

MATRICARIA RECUTITA L.'NİN
UÇUCU YAĞI VE BİLEŞENLERİNİN
MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU

Doktora Tezi

Zeynep FIRAT

Eskişehir 2023

**MATRICARIA RECUTITA L.'NİN UÇUCU YAĞI VE BİLEŞENLERİNİN
MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU**

Zeynep FIRAT

DOKTORA TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen 1401S008 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

ÖZET

MATRICARIA RECUTITA L.'NİN UÇUCU YAĞI VE BİLEŞENLERİNİN MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU

Zeynep FIRAT

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Farmakope kalitesinde ticari olarak temin edilen papatya uçucu yağı, GC/MS ve GC/FID ile analitik kalite doğrulamasından sonra kullanılmış ve ana bileşenleri α -bisabolol oksit A (%47,7) ve B (%6,2), (*E*)- β -farnesen (%21,5), α -bisabolon oksit A (%5,7), kamazulen (%4,1) ve α -bisabolol (%2,1) olarak belirlenmiştir. Bu tez kapsamında papatya uçucu yağının ve onun bileşenlerinden olan α -bisabolol, bisabolol oksitler, farnesen ve kamazulenin 22 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyon potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

Papatya uçucu yağının biyotransformasyon çalışmalarında kullanılması yanında, bisabolol oksitler ve kamazulen, uçucu yağdan izole edilerek, α -bisabolol ve farnesen izomerleri karışımı ise ticari olarak temin edilerek kontrolleri yapılmış ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

α -Bisabololün yüksek verimli dönüşümü, *Penicillium neocrassum* ile sağlanarak yeni metabolit (%94) kromatografik olarak saflaştırılmış ve spektroskopik tekniklerle 2-(5-metil-5-(6-metil-7-oksabisiklo[4.1.0]heptan-3-il)tetrahidrofuran-2-il)propan-2-ol, kısaca “bisafuranol” ilk defa yeni doğal madde olarak adlandırılmıştır.

α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu sonucu üretilen diğer beş metabolitten ikisi α -bisabolol oksit A, üçü ise α -bisabolol oksit B olarak tanımlanmıştır. Farnesen izomerleri karışımından mikroorganizmaların katalizörlüğünde; α -bisabolol oksit B, α -bisabolon oksit A olmak üzere, diğer iki metabolit α -bisabolol oksit A olarak analiz edilmiştir.

Ayrıca biyotransformasyon sonucu ekstre edilen metabolit karışımlarının *in vitro* antimikrobiyal (mikrodilüsyon yöntemi) antioksidan (DPPH radikal süpürücü) etkileri, mikro-UV-spektrofotometrik siklooksijenaz-1 (COX-1), 5-lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyon deneyleri olmak üzere biyoaktiviteleri substratlarla karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve *in silico* olarak moleküllerin toksisite değerlendirmesi yapılmıştır. Toksisite tahmin sonucuna göre yeni bileşik “bisafuranol”ün, oral toksisitesinin olmadığı ve kısmen güvenli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Matricaria recutita* uçucu yağı, α -Bisabolol, Bisabolol oksit, Biyotransformasyon, Biyoaktivite

ABSTRACT

MICROBIAL TRANSFORMATION OF *MATRICARIA RECUTITA* L. ESSENTIAL OIL AND ITS COMPONENTS

Zeynep FIRAT

Department of Pharmacognosy
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRÇİ

The commercially available chamomile essential oil of pharmacopoeial quality was used after analytical verification by GC/MS and GC/FID where the main components were α -bisabolol oxides A (47.7%) and B (6.2%), (*E*)- β -farnesene (21.5%), α -bisabolone oxide A (5.7%), chamazulene (4.1%), and α -bisabolol (2.1%), respectively. In this thesis, it was aimed to investigate the biotransformation potential of chamomile essential oil and its components α -bisabolol, bisabolol oxides, farnesene, and chamazulene using 22 different microorganisms.

In addition to the utilization of chamomile essential oil, the bisabolol oxides, chamazulene were isolated from the essential oil; whereas α -bisabolol and a mixture of farnesene isomers were obtained commercially, which were also used in the biotransformation studies.

The metabolite of α -bisabolol was converted in high amount (94%) by *Penicillium neocrassum*, which was purified, and elucidated by chromatographic-spectroscopic techniques as new compound 2-(5-methyl-5-(6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-yl)tetrahydrofuran-2-yl)propan-2-ol was named as "bisafuranol" for the first time as a new natural product.

Among the five metabolites produced by microbial transformation of α -bisabolol, two were identified as α -bisabolol oxide A, and three as α -bisabolol oxide B. From the mixture of farnesene isomers, catalyzed by microorganisms, α -bisabolol oxide B, α -bisabolone oxide A, and two other metabolites were identified as α -bisabolol oxide A.

In addition, *in vitro* antimicrobial (microdilution method), antioxidant (DPPH radical scavenging) effects of obtained biotransformation metabolite mixtures were evaluated for their bioactivities by cyclooxygenase-1 (COX-1), 5-lipoxygenase (5-LOX) enzyme inhibition experiments using micro-UV-spectrophometric methods, comparatively with substrates, where *in silico* toxicity was also considered. According to the toxicity prediction results, the new compound "bisafuranol" was found as orally non-toxic, which can be classified as partially safe.

