonen biyotransformasyonları</i>	12
<i>α-Fellandren biyotransformasyonları</i>	15
<i>Uçucu yağ biyotransformasyonları</i>	16
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	17
Substratlar	17
Bitkisel Materyalin Toplanması ve Uçucu Yağ Eldesi	17
Kimyasal Madde ve Çözücüler	17

Aletler	18
Mikroorganizmaların Temini ve Kültür Koleksiyonunun Oluşturulması	18
Mikroorganizmaların Geliştirilmesi	18
Kullanılan Mikroorganizmalar	19
Kullanılan Besi Ortamları	21
<i>α-medyum</i>	21
<i>Czapek's medyum</i>	21
<i>Abraham's medyum</i>	21
<i>Yumuşak agar</i>	21
<i>Hazır besi ortamları</i>	21
Sterilizasyon	22
Biyotransformasyon Çalışmaları	22
<i>Biyotransformasyonda kullanılacak substrat konsantrasyonu</i>	22
<i>Ön tarama deneyleri</i>	22
<i>Substrat stabilizasyonu ve kontrol grupları</i>	23
Tepe boşluğu-Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (KFME)	23
Örnekleme ve Ekstraksiyon	24
Preparatif Amaçlı Biyotransformasyon	24
<i>Mikroorganizma kültürü ve substrat ilavesi</i>	24
<i>Ekstraksiyon</i>	24
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	26
Analitik İTK	26
Preparatif İTK	26
Vakum Sıvı Kromatografisi	26
Sütun Kromatografisi	26
Semi-Preparatif Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	27
Yapı Tayini	27
<i>Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GK/KS)</i>	27
<i>Gaz kromatografisi (GK)</i>	27
<i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	27
<i>Polarimetri</i>	28
Biyolojik Aktivite Çalışmaları	28
<i>Antimikrobiyal aktivite</i>	28
<i>Mikro dilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi</i>	28

<i>Mikro dilüsyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi</i>	29
<i>Biyootografi yöntemi</i>	29
<i>İTK plaklarının hazırlanması</i>	29
<i>Mikroorganizma kültürünün hazırlanması</i>	29
<i>Aktivitenin belirlenmesi</i>	29
<i>Antioksidan aktivite çalışmaları</i>	30
<i>Ön tarama deneyleri</i>	30
<i>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini</i>	30
<i>ABTS radikal süpürücü etki</i>	30
<i>β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini</i>	30
<i>Toksisitenin belirlenmesi</i>	31
<i>Mikroorganizma kültürü</i>	31
<i>İTK plaklarının hazırlanması ve mikroorganizma ile kaplanması</i>	31
<i>Biyoluminesan inhibisyonunun görüntülenmesi</i>	32
BULGULAR VE TARTIŞMA	33
<i>Schinus molle L. Uçucu Yağının Bileşimi</i>	33
<i>Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi</i>	35
<i>Biyotransformasyon Ön Tarama Sonuçları</i>	35
<i>Schinus molle Uçucu Yağının Mikrobiyal Transformasyonu</i>	36
<i>Limonenin Alternaria alternata ile Mikrobiyal Transformasyonu</i>	39
<i>L1 metaboliti</i>	40
<i>L1 metabolitinin spektral verileri</i>	39
<i>L2 metaboliti</i>	41
<i>L3 metaboliti</i>	42
<i>M1 metaboliti</i>	42
<i>M2 metaboliti</i>	43
<i>(R)-(-)-α-Fellandrenin Mikrobiyal Transformasyonu</i>	
<i>ve Oluşan Metabolitler</i>	44
<i>A1 metaboliti</i>	48
<i>A2 metaboliti</i>	53
<i>A3-A5 metabolitleri</i>	53
<i>A6 metaboliti</i>	55
<i>A7-A9 metabolitleri</i>	56
<i>Biyolojik Aktivite Sonuçları</i>	58

<i>Antibakteriyel aktivite</i>	58
<i>Antikandidal aktivite</i>	59
<i>Biyootografi sonuçları</i>	60
<i>Antioksidan aktivite sonuçları</i>	62
<i>Ön tarama sonuçları</i>	62
<i>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)</i>	
<i>radikalini süpürücü etki sonuçları</i>	63
<i>ABTS radikalini süpürücü etki sonuçları</i>	63
<i>β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki</i>	64
<i>Biyoluminesan <i>Vibrio fischeri</i> yöntemi ile belirlenen</i>	
<i>akut toksisite sonuçları</i>	66
SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	71
EK	
Tezde Adı Geçen Bileşiklerin İngilizce Yazılışları	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonunda Kullanılan Biyokatalizörler	12
Şekil 2 (R)-(-)- α -Fellandren'in <i>Corynespora cassiicola</i> ile Elde Edilen Metabolitleri	15
Şekil 3 (R)-(-)- α -fellandren'in <i>Spodoptera litura</i> Larvası Kullanılarak Elde Edilen Metabolitleri	16
Şekil 4 Biyotransformasyon Ön Tarama Aşaması	23
Şekil 5 Metabolit İzolasyonuna Yönelik Preparatif Çalışma Şeması	25
Şekil 6 <i>S. molle</i> Uçucu Yağının Biyotransformasyonu ile Oluşan Metabolitler	39
Şekil 7a (R)-(+)-Limonen'in <i>A. alternata</i> ve <i>C. cassiicola</i> ile Biyotransformasyonu	40
Şekil 7b (S)-(-)-Limonen'in <i>A. alternata</i> ile Biyotransformasyonu	41
Şekil 8 Limonenden Mikrobiyal Transformasyonla Karvon (L2) Oluşumu	41
Şekil 9 Ekzo-2-hidroksi-Sineol'ün Kütle Spektrumu	42
Şekil 10 Uçucu Yağ Biyotransformasyonu ile Elde Edilen Kripton'un Kütle Spektrumu	43
Şekil 11 M2 Metabolitinin Kütle Spektrumu	43
Şekil 12 β -siklodekstrin	45
Şekil 13 (R)-(-)- α -Fellandren'in Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler	47
Şekil 14 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün Kütle Spektrumu	48
Şekil 15 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün ^1H -NMR Spektrumu	49
Şekil 16 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün ^{13}C -NMR Spektrumu	50
Şekil 17 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün ^1H - ^1H COSY Spektrumu	50
Şekil 18 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün ^1H - ^{13}C HSQC Spektrumu	51
Şekil 19 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün ^1H - ^{13}C HMBC Spektrumu	51
Şekil 20 6-Hidroksipiperiton'un Kütle Spektrumu	53
Şekil 21 A3 Metabolitinin Kütle Spektrumu	54

Şekil 22	A4 Metabolitinin Kütle Spektrumu	54
Şekil 23	A5 Metabolitinin Kütle Spektrumu	55
Şekil 24	α -Fellandren Epoksit'in (A6) Kütle Spektrumu	55
Şekil 25	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol'ün (A7) Kütle Spektrumu	56
Şekil 26	<i>p</i> -Menta-1(7),5-dien-2-ol'ün (A8) Kütle Spektrumu	57
Şekil 27	Karvotanaseton'un (A9) Kütle Spektrumu	57
Şekil 28	Biyootografi Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Etki Sonuçları	61
Şekil 29	Antioksidan Ön Tarama Deneylelerinin Sonuçları	62
Şekil 30	Substrat ve Metabolitlerin ABTS Radikal Süpürücü Etkisi	63
Şekil 31	Substrat ve Metabolitlerin β -karoten/linoleik asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Etkisi	65
Şekil 32	Substrat ve Metabolitlerin β -karoten/linoleik Asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Antioksidan Kapasite Değerleri	65
Şekil 33	Biyoluminesan Akut Toksikite Sonuçları	66
Şekil 34	Biyotransformasyon Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Metabolitler	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 <i>S. molle</i> Uçucu Yağı ile Yapılan Çalışmalar ve Rapor Edilen Ana Bileşikleri	3
Çizelge 2 <i>Schinus molle</i> 'nin Biyolojik Etkileri	4
Çizelge 3 Limonen'in Bazı Fiziko-kimyasal Özellikleri ve Spektral Verileri	6
Çizelge 4 α -Fellandren'in Bazı Fiziko-kimyasal Özellikleri ve Spektral Verileri	7
Çizelge 5 (<i>R</i>)-(+)-Limonenin Bazı Biyolojik Etkileri	8
Çizelge 6 α -Fellandren'in Biyolojik Etkileri	10
Çizelge 7 Mikrobiyal Transformasyonlarla Elde Edilen Limonen Metabolitleri	13
Çizelge 8 Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar	19
Çizelge 9 Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Mikroorganizmalar	20
Çizelge 10 Farklı Bölgelerden Toplanan <i>S. molle</i> Örnekleri ve Uçucu Yağ Verimleri	33
Çizelge 11 <i>S. molle</i> Örneklerine Ait Uçucu Yağların Ana Bileşikleri	33
Çizelge 12 <i>Schinus molle</i> Uçucu Yağının Kompozisyonu	34
Çizelge 13 <i>S. molle</i> Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Ana Bileşiklerinin Miktarlarındaki % Değişim	37
Çizelge 14 <i>S.molle</i> Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve Relatif % Miktarları	38
Çizelge 15 α -Fellandren Kontrol Grubunun KFME ve GK/MS Analiz Sonuçları	44
Çizelge 16 (<i>R</i>)-(-)-(α)-Fellandrenin Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve Relatif % Miktarları	46
Çizelge 17 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'e Ait Spektral Bulgular	49
Çizelge 18 5- <i>p</i> -Menten-1,2-diol'ün Doğada Bulunan İzomerleri	52
Çizelge 19 Antibakteriyal Etki Sonuçları	58

Çizelge 20	Antikandidal Etki Sonuçları	60
Çizelge 21	Troloksa Eşdeğer ABTS Radikal Süpürücü Etki [TEAC (mM)]	64

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

(a/h)	: Ağırlık/hacim
$[\alpha]_D^{20}$: 20°C de ölçülen spesifik çevirme açısı
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
^{13}C NMR	: Karbon-nükleer manyetik rezonans
^1H NMR	: Proton-nükleer manyetik rezonans
^1H - ^{13}C HMBC	: Proton-Carbon heteronuclear multiple bond correlation
^1H - ^{13}C HSQC	: Proton-Carbon heteronuclear single quantum coherence
^1H - ^1H COSY	: Proton-proton correlation spectroscopy
AAC	: Antioksidan kapasite
ABTS ^{•+}	: 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) radikali
ATCC	: Amerikan tıp kültür koleksiyonu
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
<i>c</i>	: Konsantrasyon
CDCl_3	: Dötoro kloroform
CFU	: Koloni oluşturan ünite
CH_2Cl_2	: Diklorometan
d	: Çift pik (doublet)
dd	: İki çift pik (double doublet)
ddd	: Üç çift pik
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH [•]	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DSM	: Alman mikroorganizma ve hücre kültürü koleksiyonu
<i>eV</i>	: Elektron volt
FID	: Alev iyonlaşma dedektörü (Flame ionization detector)
GK	: Gaz kromatografisi
IC_{50}	: %50 inhibisyon konsantrasyonu
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
SPME	: Katı faz mikroekstraksiyon (KFME)
KS	: Kütle spektrometresi

LD ₅₀	: %50 inhibisyon dozu
m	: multiplet
m/z	: kütle/yük
M ⁺	: Moleküler iyon
MeOH	: Metanol
MHA	: Mueller Hinton Agar (katı besiyeri)
MHB	: Mueller Hinton Broth (sıvı besiyeri)
MHz	: Megahertz
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mM	: Milimolar
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	: Nutrient Agar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NRRL	: Northern regional research laboratory of the USDA
PDA Dedektör	: Photo-diode array dedektör
PDA	: Patates dekstroz agar
PDMS	: Polidimetilsiloksan
ppm	: Milyonda bir kısım
RRI	: Relatif tutunma indisi
Rt	: Tutunma zamanı
s	: singlet
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
TEAC	: Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite
tr	: Eser miktarda
TTC	: Trifenil tetrazolyum klorür
UV	: Ultraviyole
YBSK	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
β-SD	: β-Siklodekstrin

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, ilaç, koku ve tat maddesi olan doğal bileşikler hergün biraz daha önem kazanmaktadır. Bu bileşiklerin çoğunluğunu terpen yapısında olanlar ve özellikle de monoterpenler oluşturmaktadır.

Doğal monoterpenlerden biyotransformasyonlarla oluşturulan doğal türevler de bu anlamda önemlidir. Yeni oluşan türevler, başlangıç maddelerinden kuvvetli ve farklı aktivitelere sahip olabildikleri gibi, koku ve tat özellikleri ile de farklı karakterlerde bileşikler olarak dikkat çekmektedir.

Bu gelişmelerden hareketle tez kapsamında henüz üzerinde pek az biyotransformasyon araştırması yapılmış bir monoterpen olan α -felandren kullanılmıştır. α -Felandren kaynağı olarak, Türkiye'nin doğal bitkisi olmamakla birlikte süs bitkisi olarak yetiştirilen *Schinus molle* L. meyve uçucu yağı kullanılması uygun olacağı düşünülmüştür. Doğrudan uçucu yağ ve ana bileşikleri olan α -felandren ve limonen üzerinde koleksiyonumuzda mevcut mikroorganizmalar ile transformasyon çalışmaları planlanmıştır. Oluşan metabolitlerden miktarı fazla olanların besiy ortamından ekstraksiyonu, izolasyonu ve yapı tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Düşük miktarlarda oluşan metabolitler ise uygun ekstraksiyonlar sonucu GK/KS analizleri ile tanımlanabilmektedir.

Saflaştırıldıktan sonra spektroskopik olarak yapı tayini gerçekleştiren metabolitlerin antibakteriyal, antikandidal, antioksidan aktivitelerinin ve *Vibrio fischeri* biyoluminesan yöntemi ile akut toksisitelerinin belirlenmesi çalışmanın ikinci kısmını oluşturmuştur.

Biyotransformasyonla elde edilen metabolitlerin her biri doğal bileşikler olarak kabul edilmekte ve tedavi alanında kullanım potansiyeline sahip olabilmektedir. Standart maddelerden daha fazla antibakteriyal, antikandidal, antioksidan aktivite göstermeleri halinde, elde edilen metabolitler potansiyel ilaç hammadesi olarak sunulacaktır.

KAYNAK BİLGİSİ

Uçucu Yağlar ve Bileşimleri

Uçucu yağlar bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen özel kokulu, oda sıcaklığında sıvı halde olan uçucu maddeler karışımıdır. Uçucu yağlar genellikle bitkinin bağlı olduğu familyaya göre belli bir oranda salgı tüylerinde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde bulunurlar. Uçucu yağ taşıyan aromatik bitkiler genellikle sıcak iklim bölgelerinde yetişirler. Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi bu bitkilerce zengindir. Uçucu yağ taşıyan bitkiler özellikle Compositae, Coniferae, Rutaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Lamiaceae, Umbelliferae, Iridaceae, Zingiberaceae ve Graminae familyalarında bulunurlar (Başer ve Demirci, 2007).

Uçucu yağlar genellikle hidrokarbonlar ve hidrokarbonların oksijenli türevlerinden meydana gelmişlerdir. Bunlar arasında alkoller, asitler, esterler, aldehitler, ketonlar, aminler ve kükürtlü bileşikler de yer alır. Uçucu yağlarda başlıca terpenoitler bulunur. Bunlar, genel terpenler formülüne $[(C_5H_8)_n]$ uyan maddelerdir ve izopren moleküllerinin kondensasyonu ile meydana gelirler. Uçucu yağlarda en çok mono-, seski- ve diterpenler ile bunların oksijenli türevleri mevcuttur. Bunlar dışında fenil propanoitler, yağ asitleri ve esterleri, kumarinler, ftalatlar ile parafinler de bazı uçucu yağların bileşimine girmektedir (Evans, 1996; Başer ve Demirci, 2007).

Kullanılan Bitkisel Materyalin Botanik Özellikleri

Anacardiaceae familyasının özellikleri

Genellikle kabukları reçineli ağaçlar ve çalılardır. Yapraklar alternat, basit, trifoliat veya pinnat, stipülsüz, çiçekler uçta veya yaprak koltuklarında panikula durumunda, erdişi veya tek eşeyli, çoğunlukla aktinomorf simetridir. Sepaller 3-5, kaidede birleşmiş veya nadiren hiç yoktur. Petaller, 3-5 serbest veya kaidede birleşik veya nadiren hiç yoktur. Stamenler petallerin iki katı kadar, nadiren daha çok veya az, iki halkada dizilmişlerdir. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, genellikle 1 lokuluslu ve 3 karpelli, nadiren 5 lokulus ve karpelli, ovüller her lokulusta tek, anatrop, plasentasyon parietal veya basal görünüşlüdür. Meyve tipi drupadır.

Çoğunlukla tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde yayılış gösteren familyanın yaklaşık 77 cins ve 600 kadar türü bulunmaktadır. Ülkemizde *Cotinus*, *Rhus* ve *Pistacia* olmak üzere 3 cins ve bunlara bağlı 9 türle temsil edilmektedir. Tezde bahsi geçen ve ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde süs bitkisi olarak yetiştirilen *Schinus* türleri ise Türkiye Florası'nda yer almamaktadır (Davis, 1972; Seçmen ve ark., 1995).

Schinus molle L. türünün genel özellikleri

Peru biber ağacı, yalancı karabiber veya kırmızıbiber ağacı olarak da isimlendirilen *S. molle*, herdem yeşil, 15 metreye kadar uzanabilen, ince, uzun, aşağı sarkık, dağınık dallı, kırmızı-siyah kabuklu, sarkık formu bir ağaçtır. Yapraklar almaşlı, yaprak sapı uzun, aşağı sarkık, bileşik yaprak şeklinde, 15-30 yaprakçıklı, yaprakçıklar mızraksı yeşil renklidir. Çiçekler aşağı sarkık salkım durumunda, yeşilimsi sarı renklidir. Erkek ve dişi çiçekler ayrı bitkilerdedir.

Meyve çekirdekli sulu, küremsi yuvarlak ve kırmızı renkli, yaz aylarında olgunlaşır dökülmeden ağaç üzerinde uzun süre kalmaktadır.

Güneşli yerlerde ve ılıman iklimlerde yetişir. Kumlu, derin, verimli toprakları tercih etmektedir. Tohumla üretilir. Vatanı Peru olup, ülkemizde daha çok Akdeniz ve Ege kıyılarında süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Yücel, 2005).

***Schinus molle* Bitkisinin Halk Arasındaki Kullanımı**

Doğal yayılım alanı olan Peru'da halk arasında infüzyon şeklinde tansiyon düşürücü ve idrar söktürücü olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bello ve ark., 1998; Marzouk ve ark., 2006). Yunanistan'da meyvelerin bazı alkollü içkilerin bileşiminde yer aldıkları bildirilmiştir (Bernhard ve ark., 1983). Ülkemizde genellikle süs bitkisi olarak yetiştirilen *S. molle*'nin meyveleri halk arasında iştah açıcı ve hazmettirici olarak, yaprakları diş ve ağız hastalıklarında antiseptik olarak kullanılmaktadır. Bazı yörelerde de baharat olarak karabiber yerine kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Ertuğ, 2004).

***Schinus molle* Uçucu Yağının Bileşimi**

Çeşitli yöntemlerle elde edilmiş ve analizleri yapılmış *S. molle* uçucu yağları ile yapılmış önceki çalışmaların ayrıntıları **Çizelge 1**'de verilmiştir.

Çizelge 1. *S. molle* Uçucu Yağı ile Yapılan Çalışmalar ve Rapor Edilen Ana Bileşikleri

Toplandığı bölge	Kullanılan kısmı	Yağ % Verimi	Ana bileşikleri*	Kaynak
Sardunya, İtalya	Yaprak	0.7	α -felandren: %25, β -felandren+limonen: %21, elemol: %14, α -ödesmol: %11	Marongiu ve ark., 2004
İzmir-Güzelbahçe	Meyve	4.3	α -felandren: %22, β -felandren: %10, limonen: %10	Başer ve ark., 1997
İzmir-Bornova	Meyve	3.14	α -felandren: %38, β -felandren: %12, limonen: %12	Başer ve ark., 1997
İzmir-Bornova	Yaprak	1.67	α -felandren: %46, β -felandren: %13, limonen: %14	Başer ve ark., 1997
Liguria, İtalya	Meyve	2.0	α -felandren: %55, β -felandren: %15, limonen: %14	Maffei ve ark., 1990
Liguria, İtalya	Yaprak	1.6	α -felandren: %30, elemol: %13, β -felandren: %9	Maffei ve ark., 1990
Hindistan	Yaprak	2.3	β -felandren + limonen: %25, α -felandren+mirsen: %13, β -karyofilen: %11	Dikshit ve ark., 1986

* GK Sonuçlarına Göre %5'in Üzerindeki Bileşiklerin Relatif % Değerleri

Schinus molle Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Biyolojik Etkileri

Daha önce yapılan çalışmalarda *Schinus molle* meyve ve yapraklarından uçucu yağ dışında tanen, alkaloid, flavanoid, steroidal saponin, sterol, terpen, zambak ve reçine gibi çeşitli maddeler izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Ferrero ve ark., 2006). Bitkinin farklı çözücüler ile elde edilen ekstralarının biyolojik etkileri ile ilgili araştırmalar **Çizelge 2**'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. *Schinus molle*'nin Biyolojik Etkileri

Aktivite	Etkili kısım	Yöntem	Doz/Sonuç	Kaynak
Analjezik ve santral depressör	Yaprak-CH ₂ Cl ₂ ekstresi	Motilite testi, kimyasal, mekanik ve termal uyarılma	LD ₅₀ :130 mg/kg /+++	Barrachina ve ark., 1997
Antibakteriyel	Kök-MeOH ekstresi	Mikro dilüsyon <i>Haemophilus influenzae</i>	500 µg/ml /+	Salinas ve ark., 2007
	Meyve-MeOH ekstresi	Mikro dilüsyon <i>Streptococcus pneumoniae</i>	62.5 µg/ml /++	
Antidepresan	Yaprak-Hekzan ekstresi	Rat kuyruktan asma testi	30 mg/kg /+++	Machado ve ark., 2007
Antikandidal	Yaprak-Su ekstresi	<i>Candida albicans</i> -disk difüzyon	105 ng/ml /++	Schmourlo ve ark., 2005
Antioksidan	İzole edilen flavon glikozitleri	Lipid peroksidasyon Serbest radikal süpürücü Süperoksit süpürücü etki	IC ₅₀ : 4.5-6.3µM IC ₅₀ : 27-45µM IC ₅₀ : 151 µM	Marzouk ve ark., 2006
Antitüberküloz	Meyve-Hekzan ekstresi	Mikroplak Alamar Blue <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	125 µg/ml /+	Salinas ve ark., 2007
Antitümoral	Yaprak-MeOH ekstresi	Hepatoselüler karsinoma hücre inhibisyonu, ELISA	IC ₅₀ : 50µg/ml /+++	Ruffa ve ark., 2002
Böcek kovucu	Meyve-hekzan ekstresi	<i>Triatoma infestans</i> larvası; kovucu etki	%1.5 (a/h) /+++	Ferrero ve ark., 2006
Fungitoksik	Yaprak Uçucu yağı	"Poisoned food" tekniği	500 ppm /+++	Dikshit ve ark., 1986

Çizelge 2. (Devamı) *Schinus molle*'nin Biyolojik Etkileri

Aktivite	Etkili kısım	Yöntem	Doz/Sonuç	Kaynak
Böcek öldürücü	Meyve- hekzan ekstresi	<i>Triatoma</i> <i>infestans</i> yumurtası; ovisidal etki	%0.5 (a/h) /+++	Ferrero ve ark., 2006
Kas gevşetici	Yaprak- CH ₂ Cl ₂ ekstresi	Rat uterusu ve domuz ileumu in-vitro kontraktıl etki	100 mg/ml /++	Bello ve ark., 1998

+++; kuvvetli, ++: orta derecede, +: zayıf etki

Monoterpenler

Monoterpenler iki izopren molekülünden oluşan 10 karbonlu bileşiklerdir. Genelde uçucu yağ ve oleorezinlerin temel bileşenlerindedir. Doğadaki tüm canlılar genellikle sekonder metabolit olarak çeşitli izopren türevlerini sentezlemektedir. Başlarda yalnızca mevalonat yoluyla sentezlendiği düşünülen izoprenin, 1993 yılından sonra yapılan araştırmalarda özellikle prokaryotlarda deoksiksiloz-5-fosfat yolundan sentezlendiği de belirlenmiştir (Eisenreich ve ark., 1997; McCaskill ve Croteau, 1998; Lange ve Croteau, 1999). Doğada izopren türevi olan tanımlanmış yaklaşık 40 bin bileşik mevcuttur (Trudgill, 1990; Withers ve Keasling, 2007). Monoterpenlerin önceleri sadece yedek karbon kaynağı olarak sentezlendikleri düşünülse de, yapılan son araştırmalarla ortaya çıkarılan çeşitli özellikleri, bitkilerin önemli bir savunma ve çoğalma aracı olduklarını göstermiştir (Carvalho ve Fonseca, 2006).

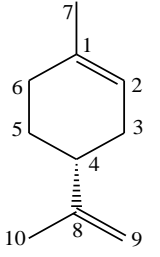
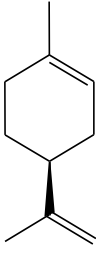
Monoterpenler sahip oldukları doğal koku ve tat özellikleri ile yeni moleküllerin sentezlenmesinde başlangıç maddesi olarak gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde çok yaygın biçimde kullanılmaktadır. 1994 yılında yapılan bir araştırmada tüm dünyada yılda 10 milyar dolarlık koku ve tat maddeleri tüketimi olduğu bildirilmiştir. Tüketim parametreleri incelendiğinde, halen çoğunun sentetik olarak üretildiği bilinen bu tip maddelerin yerine doğal ya da biyotransformasyon kaynaklı olanlarının tercih edildiği bildirilmiştir (Cheetham, 1999; Vandamme ve Soetaert, 2002).

Bu bölümde *Schinus molle* uçucu yağının ana bileşikleri olan monoterpen yapısındaki limonen ve α -fellandren hakkında derlenen bilgiler özetlenecektir.

Limonen

Bilinen en önemli ve geniş kullanım alanına sahip olan terpenlerler arasında yer alır. Parfümeri ve gıda endüstrisinde, ayrıca polimer ve yapıştırıcı kimyası alanlarında çok yaygın biçimde kullanılmaktadır. Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip iki doğal formu mevcuttur (**Çizelge 3**). Genellikle uçucu yağlarda rasemik karışımlar halinde bulunurlar. [(R)-(+)- veya *d*-] formu % 90 oranında narenciye esanslarında, [(S)-(-)- veya *l*-] formu ise çam yaprak uçucu yağlarında ve bazı *Mentha* türlerinde bulunmaktadır. Sentetik olarak terementi hidrasyonu ile de rasemik formu (dipenten) elde edilmektedir (Van der Werf ve ark., 2000).

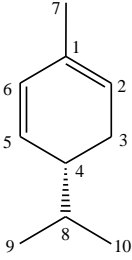
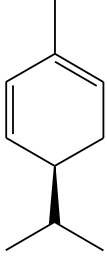
Çizelge 3. Limonen'in Bazı Fiziko-kimyasal Özellikleri ve Spektral Verileri

(C ₁₀ H ₁₆) Limonen	 <p>(R)-(+) veya (d-) CAS: 5989-27-5</p>	 <p>(S)-(-) veya (l-) CAS: 5989-54-8</p>
Kaynama noktası	176-177°C	175-177°C
Yoğunluk (d)	0.842 gr/ml	
Optik çevirme	+126.8°	-122.6°
Molekül ağırlığı	136.24	
¹ H NMR	(400 MHz-C ₆ D ₆): δ 1.67 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 4.70 (m, 2H), 5.42 (m, 1H)	
¹³ C NMR	(75 MHz- C ₆ D ₆): δ 20.5 (C-9), 23.5 (C-7), 27.9 (C-5), 30.5 (C-3), 30.7 (C-6), 41.5 (C-4), 108.6 (C-10), 120.6 (C-2), 133.2 (C-1), 150.5 (C-8).	
Kütle spektrumu	m/z: 136 (M ⁺), 121, 107, 93, 79, 68 (100), 53, 41	
Koku özellikleri	Limon, portakal	Çamsı, terementi kokulu
Sinonimleri	1-metil-4-(1-metiltenil) siklohekzen, 4-izopropenil-1-metilsiklohekzan, p-menta-1,8-dien, sitren, hesperiden, diizopren, terpilen, sinen, kajeputen, karven .	
Kaynaklar	Conolly ve Hill, 1991; Rahman ve Ahmad, 1992; Bauer ve ark., 2001; Guerrini ve ark., 2006.	

α-Fellandren

Yapılan kaynak taramasında *Schinus* türleri dışında uçucu yağında yüksek oranda *α*-fellandren taşıyan bitkiler arasında özellikle *Eucalyptus*, *Piper*, *Citrus*, *Juniperus*, *Boswellia*, *Mentha* ve *Pinus* cinslerine ait bazı türler sayılabilir. *α*-Fellandren'in fizikokimyasal ve koku özellikleri birbirinden farklı, (R)-(+) ve (S)-(+) olarak iki izomeri vardır (Çizelge 4).

Çizelge 4. α -Fellandren'in Bazı Fiziko-kimyasal Özellikleri ve Spektral Verileri

(C ₁₀ H ₁₆) α -Fellandren	 (<i>R</i>)-(-) veya (<i>L</i>) CAS: 99-83-2	 (<i>S</i>)-(+), veya (<i>d</i> -) CAS: 2243-33-6
Kaynama noktası	174°C	175-176°C
Yoğunluk	0.835 gr/ml	
Optik çevirme	-217°	+49.1°
Molekül ağırlığı	136.24	
¹ H NMR	(400 Mhz-C ₆ D ₆): δ 0.89-0.91 (2d, 6H), 1.68 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.95-2.15 (m, 2H), 2.05 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 5.71 (dd, 1H), 5.78 (dt, 1H)	
¹³ C NMR;	(75 Mhz- C ₆ D ₆) δ 20 (C-9,10), 21.1 (C-7), 31.4 (C-8), 39.9 (C-4), 120.5 (C-2), 128.5 (C-5), 130 (C-6), 131.2 (C-1).	
Kütle spektrumu	<i>m/z</i> : 136 (M ⁺), 121, 105, 93 (100), 91, 77	
Koku özellikleri	Narenciye, terpenik, hafif yeşil ve karabiber benzeri	Ot ve dereotu kokulu
Sinonimleri	2-Metil-5-(1-metiletil)-1,3-sikloheksadien, 5-izopropil-2-metil-1,3-sikloheksadien, <i>p</i> -menta-1,5-dien.	
Kaynaklar	Mosciano ve ark.,1991; Rahman ve Ahmad, 1992; Koppenhoefer ve ark., 1994; Leung ve Foster,1996; Howard ve Meylan, 1997; Guerrini ve ark., 2006.	

Monoterpenlerin Biyolojik Etkileri

Monoterpenler uzun yıllardır, sahip oldukları antibakteriyel, antifungal, antiviral, rubefiyon, iştah açıcı, gaz giderici, analjezik, anestezi, antienflamatuar, antitüsit, antiakne, antidiabetik vb. etkilerinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Grayson, 1998, Demirci, 2000).

Yapılan son çalışmalarda monoterpenlerin bazı tümör tiplerinde koruyucu ve tedavi edici özellikleri bildirilmiştir. Örneğin, *d*-limonenin metastaz halindeki gastrik tümörlerde antiangiyojenik ve proapoptotik etki gösterdiği saptanmıştır (Edris, 2007). Bu bölümden itibaren, özellikle çalışmamızda kullanılan monoterpenlerin biyolojik aktivite bulgularına yer verilmiştir.