Keywords: *Matricaria recutita* essential oil, α -Bisabolol, Bisabolol oxide, Biotransformation, Bioactivity

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konumun belirlenmesi ile başlayan, çalışmalarım süresince uzmanlık deneyimi ile bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin GC/FID, GC/MS analizler ve yorumlarında emeği olan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye,

NMR analiz sonuçlarının yorumlanması konusundaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Hasan KIRMIZİBEKMEZ'e,

Biyotransformasyon çalışmalarında deneyimlerini paylaşarak bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Gökalg İŞCAN'a,

Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi için Anadolu Üniversitesi Farmakognozisi ABD araştırma laboratuvarının alt yapısının oluşturulmasında katkısı büyük olan ve tez kapsamında literatüre kazandırılan yeni bileşiğin ismini "bisafuranol" olarak öneren Sayın Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e,

Tez izleme komitesinde bulunarak doktora tez çalışmamın şekillenmesinde bilimsel katkıları için Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresince yardımları ile bana destek olan Sayın Prof. Dr. Göksel ARLI'ye, Sayın Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e, Sayın Doç. Dr. Özer Gök'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Halil BERBER'e, Sayın Öğr. Gör. Dr. Güner SAKA'ya ve Sayın Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen 1401S008 no.lu proje kapsamında desteklenen bu tez çalışması için Anadolu Üniversitesi'ne sağladığı tüm imkanlardan dolayı teşekkür ederim.

Zeynep FIRAT

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Zeynep FIRAT

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
GÖRSELLER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Morfolojik Yapısı	4
2.3. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Ekolojisi	5
2.4. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Etnofarmakognozi Açısından Önemi.....	6
2.5. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Farmakolojik Etkileri.....	7
2.6. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin Fitokimyasal Bileşimi.....	8
2.7. Uçucu Yağlar ve Seskiterpenlerin Biyosentezi.....	8
2.7.1. <i>Matricaria recutita</i> L. uçucu yağının kimyasal yapısı	11
2.7.2. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin kemotipleri	14
2.7.3. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin uçucu yağı ve bileşenlerinin biyolojik aktiviteleri	19
2.7.3.1. <i>Antimikrobiyal aktivite çalışmaları</i>	20

	<u>Sayfa</u>
2.7.3.2. <i>Antiinflamatuvar aktivite çalışmaları</i>	21
2.7.3.3. <i>Antioksidan aktivite çalışmaları</i>	22
2.7.3.4. <i>Diğer biyolojik aktivite çalışmaları</i>	23
2.7.4. <i>Matricaria recutita</i> L.'nın uçucu yağı ve bileşenlerinin toksisitesi	24
2.8. Biyotransformasyon ve Mikrobiyal Transformasyon	25
2.8.1. Seskiterpenlerin mikrobiyal transformasyonu	27
2.8.1.1. <i>(-)-α-Bisabololün mikrobiyal transformasyonu</i>	28
2.8.1.2. <i>Farnesenin mikrobiyal transformasyonu</i>	32
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	35
3.1. DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ ve Standart Maddeler ...	35
3.2. DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler	35
3.3. DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	35
3.4. Optik Çevirme Açısı	36
3.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	36
3.5.1. Vanilin-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması	37
3.5.2. Anisaldehit-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması	37
3.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep-İTK)	37
3.7. Gaz Kromatografisi/Alev İyonlaşma Dedektörü (GC/FID) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizi	37
3.8. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi	38
3.9. Mikrobiyal Transformasyon Çalışmaları	38
3.9.1. Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar	39
3.9.2. Substrat konsantrasyonunun belirlenmesi	41
3.9.3. Substrat ilavesi, örnekleme ve ekstraksiyon	42

	<u>Sayfa</u>
3.9.4. Metabolitlerin izolasyonu ve karakterizasyonu	42
3.9.4.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi.....	43
3.9.4.2. Sıvı kromatografisi iyon tuzaklı/uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-MS-IT-TOF)	43
3.10. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	43
3.10.1. <i>In vitro</i> antioksidan aktivite.....	43
3.10.2. <i>In vitro</i> antimikrobiyal aktivite	44
3.10.3. <i>In vitro</i> antienflamatuvar aktivite.....	46
3.10.3.1. 5-Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon.....	46
3.10.3.2. Siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon	47
3.11. <i>In silico</i> Toksisite.....	48
4. BULGULAR VE YORUM	49
4.1. <i>M. recutita</i> Uçucu Yağının GC/MS ve GC/FID Analizleri	49
4.2. <i>M. recutita</i> Uçucu Yağı ve Ana Bileşenlerinin İTK Analizi ve İzolasyonu.....	50
4.3. Standartların Optik Çevirme Açılımları.....	63
4.4. Substrat Konsantrasyonu.....	63
4.5. <i>M. recutita</i> Uçucu Yağının Mikrobiyal Transformasyonu	64
4.6. α -Bisabololün Mikrobiyal Transformasyonu.....	69
4.7. α -Bisabolol oksitlerin (A ve B) Mikrobiyal Transformasyonu	81
4.8. Farnesen İzomerleri Karışımının Mikrobiyal Transformasyonu	83
4.9. Kamazulenin Mikrobiyal Transformasyonu.....	87
4.10. <i>In vitro</i> Biyolojik Aktivite Testleri.....	87
4.10.1. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve bileşenlerinin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi	87

4.10.2. <i>M. recutita</i> uçucu yağının ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi	89
4.10.3. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi	91
4.10.4. <i>M. recutia</i> uçucu yağı ve bileşenlerinin antimikrobiyal etkisi...	92
4.10.5. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisi	97
4.10.6. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisi	101
4.10.7. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve bileşenlerinin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi	104
4.10.8. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi	106
4.10.9. α - Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi.....	107
4.10.10. α -Bisabolol oksitlerin mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi	108
4.10.11. Farnesen izomerleri karışımının ve mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi	108
4.10.12. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve bileşenlerinin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi.....	109
4.10.13. <i>M. recutita</i> uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi	111