(R)-(+)-Limonen'in biyolojik etkileri

(R)-(+)-Limonen ile yapılmış çok sayıda biyolojik etki çalışması mevcuttur. Bunlar arasında, antimikrobiyal, antispazmodik, antienflamatuvar, antimutajenik, antimalaryal, antitümör, antiülser, antiviral, karsinogenez inhibisyonu, sitotoksik, antidepresan, mutajenik, insektisit, fitotoksik, psikotropik, mollusksidal, hiperlipidemik, hipotermik, hiperkolesterolemik, platelet agregasyon, iritan ve sekretolitik aktivite çalışmaları sayılabilir. Bu araştırmalardan sadece pozitif etkili sonuçlara sahip olanlar **Çizelge 5'**de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Çizelge 5. (R)-(+)-Limonenin Bazı Biyolojik Etkileri

Aktivite/Yöntem	Organizma	Sonuç*	Kaynak
Antimikrobiyal / Agardilüsyon	<i>Candida albicans</i>	1000 ppm	Tampieri ve ark., 2005
Mikrodilüsyon	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.77 ppm	Oumzil ve ark., 2002
	<i>S. simulans</i>	5.55 ppm	
	<i>S. saprophyticus</i>	2.77 ppm	
	<i>Entrococcus sp.</i>	5.55 ppm	
	<i>Bacillus antrachis</i>	2.77 ppm	
	<i>Escherichia coli</i>	5.55 ppm	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.77 ppm	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.55 ppm	
	<i>Citrobacter freundii</i>	11.1 ppm	
	<i>Enterobacter avium</i>	2.77 ppm	
	<i>Proteus mirabilis</i>	5.55 ppm	
	<i>C. albicans</i>	2.77 ppm	
<i>C. glabrata</i>	2.77 ppm		
Disk difüzyon 4 µl /disk	<i>C. albicans</i>	19 mm	Filipowicz ve ark., 2003
	<i>Serratia marcescens</i>	9 mm	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 mm	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	13 mm	
	<i>S.aureus</i>	12 mm	

*: MİK değeri (ppm, mg/ml) veya inhibisyon zon çapı (mm)

Çizelge 5. (Devam) (R)-(+)-Limonenin Bazı Biyolojik Etkileri

Aktivite/Yöntem	Organizma	Sonuç*	Kaynak
Mikrodilüsyon	<i>Bacillus cereus</i>	3 mg/ml	Vuuren ve Viljoen., 2007
	<i>Enterococcus faecalis</i>	27 mg/ml	
	<i>S. aureus</i>	13 mg/ml	
	<i>E. coli</i>	11 mg/ml	
	<i>P. aeruginosa</i>	4 mg/ml	
	<i>K. pneumoniae</i>	12 mg/ml	
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	8 mg/ml	
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3 mg/ml	
Makrodilüsyon	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.27– 0.66 ppm	Mourey ve Canillac, 2002
Disk difüzyon 5 µl/disk	<i>E. coli</i>	12 mm	Agarwal ve ark., 2002
	<i>E. faecalis</i>	10 mm	
	<i>S. typhi</i>	12 mm	
	<i>S. aureus</i>	13 mm	
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	12 mm	
	<i>Streptococcus mutans</i>	23 mm	
	<i>B. cereus</i>	13 mm	
	<i>Microsporum gypseum</i>	30 mm	
	<i>Aspergillus niger</i>	33 mm	
	<i>A. flavus</i>	25 mm	
	<i>Trichophyton rubrum</i>	15 mm	
	<i>Sporothrix schenckii</i>	23 mm	
	<i>C. albicans</i>	17 mm	
Sitotoksik /XTT testi	Hücre kültürü- CCD-19Lu	aktif 200 mM	Rolseth ve ark., 2002
Antimutajenik/Agar-plak	<i>Salmonella typhimurium</i>	100 µM	Shamon ve ark., 1994

*: MİK değeri (ppm, mg/ml) veya inhibisyon zon çapı (mm.)

Çizelge 5. (Devam) (R)-(+)-Limonenin Bazı Biyolojik Etkileri

Aktivite/Yöntem	Organizma	Sonuç*	Kaynak
Antiülser/İntragastrik	<i>in-vivo</i> Rat	40 mg/kg	Rodriguez ve ark., 1994
Karsinogenez inhibisyonu/RPMI-8402 hücreleri	Hücre kültürü	1-5 mM	Saleh ve ark., 1998
Insektisit/Repellent test	<i>Culex pifiens</i>	0.6 µg/ml	Tanida ve ark., 1991
Mollusksidal/mortalite testi	<i>Biomphlaraia glabrata</i>	50 ppm	Bezerra ve ark., 1981
Platelet agregasyon inhibisyonu/Araşidonik asit inhibisyonu	Tavşan	100 mg/ml	Rasheed ve ark., 1984
Toksisite (LD ₅₀)	Rat-oral doz	400 mg/kg	De Barros ve ark., 2000

*: MİK değeri (ppm, mg/ml) veya inhibisyon zon çapı (mm.)

α-Fellandrenin biyolojik etkileri

α-Fellandren ile ilgili yapılan kaynak taramalarında oldukça sınırlı sayıda biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmıştır (**Çizelge 6**).

Çizelge 6. *α*-Fellandren'in Biyolojik Etkileri

Aktivite	Yöntem	Sonuç	Kaynak
Antiankilostomiazis	<i>Ancylostoma caninum</i> , İnsan ve köpekte oral doz	1-1.6 ml/kg inaktif	Smille ve Pessoa, 1924
Antibakteriyel	Agar-plak <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i>	inaktif	Ross ve ark., 1980
Antifungal	Agar-plak <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>Aspergillus aegyptiacus</i>	inaktif	
Hiperkolesterolemik	<i>in-vivo</i> 14 gün boyunca diyet ilavesi	%1 aktif	Imaizumi ve ark., 1985

Çizelge 6. (Devam) α -Fellandren'in Biyolojik Etkileri

Aktivite/Yöntem	Organizma	Sonuç	Kaynak
Hiperlipidemik	<i>in-vivo</i> 14 gün boyunca %1 oranında diyet ilavesi	inaktif	Imaizumi ve ark., 1985
Karsinojenik	<i>in-vivo</i> Rat deri tümörü	%10 tümör artışı	Homburger ve Boger, 1968
Kilo azaltıcı	<i>in-vivo</i> 14 gün boyunca %1 oranında diyet ilavesi	inaktif	Imaizumi ve ark., 1985
Toksisite	Oral doz, 1 ml/kg, Köpek	inaktif	Smillie ve Pessoa, 1924

Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon)

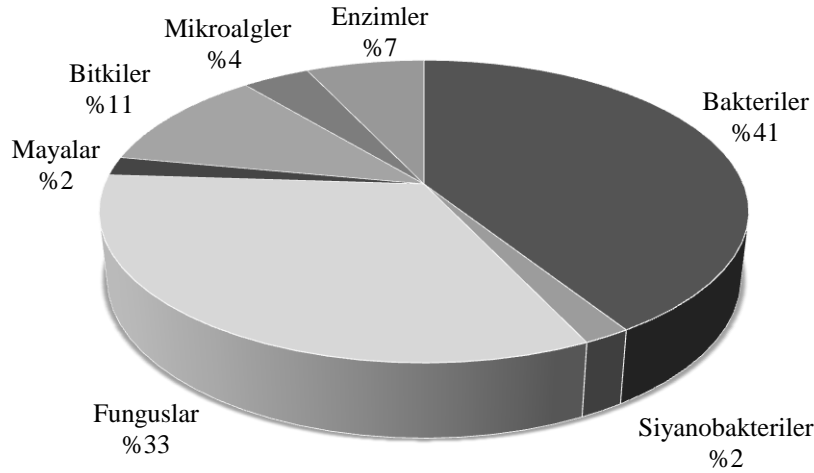
Biyotransformasyon terimi, *in vivo* şartlarda vücuda giren yabancı maddelerin enzimler ile zararsız hale getirilmesi reaksiyonlarını (metabolizasyon) ifade etmektedir. Bunlar özellikle karaciğerdeki enzimler tarafından gerçekleştirilen bir seri oksidasyon, redüksiyon, dekarboksilasyon veya hidroliz reaksiyonlarını kapsamaktadır. Sonraki adımda, daha az zararlı hale getirilen metabolitlerin ikinci bir sistemle vücuttan atılımı sağlanır. Benzer reaksiyonların mikroorganizmalar, doku kültürleri veya enzim sistemleri aracılığı ile bilinen maddelerden yola çıkılarak laboratuvar şartlarında yeni metabolitlerin sentezlenmesine de mikrobiyal transformasyon denmektedir (Roberts, 1992; Kieslich, 1997; Hashimoto ve Ozaki, 1999). Bu tez çalışması da dahil olmak üzere çoğu zaman biyotransformasyon terimi de bu maksatla kullanılmaktadır.

Mikrobiyal transformasyonlarda, en çok rastlanan ve en verimli dönüşümler, oksidoredüktaz ve hidrolazların katalizlediği reaksiyonlardır. Oksidoredüktazlar, C-C, C-H veya C=C bağlarına oksijen ekleyen veya hidrojen atomu koparan enzimlerdir. Hidrolazlar, glikozit, peptit, ester, amit gruplarını ve benzer şekilde C-N bağlarını hidroliz eden enzimlerdir (Loughlin, 2000). Bunların dışında dehidrasyon (proteaz, esteraz ve lipazlar), kondensasyon ve degradasyon reaksiyonları, yeni karbon-karbon ve hetero-atom bağlarının oluşumu, izomerizasyon ve yer değiştirme reaksiyonlarına da rastlanmaktadır. Genellikle bu tip reaksiyonların geleneksel kimyasal sentezlerle gerçekleştirilmesi oldukça zordur. Yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmalarında genellikle asiklik bileşikler, terpenler, aromatik bileşikler, oksijen- veya azot- içeren heterosiklik bileşikler, alkaloidler ve karbonhidratlar substrat olarak kullanılmaktadır (Kieslich, 1976).

Monoterpenlerin biyotransformasyonu

Son yıllarda doğal kaynaklı monoterpen biyotransformasyonları, enantiomerik seçicilikte, saf koku ve tat moleküllerinin üretilebilmesi ve oluşan ürünlerin “doğal” kabul edilmesinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur.

Yapılan çalışmalarda immobilize veya çözünebilir enzimler, hücre ekstraktları veya tüm hücre sistemleri (mikroorganizma kültürleri) kullanılmaktadır (**Şekil 1**).



Şekil 1. Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonunda Kullanılan Biyokatalizörler (Carvalho ve Fonseca, 2006)

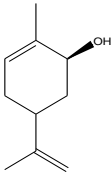
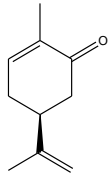
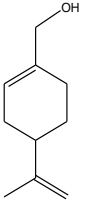
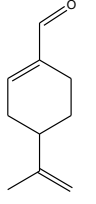
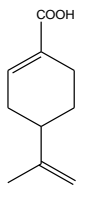
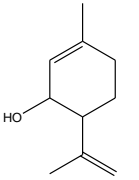
Hızla ve spesifik metabolit üretimi yapılabilen ancak izolasyonu ve stabilizasyonu zor olan enzimlerle çalışmak oldukça pahalıdır ve bazen özel kofaktörlere gereksinim duymaktadır. Tüm hücre kültürleri ucuz ve pratik olmasına rağmen, ortamın kontamine olma riski, substratın muhtemel toksik etkisi ve bazı istenmeyen yan metabolitlerin oluşumu, işlemin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Ancak, hücre membranı tarafından korunan birden fazla enzimin (sitokrom-P450 gibi multi enzim sistemleri) aynı anda çalışması ve kofaktör gerektirmemesi büyük avantaj sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı mikrobiyal transformasyon çalışmalarında en çok tüm hücre sistemleri tercih edilmektedir (Carvalho ve Fonseca, 2006).

Genellikle doğada bol miktarda bulunan monoterpenler transformasyonlar için başlangıç molekülleri olarak kullanılmaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan monoterpenler arasında, mirsen, geraniol, nerol, sitronellol, sitral, sitronellal, linalool, lavandulol, limonen, terpinolen, terpinen, terpineol, terpinen-4-ol, mentol, menton, karvon, karveol, pulegon, kafur, iyononlar, sineoller, piperiton, α -pinen, β -pinen ve tuyon sayılabilir (Kieslich, 1976; Trudgil, 1990; Van Dyk ve ark., 1998; Demyttenaere, 2000; Noma ve Asakawa, 2000; Duetz ve ark., 2003; Farooq ve ark., 2004).

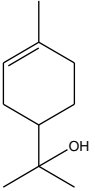
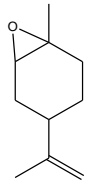
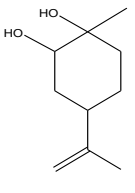
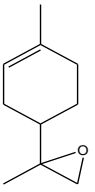
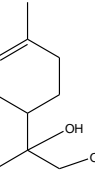
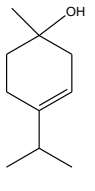
Limonen biyotransformasyonları

Limonen özellikle portakal suyu üretimi esnasında kabuk yağlarından bol miktarda elde edilmektedir. Tüm dünyada yılda yaklaşık olarak 50bin ton enantiomerik olarak saf *d*-limonen elde edilmekte ve kilogramı 1-2 dolara satılmaktadır. Aynı zamanda limonenin kimyasal iskeleti çeşitli koku, tat ve ilaç molekülleriyle benzerlik göstermektedir. Bu anlamda özellikle oksijenlenmiş limonen metabolitleri olan, α -terpineol, perillil alkol, karveol ve karvon örnek olarak verilebilir (Çizelge 7). Ancak bu metabolitlerin üretilmeleri kimyasal yollarla yapıldıklarında rasemik karışımlar elde edildiğinden, mikroorganizmalar veya enzim sistemleri tercih edilerek saf enantiomerlerin sentezi sağlanmaktadır (Duetz ve ark., 2003).

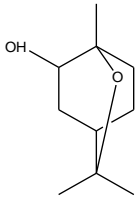
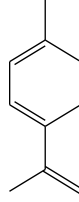
Çizelge 7. Mikrobiyal Transformasyonlarla Elde Edilen Limonen Metabolitleri

Metabolit	Mikroorganizma	Kaynak
 trans-Karveol	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Penicillium digitatum</i> <i>Synechococcus</i> sp. <i>E.coli</i> <i>Rhodococcus opacus</i>	Kieslich ve ark., 1986; Duetz ve ark., 2003; Hamada ve ark., 2003;
 d-Karvon	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Penicillium digitatum</i> <i>Aspergillus cellulosa</i> <i>Rhodococcus opacus</i> <i>Pleurotus sapidus</i>	Onken ve Berger, 1999; Duetz ve ark., 2003.
 Perillil alkol	<i>Aspergillus cellulosa</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium</i> sp. <i>P. putida</i>	Demyttenaere ve ark., 2001a; Duetz ve ark., 2003;
 Perillaldehit	<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium</i> sp.	Duetz ve ark., 2003;
 Perillik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. incognita</i> <i>P. gladioli</i> <i>P. putida</i> <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium</i> sp.	Miyazawa ve ark., 1998; Duetz ve ark., 2003;
 İzo-piperitenol	<i>Hormonema</i> sp., <i>Chaetomium globosum</i> <i>Chaetomium cochloides</i>	Kieslich ve ark., 1986; Van Dyk ve ark., 1998.

Çizelge 7. (Devam) Mikrobiyal Transformasyonlarla Üretilen Limonen Metabolitleri

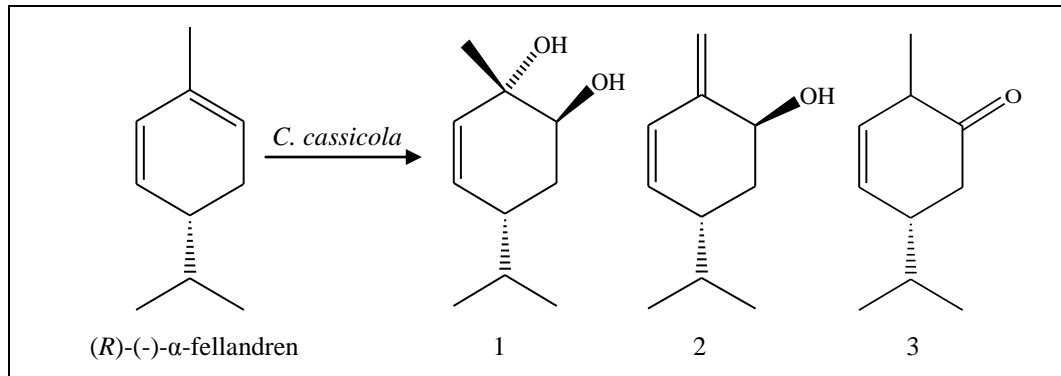
Metabolit	Mikroorganizma	Kaynak
 <p>α-terpineol</p>	<p><i>Cladosporium</i> sp. <i>Penicillium digitatum</i> <i>Armillareira mella</i> <i>Pseudomonas gladioli</i> <i>A. cellulosa</i> <i>E.coli</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i></p>	<p>Kieslich ve ark., 1986; Demyttenaere ve ark., 2001a;</p>
 <p>Limonen-1,2-epoksite</p>	<p><i>Diplodia gossypina</i> <i>Corynespora cassisola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Penicillium digitatum</i></p>	<p>Van der Werf ve ark., 1998; Demyttenaere ve ark., 2001a;</p>
 <p>(8-p-menten-1,2-diol)</p>	<p><i>Pseudomonas</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Diplodia gossypina</i> <i>Corynespora cassisola</i> <i>Armillareira mella</i> <i>A. cellulosa</i> <i>Trichosporum cutaneum</i></p>	<p>Muherjee, ve ark., 1973; Kieslich ve ark., 1986; Abraham ve ark., 1986; Demyttenaere ve ark., 2001a; Pinheiro ve Marsaioli, 2007</p>
 <p>Limonen-8,9-epoksite</p>	<p><i>Xanthobacter</i> sp.</p>	<p>Van der Werf ve ark., 1998,</p>
 <p>p-Ment-1-en-8,9-diol</p>	<p><i>Spodoptera lutura</i> (kelebek larvası)</p>	<p>Miyazawa ve ark., 1998;</p>
 <p>Ment-3-en-1-ol</p>	<p><i>Penicillium digitatum</i></p>	<p>Demyttenaere ve ark., 2001a;</p>

Çizelge 7. (Devam) Mikrobiyal Transformasyonlarla Üretilen Limonen Metabolitleri

Metabolit	Mikroorganizma	Kaynak
 Ekzo-2-hidroksi-sineol	<i>Penicillium digitatum</i>	Demyttenaere ve ark., 2001a;
 1,3,5- <i>p</i> -mentatrien	<i>Penicillium digitatum</i>	Demyttenaere ve ark., 2001a;

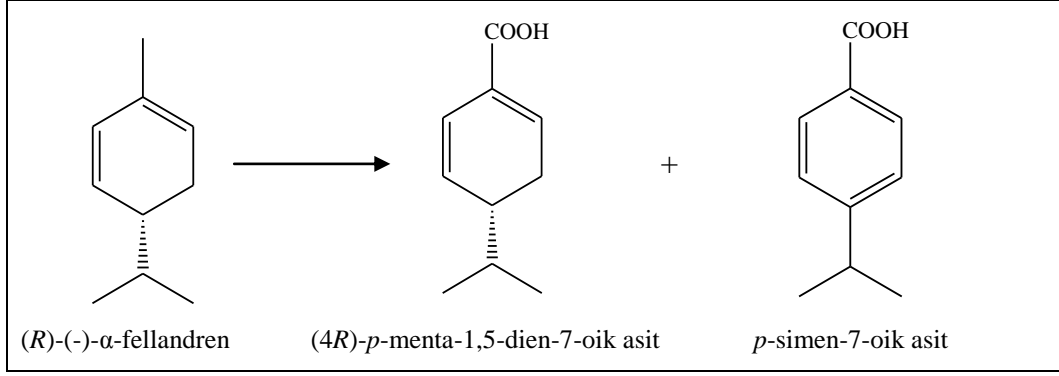
α -Fellandren biyotransformasyonları

Yapılan kaynak taramalarında, Abraham ve ark., (1986) tarafından (*R*)-(-)- α -fellandrenin, *Corynespora cassicola* DSM-62474 (filamentli fungus) ile gerçekleştirilen tek bir biyotransformasyon çalışmasına rastlanmıştır. Oluşan metabolitler, (1*S*,2*S*,4*R*)-5-*p*-menten-1,2-diol (1), yabunikkeol (2) ve 5-*p*-menten-2-on (3) olarak bildirilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. (*R*)-(-)- α -Fellandren'in *Corynespora cassicola* ile Elde Edilen Metabolitleri

Bir başka araştırmada *Spodoptera litura* larvası kullanılarak *in-vivo* ortamda α -fellandren'den (Şekil 3), *p*-simen-7-oik asit (kumik asit) ve (4*R*)-*p*-menta-1,5-dien-7-oik asit elde edilmiştir (Miyazawa ve Wada, 2000).



Şekil 3. (R)-(-)- α -fellandren'in *Spodoptera litura* Larvası Kullanılarak Elde Edilen Metabolitleri

Bir diğer çalışmada, elektrokimyasal yöntemlerle α -fellandren'den *trans*-yabunikkeol elde edilmiştir (Montiel ve ark., 1987). Gama ışınları kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada (Cataldo ve ark., 2004) α -fellandren'den herhangi bir metabolit elde edilemediği bildirilmiştir.

Uçucu yağ biyotransformasyonları

Yapılan kaynak taramalarında biyotransformasyon çalışmalarının büyük çoğunluğunda, doğal veya sentetik olarak elde edilen uçucu yağ bileşiklerinin substrat olarak kullanıldığı görülmüştür. Biyotransformasyon araştırmalarında uçucu yağın kendisinin kullanıldığı çok az sayıda araştırma olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, GK ve GK/KS ile ana bileşenlerinin α -pinen (%70) ve β -pinen (%20) olduğu belirlenen terementi esansının bitki doku kültürleri kullanılarak transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 20 gün süresince belirli günlerde örnekler alınarak α - ve β -pinen'in, kültür ortamındaki azalma miktarı incelenmiştir. 20 gün sonunda α - ve β -pinen'in tamamen tükendiği ve ortamda yüksek oranlarda verbenon (%58), *trans*-sobrerol (%18), α -terpineol (%10) ve *trans*-verbenol (%8) oluştuğu saptanmıştır (Dvorakova ve ark., 2007).

Uçucu yağın substrat olarak kullanıldığı bir başka çalışmada da %97 oranında (R)-(+)-limonen taşıdığı belirlenen portakal kabuğu uçucu yağının *Fusarium oxysporum* ile mikrobiyal transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan GK/KS analizleri sonucunda limonenin tamamına yakınının (R)-(+)- α -terpineol'e dönüştüğü bildirilmiştir (Marostica ve Pastore, 2007).

%75 oranında (+)-linalool taşıyan *Coriandrum sativum* uçucu yağının *Aspergillus niger* ile yapılan biyotransformasyonunda *cis*-furanoit linalool oksit ve *cis*-piranoit linalool oksit meydana geldiği bildirilmiştir (Demyttenaere, 2001b).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu bölümde mikrobiyal transformasyon çalışmalarında ve biyolojik aktivite testlerinde kullanılan substratlar, kimyasal maddeler ve çözücüler, aletler, besi ortamları, mikroorganizmalar ve çalışma yöntemlerine yer verilmiştir.

Substratlar

Transformasyon ve biyolojik aktivite çalışmalarında substrat olarak (*R*)-(-)- α -felandren (Fluka- \geq %98), (*R*)-(+)-limonen (Aldrich- \geq %95) ve *Schinus molle* uçucu yağı kullanılmıştır.

Bitkisel Materyalin Toplanması ve Uçucu Yağ Eldesi

Bu çalışmada kullanılan *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) bitkisinin yaprak ve meyveleri Ocak'2006 ve Ağustos'2006 tarihleri arasında, İzmir-Bornova, Seferihisar, Çiğli ve Aydın-Didim bölgelerinden toplanmıştır. Toplanan örnekler gölgede, oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Uçucu yağ eldesi su distilasyonu yöntemiyle Clevenger tipi aparey kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapraklar olduğu gibi, meyveler ise tunç havanda dövüldükten sonra 2 litrelik balona 100 gr kadar tartılarak aktarılmıştır. 10 katı kadar distile su ilave edilerek 3 saat süreyle distilasyon işlemi yapılmıştır. Bu süre sonunda dereceli kısımda biriken yağın hacmi okunarak kaydedilmiştir (Türk Farmakopesi, 2004)

Kimyasal Madde ve Çözücüler

- 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil: DPPH (Sigma)
- Glasiyel asetik Asit (Carlo Erba)
- Diklorometan (Merck)
- Etil asetat (Carlo Erba)
- Sodyum hipofosfat (Na_2HPO_4) (Fluka)
- Dimetil sülfoksit (Riedel de Haen)
- Aseton (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Sülfürik asit (Riedel de Haen)
- Anisaldehit (Fluka)
- Kloroform (Merck)
- Silikajel 60G (Merck 7734)
- *n*-hekzan (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Dötorokloroform (Aldrich)
- Gliserol (Merck)
- Linoleik asit (Sigma)
- Susuz sodyum sülfat (Fluka)
- Askorbik asit (Sigma)
- 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit): ABTS^{•+} (Sigma)
- Agar agar (Fluka)
- Ampisilin (Sigma)
- Benomil (Riedel de Haen)
- Bütillenmiş hidroksitoluen (Sigma)
- Glikoz (Fluka)
- Ketokonazol (Merck)
- Kloramfenikol (Sigma)
- Klotrimazol (Sigma)
- Malt ekstresi (Fluka)
- Baryum klorür (Sigma)
- Pepton (Fluka)
- Sodyum klorür(NaCl) (Fluka)
- Trifenil tetrazolyum klorit (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)
- Vanilin (Sigma)
- Yeast ekstrakt (Fluka)
- β -Karoten (Sigma)
- β -Siklodekstrin (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)

- Troloks (Sigma)
- Hidroklorik asit (HCl)
- Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sodyum persülfat (Sigma)
- Potasyum hidroksit (KOH)
- Potasyum klorür (KCl)

Aletler

- Clevenger apareyi, (İldam)
- Gaz-Kromatografisi, (Agilent 6890N GC)
- Gaz-Kromatografisi / (Kütle Spektrometresi, (Agilent 5975 GC-MSD)
- Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi, (Bruker DPX FT NMR-500 Mhz)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, (Shimadzu LC10A Vp)
- Spektrofotometre, (Shimadzu UV1700 PharmaSpec)
- Polarimetre, (Kruss, P8000)
- Steril Kabin, (Esco EN1822)
- pH-Metre, (WTW Inolab)
- Vorteks, (Ika Genius 3)
- Ultrasonik su banyosu, (Bandelin-sonorex)
- Su banyosu, (GFL-1086)
- Bakteriyolojik etüv, (MMM-Incucell)
- Çalkalamalı (orbital) etüv, (New Brunswick Scientific)
- Otoklav, (Hirayama HV-50)
- Santrifüj, (Sigma)
- Otomatik multikanal pipetör, (Brand)
- Ultraviyole lambası, (Camag)
- Vakumlu filtrasyon sistemi, (Sartorius)
- Vakumlu yoğunlaştırıcı, (Labconco)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı, (Heidolph MR3001)
- Rotavapor, (Heidolph)
- Otomatik İTK uygulama ve develope sistemi, (Camag ATS4 ve ADC2)
- Biyoluminesan toksisite test kiti (Chromadex[®])
- Biyoluminesan görüntüleme sistemi (Camag BioLuminizer[®])
- Ultra derin dondurucu (-85°C), (New Brunswick Scientific)

Mikroorganizmaların Temini ve Kültür Koleksiyonunun Oluşturulması

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında ve antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar, ATCC (American Type Culture Collection), NRRL (ARS; Agricultural Research Service), DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), AHU (AHU Culture Collection, Hokkaido Üniversitesi-Japonya), Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü, Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi-Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü, Hacettepe Üniversitesi-Biyoloji Bölümü ve Regensburg Üniversitesi, Fen Fakültesi, Almanya, Balıkesir Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü gibi çeşitli birimlerden temin edilmiştir. Koleksiyon oluşturmak üzere tüm mikroorganizmalar, SDA, PDA, MHA, α -medyum, Malt Extract Broth, Malt Extract Agar gibi besi ortamlarında geliştirilerek, saflıkları kontrol edilmiştir. Daha sonra kültürler gliserolün distile sudaki %15'lik steril

çözeltisini içeren mikro-reaksiyon tüplerine aktarılmıştır. Hazırlanan çoklu stoklar daha sonra tekrar kullanılmak üzere -85°C de saklanmıştır.

Mikroorganizmaların Geliştirilmesi

Mikroorganizmalar kullanılacağı zaman uygun besi ortamına aşılansarak 24-26 °C de 48-72 saat (transformasyon çalışmalarında kullanılacaklar için) veya 28°C ve 37°C’de 24 saat (biyolojik aktivite testlerinde kullanılacaklar için) inkübe edilmiştir.

Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyotransformasyon ve antimikrobiyal etki deneylerinde toplam 47 adet mikroorganizma kullanılmıştır. **Çizelge 8** ve **9**’da kaynakları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 8. Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar

No	Adı	Kaynak
F1	<i>Corynespora cassicola</i>	DSM 62474, Almanya
F2	<i>Corynespora cassicola</i>	DSM 62475, Almanya
F3	<i>Fusarium heterosporium</i>	DSM 62719, Almanya
F4	<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317, ABD
F5	<i>Yarrowia lipolitica</i>	NRRL YB-423, ABD
F6	<i>Alternaria alternata</i>	NRRL 20593, ABD
F7	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL Y-326, ABD
F8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763, ABD
F9	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NRRL Y-8279, ABD
F10	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	NRRL Y-1026, ABD
F11	<i>Neurospora crassa</i>	-N23, Hacettepe Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
F12	<i>Neurospora crassa</i>	-N24, Hacettepe Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
F13	<i>Neurospora crassa</i>	-WT-,Regensburg Üniv.,FenFak., Almanya
F14	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 1284, ABD
F15	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374, ABD
F16	<i>Fusarium culmorum</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
F17	<i>Botrytis cinerea</i>	AHU 9424, Japonya

Çizelge 8. (Devam) Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar

F18	<i>Aspergillus flavus</i>	Balıkesir Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
F19	<i>Penicillium expansum</i>	Balıkesir Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
F20	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ATCC-24725
B1	<i>Pseudomonas putida</i>	NRRL B-4067, ABD
B2	<i>Devosia riboflavina</i>	NRRL B-784, ABD

F1-F20: Fungus B1, B2: Bakteri

Çizelge 9. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Mikroorganizmalar

No	Adı	Kaynak
1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567
5	<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B-123
6	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
8	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711
9	<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B-4378
10	<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Klinik İzolat
11	<i>Agrobacterium tumefaciens (S6)</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
12	<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	NRRL B-4072
13	<i>Pseudomonas syringae pv. phaseolicola</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
14	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
15	<i>Serratia marcescens</i>	NRRL B-2544
16	<i>E.coli O157:H7</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji B.
17	<i>Candida albicans</i>	Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Klinik İzolat
18	<i>Candida albicans</i>	NRRL 27077
19	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028

Çizelge 9. (Devam) Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Mikroorganizmalar

20	<i>Candida glabrata</i>	Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Klinik İzolat
21	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y-900
22	<i>Candida tropicalis</i>	NRRL Y-12968
23	<i>Candida krusei</i>	NRRL Y-7179
24	<i>Candida zeylanoides</i>	NRRL Y-1774
25	<i>Candida parapsilosis</i>	NRRL Y- 12696

Kullanılan Besi Ortamları

α -medyum

20 gr glikoz, 5 gr pepton, 5 gr yeast ekstrakt, 5 gr NaCl, 5 gr Na₂HPO₄ distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, otoklavda steril edilmiştir. 0.1 N HCl veya KOH kullanılarak pH.7'ye ayarlanmıştır.

Czapek's medyum

15 gr glikoz, 15 gr sakkaroz, 1 gr KCl, 1 gr K₂HPO₄, 1 gr MgSO₄.7H₂O, 0.01 gr FeSO₄.7H₂O distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, steril edilmiştir. 0.1 N HCl veya KOH kullanılarak pH.7'ye ayarlanmıştır.

Abraham's medyum

10 gr glikoz, 10 gr pepton, 3 gr maya ekstresi, 20 gr malt ekstresi, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, steril edilmiştir. 0.1 N HCl veya KOH kullanılarak pH.7'ye ayarlanmıştır.

Yumuşak agar

Hazır karışım halinde temin edilmiş MHB besiyerine %7.5 gr/l oranında bakteriyolojik agar ilave edilmiş, ısıtılıp homojenizasyon sağlandıktan sonra gerekli miktarda tüplere dağıtılarak otoklavda steril edilmiştir. Biyootografi deneylerinde kullanılmak üzere +4°Cde saklanmıştır.

Hazır besi ortamları

Çalışmamızda kullanılan, Mueller-Hinton Broth (Fluka), Mueller Hinton Agar (Fluka), Sabouraud Glukoz Agar (Fluka), Patates Dekstroz Agar (Merck), Malt Ekstrakt Agar (Fluka), Malt Ekstrakt Broth (Merck), Nutrient Agar (Fluka) gibi hazır olarak temin edilen besi ortamları kutu üzerindeki tarife uygun olarak sulandırılarak hazırlanmış ve steril edilerek kullanılmıştır. Petri kaplarına besiyeri dökülmesi işlemi steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Petriler en fazla 2 hafta süreyle saklanmış, kullanılacağı güne kadar +4°Cde muhafaza edilmiştir.

Sterilizasyon

Katı ve sıvı besiyerleri hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de, 1.5 atm basınç altında 20 dakika boyunca steril edilmiştir. pH ayarlaması sıvı besiyerleri otoklavdan çıkarıldıktan sonra, membran filtre (0.2 µm) ile steril edilmiş 0.5 N

KOH veya HCl ile yapılmıştır. Biyoluminesan akut toksisite deneyinde kullanılan tüm besiyeri ve çözeltiler 121 °C'de, 1.5 atm basınç altında 40 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilmiştir.

Mikroorganizma ile kontamine olmuş tüm laboratuvar malzeme ve gereçleri otoklavda steril edildikten sonra atılmış veya yıkanarak tekrar kullanılmıştır.

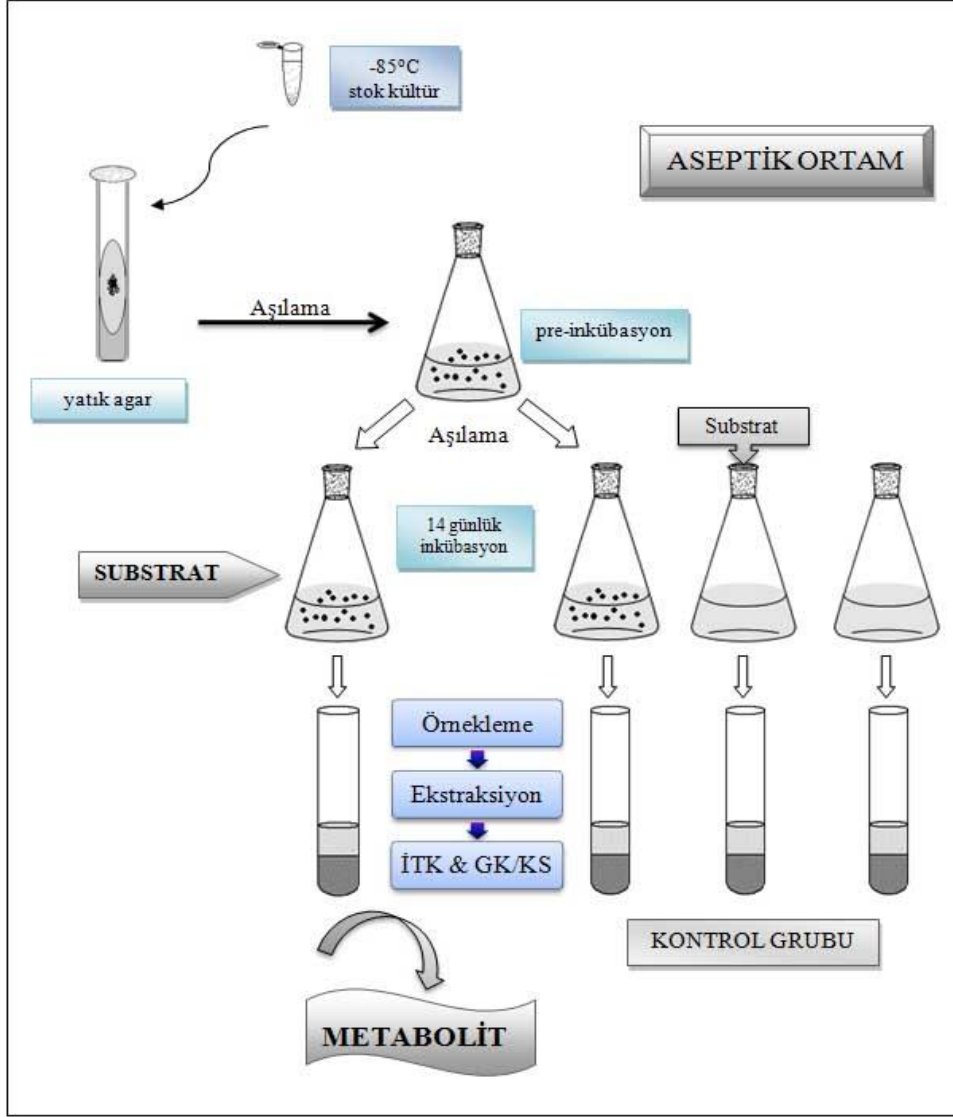
Biyotransformasyon Çalışmaları

Biyotransformasyonda kullanılacak substrat konsantrasyonu

Dönüşümleri planlanan (*R*)-(-)- α -felandren, (*R*)-(+)-limonen ve *Schinus molle* uçucu yağının, biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak olan mikroorganizmalara karşı toksik olmayan dozları belirlenmiştir. Bunun için makro dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (Beşe, 1989). Sıvı besi yeri içeren deney tüplerinde substratların çift katlı seri dilüsyonları hazırlanarak (1 mg/ml ile 0.06 mg/ml aralığında) her biri denenecek mikroorganizma ile aşılanmıştır. 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üremenin engellenmediği dozlar (MİK) belirlenerek deneylerde kullanılmıştır.

Ön tarama deneyleri

Çizelge 8'de listelenmiş, koleksiyonumuza ait mikroorganizmaların tamamı ikili gruplar halinde aynı ortam şartlarında başlangıç materyalleri ile etkileştirilmiştir. 250 ml'lik erlenlerde 100'er ml hazırlanan α -medyum, agar plaklarında yeterli olgunluğa erişen mikroorganizmalar ile inoküle edilmiş, 48 saat, 26°C de 200 rpm çalkalama hızında pre-inkübasyona tabi tutulmuştur (**Şekil 4**). Bu süre zarfında mikroorganizmaların yeni ortamlarına adaptasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda mikroorganizma tekrar taze besi ortamlarına çift paralel olarak ekilmiş yine aynı şartlarda 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda erlenlerden biri mikroorganizma kontrolü olarak ayrılırken, diğerine uygun çözücü içinde toksik olmayan dozlarda substrat ilave edilerek, çalkalamalı etüvde 14 günlük inkübasyona bırakılmıştır (Abraham ve ark., 1986; Lee ve ark., 1990; Abourashed ve ark., 1999).



Şekil 4. Biotransformasyon Ön Tarama Aşaması

Substrat stabilizasyonu ve kontrol grupları

Yukarıda bahsedilen mikroorganizma kontrol erleni yanında α -medyum içeren diğer bir erlene substrat ilave edilerek, maddenin inkübasyon süresi boyunca stabilitesinin kontrolü sağlanmıştır. Diğer bir erlene ise sadece besi ortamı ilave edilerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 14 günlük inkübasyon süresince substratın stabilitesinin kontrolü “Tepe Boşluğu-Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (KFME)” yöntemiyle yapılmıştır. Sadece substrat bulunan besi ortamından belli saat ve günlerde örnekleme yapılarak Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) ile varlığı kontrol edilmiştir.

Tepe Boşluğu-Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (KFME)

100 μ m kalınlığında polidimetilsiloksan (PDMS) kaplı adsorban uçtan oluşan KFME şırıngası, ağzı parafilm ile kaplanarak kapatılan erlenin tepesinden içeriye sokularak, 15 dakika, 40°C sıcaklıkta beklenmiştir. Şırınga ucuna tutunan

maddelerin belirlenebilmesi için GK/KS sisteminin enjeksiyon portunda 5 dk bekletilerek kolona verilmiştir (Vas and Vekey, 2004).

Örnekleme ve Ekstraksiyon

14 gün süresince kontroller dahil inkübasyonu süren erlenlerden, düzenli olarak 1., 3., 5., 7., ve 14. günlerde aseptik şartlarda 2'şer ml örnekler alınmıştır. Deney tüpüne alınan bu örneklere 0.5 ml etil asetat ilave edilmiş, vortekste 30 saniye süresince çalkalanmıştır. Etil asetatlı kısmın ayrılabilmesi için 4000 rpm devirde 5 dk santrifüjlenmiştir. Kontrol erlenleri de dahil olmak üzere aynı işlem 3 kez tekrarlanarak örneklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstreler aynı gün İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) kullanılarak kontrol edilmiştir. 14 günlük inkübasyon sonunda tüm erlenler ekstre edilerek, İTK sonuçlarına göre metabolit olduğu düşünülen örneklerden GK/KS numunesi hazırlanmıştır. Örnekler GK/KS'ye verilmeden önce kendi çözücüsü ile önceden hazırlanmış silikajel G taşıyan mini kolonlardan geçirilmiştir.

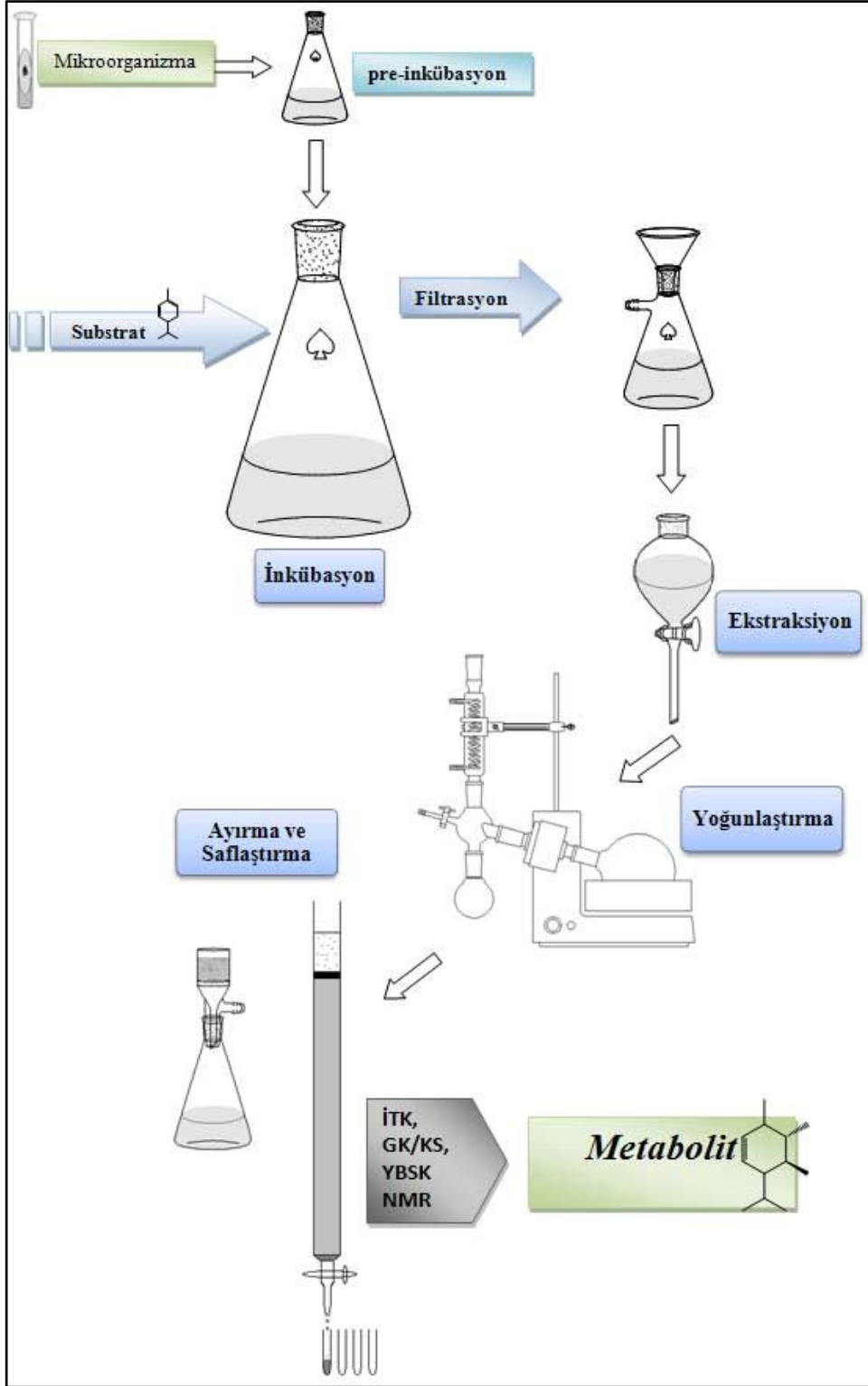
Preparatif Amaçlı Biyotransformasyon

Mikroorganizma kültürü ve substrat ilavesi

Ön tarama deneylerinde İTK ve GK/KS sistemleri ile metabolit oluştuğu belirlenen kültür ortamları büyük hacimlerde hazırlanmıştır. Bunun için 2 litrelik erlenlerde 1 litre besiyeri hazırlanmış, madde ilavesinden 48-72 saat önce mikroorganizma ile aşılansarak inkübasyona bırakılmıştır. Gelişimini tamamlayan kültürlerle, aseptik şartlar altında 500 mg başlangıç maddesi steril β -siklodekstrine emdirilerek ilave edilmiş, 200 rpm ve 28°C de çalkalayıcı inkübatöre bırakılmıştır (Şekil 5).

Ekstraksiyon

Ön tarama deneylerine göre, metabolitin en yüksek seviyede olduğu gün transformasyon işlemine son verilerek, besi ortamı etil asetat ile ekstre edilmiştir. Öncelikle vakumlu Buchner hunisi kullanılarak besi ortamı misellerden kurtarılmıştır. Süzülen besiyeri hacmi kadar etil asetat ile ayırma hunisinde en az 3 defa ekstre edilmiştir. Ayrılan fazlar birleştirilerek öncelikle susuz Na_2SO_4 'tan geçirilmiş ardından alçak basınç altında 40°C'de yoğunlaştırılmıştır. Küçük bir silikajel taşıyan kolondan süzildükten sonra metabolit varlığı GK/KS kullanılarak doğrulanmıştır. Elde edilen ekstre vakum-sıvı kromatografisi yöntemi ile fraksiyonlandıktan sonra hedef metabolitin ayırımı ve izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 5. Metabolit İzolasyonuna Yönelik Preparatif Çalışma Şeması

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Analitik İTK

Alüminyum destek üzerine 0.2/0.25 mm kalınlığında silikajel GF₂₅₄ kaplanmış, 10x10 ve 10x20 ebatlarında hazır plaklar kullanılmıştır. Gerektiğinde istenen boyutlarda kesilerek kutularında nemden ve açık havadan uzakta muhafaza edilmiştir. Uygun çözücü sisteminde develope edilen plaklar kurutulduktan sonra UV 254-366 nm dalga boyunda incelenerek gerekli işaretlemeler yapılmıştır. Bu dalga boylarında absorpsiyon vermeyen maddelerin belirlenmesinde ise anisaldehid-sülfürik asit veya vanilin-sülfürik asit reaktifleri kullanılmıştır. Reaktif uygulamasından sonra plaklar 110°C de 1-2 dk ısıtılmıştır.

Metabolit oluşumunun kontrolü için yapılan İTK çalışmalarında hekzan:etilasetat (9:1, 3:1, 1:1), hekzan:aseton (3:1, 1:1), diklorometan:aseton (9:1, 4:1, 3:1, 3:2, 1:1) gibi çeşitli çözücü sistemleri denenerek kullanılmıştır.

Preparatif İTK

10x20 cm ebatlarında Silikajel G cam destekli hazır plaklar kullanılmıştır. Plağa uygun ebattaki tank önceden uygun çözücü sistemi ile doyurulmuş, ayrılacak karışım bir bant şeklinde plak tabanına uygulanmıştır. Maddeler sürüklendikten sonra plak kurutulmuş ve bir UV lambası altında istenen madde işaretlenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddeler için plak kenarına ince bir şerit halinde belirteç püskürtülmüştür. İzolasyonu planlanan maddeler bantlar halinde ince uçlu bir spatül ile dikkatlice kazınarak içinde uygun çözücü bulunan beherlere aktarılmıştır. Borosilikat filtreye sahip mini-hunilerden süzülüp madde silikajelden kurtarılmıştır. Elde edilen metabolit çözeltisi azot gazı veya düşük basınç altında yoğunlaştırılmıştır.

Vakum Sıvı Kromatografisi

Ekstrenin fraksiyonlanması için ekstre miktarının 40-50 katı kadar tartılmış ve 110°C de 2 saat aktive edilmiş silikajel G, 3 cm çapında, 40 cm boyunda şilifli kolona yüklenmiştir. Kolon vakumlu erlene yerleştirildikten sonra n-hekzandan başlanarak metanole kadar gradiyent elüsyon yapılarak ekstre fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlar İTK ile incelenmiş, metabolit taşıyan fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır.

Sütun Kromatografisi

Vakum sıvı kromatografisi ile ayrılan ve metabolit bulunan fraksiyonlar klasik kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Bunun için ekstre ve kullanılacak silikajel miktarına göre 1.5x45 ve 2x50 cm ebatlarında kolonlar tercih edilmiştir. Kolon hekzan ile ıslatılmış silikajel ile yaş usulde doldurulmuştur. Ekstre hekzan:etilasetat (3:1) karışımı içinde çözülerek az miktarda silikajele emdirilmiştir. Çözücülerin tamamen uçması için 40°C lik etüvde ara sıra kuru bir spatülle karıştırmak suretiyle 1 saat boyunca bekletilmiştir. Hekzandan başlanarak etil asetat ile gradiyent elüsyon yapılarak (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 40:60, 30:70) 3'er ml lik fraksiyonlar toplanmış ve en son kolon metanol ile yıkanmıştır. Tüm fraksiyonlar elüsyon devam ederken, İTK ile kontrol edilmiştir. Elde edilen

fraksiyonlar vakumlu konsantratöre yerleştirilerek yoğunlaştırılmış ve metaboliti en saf haliyle taşıyanlar birleştirilmiştir.

Semi-preparatif yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)

Sütün kromatografisi sonucunda alınan metabolit fraksiyonlarının saflaştırılması için semi-preparatif kolon yardımıyla YBSK sistemi kullanılmıştır. Fraksiyonlar Shimadzu LC 10AVp sistemi kullanılarak diklorometan:aseton (3:2) çözücü sistemi ile silikajel kolonda (10 x 250 mm, 10 µm partikül çapı, GL Science)'da izokratik yöntemle ayrılmıştır. Karışımlar PDA dedektör kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Mobil fazda kullanılan çözücü sisteminde çözünen örnek 50 µl lik hacimlerde enjekte edilmiş ve 325 nm'de ayrılan pikler eşzamanlı olarak dedektör çıkışından toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar yoğunlaştırıldıktan sonra GK/KS sistemi ile doğrulaması yapılmış ve saflıkları kontrol edilmiştir.

Yapı Tayini

Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GK/KS)

Mikrobiyal transformasyonda kullanılacak uçucu yağ dahil tüm substratların ve oluşan metabolitlerin kütle spektrumlarının alınması için kullanılmıştır. Bu amaçla Agilent 5975 GC-MSD sistemi, HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0.8 mL/dak akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C'dir. 70eV elektron enerjisiyle, 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C'de 10 dak, 4°C/dak artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dak, 1°C/dak artışla 240°C'ye yükselen toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi"nin yanı sıra Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 2.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmış, ayrıca ilgili kaynaklardaki değerlerden de yararlanılmıştır.

Gaz kromatografisi (GK)

Substrat olarak kullanılacak *Schinus molle* uçucu yağının kompozisyonundaki maddelerin relatif yüzdeleri gaz kromatografisinden (FID dedektör) yararlanılarak belirlenmiştir. Bunun dışında standart maddelerin ve metabolitlerin saflıklarının belirlenmesinde de GK kromatogramlarından yararlanılmıştır. Bu amaçla Agilent 6890N GK sistemi, HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0.8 mL/dak akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C dir. 300°C sıcaklıkta, FID (Flame Ionization Detector) tip dedektör kullanımıdır. Relatif tutunma indislerinin (RRI) hesaplanmasında n-alkanlar referans olarak kullanılmıştır.

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

¹H NMR (500 Mhz) ve ¹³C NMR (125 Mhz) spektrumları, Bruker DPX FT NMR sistemi ile alınmıştır. Ayrıca Japonya Tokushima Bunri Üniversitesinde 400 Mhz'lik Jeol ECX NMR sistemlerinde de ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC ve ¹H-¹³C HMBC analizleri yapılmıştır. Çözücü olarak dötoro-kloroform (CDCl₃) kullanılmıştır. Kimyasal kayma değerleri ppm olarak verilmiştir.

Polarimetri

Dalga doyu 589.3 nm olan sodyum D ışığı kullanılmıştır. Ölçümü yapılacak maddeler uygun çözücüde bilinen konsantrasyonlarda hazırlanarak, 0.5 dm uzunluğundaki örnek tüpüne aktarılmıştır. Sapma açısı 20 saniye aralıklarla 10 kez ölçülerek, ortalaması alınmıştır. Spesifik çevirme açısı Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen **Eşitlik 1**'e göre hesaplanmıştır (Avrupa Farmakopesi 2005).

$$[\alpha]_D^{20} = 1000 \cdot \alpha / l \cdot c \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Burada $[\alpha]_D^{20}$: Spesifik çevirme açısı; α ; ölçülen sapma açısı; l: örnek tüpünün desimetre cinsinden uzunluğu; c: maddenin çözeltideki konsantrasyonu (gr/L)'dur.

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Mikrobiyal transformasyonlarda kullanılan başlangıç maddeleri, standart antimikrobiyal maddelerin ve oluşan bazı metabolitlerin farklı yöntemlerle biyolojik etkileri incelenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite

Mikro dilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Çizelge 9'da listelenen bakteriler deneyden 1 gün önce -85°C den çıkarılarak, Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarına ekilmiştir. İnsan patojenleri 37°C de, bitki patojenleri 28°C de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Saflikları kontrol edilen kültürlerden birer koloni alınarak Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine pasajlanmış, aynı sıcaklık derecelerinde 18-24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerden belirli miktarlarda alınarak yeni hazırlanmış MHB tüplerine belirli miktarlarda aktararak bulanıklıkları McFarland No:0.5 (BaCl_2 %1.75, 0.36 N H_2SO_4 içinde), tüpüne göre ayarlanmıştır. Bu şekilde yaklaşık 10^8 CFU/ml'lik (mililitredeki koloni oluşturan ünite) bakteri konsantrasyonu elde edilmiştir.

Numuneler 16 mg tartılarak %50'lik steril DMSO'da çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Önceden 100'er μl steril MHB aktarılmış "U tipi" 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında çift katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 8 mg/ml ile 0.001 mg/ml aralığında madde konsantrasyonları elde edildikten sonra, otomatik multikanal pipetör kullanılarak 100'er μl bakteri kültürlerinden ilave edilmiştir. Plakların kapakları kapatılarak uygun sıcaklıklarda, 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda üremenin olduğu alanların daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa trifenil tetrazolyum klorit (TTC) çözeltisinden (metanolde %1) 20'şer μl ilave edilmiştir. 2 saat daha etüvde bekletilen plaklar incelenerek, minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Standart antimikrobiyal madde olarak kloramfenikol ve ampisilin kullanılmıştır. Plakta son kuyucuk sütunu üreme kontrolü olarak, en alt kuyucuk satırı da madde kontrolü olarak kullanılmıştır. Deneyler çift paralel olarak yapılmış, MİK değerleri ortalama olarak verilmiştir (Konneman ve ark.,1997; Amsterdam, 1997).

Mikro dilüsyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi

Çizelge 9'da listelenen 9 adet *Candida* türü antibakteriyel deneyde anlatıldığı şekilde test edilmiştir. Farklı olarak, deneyde kullanılan mikroorganizma yoğunluğu 10^6 CFU/ml'dir. Ayrıca standart antifungal madde olarak ketokonazol, benomil [metil-1-(butilkarbomil)-2-benzimidazol-karbamat], klotrimazol ve griseofulvin kullanılmıştır. Deneyler çift paralel olarak yapılmış, MİK değerleri ortalama olarak verilmiştir.

Biyootografi yöntemi

Biyootografi yöntemi biyoaktif bir ekstre veya madde karışımı içindeki aktiviteden sorumlu madde ve/veya maddeleri belirlemek için kullanılmaktadır (Janssen ve ark., 1986; Rahalison ve ark., 1991; Nostro ve ark., 2000). Bu yöntem ile başlangıç maddeleri, transformasyon sonucu elde edilen ham ekstratlar ve saflaştırılmış metabolitler önceden seçilen bir grup insan, gıda ve bitki patojeni mikroorganizmaya karşı test edilmiştir. Yöntem birkaç aşamadan oluşmaktadır.

İTK plaklarının hazırlanması

8x8 cm ebatlarında kesilen silikajel GF₂₅₄ plaklara 10 mg/ml konsantrasyondaki örneklerden Drummond kılcal borularıyla 5'er µl halinde uygulanmıştır. Her test mikroorganizması için ayrı plak hazırlanmıştır. Önceden diklorometan:aseton (4:1) çözücü sistemi ile doyurulan İTK tankına plaklar yerleştirilerek develope edilmiştir. Daha sonra plaklar 40°C'lik etüvde 30 dk bekletilerek tamamen çözücünden arınması sağlanmıştır. Plaklardan biri referans olarak seçilmiş, önce UV 254 ve 366 nm de incelenmiş, ardından anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile spotların yerleri belirlenmiştir. Diğer plaklar başka bir işlem uygulanmadan mikroorganizma kültürü ile kaplanmıştır.

Mikroorganizma kültürünün hazırlanması

Bir gün önce MHB besi ortamı içeren tülerde geliştirilen kültürler, önceden hazırlanmış ve deney süresince 42°C deki su banyosunda bekletilerek katılaşması engellenen yumuşak agar tüplerine (%7.5 agar) McFarland No.5 bulanıklık standardı referans alınarak aşılacaktır. Bu sıcaklıkta canlılıklarını yitirmeyen kültürler bir sonraki aşamaya kadar bekletilmiştir.

Aktivitenin belirlenmesi

Nutrient agar (NA) besiyeri 13 cm'lik steril petri kaplarına bir taban oluşturacak şekilde 20 ml kadar dökülmüştür. Develope edilmiş plaklar her bir mikroorganizma için farklı bir agar plağına aseptik şartlar altında yerleştirilmiştir. 42°C deki su banyosunda bekletilen mikroorganizma ile henüz aşılana kültürler İTK plağı üzerinde çok ince bir katman oluşturacak şekilde yavaşça petriye dökülmüştür. Donması beklendikten sonra plaklar uygun sıcaklıklarda 24 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda plaklara TTC tuzu çözeltisi (Metanolde %1.5) püskürtülerek 3-4 saat daha etüvde bırakılmışlardır. Üremenin olmadığı alanlar, reaktif ile renklendirilmiş canlı bakteri halısı üzerinde şeffaf zonlar olarak belirmiştir. Daha önceden anisaldehit-sülfürik asit reaktifi püskürtülerek hazırlanan referans plakla karşılaştırılarak aktiviteden sorumlu lekeler belirlenmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmaları

Ön tarama deneyleri

Standart başlangıç maddeleri, transformasyon ekstraları ve saflaştırılmış metabolitler otomatik İTK uygulama ve develope cihazları (Camag ATS4 ve ADC2) kullanılarak 10 mg/ml konsantrasyonda 4'er µl hacimde 3 adet silikajel GF₂₅₄ plağına uygulanmış ve diklorometan:aseton (4:1) sisteminde develope edilmiştir. Plaklardan biri reaktifle renklendirilerek referans plak olarak ayrılmıştır. Diğer plaklara ise ayrı ayrı 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (%5 metanolde) ve 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal çözeltileri püskürtülerek 30 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiş ve Camag-analiz ve görüntüleme sisteminde (Camag-Reprostar-3) fotoğraflanmıştır. ABTS çözeltisi 7 mM ABTS^{•+} ve 2.5 mM sodyum persülfat (Na₂S₂O₈) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilerek hazırlanmıştır. Uygulanan radikallerin rengini açan maddeler referans plakla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Standart antioksidan madde olarak askorbik asit çözeltisi (%4 metanolde) kullanılmıştır.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

Standart madde ve metabolitlerin DPPH radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark. (1999)'nın metoduna göre yapılmıştır. Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) içerisinde 10 mg/ml-0.1 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış 50 µL numune çözeltileri ayrı ayrı 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) ve 1 mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış DPPH[•] ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak numune içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbans değerleri UV spektrofotometre kullanılarak 517 nm de okunmuştur.

ABTS radikal süpürücü etki

Standart TEAC metodu (Papandreou ve ark., 2006) kullanılarak gerçekleştirilen deney, ABTS radikalini süpürülmesi ve vitamin E nin suda çözünen analogu olan Troloks ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. 7 mM ABTS^{•+} ve 2.5 mM sodyum persülfat (Na₂S₂O₈) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesi sonucu mavimsiyem yeşil renkli radikal oluşumu sağlanmış, bu çözeltinin 734 nm deki absorbansı 0.8-0.7 olacak şekilde absolü etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL örnek/troloks/standart ve 990 µL hazırlanan ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılarak, 1 dk'lık aralıklarla 734 nm de absorbansı 30 dk süre ile ölçülmüştür. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasitesi Troloks un kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Numunelerin antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre (Oomah ve Mazza, 1996; Velioglu ve ark 1998) yapılmıştır. 1 mL β-karoten (0.2 mg/ml kloroform içerisinde), içerisinde linoleik asit (40 mg) ve Tween 20 (400 mg) bulunan bir behere ilave edilmiş, kloroform azot gazı altında yoğunlaştırılmıştır. Daha sonra 50 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda hızla karıştırılmıştır. Kontrol, örnek ve standart ilave edilmeden aynı şartlarda hazırlanmıştır. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise β-karotensiz olarak hazırlanmıştır. Tüm örneklerin absorbans değerleri 470 nm de spektrofotometre

kullanılarak ölçülmüştür. Ardından örnekler 50°C de termal otooksidasyona tabi tutularak her 15 dk da bir absorbansları okunmuş ve toplam 120 dakika süreyle kinetikleri ölçülmüştür. %AA **Eşitlik 2'**ye göre hesaplanmıştır.

$$\%AA = [1 - (Ab^0_{\text{örnek}} - Abs^{120}_{\text{örnek}}) / (Ab^0_{\text{kontrol}} - Abs^{120}_{\text{kontrol}})] \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Burada %AA: % antioksidan aktiviteyi; $Ab^0_{\text{örnek}}$: örneğin 0.dk daki absorbansı; $Abs^{120}_{\text{örnek}}$: örneğin 120.dk daki absorbansı; Ab^0_{kontrol} : kontrolün 0.dk daki absorbansı; $Abs^{120}_{\text{kontrol}}$: kontrolün 120. dk daki absorbansı'nı ifade etmektedir.

Toksisitenin belirlenmesi

Bu amaçla biyoluminesan *Vibrio fischeri* akut toksisite deneyi yapılmıştır (Backhaus ve ark., 1997; Zhou ve ark., 2006). Bu deney ile substrat ve bunların metabolitlerinin toksik etkileri, deniz florasına ait bir bakteri olan ve akut toksisite deneylerinde yaygın biçimde kullanılan *Vibrio fischeri* ve özel test kiti (Bioluminex-BAYER®) ile gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizma kültürü

Hazır temin edilen besi ortamları 1 litre distile su içinde çözülerek 121°C de 40 dk otoklavlanmıştır. Steril edilen besi ortamı soğuduktan sonra, aseptik şartlar altında 0.2 µm por çaplı membran filtre ile steril edilmiş 6 ml %50 gliserol çözeltisi ilave edilmiştir. Deneyden bir gün önce, dondurucuda saklanan *V. fischeri*, hazırlanan besi ortamının 200 ml'sine ekilmiş ve 24–36 saat 120 rpm de, 28°C de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda karanlık ortamda bakıldığında bioluminesan ışımaya veren kültürden 100 µl alınarak yeni besi ortamına pasajlanmış ve bir gün sonra tekrar kullanılmak üzere çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kültürler her gün taze besi ortamına pasajlanarak 1 hafta boyunca ışımaya özelliklerini kaybetmemeleri sağlanmıştır.

İTK plaklarının hazırlanması ve mikroorganizma ile kaplanması

10x10 cm ebadındaki silikajel İTK plakları test öncesinde metanol ile yıkanmış ve 30 dk 40°C lik etüvde kurutulmuştur. 1 ve 10 mg/ml konsantrasyonda (metanolde) hazırlanan örnekler maksimum 10 adet bant, 6 mm bant genişliği, 8 mm bant arası mesafe ve 8 mm başlangıç mesafesi olacak şekilde otomatik İTK uygulayıcı ile 10'ar µl hacimde plaklara uygulanmıştır. Önceden 30 dk süreyle çözücü sistemi ile doyurulmuş tankta develope edilmiştir. 24-36 saat önceden ekilmiş ve ışımaya yaptığı belirlenen bakteri kültürü içine hazır kit içinde mevcut olan A tamponundan 15.6 gr ilave edilmiştir. Daha sonra kültür sıvısı 10x1.5x13 cm (en x derinlik x boy) ebatlarındaki cam daldırma tankına 180 ml kadar aktarılmıştır. Daha önceden develope edilerek kurutulmuş plaklar otomatik daldırma cihazı kullanılarak, kültür ortamı ile kaplanmıştır. Sıvının fazlası plak yüzeyine zarar vermeden lastik süpürge ile sıyrılmıştır. Bu işlemden sonra plak oda sıcaklığında 5 dk. kurumaya bırakılmıştır. Daldırma tankı içindeki mikroorganizmalar belli aralıklarla karıştırılarak mikroorganizmaların canlılığı 5-6 saat sağlanmaktadır.