4.10.14. α-Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi	112
4.11. Moleküllerin <i>In silico</i> Toksikite Değerlendirmesi	113
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	115
KAYNAKÇA.....	120
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Papatya uçucu yağlarının Avrupa Farmakopesi kalitesinde olması için gereken özellikler	15
Tablo 2.2. Farklı menşeli papatya türlerinin uçucu yağ bileşimleri ve referansları..	16
Tablo 2.3. (-)- α -Bisabololün <i>G. cingulata</i> ile biyotransformasyonu sonucu izole edilen metabolitler.....	29
Tablo 3.1. Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar	39
Tablo 3.2. Antibakteriyel aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar	44
Tablo 3.3. Antikandidal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar	46
Tablo 4.1. Papatya uçucu yağı ana bileşenlerinin GC/FID ve GC/MS sonuçları	49
Tablo 4.2. Papatya uçucu yağı ana bileşenlerinin R_f değerleri	53
Tablo 4.3. Papatya uçucu yağı İTK kromatogramında gözlenen spotlar	54
Tablo 4.4. Farnesen izomerleri karışımı GC/MS sonuçları	62
Tablo 4.5. Optikçe aktif standart maddelerin özgül çevirme dereceleri	63
Tablo 4.6. Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları	64
Tablo 4.7. α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları.....	69
Tablo 4.8. Metabolit BE1 için ^{13}C ve ^1H NMR verileri ve önemli HMBC bağlantıları.....	77
Tablo 4.9. α -Bisabolol oksitlerin biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları	82

Tablo 4.10. Farnesen izomerleri karışımının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları	84
Tablo 4.11. Papatya uçucu yağı ve bileşeninin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi	88
Tablo 4.12. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi	90
Tablo 4.13. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi	92
Tablo 4.14. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)]	93
Tablo 4.15. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)].....	96
Tablo 4.16. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım	97
Tablo 4.17. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım	98
Tablo 4.18. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 3. kısım	98
Tablo 4.19. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 4. kısım	99
Tablo 4.20. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım	100
Tablo 4.21. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım	100

Tablo 4.22. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 3. kısım	101
Tablo 4.23. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım	102
Tablo 4.24. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım	102
Tablo 4.25. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım	103
Tablo 4.26. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım	103
Tablo 4.27. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin 5-LOX inhibisyon sonuçları.....	104
Tablo 4.28. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları	106
Tablo 4.29. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları	107
Tablo 4.30. α -Bisabolol oksitlerin mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrenin 5-LOX inhibisyon sonucu	108
Tablo 4.31. Farnesen izomerleri ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları	109
Tablo 4.32. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin COX-1 inhibisyon sonuçları	109
Tablo 4.33. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen bazı ekstrelerin COX-1 inhibisyon sonuçları	111
Tablo 4.34. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen bazı ekstrelerin COX-1 inhibisyon sonuçları	112

Tablo 4.35. *In silico* oral toksisite tahmin sonuçları 113

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Terpen mevalonat (MVA) ve metileritritol fosfat (MEP) yolakları.....	9
Şekil 2.2. Seskiterpenlerin siklizasyon şeması	10
Şekil 2.3. Papatya uçucu yağındaki ana bileşenler	12
Şekil 2.4. Matrisinin kamazulen molekülüne dönüşümü	14
Şekil 2.5. (-)- α -Bisabololün <i>G. cingulata</i> ile metabolik yolağı	30
Şekil 2.6. (-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ile bisabolol oksit B'ye dönüşümü	30
Şekil 2.7. (-)- α -Bisabololün <i>Absidia coerulea</i> ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler	31
Şekil 2.8. Farnesenin stereoizomerleri	33
Şekil 2.9. α -Farnesenin mikrobiyal transformasyonu sonucu oluşan metabolitler ...	34
Şekil 3.1. Mikrobiyal transformasyon deney prosedürü.....	38
Şekil 3.2. Substrat konsantrasyonu belirlenme yöntemi.....	41
Şekil 4.1. Papatya uçucu yağının farklı çözücü sistemlerindeki İTK kromatogramları-I	51
Şekil 4.2. Papatya uçucu yağının farklı çözücü sistemlerindeki İTK kromatogramları-II	51
Şekil 4.3. Papatya uçucu yağının diklorometan çözücü sistemi ile İTK kromatogramları	52
Şekil 4.4. Papatya uçucu yağı ve standart maddelerin İTK kromatogramları-I	52
Şekil 4.5. Papatya uçucu yağı ve standart maddelerin İTK kromatogramları-II.....	53

Şekil 4.6. Papatya uçucu yağı İTK profilinde gözlenen spotlar	54
Şekil 4.7. Farklı tip papatya uçucu yağlarının İTK profili (Wagner ve Blatt, 1996)	55
Şekil 4.8. Papatya uçucu yağının İTK profilindeki spotların belirlenmesi	56
Şekil 4.9. Papatya uçucu yağının prep-İTK kromatogramı	58
Şekil 4.10. İzole edilen kamazulen ve standart madde kamazulenin İTK profili.....	58
Şekil 4.11. Kamazulenin prep-İTK ile izolasyonu	59
Şekil 4.12. Papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitler (BxO) ve bisabolol oksit A standardının (BxOA) İTK profili	59
Şekil 4.13. Papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitlerin (A ve B) GC kromatogramı.....	60
Şekil 4.14. Papatya uçucu yağının prep-İTK kromatogramı	61
Şekil 4.15. β -Bisabolen ve (<i>E</i>)- β -farnesenin moleküler yapısı.....	63
Şekil 4.16. BB2, BB1 (<i>T. elegans</i>), BF1 (<i>C. cassicola</i>), BH1 (<i>P. valentinum</i>), BI4 (<i>R. stolonifer</i>) metabolitlerinin oluşum yolağı	71
Şekil 4.17. Bisabol oksit A ve B için önerilen moleküler parçalanma mekanizması	72
Şekil 4.18. (1S,3R,4R,7S)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol	73
Şekil 4.19. α -Bisabololün çift bağ üzerinden olmayan hidroksillenme pozisyonları	73
Şekil 4.20. BE1 metabolitinin İTK profili ve prep-İTK ile izolasyonu.....	74
Şekil 4.21. BE1 metabolitinin kütle spektrumu (GC/MS data).....	74
Şekil 4.22. BE1 (<i>P. neocrassum</i>) metabolitinin oluşum yolağı.....	75
Şekil 4.23. BE1 metabolitinin HR-ESI-MS spektrumu.....	76