Biyolüminesan inhibisyonunun görüntülenmesi

Kuruyan plaklar, kamera bağı biyolüminesan görüntüleme odacığına yerleştirilmiştir (CAMAG BioLuminizer®). Bilgisayar destekli görüntüleme programı (Wincats-2005) yardımıyla ışımada derecesindeki azalmalar belirlenerek, negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılarak maddelerin belirli dozlardaki toksisiteleri belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

S. molle L. Uçucu Yağının Bileşimi

Farklı yörelerden toplanan bitkilerin (Çizelge 10) uçucu yağları GK ve GK/KS sistemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Çizelge 11’de bu yağların ana bileşikleri verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde dövülmüş meyve kullanıldığında yağ veriminin yükseldiği ve α -fellandrenin relatif miktarın arttığı gözlenmiştir. Mevsimsel olarak yağ verimlerinin değişmediği ancak α -fellandren miktarlarının Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan bitkilerde daha fazla olduğu saptanmıştır. İzmir-Seferihisar’dan toplanmış olan örneğin dövülmüş meyvelerinden elde edilen uçucu yağ (Y7) biyotransformasyon deneylerinde kullanılmıştır. GK ve GK/KS sistemleri kullanılarak belirlenen tam kompozisyonu Çizelge 12’de verilmiştir. Uçucu yağın yaklaşık %97’sini oluşturan toplam 78 bileşik tanımlanmıştır. α -Fellandren (%52), limonen (%15) ve β -fellandren (%14.6) yağın ana bileşikleri olarak belirlenmiştir.

Çizelge 10. Farklı Bölgelerden Toplanan *S. molle* Örnekleri ve Uçucu Yağ Verimleri

No	Kullanılan Kısmı	Toplandığı yer	Tarih	% Verim (KDV)
Y1	Yaprak	İzmir-Karşıyaka	Ocak’2006	2.7
Y2	Yaprak	Aydın-Didim	Mayıs’2006	2.6
Y3	Yaprak	İzmir-Seferihisar	Ağustos’2006	1.2
Y4	Yaprak	İzmir-Çiğli	Temmuz’2006	1.8
Y5	Meyve	İzmir-Çiğli	Temmuz’2006	0.8
Y6	Meyve	İzmir-Seferihisar	Ağustos’2006	0.4
Y7	Meyve d.*	İzmir-Seferihisar	Ağustos’2006	4.4

KDV: Kuru Drog Üzerinden Hesaplanmış Verim, d.*: Dövülmüş

Çizelge 11. *S. molle* Örneklerine Ait Uçucu Yağların Ana Bileşikleri

Bileşik	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
α -pinen	1.8	1.6	3.8	4.2	2.9	2.9	4.7
α -fellandren	9.8	12	38.5	29	26.7	15	51.8
mirsen	4.9	7.8	tr	28	tr	tr	tr
limonen	9.8	4.8	10.7	13.4	8.4	5.4	14.9
β -fellandren	5.7	4.6	10.7	13.3	7.7	3.2	14.6
<i>p</i> -simen	1.3	1	1.9	2.2	2.9	19	1.8

tr: %0.1’den az

Çizelge 12. *Schinus molle* Uçucu Yağının Kompozisyonu (Y7)

RRI	Bileşik	%	RRI	Bileşik	%
1032	α -pinen	4.7	1553	linalol	tr
1035	α -tuyen	0.1	1571	<i>trans-p</i> -ment-2en-1-ol	0.1
1076	kamfen	tr	1571	metil sitronellat	tr
1118	β -pinen	0.1	1591	bornil asetat	0.1
1132	sabinen	0.1	1600	β -elemen	0.1
1174	mirsen	tr	1611	terpinen-4-ol	tr
1176	α-felandren	51.8	1612	β -karyofillen	2.1
1183	psödolimonen	0.1	1628	aromadendren	0.1
1188	α -terpinen	tr	1638	<i>cis-p</i> -ment-2en-1-ol	tr
1203	limonen	14.9	1639	kadina 3,5-dien	tr
1218	β-felandren	14.6	1661	allo-aromadendren	0.1
1246	(<i>Z</i>)- β -osimen	tr	1668	sitronellil asetat	tr
1250	etil hekzanoat	tr	1677	<i>epi</i> -zonaren	tr
1255	γ -terpinen	tr	1687	α -humulen	0.4
1266	(<i>E</i>)- β -osimen	tr	1704	γ -muurolen	0.1
1280	<i>p</i> -simen	1.8	1708	leden	tr
1290	terpinolen	0.2	1726	germakren D	0.1
1399	metil oktanoat	0.7	1740	α -muurolen	0.2
1444	etil oktanoat	tr	1742	β -selinen	0.1
1466	α -kubeben	tr	1744	α -selinen	0.1
1497	α -kopaen	tr	1755	bisiklogermakren	0.4
1532	kafur	tr	1765	geranil asetat	0.2
1544	α -gurjunen	0.2	1773	δ -kadinen	1.6
1549	β -kubeben	tr	1776	γ -kadinen	0.2

RRI: Relatif tutunma indisi

Çizelge 12. (Devam) *Schinus molle* Uçucu Yağının Kompozisyonu

RRI	Bileşik	%	RRI	Bileşik	%
1807	α -kadinen	0.1	2084	oktanoik asit	tr
1823	<i>p</i> -menta- 1(7),5-dien-2-ol	0.1	2088	1- <i>epi</i> -kubenol	0.1
1819	geranil izobütirat	0.1	2096	elemol	0.1
1857	geraniol	0.1	2104	viridiflorol	0.1
1864	<i>p</i> -simen-8-ol	tr	2105	geranil hekzanoat	tr
1900	epi-kubebol	0.1	2144	spatulenol	0.1
1901	geranil bütirat	tr	2187	<i>t</i> -kadinol	0.3
1921	α -fellandren epoksit	tr	2209	<i>t</i> -muurolol	0.4
1953	palustrol	0.1	2219	δ -kadinol	0.1
1957	kubebol	0.1	2239	karvakrol	0.1
2008	karyofillen oksit	0.1	2250	α -ödesmol	0.1
2050	<i>E</i> -nerolidol	tr	2255	α -kadinol	1.1
2057	ledol	0.1	2287	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>) farnesol	tr
2069	germakren D-4-ol	0.6	2384	1-hekzadekanol	tr
2080	kubenol	0.1	2503	dodekanoik asit	tr

RRI: Relatif tutunma indisi

Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikroorganizmalar ile etkileştirilecek olan α -fellandren ve *S. molle* uçucu yağının 10 ml α -medyum içeren tüplerde 1 mg/ml ile 0.06 mg/ml konsantrasyon aralığında çift kat seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Önceden PDA veya SDA plaklarında geliştirilen bakteri, maya ve filamentli funguslar her bir tüpe 1 öze ucu kadar ilave edilmiştir. Her bir mikroorganizma için üreme kontrolü de hazırlanmıştır. 72 saat 28°Cde yapılan inkübasyon süresi sonunda 0.5 mg/ml ve altındaki konsantrasyonlarda tüm mikroorganizmaların pozitif kontrolle eşit şekilde üredikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak tüm transformasyon deneylerinde 0.5 mg/ml lik substrat konsantrasyonu kullanılmıştır.

Biyotransformasyon Ön Tarama Sonuçları

Substratlar, 22 farklı mikroorganizma ile yöntemler kısmında açıklanan şekilde biyotransformasyona bırakılmış, inkübasyon süresince 1., 3., 5., 7. ve 14. günlerde örnekler alınarak öncelikle İTK ile metabolit varlığı kontrol edilmiştir. Yapılan ön tarama sonuçlarına göre, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında kullanılan 22

mikroorganizmadan 19'unun *Schinus molle* uçucu yağından ve α -felandren'den çeşitli metabolitler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu türler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar 14. günde durdurulmuş, elde edilen ekstratlar GK/KS sisteminde incelenmiştir. *Fusarium moniliforme* (F15), *Penicillium expansum* (F19) ve *Pseudomonas putida* (B1) türleri ile yapılan denemelerde herhangi bir metabolit oluşumu gözlenmemiştir.

***Schinus molle* Uçucu Yağının Mikrobiyal Transformasyonu**

Yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen ön tarama deneylerinin sonuçlarına göre metabolit olduğu saptanan farklı mikroorganizmalara ait kültür ortamları 14. günlerinde ekstre edilmiş ve GK/KS'de analiz edilmiştir. **Çizelge 13**'de uçucu yağın taşıdığı bileşiklerin biyotransformasyon öncesi ve sonrasındaki miktarlarının relatif yüzde değerleri kendi aralarında karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 14'de ise uçucu yağın biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin kolondaki tutunma zamanları (Rt) ve ekstre içindeki relatif % değerleri gösterilmiştir. Tanımlanmış olan ve limonenden oluştuğu belirlenen metabolitler "L" harfi ile, α -felandreneden oluştuğu belirlenenler ise "A" harfi ile belirtilerek numaralandırılmıştır. Tam olarak yapısı aydınlatılmayan veya uçucu yağda hangi maddeden oluştuğu belirlenemeyen diğer metabolitler ise "M" harfi ile gösterilmiştir. *S. molle* uçucu yağından oluşan metabolitler özet halinde **Şekil 6**'da gösterilmiştir.

Çizelge 13'de görüldüğü gibi, yağda bulunan α -pinen'in (%5) F40-42, F54, F62 ve F69 fungusları tarafından tamamen metabolize edildiği görülmektedir. Miktarının az olması nedeniyle izole edilemediğinden ekstre içerisinde bu maddeye ait metabolit varlığı araştırılmamıştır. Yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstratlerde limonenin relatif % miktarları incelendiğinde *Alternaria alternata* (F6) ekstresinde limonen miktarının %0.1 den az olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu **Çizelge 14**'de verilen metabolit yüzdeleri ile karşılaştırıldığında L1 metabolitinin de en yüksek oranda yine bu ekstrede bulunduğu görülmektedir. Ayrıca *Neurospora crassa*'nın 3 farklı suşuna (F11, 12, 13) ait ekstratlerde limonenin tamamen tüketildiği ancak beklenen L1 metabolitinin oluşmadığı gözlenmiştir.

Yağda %52 oranında bulunan α -felandrenin ise tüm ekstratlerde miktarı azalmış ve yine bu ekstratlerde relatif olarak %3 ile %17 arasında değişen miktarlarda A1 metabolitine rastlanmıştır (**Çizelge 13 ve 14**). L1 metabolitini yüksek bir verimle oluşturan F6'nın, A1 metabolitini de en yüksek verimle meydana getirdiği belirlenmiştir. *S. molle* uçucu yağının biyotransformasyonu sonucunda elde edilen bulgulara göre α -felandrenden A1 metabolitini yüksek verimle oluşturan 16 mikroorganizma ile tekrar etkileştirilmiş ve belirlenen metabolitler (A1-A9) ayrı bir başlık altında açıklanmıştır.

Çizelge 13. *S. molle* Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Ana Bileşiklerinin Miktarlarındaki % Değişim

Yağdaki ana bileşikler	Mikroorganizmalar																		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	B2	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F16	F17	F18	F20
α -pinen (%5*)	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	0.35	0.1	-	0.1	-	-	-	tr	tr	-	-	-
α -felandren (%52*)	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	1.0	6.2	3.5	0.2	6.3	-	-	-	tr	3.0	-	-	6.0
limonen (%15*)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	tr	1.3	4.4	1.3	0.2	2.4	-	-	-	tr	2.6	-	-	3.2
β -felandren (%15*)	tr	tr	0.3	0.3	0.2	tr	1.0	3.0	1.7	0.3	4.5	-	tr	-	-	2.0	-	-	3.3

Tr: < % 0.1, *: Transformasyon öncesindeki relatif miktarlar

F1: *Corynespora cassicola*

F6: *Alternaria alternata*

F11: *Neurospora crassa* –N23

F17: *Botrytis cinerea*

F2: *Corynespora cassicola*

F7: *Aspergillus niger*

F12: *Neurospora crassa* –N24

F18: *Aspergillus flavus*

F3: *Fusarium heterosporium*

F8: *Saccharomyces cerevisiae*

F13: *Neurospora crassa* -wild type-

F20: *Phanerochaete chrysosporium*

F4: *Aspergillus alliaceus*

F9: *Kluyveromyces lactis*

F14: *Fusarium solani*

B2: *Devosia riboflavina*

F5: *Yarrowia lipolitica*

F10: *Schizosaccharomyces japonicus*

F16: *Fusarium culmorum*

Çizelge 14. *S.molle* Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve Relatif % Miktarları

Metabolit	Rt	Mikroorganizmalar																		
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	B2	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F16	F17	F18	F20
L1	49.3	11.6	-	-	-	tr	22.0	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2	36.2	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-
L3	35.7	0.3	-	0.2	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-
A1	47.8	3.5	1.5	2.2	2.3	3.0	17.0	1.7	5.6	2.1	4.1	1.2	1.8	11.6	7.9	3.25	1.2	13.0	6.9	11.0
A2	53.7	-	-	-	-	-	-	1.7	-	0.5	tr	-	-	2.0	-	-	1.3	12.3	-	2.8
A3	50.2	1.2	1.7	1.9	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	1.17	-	-	tr	-	-
A4	52.4	tr	-	-	-	1.0	0.9	3.5	3.0	1.6	tr	-	4.7	6.11	4.20	-	2.7	12	2.9	3.9
A5	51.3	-	tr	-	tr	0.6	tr	2.7	2.0	0.7	1.1	-	-	2.9	1.7	tr	tr	4.9	3.2	-
M1	34.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-	-	-
M2	43.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	1.1	-	-	-

Rt: Tutunma Zamanı (Retention time), tr: %0.1'den az

F1: *Corynespora cassicola*

F2: *Corynespora cassicola*

F3: *Fusarium heterosporium*

F4: *Aspergillus alliaceus*

F5: *Yarrowia lipolitica*

F6: *Alternaria alternata*

F7: *Aspergillus niger*

F8: *Saccharomyces cerevisiae*

F9: *Kluyveromyces lactis*

F10: *Schizosaccharomyces japonicus*

F11: *Neurospora crassa -N23*

F12: *Neurospora crassa -N24*

F13: *Neurospora crassa -wild type-*

F14: *Fusarium solani*

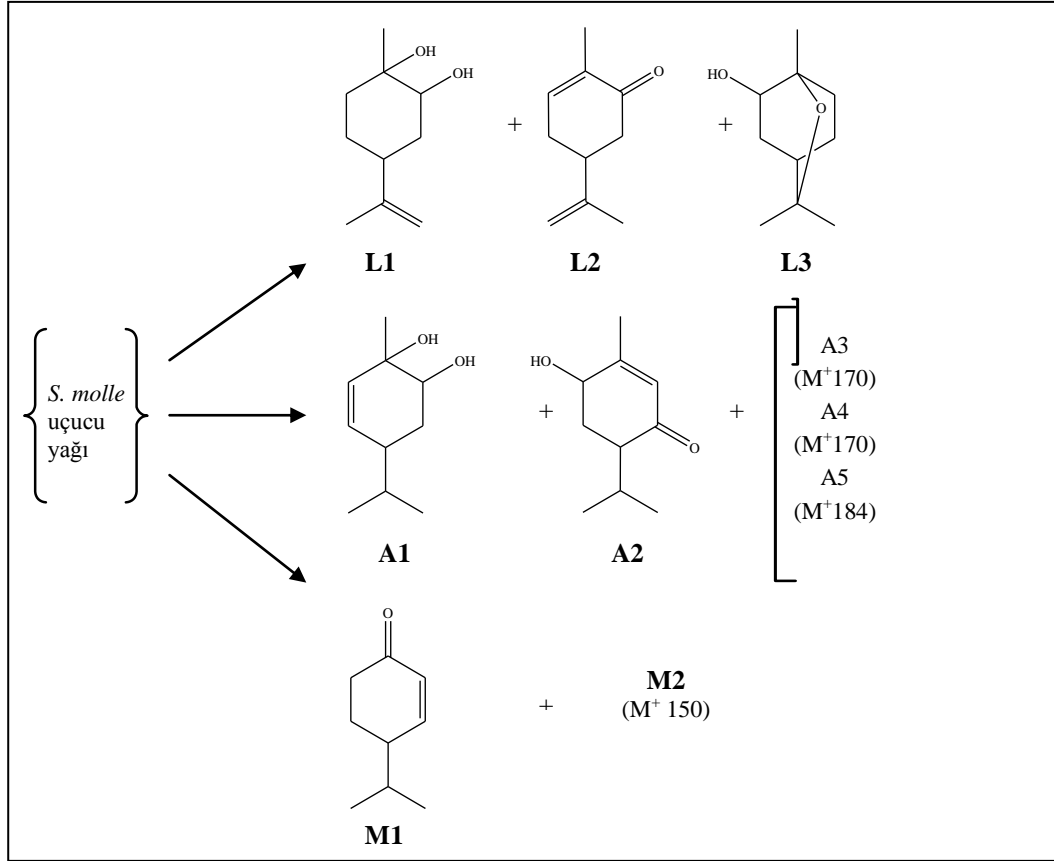
F16: *Fusarium culmorum*

F17: *Botrytis cinerea*

F18: *Aspergillus flavus*

F20: *Phanerochaete chrysosporium*

B2: *Devosia riboflavina*



Şekil 6. *S. molle* Uçucu Yağının Biotransformasyonu ile Oluşan Metabolitler

S. molle yağı ile gerçekleştirilen mikrobiyal transformasyon sonuçlarına göre, *Corynespora cassicola* DSM 62474 (F1) ve özellikle *Alternaria alternata* NRRL 20593 (F6) türlerinin yüksek oranlarda L1 metabolitini ürettikleri belirlenmiştir. F6 fungusuna ait ekstreden preparatif İTK ile 8 mg izole edilen maddenin GK/KS kullanılarak kütle spektrumu alınmış ve saflığı kontrol edilmiştir. Daha sonra CDCl_3 ile çözülen maddenin ^{13}C ve ^1H NMR spektrumları çekilmiştir. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında (Abraham ve ark., 1986; Van der Werf ve ark., 1999) bu maddenin yapısı iyi bilinen ve çeşitli fungus ve bakteriler kullanılarak daha önceki çalışmalarda *R*-(+)-limonenden sentezlenen **8-*p*-menten-1,2-diol** (L1), (limonen-1,2-diol) olduğu belirlenmiştir.

Limonenin *Alternaria alternata* ile Mikrobiyal Transformasyonu

S. molle uçucu yağının mikrobiyal transformasyonu ile elde edilen L1 metabolitinin, enantiyomerik olarak saf (*R*)-(+)-limonenden elde edilebilmesi için yine *Alternaria alternata* fungusu kullanılarak preparatif olarak çalışılmıştır. Gelişmiş kültür ortamına 500 mg substrat ilave edilmiş, 14 günlük inkübasyon süresi sonunda etil asetat ile ekstre edilmiştir. 850 mg olarak elde edilen ham ekstreden sütun kromatografisi ile yaklaşık 100 mg metabolit izole edilmiştir. Biyolojik aktivite çalışmalarında, enantiyomerik olarak saf *R*-(+)-limonenden sentezlenen bu metabolit (L1) kullanılmıştır.

L1 metaboliti

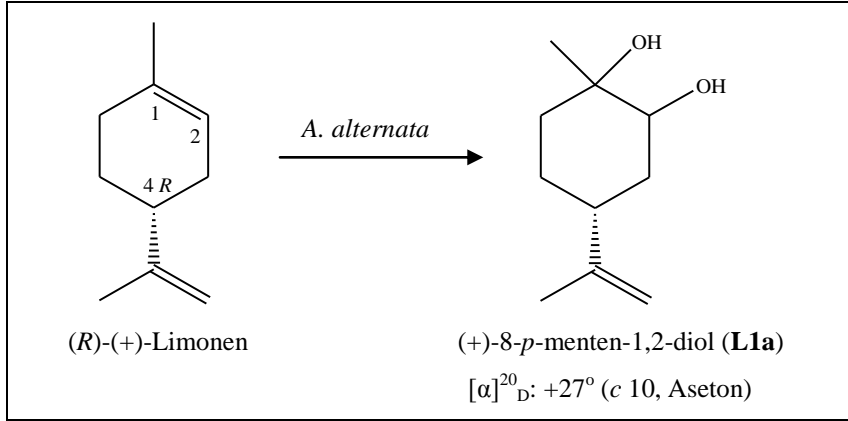
L1 metabolitinden elde ettiğimiz spektral verilerin bir çok kaynakta mevcut olmasından ötürü (Abraham ve ark., 1986; Van der Werf ve ark., 1999; Ishikawa ve ark., 2002a; Pinheiro ve Marsaioli, 2007), kendi bulgularımızın özet halinde verilmesi uygun görülmüştür. Ayrıca, *Corynespora cassicola*, *Alternaria alternata* ve *Kluyveromyces lactis* mikroorganizmalarıyla limonenin, 8-*p*-menten-1,2-diol'e dönüşümü (Şekil 7a) ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

L1 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z : 170 (M^+ , 1), 152 (33), 137 (18), 108 (39), 93 (26), 71 (100), 67 (45), 43 (55).

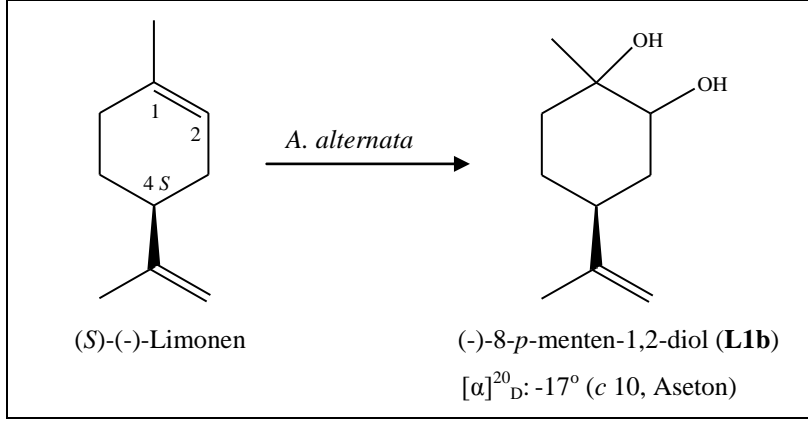
1H NMR (500 MHz): δ 1.23 (3H, s, H-7), 1.75 (3H, s, H-10), 1.50-2.0 (6H, m, H-3, H-5, H-6), 2.3 (1H, m, H-4), 3.67 (1H, s, H-2), 4.76 (2H, s, H-9)

^{13}C NMR (125 MHz): δ 21.1 (C-9), 26.2 (C-7), 26.7 (C-5), 33.7 (C-3), 34.1 (C-6), 37.5 (C-4), 71.3(C-1), 74 (C-2), 109 (C-10), 149.3 (C-8).



Şekil 7a. (R)-(+)-Limonen'in *A. alternata* ve *C. cassicola* ile Biotransformasyonu

Daha önce (R)-(+)-limonen ile yapılan tüm mikrobiyal transformasyon çalışmalarında elde edilen ve tanımlanan metabolitin (1*S*,2*S*,4*R*) formunda olduğu, limonenin diğer izomeri olan *S*-(-)-formu ile yapılan çalışmalar sonucunda da aynı spektral verilere sahip (1*R*,2*R*,4*S*)-8-*p*-menten-1,2-diol'ün oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda birbirinin enantiomeri olan bu iki metabolitin optik çevirme açılarının ise sırasıyla +41.8° ve -38.5° olduğu rapor edilmiştir (Abraham ve ark., 1986; Van der Werf ve ark., 1999). Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmamızda (R)-(+)-limonen dışında ticari kaynaklardan temin edilen *S*-(-)-limonen ile de biyotransformasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan spektroskopik analizlerde izole edilen metabolitin tüm spektral verilerinin L1 metaboliti ile aynı olduğu belirlenmiştir. Kaynak bilgilerinde yalnızca optik çevirme açılarının farklı olduğu bildirilen bu iki metabolitin sırasıyla optik çevirme açıları ölçülmüş, +27° (c 2, aseton) olan ve (R)-(+)-limonenden oluşan metabolit **L1a**, -17° (c 10, aseton) olan ve *S*-(-)-limonenden elde edilen metabolit ise **L1b** (Şekil 7b) şeklinde adlandırılmıştır.



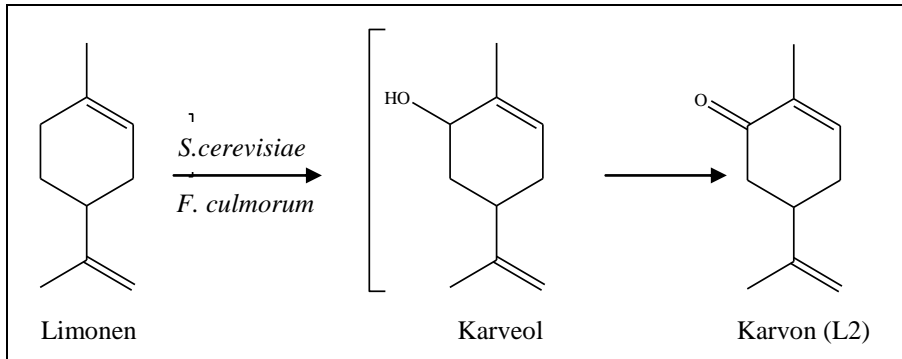
Şekil 7b. (S)-(-)-Limonen'in *A. alternata* ile Biotransformasyonu

Doğada 8-*p*-menten-1,2-diol (1*R*,2*S*,4*S* formu) ilk kez Grag ve Agarwal, (1988) tarafından *Ferula jaeschkeana* bitkisinden izole edilerek tanımlanmıştır. Ishikawa ve ark., (2002a) tarafından yapılan bir çalışmada da (1*S*,2*S*,4*R*)-8-*p*-menten-1,2-diol'ün *Anethum graveolens* meyvelerinde bir monoterpene glikoziti formunda (2-*o*-β-D-glukopiranozit) bulunduğu bildirilmiştir. (1*R*,2*R*,4*R*) ve (1*R*,2*S*,4*R*) formları da sırasıyla *Schizonepeta tenuifolia* (Yang ve ark., 2002) ve *Baccharis linearis* (Brown, 1994) türlerinin uçucu yağlarında tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada portakal balında yapılan KFME-GK/KS analizi ile 8-*p*-menten-1,2-diol olduğu saptanmıştır. 0.2 mg/kg konsantrasyonda olduğu belirlenen ve limonenin biyotransformasyonu ile oluşan bu metabolitin, portakal balı için önemli bir ayırt edici molekül olduğu bildirilmiştir (Piasenzotto ve ark., 2003).

L2 metaboliti

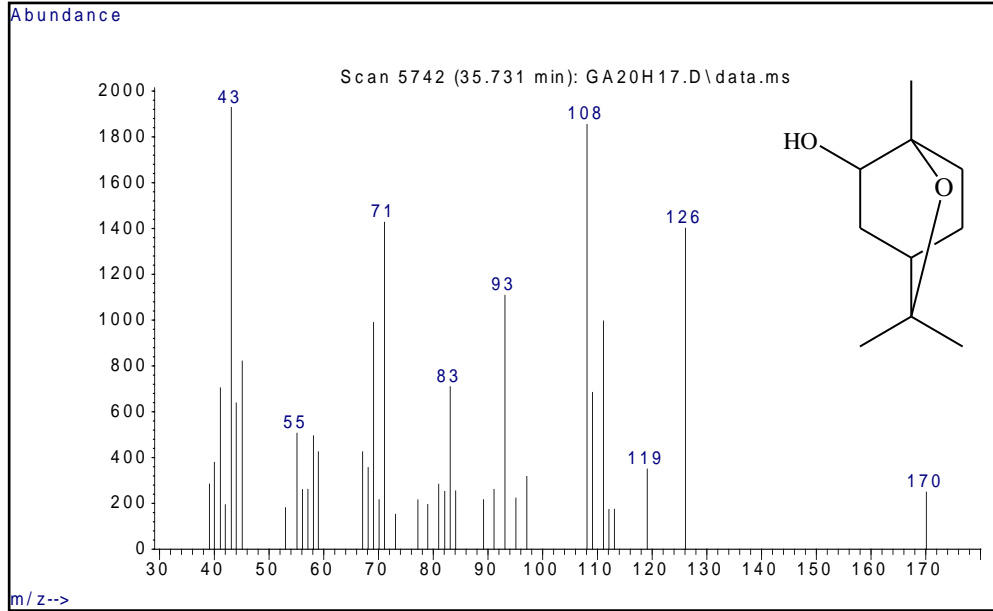
S. molle uçucu yağının *Saccharomyces cerevisiae* ve *Fusarium moniliform* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarında elde edilen etil asetat ekstraktlarında **karvon** (5-*p*-ment-6,8-dien-2-on) (%0.5) bulunduğu gözlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda (Onken ve Berger, 1999; Duetz ve ark., 2003) 5 farklı fungus türüyle (*R*)-(+)-limonenden sırasıyla karveol ve karvon elde edildiği bildirilmiştir (Şekil 8). Karvon çok iyi bilinen bir molekül olduğu için spektral verilerine burada yer verilmemiştir.



Şekil 8. Limonenden Mikrobiyal Transformasyonla Karvon (L2) Oluşumu

L3 metaboliti

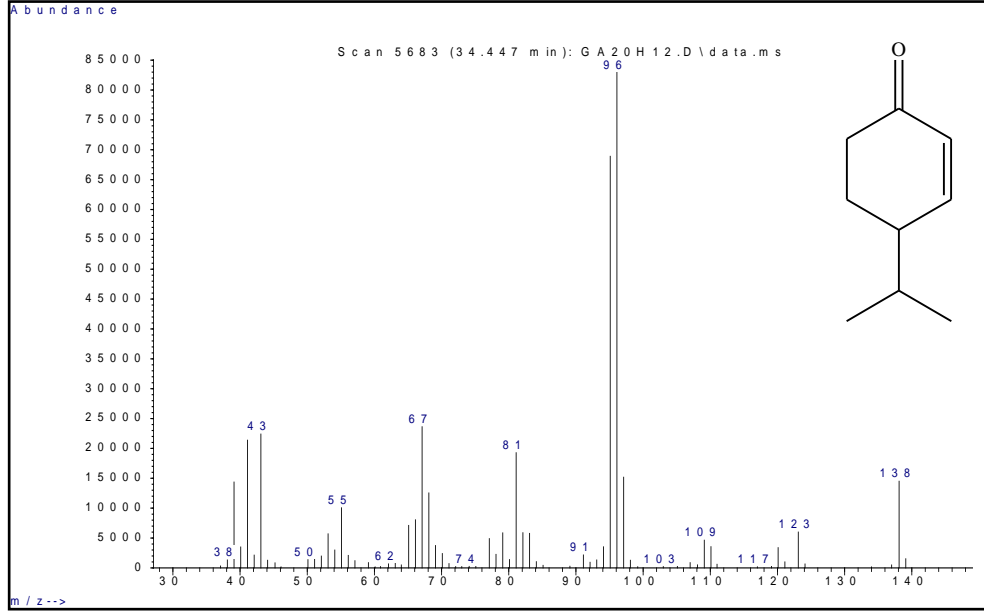
Corynespora cassicola'nın iki ayrı suşu (F1 ve F2) ile *Alternaria alternata* (F6) ve *Botrytis cinerea* (F17) funguslarının biyotransformasyon ekstralarının GK/KS ile yapılan kontrollerinde relatif olarak %0.1 ile %0.4 arasında değişen oranlarda **ekzo-2-hidroksisineol** [C₁₀H₁₈O₂, EI/MS *m/z*: 170(M⁺, 20), 126 (72), 108 (96), 93 (57), 83 (37), 71 (74), 55 (26), 43 (100)] varlığı tespit edilmiştir. Demyttenaere ve ark., (2001a)'nın yaptıkları çalışma sonucunda *Penicilium digitatum*'un mikrobiyal transformasyonla (*R*)-(+)-limonenden, %0.2 oranında ekzo-2-hidroksisineol sentezlendiğini bildirmiştir. Bir diğer çalışmada aynı metabolitin rat karaciğerinden elde edilen sitokrom P450 enzimleri kullanılarak 1,8-sineolden sentezlendiği bildirilmiştir (Miyazawa ve ark., 2001). Kullandığımız uçucu yağda 1,8-sineol bulunmadığından **Şekil 9**'da kütle spektrumu verilen ekzo-2-hidroksisineol'ün uçucu yağın taşıdığı limonenden hareketle oluştuğu düşünülmektedir.