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.24. BE1 metabolitinin ¹ H NMR spektrumu	78
Şekil 4.25. BE1 metabolitinin ¹³ C NMR spektrumu	78
Şekil 4.26. BE1 metabolitinin 2D ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	79
Şekil 4.27. BE1 metabolitinin 2D ¹ H- ¹³ C HMBC spektrumu	79
Şekil 4.28. BE1 metabolitinin 2D ¹ H- ¹³ C HSQC spektrumu	80
Şekil 4.29. BE1 metabolitinin FT-IR spektrumu.....	80
Şekil 4.30. Bisabolol oksitlerin önerilen enzimatik oksidasyonu.....	83
Şekil 4.31. Farnesen izomerleri karışımının <i>A. niger</i> NRRL 326 ve <i>M. ramannianus</i> ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler ..	85
Şekil 4.32. <i>A. niger</i> NRRL 326 ile oluşan FA2 metaboliti ve bisabolon oksit A'nın GC/MS spekturumu.....	86
Şekil 4.33. Bisabolon oksit A ve bisabolol oksit A'nın olası biyotransformasyonu .	87
Şekil 4.34. <i>B. cinerea</i> ekstresinin DPPH radikal süpürücü etkisi.....	91
Şekil 5.1. (-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ile oluşan metabolitler..	115
Şekil 5.2. Farnesen izomerleri karışımının mikrobiyal transformasyonu ile oluşan metabolitleri	116

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin genel görünümü	3
Görsel 2.2. <i>Matricaria recutita</i> L.'nin morfolojik yapısı.....	5
Görsel 2.3. <i>Matricariae aetheroleum</i>	11

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

[α]	: Özgül Çevirme Derecesi
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
BP	: Base Peak (Temel Pik)
br	: Broad
CDCl_3	: Dötero kloroform
COX	: Cyclooxygenase (Siklooksijenaz)
d	: Doublet
dk	: Dakika
DMAPP	: Dimetilallil difosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH*	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
ESCOP	: European Scientific Cooperative on Phytotherapy (Avrupa Bilimsel Fitoterapi Birliği)
EtOAc	: Etil asetat
EtOH	: Etil alkol
eV	: Elektron Volt
FID	: Flame Ionization Detector (Alev İyonlaşma Dedektörü)

FT-IR	: Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)
GC	: Gaz Kromatografisi
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
IPP	: İzopentenil Difosfat
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
KBr	: Potasyum bromür
KOH	: Potasyum hidroksit
LC-MS-IT-TOF	: Sıvı Kromatografisi İyon Tuzaklı/Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LD ₅₀	: %50 Letal (Öldürücü) Dozu
LOX	: Lipoksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
m	: Multiplet
M ⁺	: Moleküler İyon
<i>m/z</i>	: Kütle/Yük
m	: Multiplet
MEP	: Metileritritol Fosfat
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MHz	: Mega Hertz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

mM	: Milimolar
MS	: Kütle Spektrometresi
MVA	: Mevalonat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojenfosfat
Na ₂ SO ₄	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NDGA	: Nordihidroguairatik asit
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NRRL	: Northern Regional Research Laboratory (Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
ppm	: Parts per Million (Milyonda Bir Birim)
Prep-İTK	: Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
<i>R_f</i>	: Retention Factor (Alıkonma Faktörü)
rpm	: Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Enstitüsü Besiyeri
RT	: Retention Time (Alıkonma Zamanı)
s	: Singlet
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SMILES	: Simplified Molecular Input Line Entry System (Basitleştirilmiş Moleküler Girdi Hattı Giriş Sistemi)

t	: Triplet
TMPD	: N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
δ	: Kimyasal Kayma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asteraceae familyasının önemli türlerinden olan papatya (*Matricaria recutita* L.) insanlar tarafından yüzyıllardır bilinmekte ve “tıbbi türler arasındaki yıldız” olarak anılmaktadır. Bitkinin çiçek kısımlarından hazırlanan infüzyon, halk arasında birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar ile drogun etkileri ve toksisite yönünden nispeten güvenilir olduğu kanıtlanmış, bu nedenle papatyanın değeri giderek artmıştır (Eddouks vd., 2002; Schilcher, 2005b; Khan ve Abourashed, 2010; Güzel vd., 2015; Neves vd., 2009; Benítez vd., 2010; Gupta vd., 2010; Singh vd., 2011; Engels ve Brinckmann, 2015; El Mihyaoui vd., 2022). Avrupa Farmakopesi’nde ise; çiçeği (*Matricariae flos*), uçucu yağı (*Matricariae aetheroleum*) ve sıvı ekstresi (*Matricariae extractum fluidum*) olmak üzere üç formu kayıtlıdır (Ph. Eur. 8.0).

Papatya çiçeklerinden buhar distilasyonu yöntemi ile elde edilen papatya uçucu yağının önemi; bileşimindeki seskiterpen yapıdaki bileşiklerden [α -bisabolol, α -bisabolol oksit A ve B, (*E*)- β -farnesen, α -bisabolon oksit A] ve kamazulenden kaynaklanmaktadır (Schilcher, 2005a; El Mihyaoui vd., 2022). Ayrıca Avrupa Farmakopesi’nde bisabolol oksitler ya da (-)- α -bisabolol açısından zengin olmak üzere iki farklı tip papatya uçucu yağı tanımlanmaktadır ve uçucu yağın kalitesi bisabolol oksitlerin, α -bisabololün ve kamazulenin miktarları ile ilişkilendirilmektedir (Ph. Eur. 8.0). Özellikle parfümeri ve ilaç endüstrisi için değerli olan papatya uçucu yağının kemotipine bağlı olarak farmakolojik ve toksikolojik etkileri değişebilmekte; bu nedenle uçucu yağ ve bileşenlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar etkilerinin yanında toksisite profillerinin araştırılması önem arz etmektedir. Ancak papatya uçucu yağının ve bileşenlerinin biyoaktivitesi ve toksisitesi ile ilgili çalışmalar nispeten azdır (Ramadan vd., 2006; Sharafzadeh ve Alizadeh, 2011; Singh ve Aishwarya, 2017).

Doğal maddelerin biyoteknolojik yöntemlerle türevlendirilmesi güncel ilaç araştırmaları içinde yer almaktadır. Biyoteknolojik türevlendirme yöntemlerinden biri olan mikrobiyal transformasyon, klasik kimyasal yollarla sentezlenmesi zor ya da imkânsız olan maddelerin kompleks biyodönüşümlerini gerçekleştirmek gibi avantajları ve kimyasal sentezlerin aksine çevre dostu bir yaklaşıma sahip olması nedeniyle; yeşil kimya, doğal maddeler kimyası ve medisinal kimya alanında büyük bir öneme sahiptir. Bu sayede doğal ilaç, koku ve tat maddeleri gibi yeni biyoaktif maddelerin üretimi biyoteknolojik yöntem ile gerçekleştirilebilmektedir (Gavrilescu ve Chisti, 2005; Hegazy

vd., 2015 Smitha vd., 2017; Diep vd., 2018; Cano-Flores vd., 2020; Sambyal ve Singh, 2020; Qin ve Dong, 2023). Genel olarak biyotransformasyon çalışmalarında uçucu yağların doğrudan kullanımı yaygın değildir (Dvořáková vd., 2007; İşcan, 2009; Novaković vd., 2018). Fakat uçucu yağların doğal koku, tat ve farmakolojik etkilerinin; düşük maliyetli, çevre dostu, sürdürülebilir ve yüksek seçiciliğe sahip bir yaklaşım olan mikrobiyal transformasyon yöntemi ile zenginleştirilebilmesi mümkündür.

Literatürde, monoterpenlerin biyotransformasyonu özellikle son 40 yılda oldukça kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Bhatti vd., 2014; Demirci vd., 2004; Farooq vd., 2002); bununla birlikte α -bisabolol, α -bisabolol oksit A ve B, farnesen gibi parfümeri ve ilaç endüstrisi için değerli olan seskiterpenlerin biyotransformasyonu ile ilgili çalışma nispeten azdır (Miyazawa vd., 1995; Limberger vd., 2003; Krings vd., 2006; Park vd., 2022). Papatya uçucu yağının substrat olarak doğrudan kullanımına dayalı biyotransformasyon çalışması ise daha önce gerçekleştirilmemiştir.

Bu tez kapsamında, Avrupa Farmakopesi kalitesindeki papatya uçucu yağı ve içindeki bazı bileşenlerinin (α -bisabolol, α -bisabolol oksitler, kamazulen ve farnesen) mikrobiyal transformasyonu ile yeni biyoaktif metabolitlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, bisabolol oksitlerin ve kamazulenin papatya uçucu yağından izolasyonunun gerçekleştirilebilmesi, ticari kaynaklardan teminine oranla daha ekonomik olduğundan, biyotransformasyon çalışmalarında bu izole maddelerin kullanılması bir katma değer olarak gösterilebilir. Ayrıca elde edilen biyotransformasyon ekstrelerinin substratları ile karşılaştırmalı olarak biyoaktiviteleri araştırılmış, yapısı aydınlatılan metabolitlerin *in silico* yöntem ile toksisite profilleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Matricaria recutita* L.'nin Genel Özellikleri

Asteraceae familyasının önemli bir üyesi olan, tıbbi öneme sahip *Matricaria recutita* L. [sin. *Chamomilla recutita* L. (Rauschert) ve sin. *Matricaria chamomilla* L.] İngilizce'de "German chamomile" (Alman papatyası) ve "Hungarian chamomile" (Macar papatyası) (Görsel 2.1); ülkemizde ise "tıbbi papatya" ya da "Mayıs papatyası" olarak bilinen, Mayıs ayından ağustos ayna kadar çiçek açan ve 20-60 cm yüksekliğe ulaşabilen tek yıllık otsu bir bitkidir (Reichling ve Beiderbeck, 1991; Baytop, 1999).



Görsel 2.1. *Matricaria recutita* L. 'nin genel görünümü (21.05.2023, Eskişehir)

Tür, güney ve doğu Avrupa ile batı Asya'ya özgü olmasına rağmen farklı iklim ve toprak çeşitlerinde büyüme yeteneğine sahip olmasından dolayı, neredeyse tüm dünya genelinde görülmektedir (Razmjoo vd., 2008; Salamon vd., 2023).