Şekil 9. Ekzo-2-hidroksi-Sineol'ün (L3) Kütle Spektrumu

M1 metaboliti

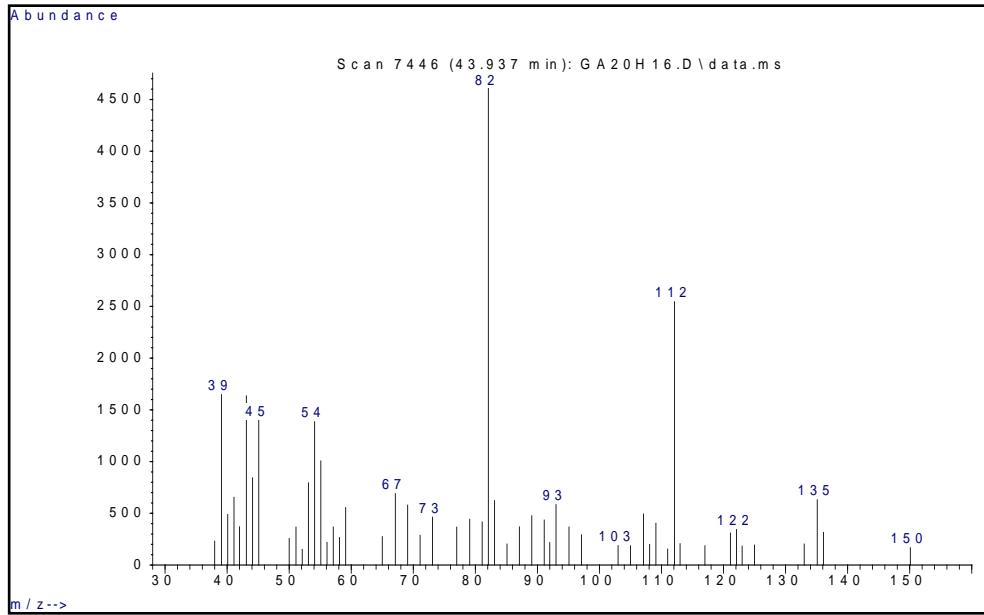
Schinus molle uçucu yağının *Neurospora crassa*-N24 suşu ile yapılan biyotransformasyonu sonucunda elde edilen ekstrada %2.3 oranında **kripton** (4-izopropilsiklohekzen-2-on), [C₁₀H₁₄O, EI/MS *m/z*: 138 (M⁺, 17), 123 (8), 109 (6), 96 (100), 81 (23), 67 (28), 55 (12), 43 (26)] olduğu belirlenmiştir (**Şekil 10**). Limonenden kripton oluşumu ile ilgili herhangi bir kaynak bilgisine rastlanmadığı için hangi maddeden dönüşmüş olabileceği bilinmemektedir. Kriptonun doğada *Eucalyptus cneorifolia* ve *Lavandulae* sp. uçucu yağlarında bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan kaynak taramalarında yalnızca 4-izopropil siklohekzanondan kimyasal sentezle elde edilebildiği görülmüştür (Mori, 2006).



Şekil 10. Uçucu Yağ Biotransformasyonu ile Elde Edilen Kripton'un Kütle Spektrumu

M2 metaboliti

Fusarium solani ve *F. culmorum* funguslarının biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstrede belirlenen bu madde ile ilgili yapılan KS kütüphane ve literatür taramalarından herhangi bir bulgu elde edilemediğinden ve miktarının çok az olmasından dolayı (%0.4-1.1) izole edilip tanımlanamamış, yalnızca kütle spektrumu [EI/MS m/z : 150(M^+ , 3), 135 (13), 112 (56), 93 (13), 82 (100), 67 (15), 54 (31), 39 (35)] verilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. M2 Metabolitinin Kütle Spektrumu

Schinus molle uçucu yağının biyotransformasyona tabi tutulması sonucunda ana maddeleri olan limonen (%15) ve α -felandrenin (%52) kullanılan mikroorganizmalar ile dönüşüm potansiyelleri ve oluşabilecek muhtemel metabolitler hakkında fikir sahibi olunmuştur. Aynı zamanda kullanılan funguslardan hangilerinin bu dönüşümleri gerçekleştirebileceği saptanmıştır. Böylece zaman tasarrufu sağlanmış ve pahalı olan standart maddelerin her bir mikroorganizma ile ayrı ayrı denenmesine gerek kalmamıştır. Uçucu yağların biyotransformasyonlarda kullanımının bir diğer faydası da, biyotransformasyon prosesi sonucunda doğada çok nadir olarak bulunan bazı aktif maddeler bakımından yağın zenginleştirilebilmesidir (Dvorakova ve ark., 2007). Uçucu yağların bu maksatla biyotransformasyonlarda kullanılması ülkemizde ilk kez bu çalışma ile yapılmaktadır.

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında şiral özellikte moleküller substrat olarak kullanılıyor ise substrat ve oluşan metabolitin de hangi enantiyomerik yapıda olduğu belirlenmelidir. Bir molekülün tüm spektral verileri birbirinin aynı olan iki izomeri farklı biyolojik etkiler gösterebilmektedir (Vuuren ve Viljoen, 2007). Bu nedenle çalışmamızda uçucu yağın biyotransformasyonu ile elde edilen metabolitler yerine saf enantiyomerlerden elde edilenler biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

(R)-(-)- α -Felandrenin Mikrobiyal Transformasyonu ve Oluşan Metabolitler

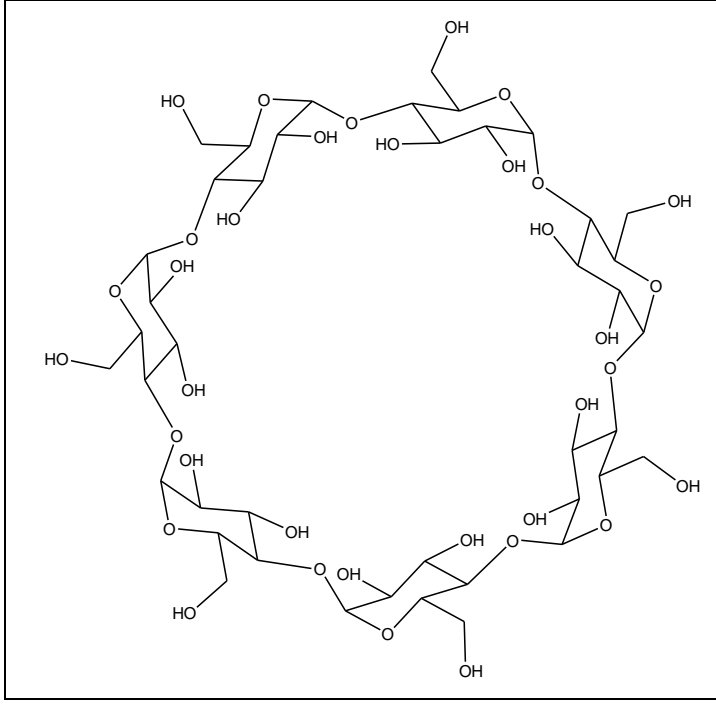
(R)-(-)- α -Felandrenin ön tarama deneylerinde hazırlanan kontrol gruplarının 1. gününde KFME tekniği ile örnekleme yapılmış, GK/KS analizlerinde felandrenin, büyük oranda azaldığı görülmüştür. Bunun üzerine çeşitli saat ve günlerde örnekler alınarak GK/KS'de analiz edilmiş, 14 gün boyunca (R)-(-)- α -felandrenin besi ortamındaki varlığı incelenmiştir (**Çizelge 15**). Besiyeri ve α -felandren taşıyan kontrol erleni incelendiğinde, 2. gün sonunda ortamda α -felandren kalmadığı belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalar sonucunda suda çözünmeyen maddelerin, sulu besi ortamlarında çözünürlüğünü arttıran, substrat ve metaboliti koruma özellikleri olan β -siklodekstrin'in (**Şekil 12**) bu amaçla kullanıldığı görülmüştür (Jadoun ve Bar, 1993; Roglic ve ark., 2007). Ticari kaynaklardan temin edilen β -siklodekstrin (β -SD) bu maksatla kullanılarak aynı denemeler tekrar yapılmış, elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak **Çizelge 15**'de verilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, tüm deney setlerinde α -felandren, belirli oranlarda β -SD'ye (**Şekil 12**) emdirildikten sonra besi ortamına ilave edilmiştir.

Çizelge 15. α -Felandren Kontrol Grubunun KFME ve GK/KS Analiz Sonuçları

Kontrol Grupları	6. saat	24. saat	48. saat	6. gün	14. gün
α -felandren + besiyeri	+	-	-	-	-
α -felandren + β -SD + besiyeri	+	+	+	+	+

+/-: var/yok



Şekil 12. β -siklodekstrin

Bu ön denemeler sonucunda uçuculuğu azaltılmış ve çözünürlüğü arttırılmış (*R*)-(-)- α -felandren (≥ 95 , Fluka) ile 22 adet mikroorganizma ile tekrar etkileştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda oluşan metabolitlerin relatif % miktarları GK/KS kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar **Çizelge 16**'da özetlenmiştir. Çok düşük miktarlarda (<0.1) dönüşüm gerçekleştiren mikroorganizmalara ait biyotransformasyon sonuçları tabloya ilave edilmemiştir. *S*-(+)-felandren yapılan tüm araştırmalara rağmen piyasadan temin edilemediğinden biyotransformasyon çalışmalarımızda kullanılamamıştır.

Çizelge 16. (R)-(α)-Fellandrenin Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve Relatif % Miktarları

Madde	Rt	Mikroorganizma															
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F8	B2	F9	F12	F13	F14	F16	F17	F18	F20
α-Fellandren*	15.5	0.1	0.3	0.3	0.5	0.7	-	3.2	1.1	5.8	-	-	0.2	tr	tr	-	22.6
A1	47.8	22.4	9.1	14.1	1	15.6	60.6	22.6	14.9	12.4	20.3	20.1	16.6	27.8	22.7	41.2	13
A2	53.7	-	-	-	-	-	-	3.4	1.3	2.3	tr	-	1.8	4.0	10.5	-	2.7
A3	50.2	2.8	0.3	1.2	-	-	-	0.8	0.4	-	-	tr	-	0.9	1.1	-	0.4
A4	52.4	1	-	-	2.5	4.6	2	7.6	5.4	4.9	2.8	3.4	3.9	8.7	4.7	tr	tr
A5	51.3	-	1.5	-	4.8	2.4	3.1	5.1	3.4	3.4	4.2	5.3	4.6	7.1	5.7	3.3	5
A6	41.0	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0.1	-	-	-	0.3	-	-	-
A7	32.9	tr	-	-	-	tr	tr	0.32	tr	0.13	-	-	-	-	-	-	0.13
A8	38.0	tr	-	-	tr	-	2.1	2.0	1.2	0.2	-	-	-	4.8	0.8	-	1.8
A9	34.4	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2

*Biyotransformasyon sonucunda ortamda kalan α -fellandrenin relatif % miktarı, tr: %0.1'den az, - : yok

F1: *Corynespora cassicola*

F5: *Yarrowia lipolitica*

F12: *Neurospora crassa* –N24

F17: *Botrytis cinerea*

F2: *Corynespora cassicola*

F6: *Alternaria alternata*

F13: *Neurospora crassa* -wild type-

F18: *Aspergillus flavus*

F3: *Fusarium heterosporium*

F8: *Saccharomyces cerevisiae*

F14: *Fusarium solani*

F20: *Phanerochaete chrysosporium*

F4: *Aspergillus alliaceus*

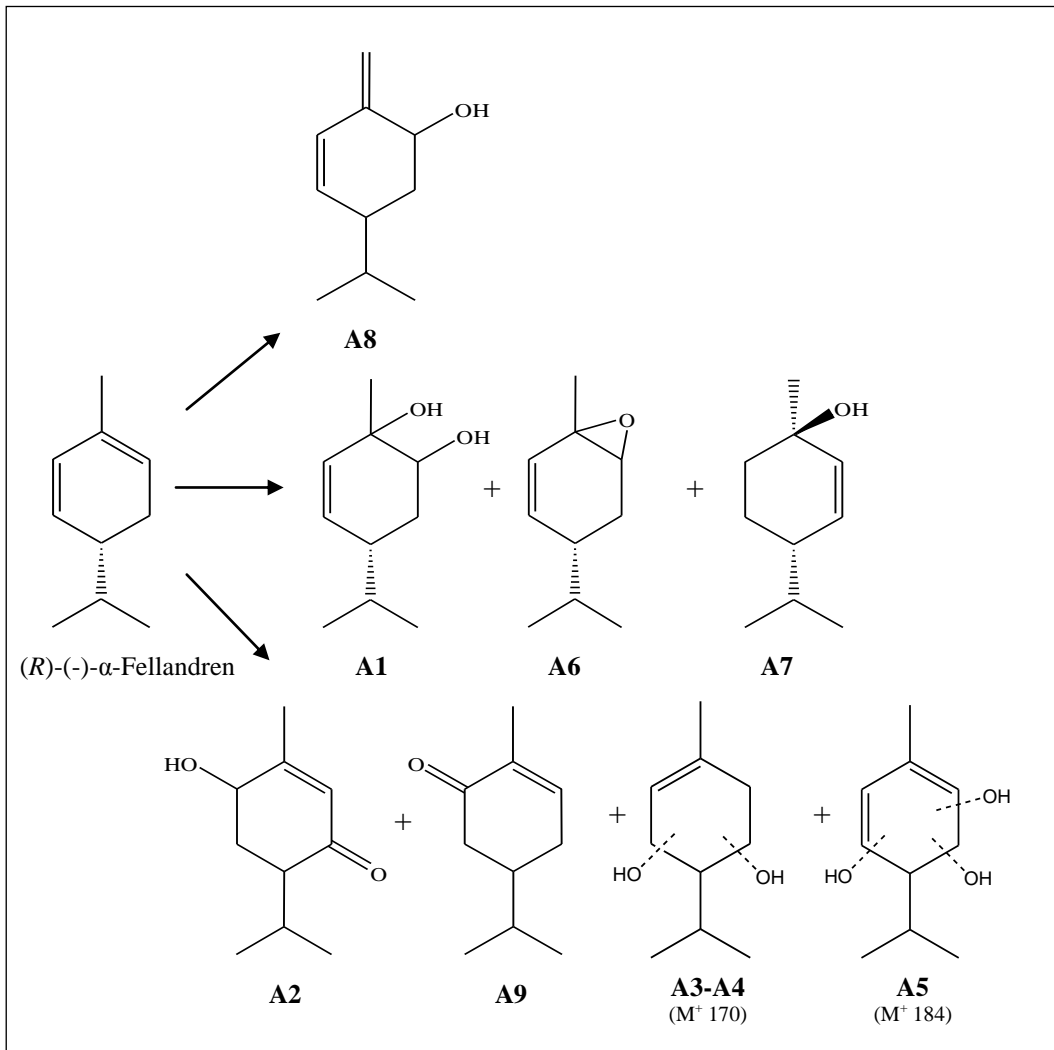
F9: *Kluyveromyces lactis*

F16: *Fusarium culmorum*

B2: *Devosia riboflavina*

Çizelge 16'daki, biyotransformasyon ekstrilerine ait GK/KS bulguları incelendiğinde **A1** metabolitinin %1 ile %60 arasındaki miktarlarda tüm mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. Özellikle *Alternaria alternata* fungusunun, ortamdaki tüm α -fellandreni kullandığı ve en yüksek verimle (%60.6) **A1** metabolitini oluşturduğu görülmüştür. *Schinus molle* uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan **A1-A6** metabolitlerinin, (*R*)-(-)- α -fellandren dönüşümlerinde de olduğu saptanmış, farklı olarak uçucu yağ transformasyonlarında rastlanmayan **A7**, **A8** ve **A9** metabolitlerinin varlığı tespit edilmiştir (**Şekil 13**).

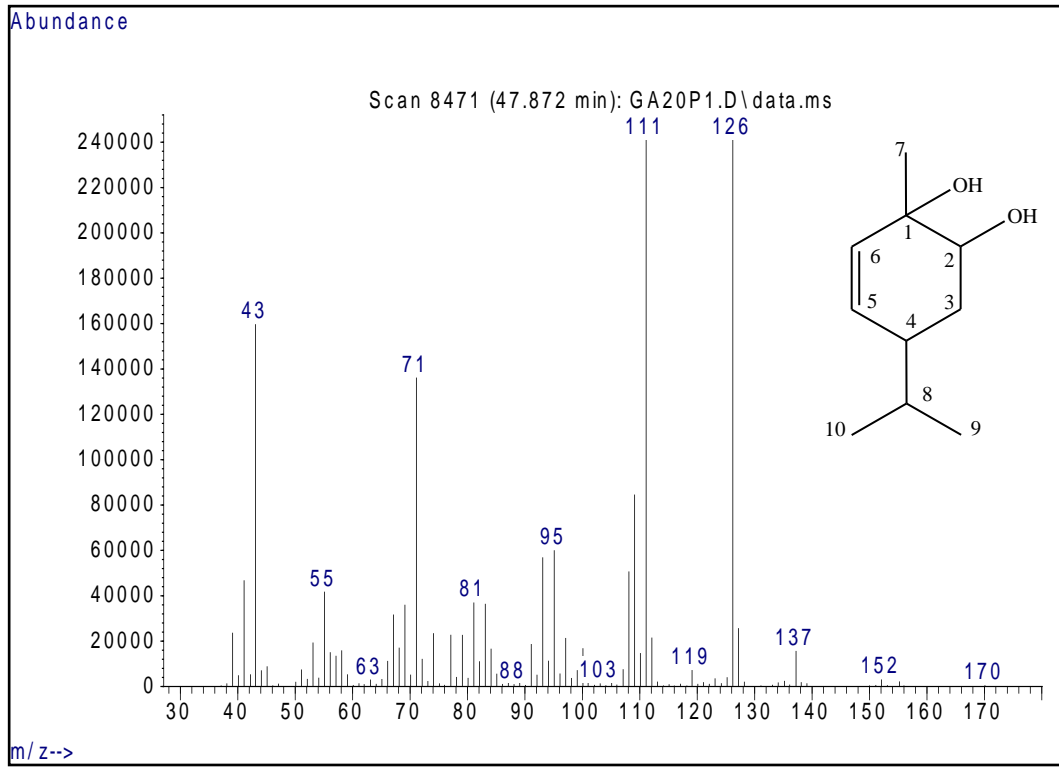
Biyotransformasyon sonucunda ortamda kalan (*R*)-(-)- α -fellandren miktarları incelendiğinde F20 fungusu hariç diğer tüm fungusların bu maddeyi büyük oranda metabolize ettiği görülmektedir.



Şekil 13. (*R*)-(-)- α -Fellandren'in Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler

A1 metaboliti

48 saat önceden geliştirilen *Alternaria alternata* kültürü içerisine 500 mg (R)-(-)- α -fellandren ilave edilmiş, 14 günlük inkübasyon süresi sonunda yapılan ekstraksiyon sonucu 1 gr. ham ekstre elde edilmiştir. Kromatografik yöntemler ile ayrılan ve GK/SK ile yüksek oranda metabolit içerdiği belirlenen fraksiyon semi-preparatif YBSK tekniği ile saflaştırılmıştır. Elde edilen A1 metabolitinin (65 mg) kütle, ^1H , ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC ve ^1H - ^{13}C HMBC spektrumları alınmıştır (Şekil 14-19). Yapılan spektrum değerlendirmeleri (Çizelge 17) ve kaynak bulgularının karşılaştırılması sonucunda metabolitin **5-p-menten-1,2-diol** (2-metil-5-(1-metiletil)-3-sikloheksen-1,2-diol), [$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$, EI/MS m/z : 170(M^+ , 1), 152 (3), 137 (6), 126 (100), 111 (98), 95 (25), 81 (15), 71 (57), 55 (17), 43 (66)] olduğu belirlenmiştir.

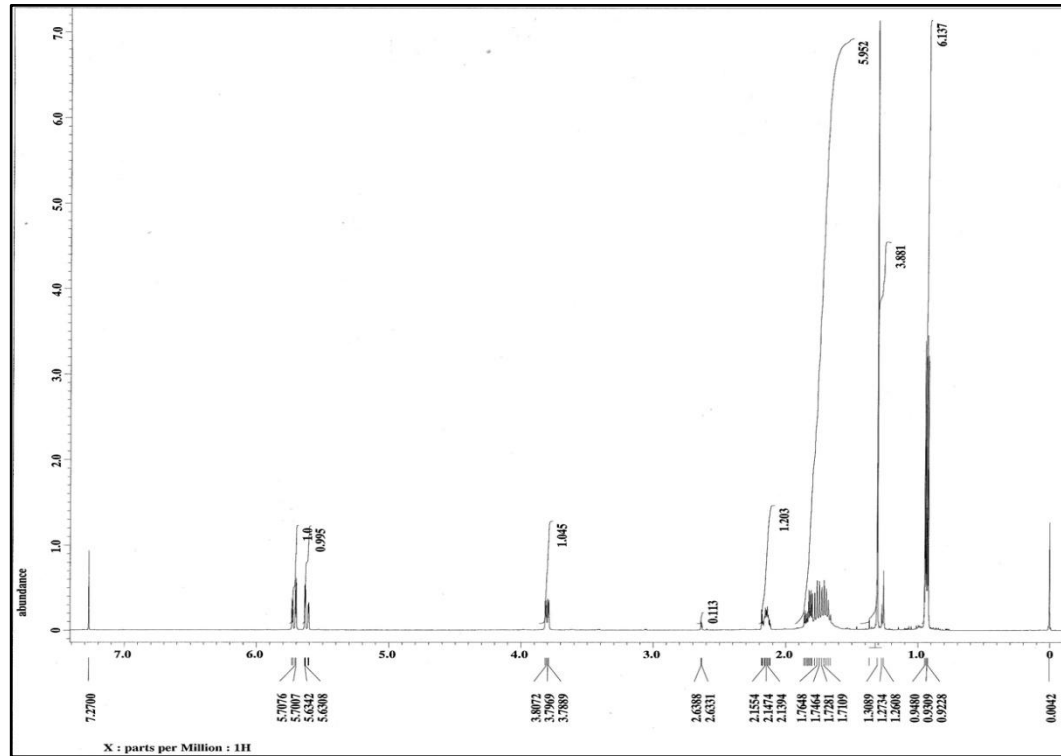


Şekil 14. 5-p-Menten-1,2-diol'ün (A1) Kütle Spektrumu

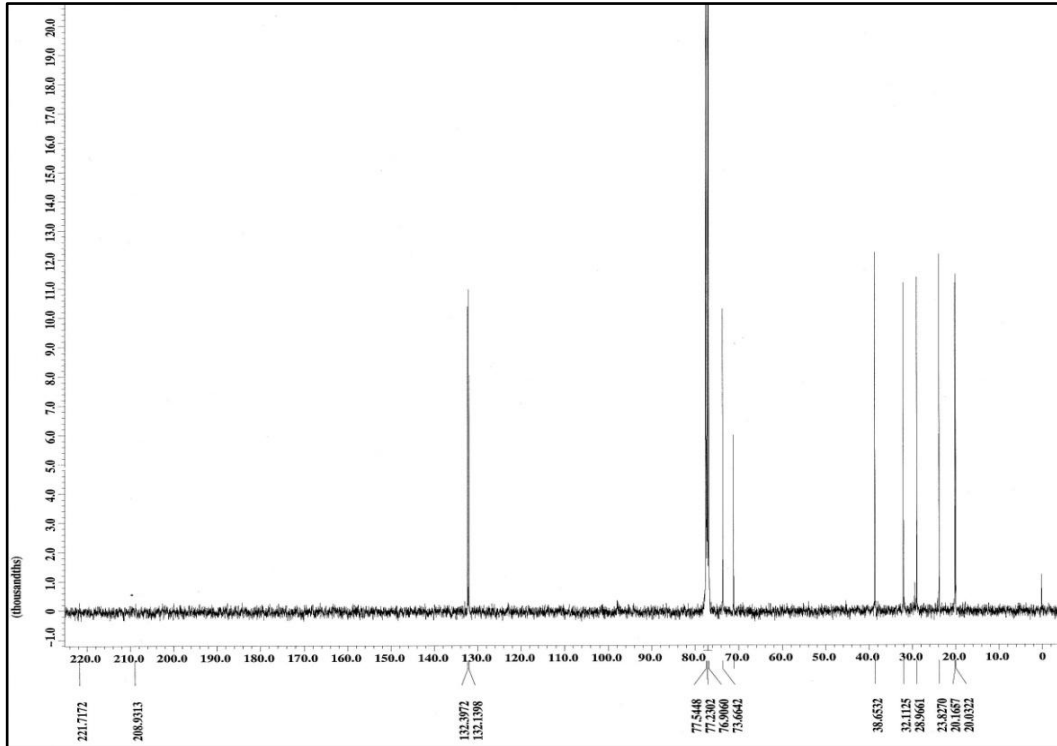
Çizelge 17. 5-*p*-Menten-1,2-diol'e Ait Spektral Bulgular

C	¹ H NMR (400 MHz) δ	¹³ C NMR (100 MHz) δ	HMBC δ
1	-	71.2	-
2	3.79, dd (1H)	73.7	132.1, 71.2, 38.7, 28.9, 23.9
3	1.84, ddd (1H)	28.9	132.4, 73.7, 71.2, 38.7, 32.1
	1.80, ddd (1H)		132.4, 73.7, 71.2, 38.7, 32.1
4	2.14, m (1H)	38.7	132.1, 32.1
5	5.70, dd (1H)	132.4	132.1, 71.2, 73.7, 38.7, 28.9
6	5.63 ddd, (1H)	132.1	132.4, 73.7, 38.7, 23.9
7	1.30, s, (3H)	23.9	132.1, 73.7, 71.2, 38.7, 28.9
8	1.71, ddd, (1H)	32.1	132.4, 20.2, 20.0
9	0.93, d, (3H)	20.2	32.1, 38.7
10	0.92, d, (3H)	20.1	32.1, 38.7

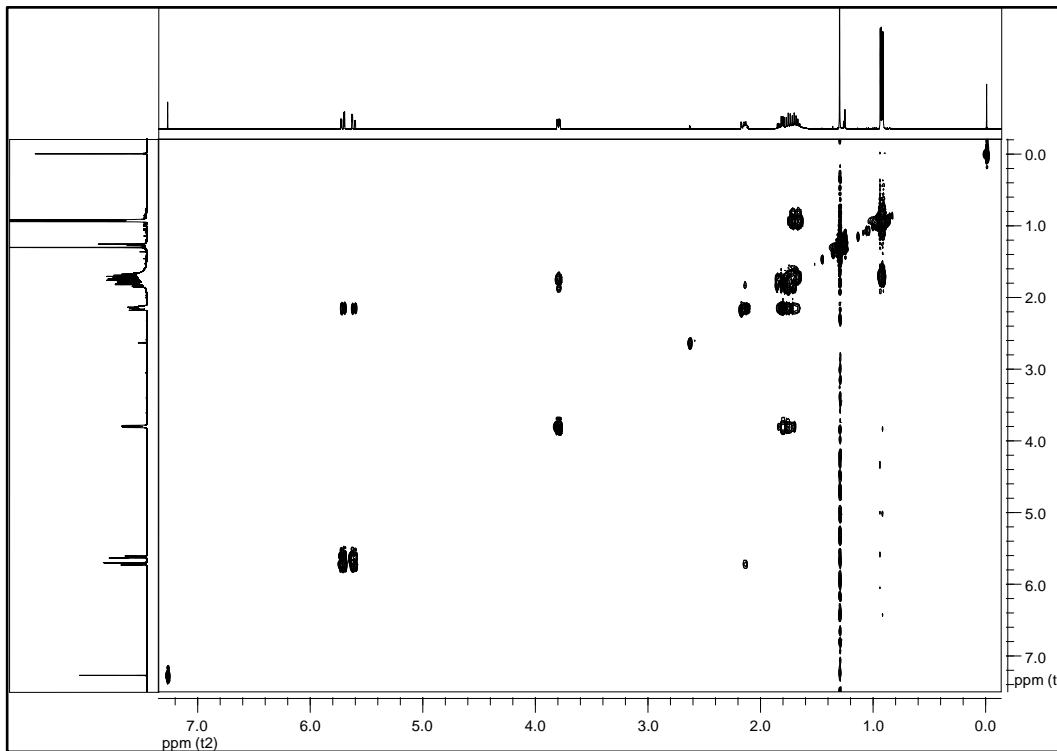
δ: Kimyasal kayma, ppm, C: Karbon atomu



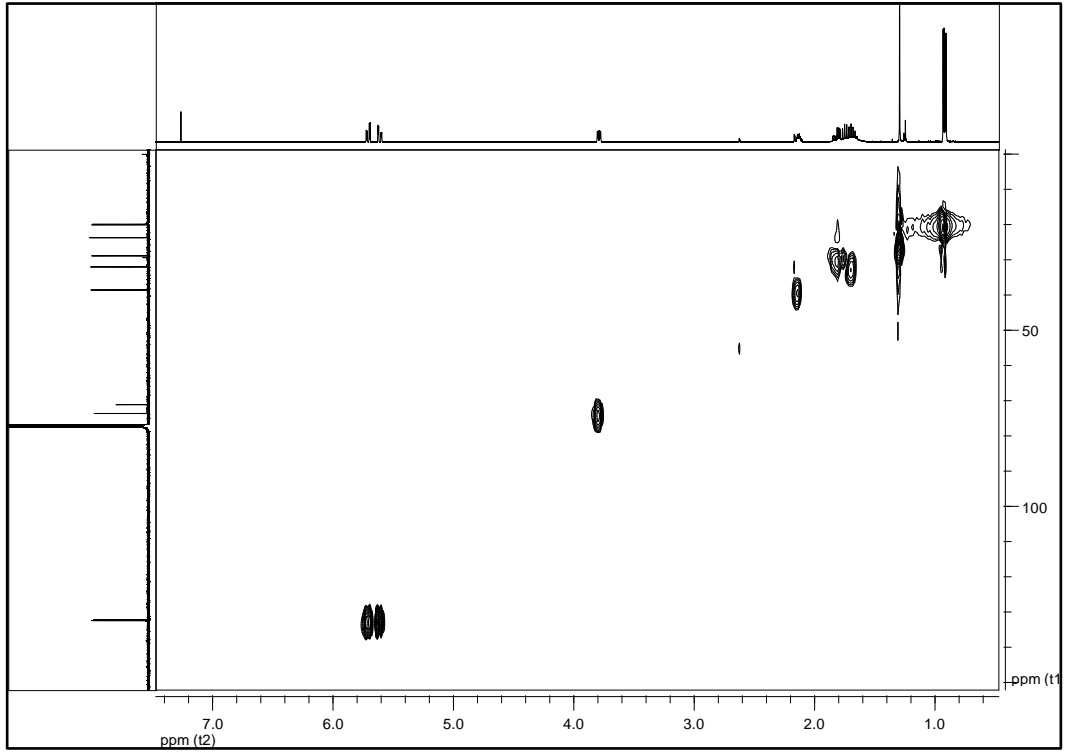
Şekil 15. 5-*p*-Menten-1,2-diol'ün ¹H-NMR Spektrumu



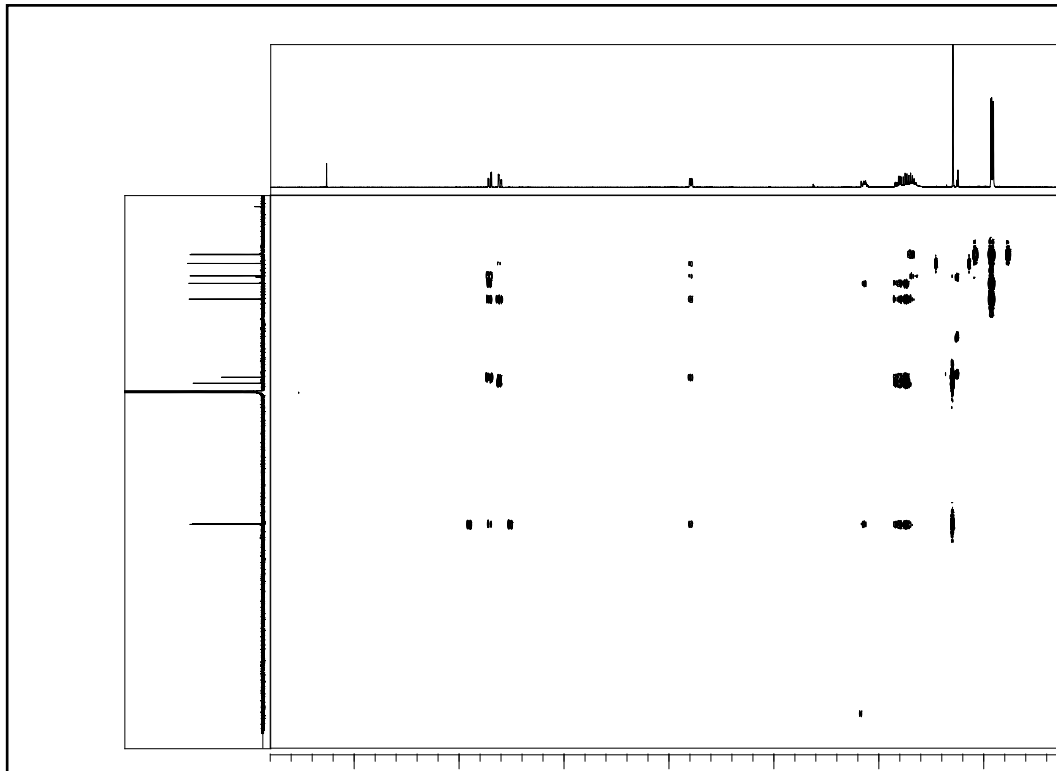
Şekil 16. 5-*p*-Menten-1,2-diol'ün ¹³C-NMR Spektrumu



Şekil 17. 5-*p*-Menten-1,2-diol'ün ¹H-¹H COSY Spektrumu



Şekil 18. 5-*p*-Menten-1,2-diol'ün ^1H - ^{13}C HSQC Spektrumu



Şekil 19. 5-*p*-Menten-1,2-diol'ün ^1H - ^{13}C HMBC Spektrumu

Elde ettiğimiz **A1** metaboliti metanolde çözülerek polarimetrede optik çevirme açısı ölçülmüş ve -24° (c 10, metanol) olarak hesaplanmıştır. Yapılan kaynak taramalarında 5-*p*-menten-1,2-diol'ün diğer enantiyomeri ve diastereo izomerlerinin çeşitli bitkilerden izole edilerek tanımlandığı belirlenmiştir. Spektral verileri büyük ölçüde benzeşen ancak farklı optik çevirme açlarına sahip olan bu maddeler **Çizelge 18**'de özetlenmiştir.