Arjantin, Mısır, Almanya, Polonya, İspanya, bazı Balkan ülkeleri (Bosna Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan ve Sırbistan), Çek Cumhuriyeti ve Slovakya, *M. recutita*'nın ticari olarak üretiminde yüksek potansiyele sahiptir (Salamon, 2004; Salamon vd., 2023). Almanya'da yaklaşık 1000 hektar kadar geniş bir alanda papatya ekilmektedir (Honermeier vd., 2013). Geçmiş yıllarda Macaristan, kaliteli papatya çiçeklerinin ihracatında dünya talebinin %40-50'sini karşılayabilecek bir pazarın hakimiydi. 1990'lı yıllara gelindiğinde ise Doğu Avrupa, Mısır ve Arjantin'de kültüre alınan bitkinin Avrupa

pazarında daha ucuza satışa sunulması, Macaristan ihracat ekonomisini olumsuz yönde etkilemiştir (Gosztola, 2012).

M. recutita, dünya genelinde en yaygın kullanılan tıbbi bitkilerden biridir ve 26 ülkenin farmakopesinde ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Alman E Komisyonu, Avrupa Bilimsel Fitoterapi Birliği (ESCOP) monograflarında yer almaktadır (Petronilho, vd., 2011; WHO, 1999).

Avrupa Farmakopesi'nde, çiçeği (*Matricariae flos*), uçucu yağı (*Matricariae aetheroleum*) ve sıvı ekstresi (*Matricariae extractum fluidum*) olmak üzere üç formu kayıtlıdır (Ph. Eur. 8.0).

Ülkemizde papatya adıyla anılan birçok tür olmasına rağmen (Arslan, 2019) dünya genelinde tıbbi olarak yaygın şekilde kullanılan iki papatya türü vardır: *M. recutita* L. (Alman papatyası) ve *Chamaemelum nobile* L. (Roman papatyası). Her iki papatya türü de görünüş olarak birbirine benzer olmasına ve sıklıkla karıştırılmasına rağmen, ayırt edici özellikleri vardır: *M. recutita* L. tek yıllık bir tür iken, *C. nobile* L. çok yıllıktır ve çiçek morfolojileri de birbirinden farklıdır (Singh vd., 2011). Ayrıca bu iki türün uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri de birbirinden farklılıklar göstermektedir. *M. recutita* uçucu yağı, α -bisabolol ve α -bisabolol oksitlerini, kamazulen ve polinler içerirken; *C. nobile* uçucu yağı ise daha az miktarda kamazulen içerir ve temel olarak anjelik asit ve tiglik asit esterlerinden oluşur (Srivastava vd., 2010).

2.2. *Matricaria recutita* L.'nin Morfolojik Yapısı

M. recutita, düz, pürüzsüz, tüysüz gövdeli ve birçok dalı olan, yaklaşık 30-40 cm boyunda tek yıllık bir bitkidir. Yaprak ayaları (2-3 alternat) bölünmüş, tüylü, kısa ve sapsızdır. Bitkinin heteromorf infloresansı vardır. Gövdenin üstünde, dallarda ve yaprak koltuklarında büyüyen çiçekler pedisel ile birleşen korimboz bir düzene sahiptir. Meyve küçük, pürüzsüz ve sarımtırak renklidir (WHO, 1999; Wu vd., 2022).

Kapitulum infloresans yapısındadır ve tabanında braktelerin oluşturduğu involukrum bulunur. İnvolutrum brakteleri kahverengi-gri zarımsı kenarlı, ovat veya lanseolattır. Uzamış konik reseptekulumu; geceleri ve döllenmeden sonra aşağı doğru sarkan 12-20 beyaz lingulat yapıda (dilsiz) çiçekler ve merkezde sarı tubular yapıda (tüpsü) çiçeklerden oluşur. Reseptakulumun içi boştur ve paleasızdır; bu durum *Matricaria* çiçeklerini, *C. nobile* türünden ayıran en önemli özelliktir (Görsel 2.2). Drog hoş aromatik bir kokuya sahiptir (Trease ve Evans, 2002; İşcan vd., 2019; Wu vd., 2022).



Görsel 2.2. *Matricaria recutita L.* 'nın morfolojik yapısı (21.05.2023, Eskişehir)

2.3. *Matricaria recutita L.*'nin Ekolojisi

Papatya, çok çeşitli iklim koşullarına ve toprak yapısına (kurak, tuzlu, sodik) uyum sağlayabilen bir bitkidir (Mikhak vd., 2017). Optimum toprak pH'sı 8 olmasına rağmen, Mart-Mayıs döneminde yağışın yeterli miktarda olduğu ve sodyum klorür miktarının çok fazla olmamasına bağlı olarak pH 9'a kadar olan alkali topraklarda bile yetişebilmektedir (Tucakov, 1957). Bununla birlikte, bitkinin en uygun yetiştirilme ortamı, 30-32°C'de kuru toprak ve %40-50 bağıl neme sahip havadır (Wu vd., 2022); fakat 2-20°C arasında değişen soğuk hava koşullarına da dayanıklıdır (Singh vd., 2011). Papatyanın doğal koşullara karşı dayanıklılık mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır; ancak yapılan çalışmalar stres ile bitkilerin direnci arasındaki ilişkiden ısı şok proteinlerinden biri olan Hsp90 (Heat Shock Protein 90)'ın sorumlu olduğunu göstermektedir (Xu vd., 2013; Ling vd., 2014).

Bitkinin bölgesel çevre faktörlerine bağlı olarak ekim ve hasat mevsimleri de farklılık göstermektedir. Kış ekimi, her yıl ekim ayının başlarında tropikal ve subtropikal düzlüklerde yapılır ve çiçeklenme gelecek yılın şubattan nisan ayına kadar gerçekleşir. Yaz ekimi ise yüksek rakımlı alanlar için uygundur ve çiçeklenme dönemi mayıstan hazirana kadardır (Bhattacharjee, 2005'ten aktaran Wu vd., 2022).

2.4. *Matricaria recutita* L.'nin Etnofarmakognozi Açısından Önemi

M. recutita yüzyıllardır insanlar tarafından kullanılan, Asteraceae familyasının tıbbi kullanımını açısından en iyi bilinen bitkisi olmakla beraber “tıbbi türler arasındaki yıldız” olarak da anılmaktadır (Gupta vd., 2010; Singh vd., 2011). Latince ismindeki, "*Matricaria*" kelimesi "*Matrix: uterus*" kelimesinden köken almaktadır; çünkü drog antik dönemde kadınlar için menstrüasyon döngüsü problemleri ve abortus gibi sorunlarda kullanılmıştır. "*Recutitus*" ise bitkinin “kesilmiş” anlamına gelen tür epitetidir (Das, 2015). Sinonimdeki "*Chamomilla*" adı ise muhtemelen Dioscorides ve Plinius'a kadar uzanır ve elma kokusuna sahip olduğu için bitkiyi, "yerde büyüyen elma ağacı" anlamına gelen "*chamaimelon*" olarak adlandırmışlardır (Yunanca *chamai*: yer, toprak, *melon*: elma) (Franke, 2005, s. 44). Hipokrat (M.Ö. 5. yüzyıl), Dioskorides (M.Ö. 1. yüzyıl) ve Galen (M.Ö. 2. yüzyıl)'e ait eski yazmalarda papatyaya rastlanmaktadır. Hipokrat, arınma, korunma ve soğuk algınlığı ile gibi pek çok durumda papatyayı önermiştir (Das, 2015).

Eski Mısır'da papatya, Güneş tanrısının bir hediyesi olarak görülüp sıtmayı iyileştirmek için kullanılmıştır. Geleneksel olarak sindirime yardımcı, nefes tazeleyici, bağışıklığı güçlendirici, uyku kalitesini artırıcı ve rahatlatıcı, alerjii hafifleten etkilerinin yanı sıra; kadınların menstrüel problemlerinde, bronşit, böcek ısırıkları ve kaşıntı için kullanılmıştır (Sharifi-Rad vd., 2018).

İbn-i Sina ve İbnü'l-Baytâr da bitkinin sinir, sindirim ve solunum sistemlerinde tedavi edici etkilerine işaret etmişlerdir (Ghaffari ve Moein, 2013).

Unani Farmakopesi monograflarında (2007), *M. rectita* “Gul-e-Babuna” olarak adlandırılır. Hindistan'da insan vücudunun dengesini sağlamak ve hastalıkları tedavi etmek için papatya; baş ağrısı, histeri, akut konjonktivit, gonore, göğüs ağrısı, böbrekler ve mesane ile ilgili rahatsızlıklar, vücut ve kas ağrıları, rahim ile ilgili hastalıklar, sindirim sorunları, hazımsızlık ve ateşli hastalıklar için kullanılır.

Papatya, 16. ve 17. yüzyıllarda aralıklı ateş için yaygın olarak kullanılmıştır (Das, 2015). Amerika Birleşik Devletleri'ne ilk olarak Alman göçmenleri tarafından getirilerek yetiştirilmiş ve özellikle 19. yüzyılda Amerika'nın eklektik yaklaşım uygulayan hekimleri tarafından, hamileler ve çocuklar için güvenle kullanılan önemli bir tıbbi bitki haline gelmiştir (Engels ve Brinckmann, 2015).

Papatya, antienflamatuvar, antioksidan ve hafif astranjen etkilerinden dolayı dünya genelinde farklı amaçlar için uzun bir geleneksel kullanım geçmişine sahiptir (Singh ve

Aishwarya, 2017). Papatya çiçeği ekstreleri; huzursuzluk, anksiyete, depresyon, uykusuzluk, sindirim problemleri, kalp hastalıkları, hipertansiyon, baş ağrısı, hemoroit, astım, bebek nöbetleri, diş eti kanaması ve ağrısı, sıtma, seyahat bulantısı, egzama, morluklar, yanıklar ve yaralar gibi çeşitli cilt problemleri, göz, boğaz, ağız, kulak, mide, genital organlardaki enfeksiyonlar için dahili ve/veya harici olarak kullanılmıştır. Ayrıca sivri sinekleri uzaklaştırmak için tüm bitki kurutulmuş olarak yakılmaktadır (Eddouks vd., 2002; Neves vd., 2009; Benítez vd., 2010; Engels ve Brinckmann, 2015; El Mihaoui vd., 2022).

Türkiye’de ise halk arasında çiçeklerinden hazırlanan infüzyonun, sakinleştirici olarak, bronşit tedavisinde, sindirim problemlerinde ve laksatif amaçlı kullanımının yanı sıra, göz yorgunluğunu gidermek için kompres uygulaması şeklinde, bebeklerin cilt ve göz temizliğinde kullanılmaktadır (Khan ve Abourashed, 2010; Güzel vd., 2015).

2.5. *Matricaria recutita* L.’nın Farmakolojik Etkileri

Papatyanın kurutulmuş çiçek başlarından infüzyon şeklinde hazırlanan bitki çayının ve toz haline getirilmiş kurutulmuş çiçeklerinden hazırlanan tabletlerin/kapsüllerin kullanımı yaygındır. Ayrıca kurutulmuş çiçek başlarından, hazırlanan ekstreler konsantre hale getirilerek (etanolik sulu ekstre) veya buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ; jellerin, merhemlerin ve kremlerin yapısına katılır. Papatya çiçeklerinin nötral yağlar ile ekstre edilmesiyle banyo yağları, steril sulu ekstreleri ile göz damlaları hazırlanır (Schilcher, 2005b).