Çizelge 18. 5-*p*-menten-1,2-diol'ün Doğada Bulunan İzomerleri

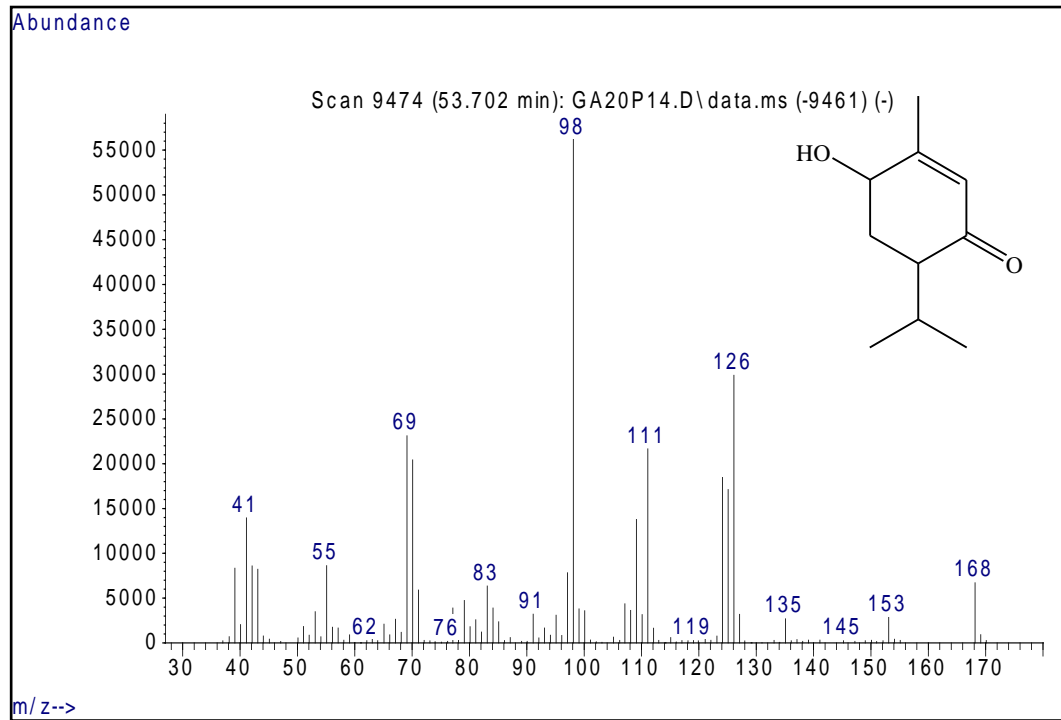
Madde	Çevirme Açısı	Bulunuşu
	(1S,2S,4R)^a [α] _D ²⁰ : -23.7°	<i>Alpinia densibracteata</i> (Sy ve Brown, 1997) <i>(R)</i> - α -Fellandren Biyotransformasyon Metaboliti (Abraham ve ark., 1986)
	(1S,2R,4R) [α] _D ²⁰ : $+24^\circ$	<i>Cuminum cyminum</i> (Ishikawa ve ark., 2002b)
	(1R,2R,4S)^b [α] _D ²⁰ : -34°	<i>Eucalyptus dives</i> (Stolow ve Sachdev, 1965)
	(1R,2S,4S) [α] _D ²⁰ : -8.5°	<i>Chenopodium multifidum</i> (Teresa ve ark., 1983)
	(1S,2R,4S) [α] _D ²⁰ : $+40^\circ$	<i>Chenopodium multifidum</i> (Teresa ve ark., 1983)
	(1S,2S,4S) [α] _D ²⁰ : $+54.5^\circ$	<i>Chenopodium multifidum</i> (Teresa ve ark., 1983)

^a: Çalışmamızda da İzole Edilen A1 Metaboliti, ^b: A1 Metabolitinin Enantiyomeri

Yapılan kaynak taramalarında (*R*)-(-)- α -felandren'in biyotransformasyonu konusunda sadece Abraham ve ark. (1986) tarafından yapılan çalışmaya rastlanmıştır. Bu araştırmanın sonucunda **Çizelge 18**'de görüldüğü gibi *Corynespora asiicola* fungusu kullanılarak (*R*)-(-)- α -felandren'den, (1*S*,2*S*,4*R*)-5-*p*-menten-1,2-diol elde edildiği bildirilmiştir. Tüm spektral verileri ve optik çevirme açısının da aynı olduğu göz önünde bulundurularak **A1** metabolitinin de 1*S*,2*S*,4*R* formundaki 5-*p*-menten-1,2-diol olabileceği düşünülmektedir.

A2 metaboliti

α -Felandrenin biyotransformasyonunda *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *N. crassa* –N24, *F. solani*, *F. culmorum*, *B. cinerea*, *P. chrysosporium* ve *D. riboflavina* (**Çizelge 16**) mikroorganizmalarının çeşitli oranlarda A2 metabolitini meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu metabolit GK/KS ile **6-hidroksipiperiton** [2-sikloheksen-1-on,4-hidroksi-3-metil-6-(1-metiletil)], [C₁₀H₁₆O₂ EI/MS *m/z*: 168 (M⁺, 12), 153 (4), 135 (5), 126 (53), 111 (39), 98 (100), 69 (40), 55 (15), 41 (24)] olarak tanımlanmış ve kütle spektrumu **Şekil 20**'de verilmiştir. Doğada bu maddenin totomerik formunun *Chenopodium multifidum* uçucu yağında bulunduğu bildirilmiştir (Teresa ve ark., 1981). Ayrıca bu maddenin *Trichosporon* sp. fungusu ile (*R*)-(-)-piperitonun biyotransformasyonu ile elde edildiği de bildirilmiştir (Van Dyk ve ark., 1998).

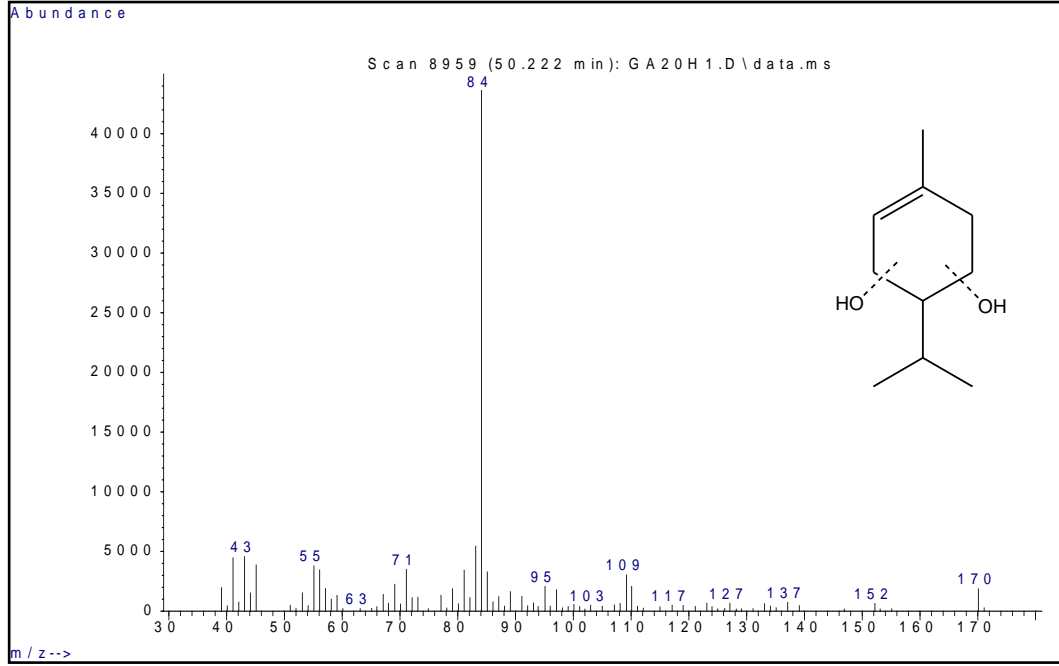


Şekil 20. 6-Hidroksipiperiton'un (A2) Kütle Spektrumu

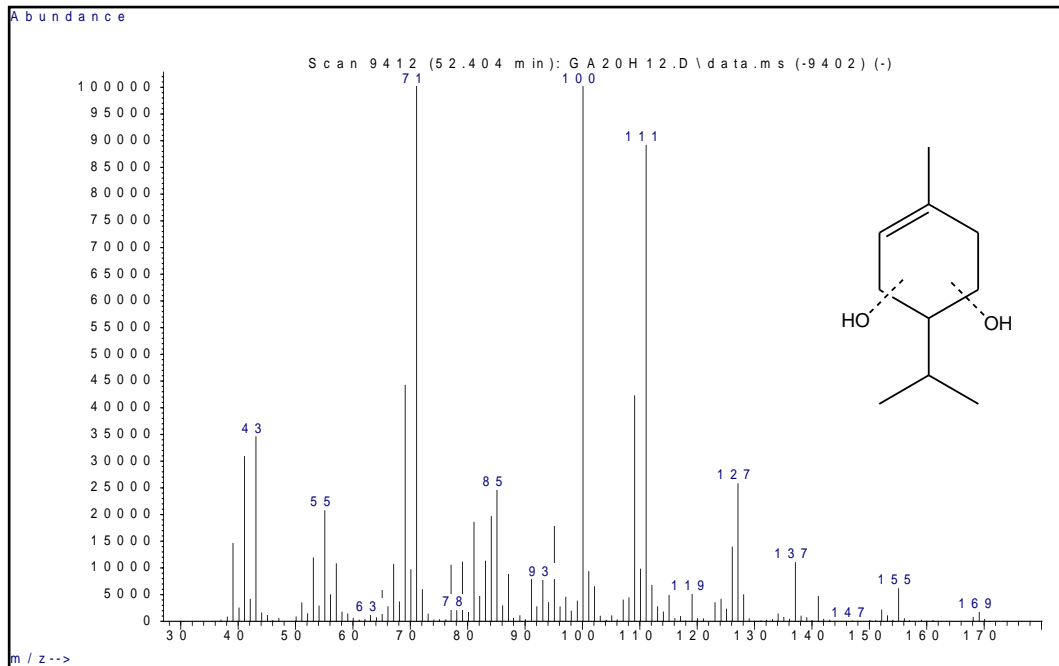
A3-A5 metabolitleri

S. molle uçucu yağının biyotransformasyonu ile önceden belirlenen bu üç metabolitin, (*R*)-(-)-(α)-felandren biyotransformasyonu sonucunda da oluştuğu görülmüştür. Özellikle molekül ağırlıkları dikkate alındığında diol olduğu düşünülen **A3** [EI/MS *m/z*: 170 (M⁺, 4), 152 (14), 109 (7), 95 (4), 84 (100), 71 (9), 69 (40), 43 (11)], **A4** [EI/MS *m/z*: 170 (M⁺, 1), 155 (68), 137 (11), 127 (24), 111

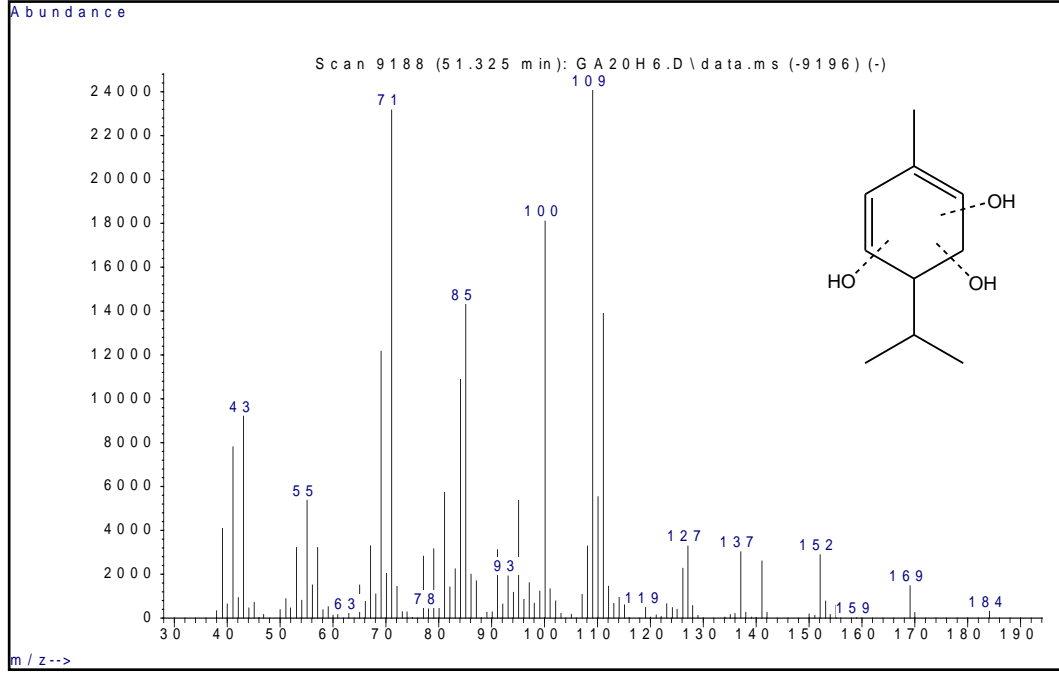
(89), 100 (100), 85 (23), 71 (98), 43 (34)] ve triol olduğu düşünölen **A5** [EI/MS m/z : 184 (M^+ , 2), 169 (6), 152 (11), 137 (11), 127 (12), 109 (100), 100 (76), 85 (60), 71 (95), 55 (23), 43 (38)] metabolitlerinin *Fusarium heterosporium* dışında denenen funguslara ait biyotransformasyon ekstrelerinin tamamına yakınında relatif olarak %1.3 ile %7.1 arasında mevcut olduğu (**Çizelge 16**) belirlenmiş, ancak az miktarda olmalarından dolayı izole edilememişlerdir. Bu metabolitlerin yapıları aydınlatılmamış, sadece GK/KS analizi sonucunda elde edilen kütle spektrumları ve muhtemel moleköl yapıları, Şekil **21-23**'de verilmiştir.



Şekil 21. A3 Metabolitinin Kütle Spektrumu



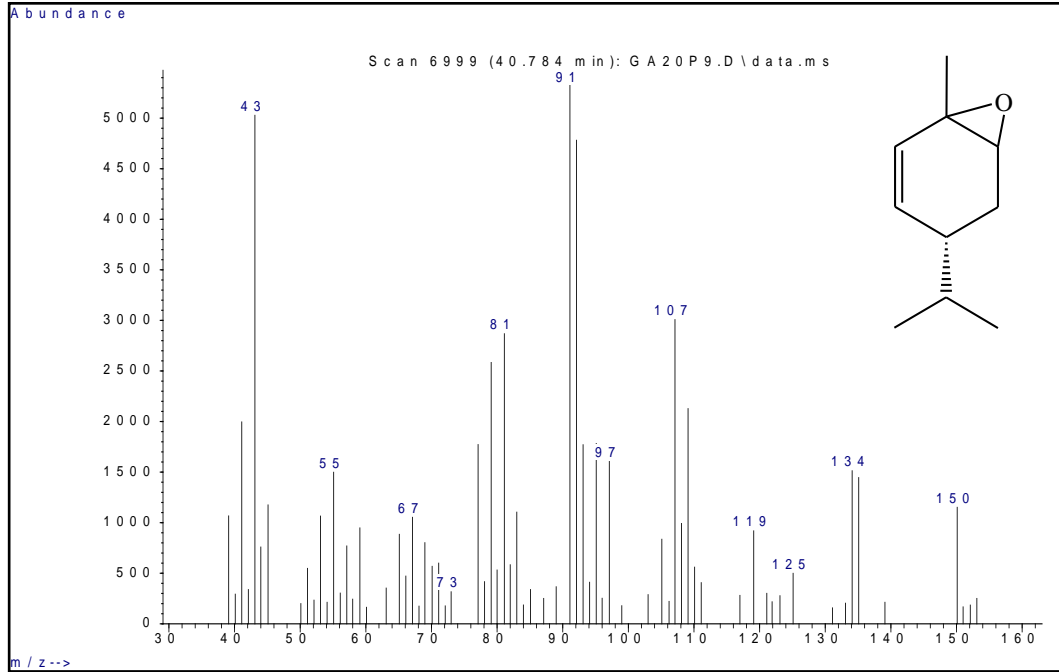
Şekil 22. A4 Metabolitinin Kütle Spektrumu



Şekil 23. A5 Metabolitinin Kütle Spektrumu

A6 metaboliti

Kluyveromyces lactis ve *Fusarium culmorum* funguslarına ait biyotransformasyon ekstralarında %0.1 ve %0.3 oranında **α -fellandren epoksit** [1,3-sikloheksadien,2-metil-5-(1-metiletil)monoepoksit], [C₁₀H₁₆O EI/MS m/z: 152 (M⁺, 4), 150 (21), 134 (28), 107 (56), 91 (100), 81 (53), 67 (19), 43 (94)] belirlenmiştir (Çizelge 16). Bu maddenin GK/KS ile elde edilen spektrumu Şekil 24’de verilmiştir.

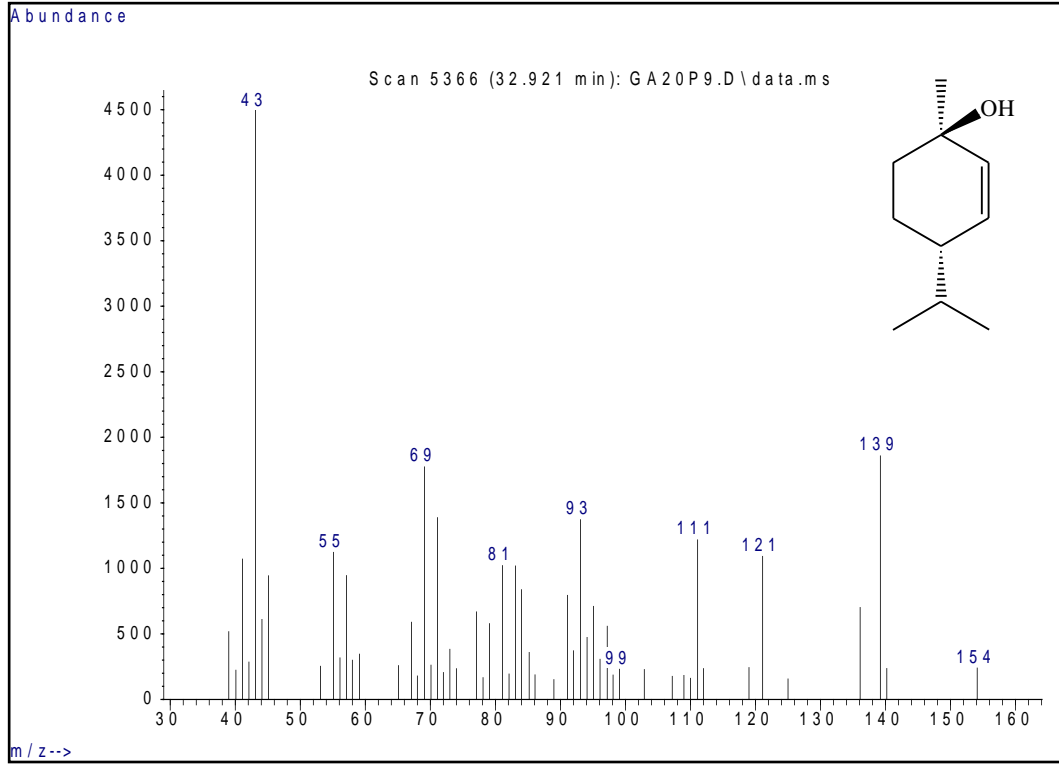


Şekil 24. α -Fellandren Epoksit’in (A6) Kütle Spektrumu

A7-A9 metabolitleri

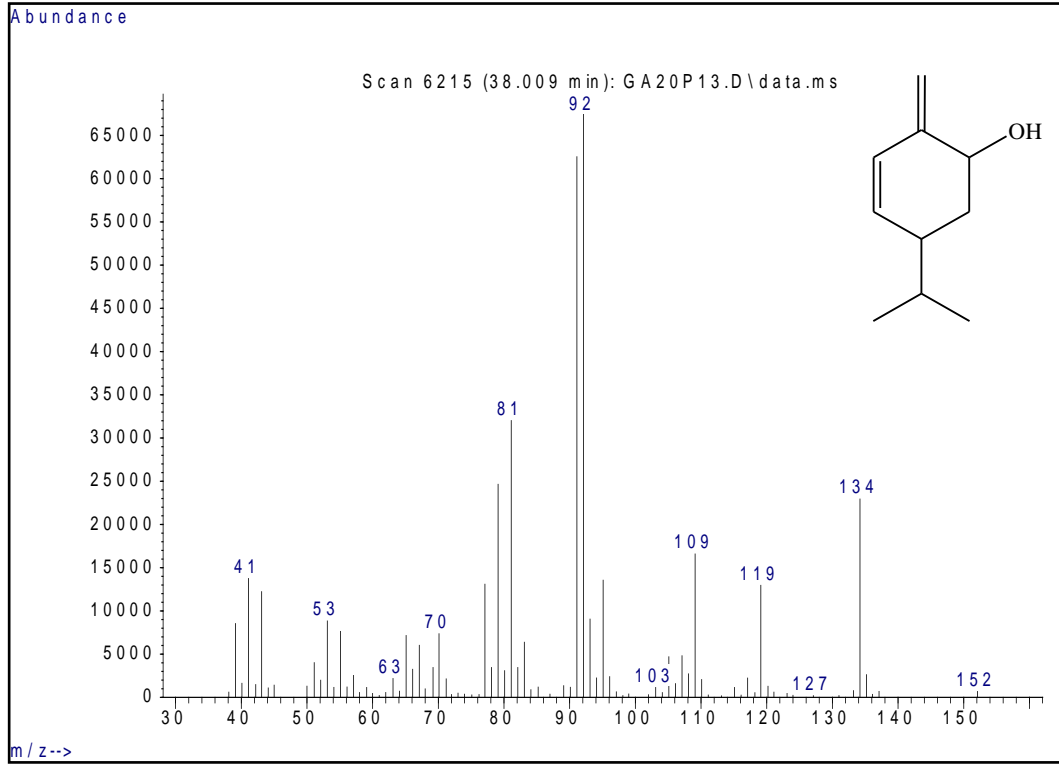
Kullanılan mikroorganizmalara ait 14. gün biyotransformasyon ekstralarında yapılan GK/KS analizleri sonucunda elde edilen spektrumlar (Şekil 25-27) ve kütüphane tarama sonuçlarına göre, çeşitli mikroorganizmalara ait ekstralarda (Çizelge 16) bu üç metabolit tanımlanmıştır. A7 metabolitinin doğada bir çok uçucu yağın bileşimine giren *cis-p-ment-2-en-1-ol* [C₁₀H₁₈O EI/MS *m/z*: 154 (M⁺, 5), 139 (41), 121 (23), 111 (27), 93 (30), 69 (38), 55 (26), 43 (100)] ve A8 metabolitinin de *p-menta-1(7),5-dien-2-ol* (sin. Yabunikkeol), [C₁₀H₁₆O EI/MS *m/z*: 152 (M⁺, 1), 134 (34), 119 (19), 109 (25), 92 (100), 81 (47), 53 (13), 41 (19)] olduğu saptanmıştır.

cis-p-Ment-2-en-1-ol'ün, (*R*)-(-)- α -felandrenden biyotransformasyonla elde edilmesi ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. *p-Menta-1(7),5-dien-2-ol* Abraham ve ark. (1986), tarafından daha önce *C. cassicola* ile (*R*)-(-)- α -felandrenin biyotransformasyonu ile elde edilmiştir.

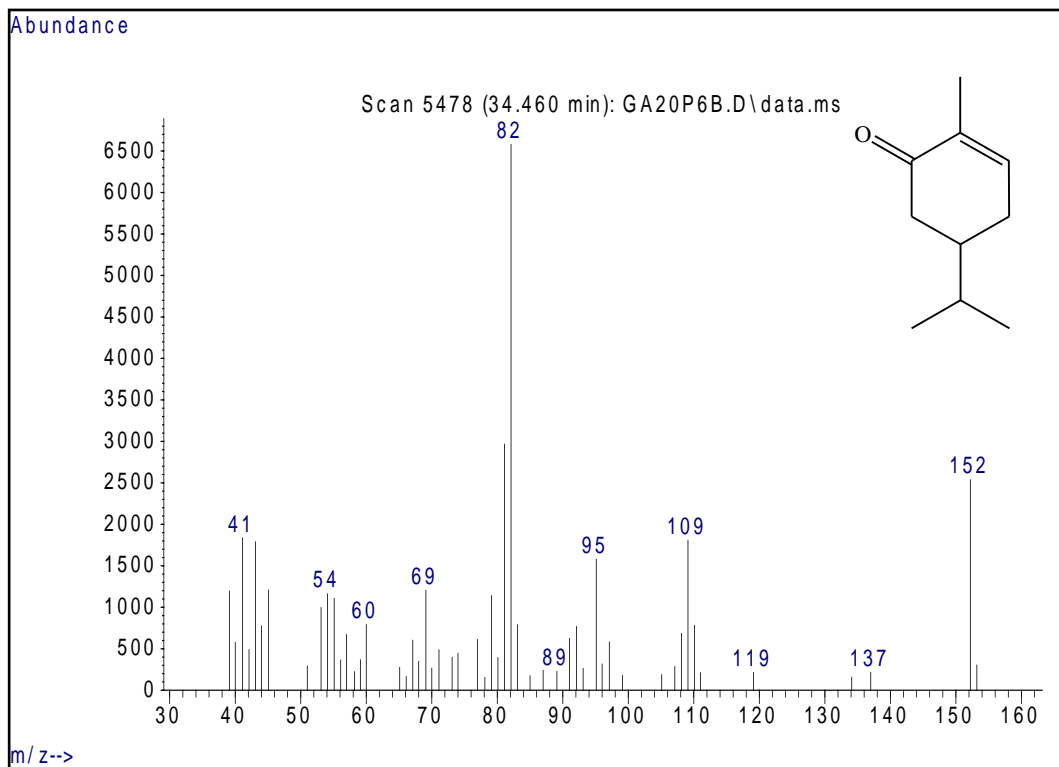


Şekil 25. *cis-p-ment-2-en-1-ol*'ün (A7) Kütle Spektrumu

A. alternata ve *P. chrysosporium* funguslarının (*R*)-(-)- α -felandrenden %0.1 ve %0.2 oranlarında **karvotanaseton** (*p-ment-1-en-6-on*, A9) [C₁₀H₁₆O EI/MS *m/z*: 152 (M⁺, 38), 137 (3), 109 (26), 95 (24), 82 (100), 69 (18), 41 (28)] oluşturduğu belirlenmiştir. Noma ve ark. (1978) tarafından yapılan çalışmada karvonun mikrobiyal transformasyonu ile elde edilen karvotanaseton'un doğada *Piper nigrum*, *Tanacetum vulgare*, *Eucalyptus deglupta*, *Cymbopogon nardus*, *Plucaria mauritanica*, *Artemisia kurramensis* bitkilerine ait uçucu yağlarla bulunduğu bildirilmiştir (Conolly ve Hill, 1991).



Şekil 26. *p*-menta-1(7),5-dien-2-ol'ün (A8) Kütle Spektrumu



Şekil 27. Karvotanaseton'un (A9) Kütle Spektrumu

Biyolojik Aktivite Sonuçları

Biyotransformasyonlarda kullanılan tüm başlangıç maddeleri ve bunların izole edilen metabolitlerinin (L1 ve A1) standart maddeler eşliğinde çeşitli yöntemler kullanılarak biyolojik etkileri araştırılmıştır.

Antibakteriyel aktivite

Antibakteriyel aktivite deneylerinde maddelerimizin, biri klinik izolat olmak üzere toplam 16 adet Gram (+) ve Gram (-) insan, bitki ve gıda patojeni bakteriye karşı olan etkileri standart antibakteriyel maddeler eşliğinde çalışılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), mg/ml cinsinden **Çizelge 19**'da verilmiştir.

Çizelge 19. Antibakteriyel Etki Sonuçları

Bakteri türü	UY.	L	L1	A	A1	S1	S2
<i>E. coli</i>	2	>4	0.06	>4	0.5	0.008	0.008
<i>S. aureus</i>	2	>4	0.06	>4	0.25	0.004	0.004
<i>P. aeruginosa</i>	4	>4	0.25	>4	0.5	0.002	0.06
<i>E. aerogenes</i>	4	>4	0.03	>4	0.5	0.008	0.004
<i>P. vulgaris</i>	2	>4	0.125	>4	0.25	0.06	0.015
<i>S. typhimurium</i>	4	>4	0.06	>4	0.5	0.01	0.004
<i>S. epidermidis</i>	2	>4	0.5	>4	0.25	0.06	0.002
<i>B. cereus</i>	2	>4	0.06	>4	0.5	0.125	0.015
<i>B. subtilis</i>	2	>4	0.5	>4	0.125	0.004	0.008
<i>S. aureus (MRSA)</i>	2	>4	0.03	2	0.125	0.25	0.03
<i>A. tumefaciens (S6)</i>	>4	>4	0.03	2	0.5	0.001	0.008
<i>E. carotovora subsp. carotovora</i>	>4	>4	0.5	2	0.25	0.001	0.008
<i>P. syringae pv. phaseolicola</i>	>4	>4	0.5	>4	0.5	0.001	0.015
<i>P. syringae pv. tomato</i>	2	>4	0.25	1	0.5	0.001	0.004
<i>S. marcescens</i>	2	>4	0.25	>4	0.125	0.004	0.06
<i>E. coli O157-H7</i>	1	>4	0.5	>4	0.125	0.001	0.004

UY.: *S. molle* uçucu yağı, L: (R)-(+)-limonen, L1: 8-*p*-menten-1,2-diol, A: (R)-(-)- α -fellandren, A1: 5-*p*-menten-1,2-diol, S1: Ampisilin, S2: Kloramfenikol

Çizelge 19'da görüldüğü gibi, biyotransformasyonlarda kullanılan başlangıç maddelerimizden α -felandren ve *S. molle* uçucu yağının 1 ile 4 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda antibakteriyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. (R)-(+)-limonenin denenen tüm bakterilere karşı MİK değerinin 4 mg/ml den büyük olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada (R)-(+)-limonen'in *S. aureus*, *B. cereus*, *Enterobacter faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı 3 ile 27 mg/ml konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir (Vuuren ve Vilijoen, 2007).

Standart antibakteriyal maddelerle karşılaştırıldığında tüm substratların oldukça zayıf etkileri olduğu saptanırken, limonen ve fellandrenen elde edilen metabolitlerin (L1 ve A1) standartlara yakın antibakteriyal etkilere sahip oldukları görülmüştür. Özellikle 8-*p*-menten-1,2-diolün *Bacillus cereus* ve Metisiline dirençli *S. aureus*'u (MRSA) ampisilinden daha düşük dozlarda inhibe ettiği (0.06 ve 0.03 mg/ml), MRSA bakterisine karşı ise kloramfenikolle aynı MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan kaynak taramalarında limonenin, oksijene maruz bırakılarak oksidasyonu sonucu elde edilen ve içinde 8-*p*-menten-1,2-diol'ün de bulunduğu çeşitli limonen metabolitleri taşıyan karışımın *Staphylococcus aureus*'a karşı 0.06 mg/ml konsantrasyonda bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (Chastain ve ark., 1992). Bu konuda tek araştırma olan bu patentin sonuçlarıyla, çalışmamızda aynı bakteriye karşı bulunan MİK değeri sonuçları birebir uyum sağlamaktadır. 8-*p*-menten-1,2-diol'ün *S. aureus* dışında, araştırmamızda kullandığımız diğer 15 bakteriye karşı olan antibakteriyal etkisi ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir (**Çizelge 19**).

Antikandidal aktivite

Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antikandidal aktivite deneylerinde *Candida albicans*'ın üç farklı suşu ile birlikte toplam 6 farklı *Candida* türü kullanılmıştır. Paralel olarak gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen MİK değerleri mg/ml cinsinden **Çizelge 20**'de verilmiştir.

Limonen ve fellandrenin, test edilen *Candida* türlerine karşı 1 ile 4 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Limonenin, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. zeylanoides*'e karşı 4 mg/ml den daha yüksek MİK değerleri olduğu görülmüştür. Limonen metaboliti olan 8-*p*-menten1,2-diol'ün (L1) göstermiş olduğu kuvvetli antibakteriyal etkilere karşın, antikandidal etkisinin zayıf olduğu saptanmıştır (**Çizelge 20**).

Çizelge 20. Antikandidal Etki Sonuçları

<i>Candida</i> türü	UY.	L	L1	A	A1	S1	S2	S3	S4
<i>C. albicans</i> ^a	1	2	1	2	1	0.02	0.004	0.5	0.008
<i>C. albicans</i> ^b	2	2	1	2	0.5	0.5	0.03	1	0.06
<i>C. albicans</i> ^c	1	1	1	2	0.25	0.25	0.125	0.25	0.06
<i>C. glabrata</i>	1	2	1	2	0.5	0.125	0.004	0.25	0.03
<i>C. utilis</i>	2	1	1	2	0.125	0.5	0.002	1	0.06
<i>C. tropicalis</i>	2	>4	2	1	0.5	0.125	0.004	0.5	0.03
<i>C. krusei</i>	2	>4	1	2	0.5	0.5	0.06	1	0.01
<i>C. zeylanoides</i>	2	>4	1	2	0.5	0.125	0.004	0.5	0.008
<i>C. parapsilosis</i>	2	2	1	2	0.5	0.125	0.008	0.5	0.06

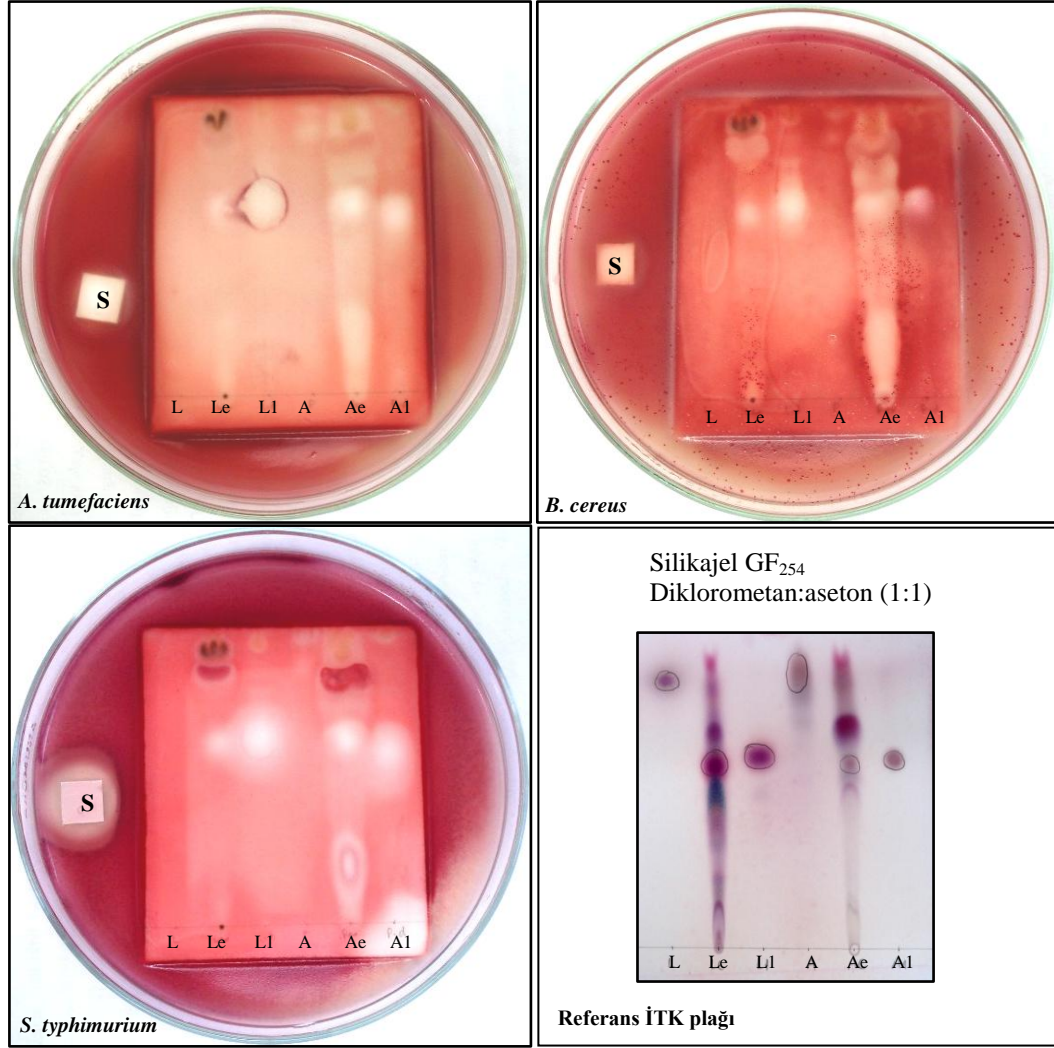
^a: Klinik izolat, ^b NRRL 27077, ^c ATCC 90028, UY.:*S. molle* uçucu yağı, L: (R)-(+)-limonen, L1: 8-*p*-menten-1,2-diol, A: (R)-(-)- α -fellandren, A1: 5-*p*-menten-1,2-diol, S1: Griseofulvin, S2: Klotrimazol, S3: Benomil, S4: Ketokonazol

Çizelge 20'de görüldüğü gibi 8-*p*-menten-1,2-diol'den daha zayıf antibakteriyal etkileri olan fellandren metabolitinin (A1), 8-*p*-menten-1,2-diole göre daha kuvvetli antikandidal etki gösterdiği belirlenmiştir. 4 farklı standart antifungal ile birlikte test edilen A1 metabolitinin, *Candida albicans*'ın iki suşu dışındaki denenen diğer tüm *Candida* türlerine karşı Benomil'den daha etkili olduğu saptanmıştır. *S. molle* uçucu yağının da 1 ve 2 mg/ml lik konsantrasyonlarda orta derecede antikandidal etkili olduğu belirlenmiştir.

Biyootografi sonuçları

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem olan biyootografi ile, biyotransformasyon sonunda elde edilen ham ekstre içindeki aktif metabolitlerin ortaya çıkarılması mümkün olmuştur. Bu maksatla *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Candida albicans* (ATCC 90028) türlerine karşı (R)-(+)-limonen (L), α -fellandren (A) ve bunların biyotransformasyon ekstreleri (Le ve Ae) ile izole edilmiş 8-*p*-menten-1,2diol (L1) ve 5-*p*-menten-1,2-diol (A1) metabolitleri test edilmiştir. Yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan plaklara 10 mg/ml konsantrasyondaki her bir örnekten 5'er μ l uygulanmıştır. Standart antibakteriyal madde olarak 2 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan kloramfenikol (S) kullanılmıştır. Mikroorganizma ile kaplanan plak inkübe edilmiş ve TTC solusyonu püskürtülmüştür. Renklenmeyen alanlara ait spotlar, referans plakla karşılaştırılarak aktiviteden sorumlu maddeler belirlenmiştir (**Şekil 28**).

Biyootografi yöntemi ile biyotransformasyon sonrasında elde edilen ham ekstreten izole edilmesi planlanan metabolitlerin antimikrobiyal etkiye sahip olanların seçici izolasyonu mümkün olabilmektedir.



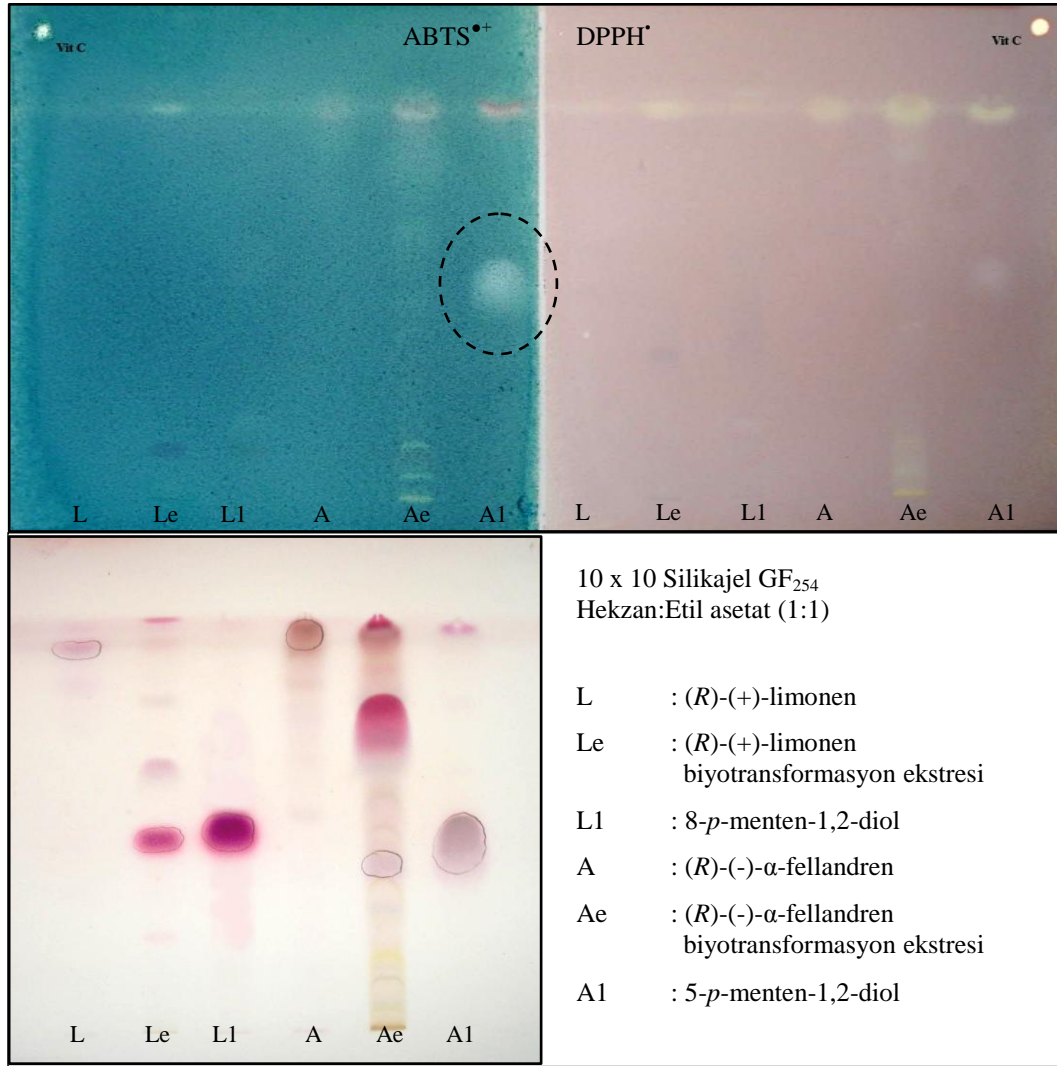
Şekil 28. Biyootografi Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Etki Sonuçları

Şekil 28’de görüldüğü gibi (*R*)-(+)-limonen ve (*R*)-(-)- α -fellandrenin test edilen mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyal etkisi olmadığı belirlenmiştir. Mikrodilüsyon sonuçları incelendiğinde (Çizelge 19 ve 20) bu maddelerin standart antimikrobiyal maddelerle kıyaslandıklarında çok düşük etkiye sahip oldukları görülmektedir. (*R*)-(+)-limonen ve (*R*)-(-)- α -fellandrenin biyotransformasyon ekstrelerinin ise *Candida albicans* haricinde denenen diğer mikroorganizmalara karşı etkili metabolitlere sahip oldukları görülmektedir. Aynı sistemde İTK plağına uygulanan 8-*p*-menten-1,2diol (L1) ve 5-*p*-menten-1,2-diol (A1) metabolitlerinin de antimikrobiyal etkilerinden dolayı oluşturdukları üremenin olmadığı renksiz alanlar gözlenmiştir. Metabolitlerin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen güçlü antimikrobiyal etkileri (Çizelge 19) bu sonuçlar ile büyük bir uyum göstermektedir. *Candida albicans*’ın kullanıldığı test plağında standart madde dışında herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

Antioksidan aktivite sonuçları

Ön tarama sonuçları

Tüm örnekler 10 mg/ml konsantrasyonda 4'er µl hacimde 3 adet silikajel GF₂₅₄ plağına uygulanmış ve diklorometan:aseton (4:1) çözücü sisteminde developpe edilmiştir. Standart antioksidan madde olarak 10 mg/ml dozda (metanolde), askorbik asit kullanılmıştır. DPPH ve ABTS radikal çözeltilerinin püskürtüldüğü plaklar incelendiğinde (Şekil 29), standart madde dışında, yalnızca A1 metabolitinin belirgin şekilde ABTS radikal çözeltisinin rengini açtığı belirlenmiştir. Limonen ve fellandrenin uygulanan dozlarında ABTS üzerinden radikal süpürücü etkisi olmadığı gözlenmiştir. DPPH püskürtülen plakta da belirgin bir soldurma gözlenmemiştir.



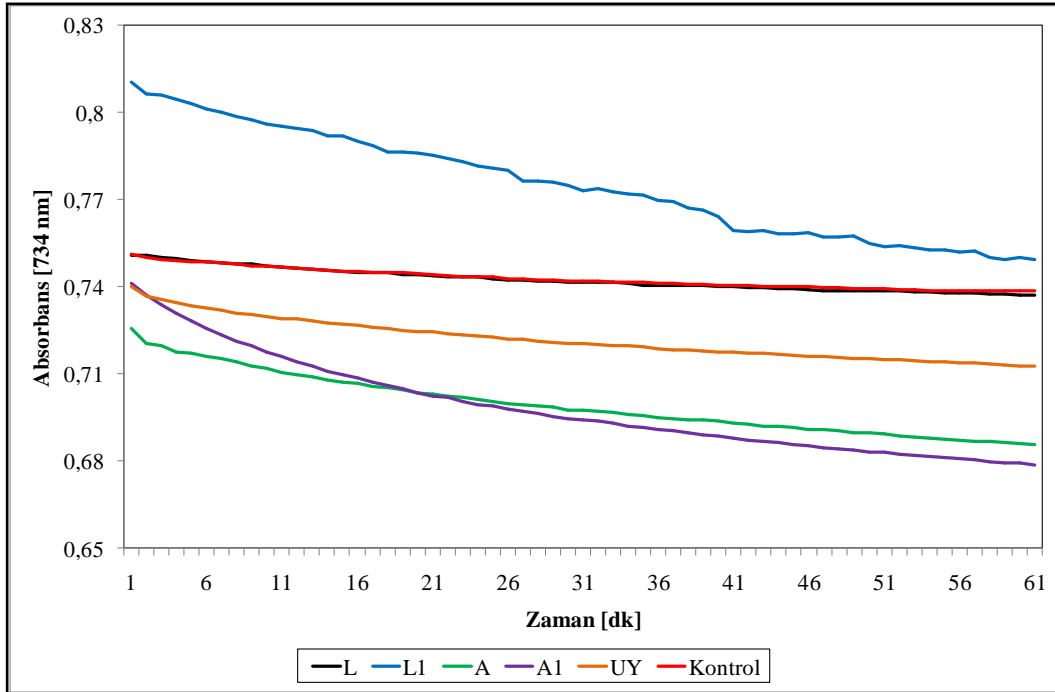
Şekil 29. Antioksidan Ön Tarama Denejlerinin Sonuçları

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki

Yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen deneyde *Schinus molle* uçucu yağı, (R)-(+)-limonen, (R)-(-)- α -felandren, 8-*p*-menten-1,2-diol ve 5-*p*-menten-1,2-diol'ün IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla 10 mg/ml ile 0.1 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve DPPH radikalini süpürücü etkisi araştırılmıştır. 517 nm de okunan absorbans sonuçlarına göre maddelerin denenen konsantrasyon aralığında DPPH radikalini soldurmadığı görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan ve IC₅₀ değeri 0.08 mg/ml olan BHT ile karşılaştırıldığında maddelerimizin oldukça zayıf etkiye (>10 mg/ml) sahip olduğu belirlenmiştir. Tüp deneyi sonuçlarının İTK plağında yapılan ön tarama deneyi sonuçlarıyla (Şekil 29) uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Yapılan bir araştırmada limonen dahil 20den fazla monoterpenin DPPH radikalini süpürücü etkisi incelenmiş, çalışmamız sonuçlarına paralel olarak en düşük etkiye limonenin sahip olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark., 2000).

ABTS radikal süpürücü etki

Yöntemler kısmında anlatılan TEAC metoduna göre örneklerimizin 60 dakika boyunca 10 mg/ml lik konsantrasyonlarının ABTS'i soldurma derecesi ölçülmüş, antioksidan etkisi iyi bilinen aynı konsantrasyondaki BHT ile karşılaştırıldığında oldukça düşük aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 21 ve Şekil 30). Limonen metaboliti olan 8-*p*-menten-1,2-diol'ün beklenen radikal süpürücü etkinin aksine oksidasyonu arttırdığı görülmüştür. Limonenin soldurma miktarının negatif kontrol ile aynı derecede olduğu, α -felandren ve biyotransformasyon metaboliti A1'in 30.dakika sonunda 0.19 ve 0.20 mM troloksa eşdeğer (TEAC) etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 30. ABTS Radikal Süpürücü Etki

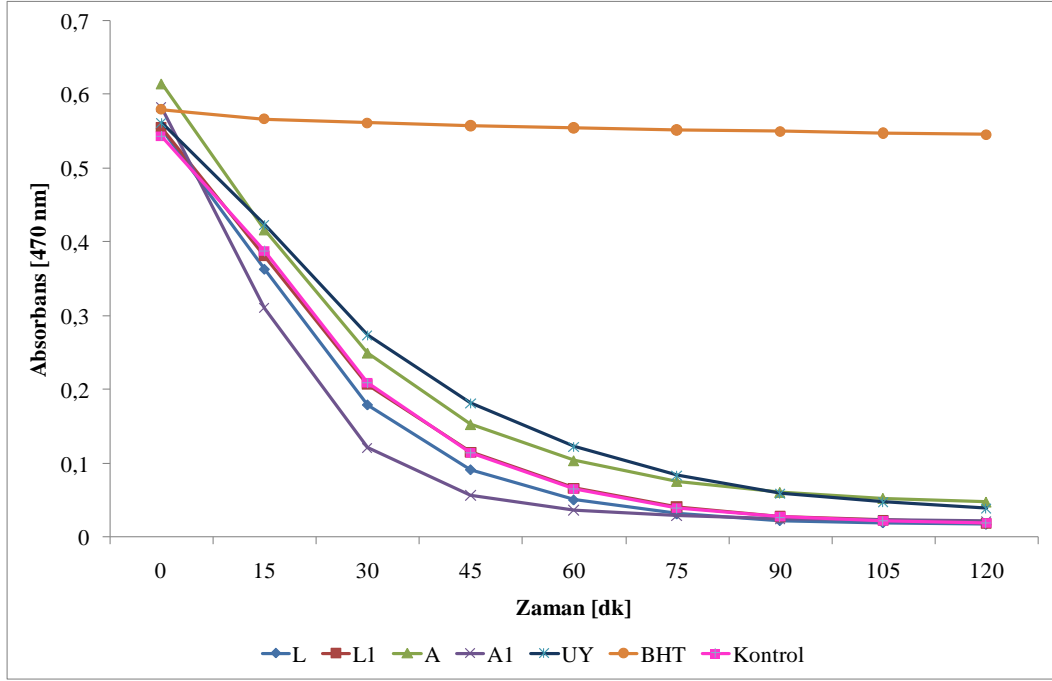
Çizelge 21. Troloksa Eşdeğer ABTS Radikal Süpürücü Etki [TEAC* (mM)]

Örnek	Zaman (dk.)			
	0	10.	20.	30.
L	0.03	0.04	0.05	0.06
L1	-0.15	-0.10	-0.07	-0.04
A	0.11	0.15	0.18	0.19
A1	0.06	0.14	0.18	0.20
UY	0.06	0.10	0.11	0.12
BHT	1.65	2.25	2.26	2.26

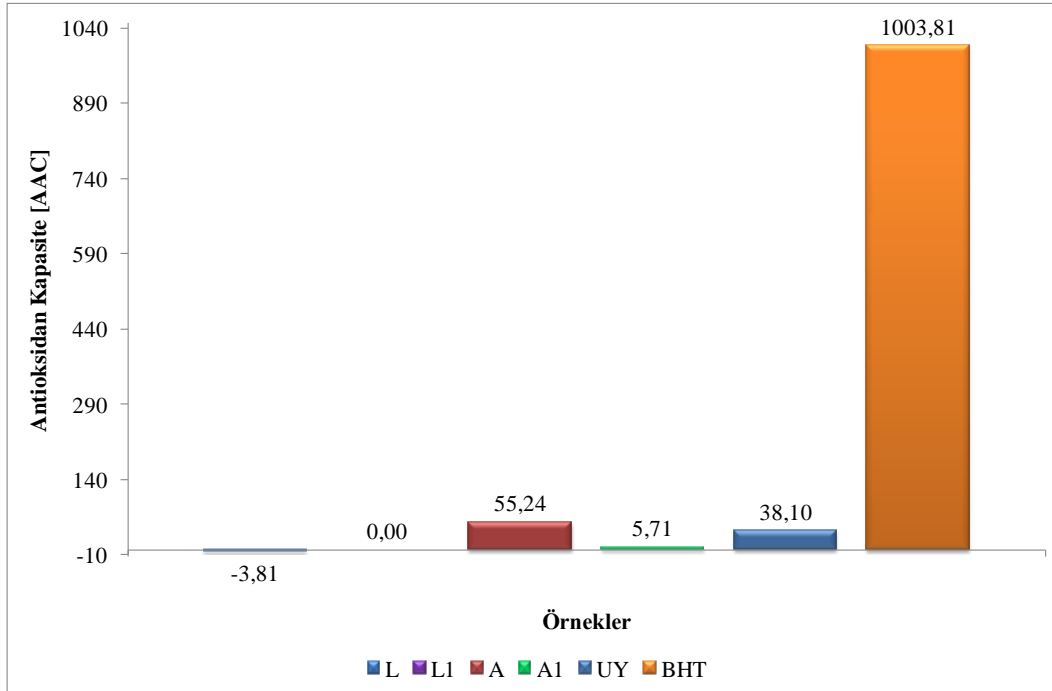
*TEAC değeri aktivite ile doğru orantılı olarak artmaktadır, L: (R)-(+)-limonen, L1: 8-*p*-menten-1,2-diol, A: (R)-(-)- α -felandren, A1: 5-*p*-menten-1,2-diol, UY: *S. molle* uçucu yağı, BHT: Butillenmiş hidroksitoluen

β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki

β -karoten soldurma deneyine göre 10 mg/ml (metanolde) konsantrasyonda hazırlanan numunelerimizin lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri 120 dakika boyunca ölçülmüş, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre oldukça düşük antioksidan kapasitesiteye (AAC) sahip oldukları belirlenmiştir (**Şekil 31** ve **32**). Yapılan bu kinetik çalışmada α -felandrenin, diğer substratlara ve metabolitlere göre daha yüksek etkisi olduğu (55.4) görülmüştür. Limonen ve α -felandrenin biyotransformasyonu ile elde edilen tüm metabolitlerin antioksidan kapasiteleri ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir.



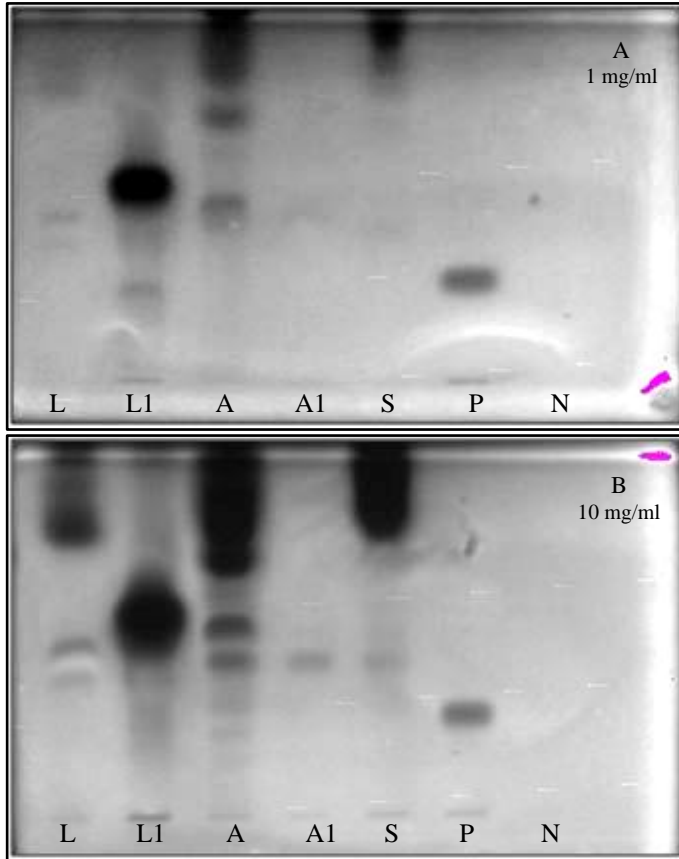
Şekil 31. Substrat ve Metabolitlerin β -karoten/linoleik Asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Etkisi



Şekil 32. Substrat ve Metabolitlerin β -karoten/linoleik Asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Antioksidan Kapasite Değerleri

Biyolüminesan Vibrio fischeri yöntemi ile belirlenen akut toksisite sonuçları

Limonen (L), α -felandren (A), 8-*p*-menten-1,2-diol (L1) ve 5-*p*-menten-1,2-diol (A1) yanında standart olarak toksisitesi iyi bilinen tuyo (S) ve test kitine ait pozitif (P) ve negatif (N) kontroller yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde plağa uygulanmış ve bakteri ile kaplanmıştır. Görüntüleme sistemi altında çekilen fotoğraflar **Şekil 30**'da verilmiştir. Toksik olan maddeler beyaz zemin üzerindeki karanlık lekeler olarak belirlenmiştir. 1 mg/ml'lik dozda A plağına uygulanan örneklerin toksisitesi incelendiğinde limonenin etkili olmadığı ancak metaboliti olan 8-*p*-menten-1,2-diol ün yüksek derecede toksik etkisi olduğu kalitatif olarak belirlenmiştir. Felandrenin denenen 1 mg/ml'lik dozda toksik olduğu, metabolitinin ise herhangi bir toksik etkisi olmadığı görülmektedir. Standart olarak kullanılan tuyo ve pozitif kontrol koyu lekeler halinde görülmektedir. Maddelerin 10 mg/ml dozda uygulandığı B plağına bakıldığında ise limonen, felandren ve 8-*p*-menten-1,2-diol'ün artan toksik etkileri büyüyen siyah lekelerden gözlenmiş, felandren metabolitinin bu dozda da toksik olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak 1 mg/ml konsantrasyonda toksik etki göstermeyen limonenin, biyotransformasyonla elde edilen metaboliti olan 8-*p*-menten-1,2-diol'ün ise 1 ve 10 mg/ml'lik konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. α -Felandrenin ise 1 ve 10 mg/ml'lik dozlarda toksik etki gösterdiği buna karşın bu maddenin biyotransformasyonu ile elde edilen 5-*p*-menten-1,2-diol'ün ise her iki dozda da toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Sonuçlar kalitatif olarak verilmiş, IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarımız ise halen devam etmektedir.



Şekil 33. Biyolüminesan Akut Toksisite Sonuçları

SONUÇ VE ÖNERİLER

Schinus molle uçucu yağı ile yapılan biyotransformasyon çalışmaları sonucunda çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak 10 metabolit varlığı belirlenmiş, altısının yapıları aydınlatılmıştır.

Yapılan kaynak taraması ve deneysel çalışmalar sonucunda *S. molle* uçucu yağının mikrobiyal transformasyonu ile oluşan 8-*p*-menten-1,2-diol (limonen-1,2-diol), karvon ve ekzo-2-hidroksisineol'ün uçucu yağın bileşiminde olan limonenden hareketle sentezlendikleri belirlenmiştir. 8-*p*-Menten-1,2-diol metabolitinin yeterli miktarda elde edilebilmesi için *Alternaria alternata* fungusu ile preparatif ölçekte çalışılmış ve bu amaçla ticari kaynaklardan temin edilen (*R*)-(+)- ve (*S*)-(-)-limonen substrat olarak ayrı ayrı denenmiştir. Sonuçta biyotransformasyon ürünleri olarak (*R*)-(+)-limonenden; (+)-8-*p*-menten-1,2-diol, (*S*)-(-)-limonenden ise (-)-8-*p*-menten-1,2-diol metabolitinin oluştuğu belirlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalardaki sonuçlar da göz önünde bulundurularak limonen moleküllerindeki şiral özellikteki 4. karbon atomunun (*R*)- ve (*S*)- formlarının metabolitlerde de korunduğu düşünülmektedir (Abraham ve ark., 1986; Van der Werf ve ark., 1999; Ishikawa ve ark., 2002a; Pinheiro ve Marsaioli, 2007). Biyolojik aktivite çalışmalarında da (*R*)-(+)-limonenden elde edilen (+)-8-*p*-menten-1,2-diol kullanılmıştır. Bunun dışında *Neurospora crassa* tarafından kripton metaboliti (sin. 4-izopropilsiklohekzen-2-on), *Fusarium solani* ve *F. culmorum* fungusları tarafından sentezlenen ve yapısı tam olarak aydınlatılamayan ancak monohidroksilli olabileceği düşünülen M2 (M⁺150) metabolitinin varlığı belirlenmiştir.

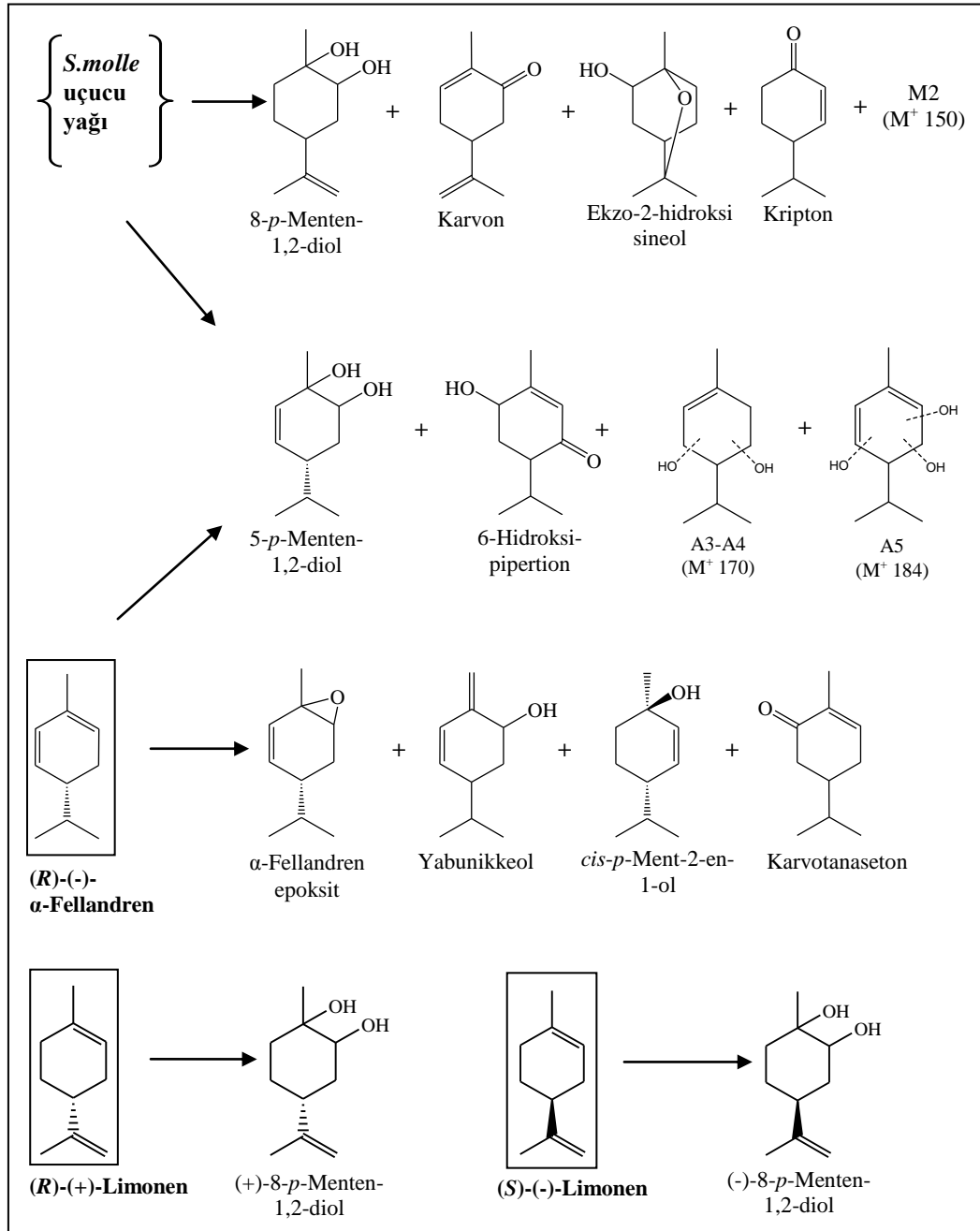
(*R*)-(-)- α -felandren ile yapılan biyotransformasyon çalışmalarında 9 metabolit oluştuğu belirlenmiş ve altısı tanımlanmıştır. Bunlardan 5-*p*-menten-1,2-diol, kullanılan tüm funguslara ait biyotransformasyon ekstrelerinde saptanmış, en yüksek verimle *Alternaria alternata* tarafından sentezlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak *A. alternata* fungusu kullanılarak preparatif olarak çalışılmış, izole edilerek saflaştırılan bu metabolit biyolojik aktivite testlerinde kullanılmıştır.

S. cerevisiae, *K. lactis*, *N. crassa* –N24, *F. solani*, *F. culmorum*, *B. cinerea*, *P. chrysosporium* ve *D. riboflavina* funguslarının (*R*)-(-)- α -felandren'i, %1.3 - %11 arasında değişen verimlerle, 6-hidroksipiperitona dönüştürdüğü belirlenmiştir. Bu maddenin (*R*)-(-)- α -felandren'den biyotransformasyonla elde edilmesi ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir. Aynı şekilde GK/KS yardımıyla yapıları aydınlatılan α -felandren epoksit, *cis-p*-ment-2-en-1-ol ve karvotanaseton'un, (*R*)-(-)- α -felandrenin biyotransformasyonu ile elde edilmesi yine ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir.

Daha önce (*R*)-(-)- α -felandrenin *Cornespora cassicola* ile biyotransformasyonu konulu bir araştırmada (Abraham ve ark., 1986) oluştuğu bildirilen Yabunikkeol isimli metabolitin [sin. *p*-menta-1(7),5-dien-2-ol], bu çalışma kapsamında ayrıca *A. alternata*, *S. cerevisiae*, *D. riboflavina*, *K. lactis*, *F. culmorum*, *B. cinerea* ve *P. chrysosporium* mikroorganizmaları tarafından da sentezlendiği gösterilmiştir.

Bunlara ilave olarak, aynı zamanda uçucu yağ biyotransformasyonu ile da oluştuğu belirlenen, ancak yapıları tam olarak aydınlatılamayan A3, A4 ve A5 olarak isimlendirilen metabolitler (*R*)-(-)- α -felandren dönüşümlerinde hemen

hemen tüm funguslar tarafından meydana getirilmiştir. Bu maddelerin yalnızca kütle spektrumlarına yer verilmiştir. Bilindiği gibi α -fellandrenin molekül ağırlığı 136'dır ve A3 ve A4 metabolitlerinin molekül ağırlığı da yapılan GK/KS analizi sonucu 170 olarak belirlenmiştir. Fellandren molekülüne iki -OH grubu (MA: 34) katılımı olabileceği, aynı şekilde molekül ağırlığı 184 olarak belirlenen A5 metabolitine de biyotransformasyon reaksiyonları ile halka içindeki 2 konjuge bağın açılmadan üç -OH grubunun bağlanmış olabileceği düşünülmektedir. -OH gruplarının stereokimyasal pozisyonlarının da molekül çeşitliliğini arttırdığı göz önüne alınmalıdır. **Şekil 34**'te, bu çalışmada belirlenen tüm metabolitler özet halinde verilmiştir.



Şekil 34. Biyotransformasyon Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Metabolitler

Başlangıç maddeleri (*R*)-(-)- α -felandren ve (*R*)-(+)-limonen ile yapılan biyotransformasyonlar sonunda izole edilen metabolitler (-)-5-*p*-menten-1,2-diol ve (+)-8-*p*-menten-1,2-diolün standart maddelerle karşılaştırılmalı olarak antibakteriyal, antikandidal, antioksidan aktiviteleri ve akut toksisiteleri araştırılmıştır.

8-*p*-menten-1,2-diol'ün (limonen-1,2-diol) yapılan deneyler sonucunda, başlangıç maddesi olan (*R*)-(+)-limonen'den çok daha kuvvetli antibakteriyal özellikler kazandığı görülmüştür. Limonen'in *Bacillus cereus*'u 4 mg/ml nin üzerindeki konsantrasyonlarda inhibe edebileceği saptanırken, metaboliti olan 8-*p*-menten-1,2-diol 0.06 mg/ml MİK değeriyle standart olarak kullanılan ampisilinden daha yüksek antibakteriyal etki göstermiştir. Aynı şekilde metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı ampisilinden daha etkili olduğu, diğer standart madde olan kloramfenikol ile aynı MİK değerinde (0.03 mg/ml) etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer patojen bakterilere karşı etkileri karşılaştırıldığında başlangıç maddesi limonene göre tüm bakterilere karşı 0.5 ile 0.03 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda çok daha yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir. Metabolitin *S. aureus* bakterisi haricinde kullanılan diğer tüm patojenlere karşı olan antibakteriyal etkisi ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir.

Kullanılan diğer substrat olan (*R*)-(-)- α -felandrenin de antibakteriyal etki testlerinde, kullanılan patojen bakterilere karşı zayıf inhibitör etkileri olduğu (MİK: 1 mg/ml ile >4mg/ml arasında), felandrenin biyotransformasyonu ile elde edilen 5-*p*-menten-1,2-diolün ise aynı patojenlere karşı 0.5 ile 0.125 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda etki gösterdiği belirlenmiştir. 5-*p*-menten-1,2-diol'ün antibakteriyal etkileri ise ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir.

S. molle uçucu yağının antibakteriyel etkisinin kullanılan diğer başlangıç maddelerine göre daha yüksek olduğu görülse de biyotransformasyonla elde edilen metabolitlerine göre oldukça zayıf olduğu (1 mg/ml ile >4 mg/ml arasında) görülmüştür.

Antikandidal etki test sonuçlarına bakıldığında, antibakteriyal etki sonuçlarının tersine felandren metabolitinin, 8-*p*-menten-1,2-diol'den daha etkin olduğu görülmüştür. Özellikle standart antifungal olarak kullanılan benomil ile karşılaştırıldığında, *Candida krusei* ve *C. utilis*'e karşı daha düşük dozlarda etki gösterdiği, *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis* ve *C. albicans*'a karşı ise aynı konsantrasyonda (0.5 mg/ml) etkili olduğu belirlenmiştir. Yüksek antifungal etkiye sahip ketokonazol ile karşılaştırıldığında ise genel olarak yeterince yüksek antikandidal etkiye sahip olmadıkları görülmüştür. Sonuç olarak metabolitlerin, başlangıç maddelerine göre çok daha yüksek antikandidal etkiye sahip oldukları görülmektedir. Mikrobiyal transformasyonla elde edilen bu iki metabolitin antikandidal etkileri yine ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

Başlangıç maddeleri ve metabolitlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan ön tarama test sonuçlarında, (*R*)-(-)- α -felandren ve metabolitinin ABTS ve DPPH radikallerinin rengini az miktarda soldurduğu görülmüştür. Yapılan DPPH radikalini süpürücü etki deneyinde 517 nm de okunan absorbans sonuçlarına göre metabolitlerin ve başlangıç maddelerinin standart antioksidan madde olan BHT ile karşılaştırıldığında dikkate değer etkilerinin olmadığı (>10 mg/ml) görülmüştür. Maddelerin kullanılan en yüksek doz olan 10 mg/ml'lik

konsantrasyondaki ABTS radikalini süpürücü etkileri incelendiğinde, 8-*p*-menten-1,2-diol'ün beklenen etkinin aksine oksidasyonu arttırdığı, limonenin tamamen etkisiz olduğu ve fellandren ve metabolitinin de 0.19 ve 0.20 mM troloksa eşdeğer etki gösterdiği belirlenmiştir.

Maddelerin 10 mg/ml konsantrasyondaki linoleik asit oksidasyonunu engelleyici etkileri incelendiğinde, 60. dk sonunda, standart madde ile karşılaştırıldığında, limonen ve metaboliti 8-*p*-menten-1,2-diolün etkisiz olduğu, α -felandrenin ise biyotransformasyonla elde edilen metaboliti olan 5-*p*-menten-1,2-diol'den daha etkili olduğu görülmüştür.

Vibrio fischeri biyoluminesan yöntemi ile 8-*p*-menten-1,2-diol, 5-*p*-menten-1,2-diol ve başlangıç maddeleri olan limonen ve α -felandrenin akut toksisite ön deneyleri gerçekleştirilmiştir. 8-*p*-menten-1,2-diol'ün akut toksisitesinin limonenden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak bu metabolitin patojen mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkili dozu limonenden çok daha düşüktür. 5-*p*-menten-1,2-diolün ise α -felandrenle kıyaslanınca toksik etkisini kaybettiği görülmüştür. Burada toksik ve antimikrobiyal etkisi zayıf olan bir monoterpenden, toksik olmayan ve antimikrobiyal etkisi kuvvetli bir metabolit elde edilmiştir.

Vibrio fischeri biyoluminesan yöntemi ile belirlenen toksisitenin yüksek canlılar üzerindeki toksik etkiyle paralellliğini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamasına rağmen, memeliler üzerinde toksik etkileri iyi bilinen tuyen (LD₅₀: 4mg/kg) gibi maddelerin (Keith ve Stavaky, 1935; De Barros ve ark., 2000) bu yöntemle de toksik etkiyi yansıması, yöntemin toksisitede kullanılabilirliğini göstermektedir.

8-*p*-menten-1,2-diol ve 5-*p*-menten-1,2-diol'ün ülkemiz için çok yeni olan bu yöntem ile belirlenen akut toksisite sonuçları ilk defa bu çalışma ile rapor edilmektedir.

Bu çalışmada *S. molle* meyve uçucu yağı ile 22 mikroorganizma ile biyotransformasyon denemeleri yapılmıştır. Biyotransformasyon aşamasının 14. gününde oluşan metabolitlerin GK/KS profilleri incelenmiştir. Sonuçlar **Çizelge 13** ve **14**'de verilmiştir. Uçucu yağ belli bileşikleri açısından zenginleştirilemeye de ana bileşiklerin metabolize olması sonucu çok farklı profiller ortaya çıkmıştır.

8-*p*-Menten-1,2-diol olarak tanımlanan metabolit *B. cereus* ve MRSA üzerinde, 5-*p*-menten-1,2-diol olarak tanımlanan α -felandren metabolitinin de yine MRSA üzerinde etkili ve tedavi alanında kullanılabilir bileşikler oldukları belirlenmiştir. Ayrıca 8-*p*-menten-1,2-diol'ün *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* gibi bitki patojenleri üzerinde gösterdikleri aktiviteler, zirai mücadelede kullanılan sentetik bakterisit veya fungusit maddelere alternatif olabileceklerini göstermiştir.

Tanımlanan ve henüz tanımlanamamış metabolitler ile yapılacak benzer aktivite çalışmaları ile yeni ilaç hammaddelerinin kullanıma kazandırılacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abourashed, E.A., Clark, A.M., Hufford, C.D., Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review, *Curr. Med. Chem.*, 6, 359-374 (1999).

Abraham, W.R., Hoffmann, H.M.R., Kieslich, K., Reng, G., Stumpf, B., Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids, *Enzymes in Organic Synthesis-Ciba Foundation Symposium 3*, London, 146-160 (1985).

Abraham, W.R., Stumpf, B., Kieslich, K., Microbial transformations of terpenoids with 1-*p*-menthene skeleton, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 24-30 (1986).

Agarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., Ahmad, A., Kumar, T.R.S., Gupta, V.K., Kumar, S., Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*, *Flavour. Fragr. J.*, 17, 59-63 (2002).

Amsterdam, D., Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, *Antibiotics in Laboratory Medicine.*; V. Lorian (ed.), 4th edition, Williams & Wilkins, Maple Press., Maryland, USA (1997).

Avrupa Farmakopesi, Physical and physicochemical methods, 5th Edition, 1.cilt, France, 28-29 (2005).

Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., Grimme, L.H., Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay, *Chemosphere*, 35 (12), 2925-2938 (1997).

Barrachina, M.D., Bello, R., Mart'inez-Cuestal, M.A., Primo-Y'ufera, E., Espluges, J., Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L., *Phytother. Res.*, 11, 317-319 (1997).

Başer, K.H.C., Demirci, F., Chemistry of Essential Oils, In: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Berger, R.G. (ed.), Springer, Almanya, 43-75 (2007).

Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Demirçakmak, B., Ülker, N., Beis, S.H., Composition of the Essential Oil of *Schinus molle* L., grown in Turkey, *J. Essent. Oil Res.*, 9, 693-696 (1997).

Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., *Common Fragrance and Flavor Materials*, Wiley V.C.H.-Strauss Offset, Almanya, 49-50 (2001).

Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 359 (1999).

- Bello, R., Beltra'n, B., Moreno, L., Calatayud, S., Primo-Yu'fera, E., Esplugues, J., *In-vitro* pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L., *Phytother. Res.*, 12, 523-525 (1998).
- Bernhard, R.A., Shibamoto, T., Yamaguchi, K., White, E., The Volatile constituents of *Schinus molle* L., *J. Agric. Food. Chem.*, 31, 463-466 (1983).
- Beşe, M., Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, Kardeşler Basımevi, İstanbul, 45-46 (1989).
- Bezerra, P., Fernandes, A.G., Craveiro, A.A., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Machado, M.L., Viana, G.S.B., Chemical composition and biological activity of essential oils from northeast Brazil genus *Lippia*, *Cienc. Cult. Suppl.*, 33, 1-14 (1981).
- Brown, G.D., Phenylpropanoids and other secondary metabolites from *Baccharis linearis*, *Phytochemistry*, 35 (4), 1037-1042 (1994).
- Carvalho, C.C.R., Fonseca, M.M.R., Biotransformation of terpenes, *Biotech. Adv.*, 24 (2), 134-142 (2006).
- Cataldo, F., Keheyan, Y., Baccaro, S., Gamma-radiolysis of chiral molecules: (*R*)-(+)-limonene, (*S*)-(-)limonene and (*R*)-(-)- α -phellandrene, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 262 (2), 423-428 (2004).
- Chastain, D.E., Sanders, E.W., Sanders, C.C., Process for producing reference bactericidal endpoint (RBE) limonene, US Patent, No: 5153229 (1992).
- Cheetham, P.S.J., Enzymes for flavor production, In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, M.C. Flickinger, S.W. Drew (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1004-1029 (1999).
- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H., Sawamura, M., Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161 (2000).
- Conolly, J.D., Hill, R.A., Mono- and Sesquiterpenoids, *Dictionary of Terpenoids*, vol 1, Chapman and Hall, London, 95-96 (1991).
- Davis, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburg University Press., Robert Cunningham and Sons Ltd., , Edinburg, UK, 2.cilt, 256 (1972).
- de Barros, V.G.S., Vale, T.G.D., Silva, C.M.M., de Abreu Matos, F.J., Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown., *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 1314-1317 (2000).

Demirci, F., Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2000).

Demyttenaere, J.C.R., Van Belleghem, K., De Kimpe, N., Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening, *Phytochemistry*, 57, 199-208 (2001a).

Demyttenaere, J.C.R., Adams, A., Vanoverschelde, J., De Kimpe, N., Biotransformation of (*S*)-(+)-linalool by *Aspegillus niger*: an investigation of the culture conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5895-5901 (2001b).

Demyttenaere, J.C.R., Biotransformation of monoterpenoids by microorganisms, *Curr. Topics in Phytochem.*, 4, 21-39 (2000).

Dikshit, A., Naqvi, A.A., Husain, A., *Schinus molle*: a new source for natural fungitoxicant, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 (5), 1085-1088 (1986).

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., Beilen, J.B., Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts and plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 269-277 (2003).

Dvorakova, M., Valterova, I., Vanek, T., Biotransformation of a monoterpene mixture by *in vitro* cultures of selected conifer species, *Nat. Prod. Comm.*, 2, 233-238 (2007).

Edris, A.E., Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review, *Phytother. Res.*, 21, 308-323 (2007).

Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A., Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin, *Tetrahedron Lett.* 38, 3889-3892 (1997).

Ertuğ, F., Wild edible plants of the Bodrum Area (Muğla, Turkey), *Turk. J. Bot.*, 28, 161-174 (2004).

Evans, W.C., *Trease and Evans Pharmacognosy*, 14th edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK. 253-260 (1996).

Farooq, A., Rahman, Atta-ur, Choudhary, Fungal transformation of monoterpenes, *Curr. Org. Chem.*, 8, 353-367 (2004).

Ferrero, A.A., Werdin González, J.O., Sánchez Chopa C., Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*, *Fitoterapia*, 77, 381-383 (2006).

Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztembroska, M., Ochocka, J.R., Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components, *Phytother. Res.*, 17, 227-231 (2003).

Garg, S.N., Agarwal, S.K., New monoterpene diols from essential oil of *Ferula jaeschkeana*, *Phytochemistry*, 3, 936-937 (1988).

Grayson, D.H., Monoterpenoids, *Nat. Prod. Rep.*, 13, 195-225 (1996).

Guerrini, A., Sachetti, G., Muzzoli, M., Rueda, G.M., Medici, A., Besco, E., Bruni, R., Compositino of the volatiles fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7778-7788 (2006).

Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y., Free-Radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.*, 32, 661-667 (1999).

Hamada, H., Kondo, Y., Ishihara, K., Nakajima, N., Hamada, H., Kurihara, R., Hirata, T., Stereoselective biotransformation of limonene and limonene oxide by Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *J. Biosci. Bioeng.*, 96 (6), 581-584 (2003).

Hashimoto, S.I., Ozaki, A., Whole microbial cell process for manufacturing aminoacids, vitamins or ribonucleotids, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 604-608 (1999).

Homburger, F., Boger, E., The carcinogenicity of essential oils, flavors and species: A review, *Cancer Res.*, 28, 2372-2374 (1968).

Howard, P.H., Meylan, W.M., *Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals*, CRC Press., New York, 144 (1997).

Imaizumi, K., Hanada, K., Mawatari, K., Sugano, M., Effect of essential oils on the concentration of serum lipids and apolipoproteins in rats, *Afr. Biol. Chem.*, 49 (9), 2795-2796 (1985).

Ishikawa, T., Kudo, M., Kitajima, J., Water soluble constituents of dill, *Chem. Pharm. Bull.*, 50 (4), 501-507 (2002a).

Ishikawa, T., Takayanagi, T., Kitajima, J., Water soluble constituents of cumin: Monoterpenoid glucosides, *Chem. Pharm. Bull.*, 50 (11), 1471-1478 (2002b).

Jadoun, J., Bar, R., Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part4. enzyme vs microbial oxidation of cholesterol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 477-482 (1993).

Janssen, A.M., Chin, N.L.J., Scheffer, J.J.C., Baerheim, S.A., Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique, *Pharm. Weekbl.*, 8, 289-292 (1986).

Keith, H.M., Stavaky, G. W. Experimental convulsions induced by administration of thujone. A pharmacologic study of the influence of the autonomic nervous system on these convulsions, Arch. Neurol. Psych., 34, 1022-1040 (1935).

Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumpf, B., Thede, B., Washausen, P., Transformation of terpenoids, Progress in essential oil research. XVI. Ernst-Joachim Brunke (Ed.), 372-394 (1986).

Kieslich, K., Biotransformations in: fungal biotechnology, Anke, T. (ed.), Chapman&Hall, Weinheim, 297-362 (1997).

Kieslich, K., Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds, Georg Thieme Verlag, Alanya, 9-83 (1976).

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger VE P.C. ve Winn W.C., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, 785-856 (1997).

Koppenhoefer, B., Behnisch, R., Epperlein, U., Holzschuh, H., Bernreuther, A., Piras, P., Roussel, C., Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances. A selected review. Perfum. Flavor., Vol. 19 (5), 1-14 (1994).

Lange, B.M., 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).

Lee, I., Elsohly, S., Hufford, H.N., Microbial metabolism studies of the antimalarial drug artheeter, J. Pharm. Res., 7, 199-203 (1990).

Leung, A.Y., Foster, S., Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Foods, Drugs and Cosmetics, Wiley Interscience Pub., USA, 639 (1996).

Loughlin, W.A., Biotransformations in organic synthesis, Biosour. Technol., 74, 49-62 (2000).

Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 31, 421-428 (2007).

Maffei, M., Chialva, F., Essential oils from *Schinus molle* L., berries and leaves, Flavour. Fragr. J., 5, 49-52 (1990).

Marongiu, B., Porcedda, A.P.S., Casu, R., Pierucci, P., Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L., Flavour. Fragr. J., 19, 554-558 (2004).

- Marostica, M.R., Pastore, G.M., Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium, *Food Chem.*, 101, 345-350 (2007).
- Marzouk, M.S., Moharrem, F.A., Haggag, E.G., Ibrahim, M.T., Badary, O.A., Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*, *Phytother. Res.*, 20, 200-205 (2006).
- McCaskill, D., Croteau, R., Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, *Trends Biotechnol.*, 16, 349-355 (1998).
- Miyazawa, M., Shindo, M., Shimada, T., Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, 29 (2), 200-205 (2001).
- Miyazawa, M., Wada, T., Biotransformation of γ -terpinene and (-)- α -phellandrene by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2893-2895 (2000).
- Miyazawa, M., Wada, T., Kameoka, H., Biotransformation of (+) and (-)-limonene by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 300-303 (1998).
- Montiel, V., Lopez, M., Aldaz, A., Stereospecific electrochemical synthesis of (+) *trans*-yabunikkeol, *Synth. Commun.*, 17, 993-996 (1987).
- Mori, K., Synthesis of (1*S*,4*R*)-4-isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol, the aggregation pheromone of the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*, its racemate, (1*R*,4*R*)-and (1*S*,2*S*)-isomers, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, 2133-2142 (2006).
- Mosciano, G., Fasano, M., Sadural, S., Michalski, J., Organoleptic characteristics of flavor materials, *Perfum. Flavor.*, 16 (2), 49-57 (1991).
- Mourey, A., Canillac, N., Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers, *Food Cont.*, 13, 289-292, (2002).
- Muherjee, B.B., Kraidman, G., Hill, Synthesis of glycols by microbial transformation of some monocyclic terpenes, *Appl. Microbiol.*, 25 (3), 447-453 (1973).
- Noma, Y., Asakawa, Y., Metabolic pathways of monoterpenoids by microorganisms, *Curr. Topics in Phytochem.*, 4, 63-78 (2000).
- 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).

- Nostro, A., Germano, M.P., D'angelo, V., Marino, A. ve Cannatelli, M.A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 379-384 (2000).
- Onken, J., Berger, R.G., Effects of R-(+)-limoenen on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*, *J. Biotechnol.*, 69, 163-168 (1999).
- Oomah, B.D. and Mazza, G., Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1746-1750 (1996).
- Oumzil, H., Ghoulemi, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Tetouani, S.F., Faid, M., Benjouad, A., Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*, *Phytother. Res.*, 16, 727-731 (2002).
- Papandreou, M.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Margarity, M., Lamari, F.N., Inhibitory activity on amyloid- β -aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8762-8768 (2006).
- Piasenzotto, L., Gracco, L., Conte, L., Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control, *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1037-1044 (2003).
- Pinheiro, L., Marsaioli, A.J., Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 44, 78-86 (2007).
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M. ve Frenk, E.A., Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants, *Phytochem. Anal.*, 2, 199-203 (1991).
- Rahman, Atta-ur, Ahmad, V.U., ^{13}C -NMR of Natural Products vol 1, Monoterpenes and Sesquiterpenes, Plenum press, New York, 20-24 (1992).
- Rasheed, A., Laekeman, G.M., Vlietinck, A.J., Janssens, J., Hatfield, G., Totte, J., Herman, A.G., Pharmacological influence of nutmeg and nutmeg constituents on rabbit platelet function, *Planta Med.*, 50 (3), 222-226 (1984).
- Roberts, S.M., Preparative biotransformations: whole cell and isolated enzymes in organic synthesis, John Wiley&Sons, Chichester (1992).
- Rodriguez, A.M., Enriz, A.D., Jauregui, E.A., Pestichanker, M.J., Gioridano, O.S., Guzman, J., San Fabien, E., Structure-activity relationship of limonene derivatives acting as gastric cytoprotective agents, *An. Assoc. Quim. Argent.*, 82 (5), 399-414 (1994).
- Roglic, U., Plazl, I., Znidarsic-Plazl, P., Batch and continuous transformation of progesterone pellets in the presence of β -cyclodextrin, *Biocatal. Biotransform.*, 25 (1) 16-23 (2007).

- Rolseth, V., Djurhuus, R., Svardal, A.M., Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells, *Toxicology*, 170 (2002).
- Ross, S.A., El-Keltawi, E.N., Megalla, S.E., Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants, *Fitoterapia*, 51, 201-205 (1980).
- Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wgner, M.L., Calcagno, M.L., Campos, R.H., Cavallaro, R., Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extraction human hepatocellular carcinoma cell line, *J. Ethnopharmacol.*, 79, 335-339 (2002).
- Saleh, M.M., Hashem, F.A., Glombitza, K.W., Cytotoxicity and *in-vitro* effects on human cancer cell lines of volatiles of *Apium graveolens* var. *filicinum*, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 8 (2), 97-99 (1998).
- Salinas-Molina, G.M., Perez-Lopez, A., Montes-Becerril, P., Alanda-Salazar, R., Fernandez, S.S., Torres, N.W., Evaluation of the Northern Mexico for *in-vitro* antimicrobial and antituberculosis activity, *J. Ethnopharmacol.*, 109, 435-441 (2007).
- Schmourlo, G., Filho, R.R.M., Alvianob, C.S., Costa S.S., Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants, *J. Ethnopharmacol.*, 96, 563-568 (2005).
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E., Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 257 (1995).
- Shamon, L.A., Chen, C., Mehta, R.G., Stelee, V., Moon, R.C., Pezutto, J.M., A correlative approach fort he identification of antimutagens that demonstrate chemopreventive activity, *Anticancer Res.*, 14 (5A), 1775-1778 (1994).
- Smillie, W.G., Pessoa, S.B., Antihelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*, *J. Pharmacol.*, 24, 359 (1924).
- Stolow, R.D., Sachdev, K., The *p*-menth-1-ene-3,6-diols correlation of absolute configuration with optical rotation, *Tetrahedron*, 21 (7), 1889-1895 (1965).
- Sy, L.K., Brown, G.D., Oxygenated bisabolens from *Alpinia densibracteata*, *Phytochemistry*, 45 (3), 537-544 (1997).
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L., Morelli, I., The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components, *Mycopathologia*, 159, 339-345 (2005).
- Tanida, M., Kikuchi, A., Tejima, H., Morohoshi, H., Fragrant insecticides for mosquito control, Japonya Kokai Tokyo Patent No: D3-285 (1991).

Teresa, J.P., Bellido, I.S., Torres, Sastre, B.A., Grande, M., Phellandrene endoperoxides from the essential oil of *Chenopodium multifidum*, *Phytochemistry*, 20, 163-165 (1981).

Teresa, J.P., Torres, C., Gonzales, M.S., Grande, M., Bellido, I.S., Δ^5 -Dehydro-1-hydroxycarvomenthols from the essential oil of *Chenopodium multifidum*, *Phytochemistry*, 22 (12), 2749-2751 (1983).

Trudgill, P.W., Microbial metabolism of monoterpenes: recent developments, *Biodegradation*, 1, 93-105 (1990).

Türk Farmakopesi 1, Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu, Gökçe Ofset, Ankara, 119-120 (2004).

Van der Werf, M., Overkamp, K.M., Bont, J.A.M., Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases, *J. Bacteriol*, 180 (19), 5052-5057 (1998).

Van der Werf, Swarts, H.J., Bont, A.M., *Rhodococcus erythropolis* DCL14 Contains a Novel Degredation Pathway for Limonene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5), 2092-2102 (1999).

Van der Werf, M., Keijzer, P.M., van der Schaft, H., *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene, *J. Biotech.*, 84, 133-143 (2000).

Van Dyk, M.S., Van Rensburg, E., Rensburg, I.P.B., Moleleki, N., Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 5, 149-154 (1998).

Vandamme, E.J., Soetaert, W., Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77, 1323-1332 (2002).

Vas, G., Vekey, K., Solid phase microextraction: a powerfull sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis, *J. Mass Spectrometry*, 29, 233-254 (2004).

Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Oomah, B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117 (1998).

Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination, *Flavour. Fragr. J.*, 22, 540-544 (2007).

Withers, S.T., Keasling, J.D., Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 980-990 (2007).

Yang, F., Zang, R., Chen, J., Monoterpenoids from *Schizonepeta tenuifolia*, Chin. Tradit. Herb. Drugs, 33, 8-10 (2002).

Yücel, E., Ağaçlar ve Çalılar 1, Etam Matbaa Tesisleri, Eskişehir, 242 (2005).

Zhaou, X., Okamura, H., Nagata, S., Applicability of luminescent assay using fresh cells of *Vibrio fischeri* for toxicity evaluation, J. Health Sci., 52 (6), 811-816 (2006).

EK

Tezde Adı Geçen Bileşiklerin İngilizce Yazılışları

(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>) Farnesol	: (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>) Farnesol
(<i>E</i>)- β -osimen	: (<i>E</i>)- β -Ocimene
(<i>Z</i>)- β -Osimen	: (<i>Z</i>)- β -Ocimene
1- <i>epi</i> -Kubenol	: 1- <i>epi</i> -Cubenol
1-Hekzadekanol	: 1-Hexadecanol
<i>allo</i> -Aromadendren	: <i>allo</i> -Aromadendrene
Aromadendren	: Aromadendrene
Bisiklogermakren	: Bicyclogermacrene
Bornil asetat	: Bornyl acetate
<i>cis-p</i> -Ment-2en-1-ol	: <i>cis-p</i> -Menth-2en-1-ol
Dodekanoik asit	: Dodecanoic acid
Elemol	: Elemol
<i>E</i> -Nerolidol	: <i>E</i> -Nerolidol
<i>epi</i> -Kubebol	: <i>epi</i> -Cubebol
<i>epi</i> -Zonaren	: <i>epi</i> -Zonarene
Etil hekzanoat	: Ethyl hexanoate
Etil oktanoat	: Ethyl octanoate
Geranil asetat	: Geranyl acetate
Geranil bütirat	: Geranyl butyrate
Geranil hekzanoat	: Geranyl hexanoate
Geranil izobütirat	: Geranyl isobutyrate
Geraniol	: Geraniol
Germakren D	: Germacrene D
Germakren D-4-ol	: Germacren D-4-ol
Kadina 3,5-dien	: Cadina 3,5-diene
Kafur	: Camphor
Kamfen	: Camphene
Karvakrol	: Carvacrol
Karyofillen oksit	: Caryophyllene oxide
Kubebol	: Cubebol

Kubenol	: Cubenol
Leden	: Ledene
Ledol	: Ledol
Limonen	: Limonene
Linalol	: Linalool
Metil oktanoat	: Methyl octanoate
Metil sitronellat	: Methyl citronellate
Mirsen	: Myrcene
Oktanoik asit	: Octanoic acid
Palustrol	: Palustrol
<i>p</i> -Menta-1(7),5-dien-2-ol	: <i>p</i> -Mentha-1(7),5-dien-2-ol
<i>p</i> -Simen	: <i>p</i> -Cymene
<i>p</i> -Simen-8-ol	: <i>p</i> -Cymen-8-ol
Psödolimonen	: Pseudolimoene
Sabinen	: Sabinene
Sitronellil asetat	: Citronellyl acetate
Spatulenol	: Spathulenol
Terpinen-4-ol	: Terpinen-4-ol
Terpinolen	: Terpinolene
T-Kadinol	: T-Cadinol
T-Muurolol	: T-Muurolol
<i>trans-p</i> -Ment-2en-1-ol	: <i>trans-p</i> -Menth-2en-1-ol
Viridiflorol	: Viridiflorol
α -Fellandren epoksit	: α -Phellandrene epoxide
α -Fellandren	: α -Phellandrene
α -Gurjunen	: α -Gurjunene
α -Humulen	: α -Humulene
α -Kadinen	: α -Cadinene
α -Kadinol	: α -Cadinol
α -Kopaen	: α -Copaene
α -Kubeben	: α -Cubebene
α -Muurolen	: α -Muurolene
α -Ödesmol	: α -Eudesmol
α -Pinen	: α -Pinene

α -Selinen	: α -Selinene
α -terpinen	: α -Terpinene
α -Tuyen	: α -Thujene
β -Elemen	: β -Elemene
β -Fellandren	: β -Phellandrene
β -Karyofillen	: β -Caryophyllene
β -Kubeben	: β -Cubebene
β -pinen	: β -pinene
β -Selinen	: β -Selinene
γ -Muurolen	: γ -Muurolene
γ -Kadinen	: γ -Cadinene
γ -terpinen	: γ -Terpinene
δ -Kadinen	: δ -Cadinene
δ -Kadinol	: δ -Cadinol