Papatya, özellikle antienflamatuvar (Shipochliev vd., 1981), antispazmodik (Yazdi vd., 2017), sedatif (Avallone vd., 2000), antimikrobiyal, antioksidan (McKay ve Blumberg, 2006) etkilere sahiptir. Papatya ekstreleri, uçucu yağı ve izole edilen bileşikler cilt enflamasyonu ve eozinofilik dermatit tedavisinde bitkisel bir drog olarak katkıda bulunabileceği gibi antipruritik ajan olarak da kullanılabilir (Purnamawati vd., 2017).

M. recutita'nın antispazmodik etkiden sorumlu olan bileşikler özellikle flavonoidler (apigenin ve apigenin-7-glikozit) grubuna dahildir; fakat terpen yapıdaki α -bisabolol de papaverine benzer şekilde antispazmodik aktivite göstermektedir. Bunun yanı sıra α -bisabolol ve kamazulen özellikle antienflamatuvar etkileri ile anılırlar. Ayrıca en-in-disikloeter hem antispazmodik hem de antienflamatuvar özelliktedir (WHO, 1999; Abad vd., 2011).

2.6. *Matricaria recutita* L.'nin Fitokimyasal Bileşimi

M. recutita uçucu yağında ve ekstralarında 120'den fazla bileşen tanımlanmıştır (Mann ve Staba, 1986'dan aktaran McKay ve Blumberg, 2006). Bu bileşenler arasında 28 terpenoit, 36 flavonoid ve farmakolojik aktivite potansiyeline sahip 52 ilave bileşik yer almaktadır (Mann ve Staba, 1986'dan aktaran Singh, 2011).

Papatya çiçeklerinde uçucu yağ (%0,24-1,9); flavonoidler (apigenin, apigenin, kersetin, rutin, luteolin, patuletin); kumarinler (eskuletin, skopoletin, umbelliferon, herniarin); proazulenler (matrisin, matrikarin vd.); azulen (kamazulen); triterpen alkoller (α - ve β -amirin, lupeol, tarakserol); steroller; seskiterpenler [(-)- α -bisabolol, bisabolol oksitler A, B, ve C, farnesen, kadinen, spatulenol]; tanenler; suda çözünen polisakkaritler; kolin; bitki asitleri (anisik, klorojenik, kafeik ve vanilik); yağ asitleri ve amino asitler içerir (McKay ve Blumberg, 2006; Khan ve Abourashed, 2010; Sharafzadeh ve Alizadeh, 2011).

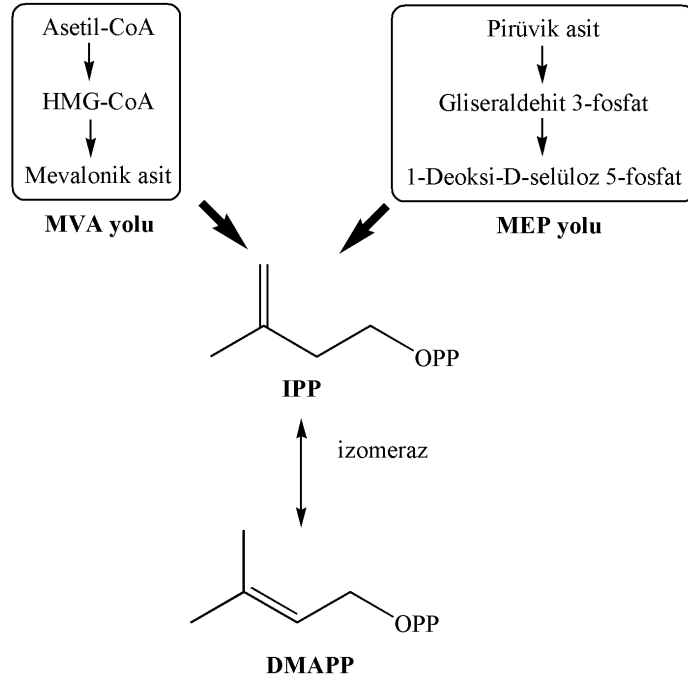
Papatyanın farmakope standardı için kurutulmuş *Matricariae flos*'un en az %0,25 apigenin-7-glikozit içermesi ve kuru veya taze çiçeklerinin, buhar distilasyonu ile elde edilen mavi renkli uçucu yağın en az %0,4 olması gerekmektedir (Ph. Eur. 8.0).

2.7. Uçucu Yağlar ve Seskiterpenlerin Biyosentezi

19. yüzyılın başlarında uçucu yağların doğasının yeni ve aydınlatıcı bir yaklaşımla araştırılmasına, bilinen en eski uçucu yağ olan terebentin ile başlanmıştır. Jacques Labillardière tarafından yapılan analiz sonucunda karbonun hidrojene oranının beşe sekiz olduğu bulunmuş ve daha sonra araştırmalar bu oranın tüm terpenler için de geçerli olduğu kanıtlanmıştır (Urdang, 1948).

Uçucu yağ (aetheroleum), canlı organizmalarda biyosentez sonucu oluşan, özel kokulu, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde olan uçucu bileşenlerin karışımıdır. Uçucu yağlar, su, buhar ve kuru distilasyon ya da soğuk sıkma yöntemleriyle elde edilir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından sabit yağlardan farklıdır. Uçucu yağlar genellikle hidrokarbonlar ve hidrokarbonların oksijenli türevlerinden meydana gelmişlerdir. Bunlar arasında alkoller, asitler, esterler, aldehytler, ketonlar, aminler ve kükürtlü bileşikler de yer alır (Trease ve Evans, 2002; Başer ve Demirci, 2007). Uçucu yağlarda en çok mono-, seski- ve diterpenler ile bunların oksijenli türevleri mevcuttur ve hoş kokularından oksijenli bileşikler, esterler sorumludur (Başer ve Demirci, 2007). Uçucu yağlar, parfümeri ve kozmetik sanayi, aromaterapi, fitoterapi başta olmak üzere yaygın olarak

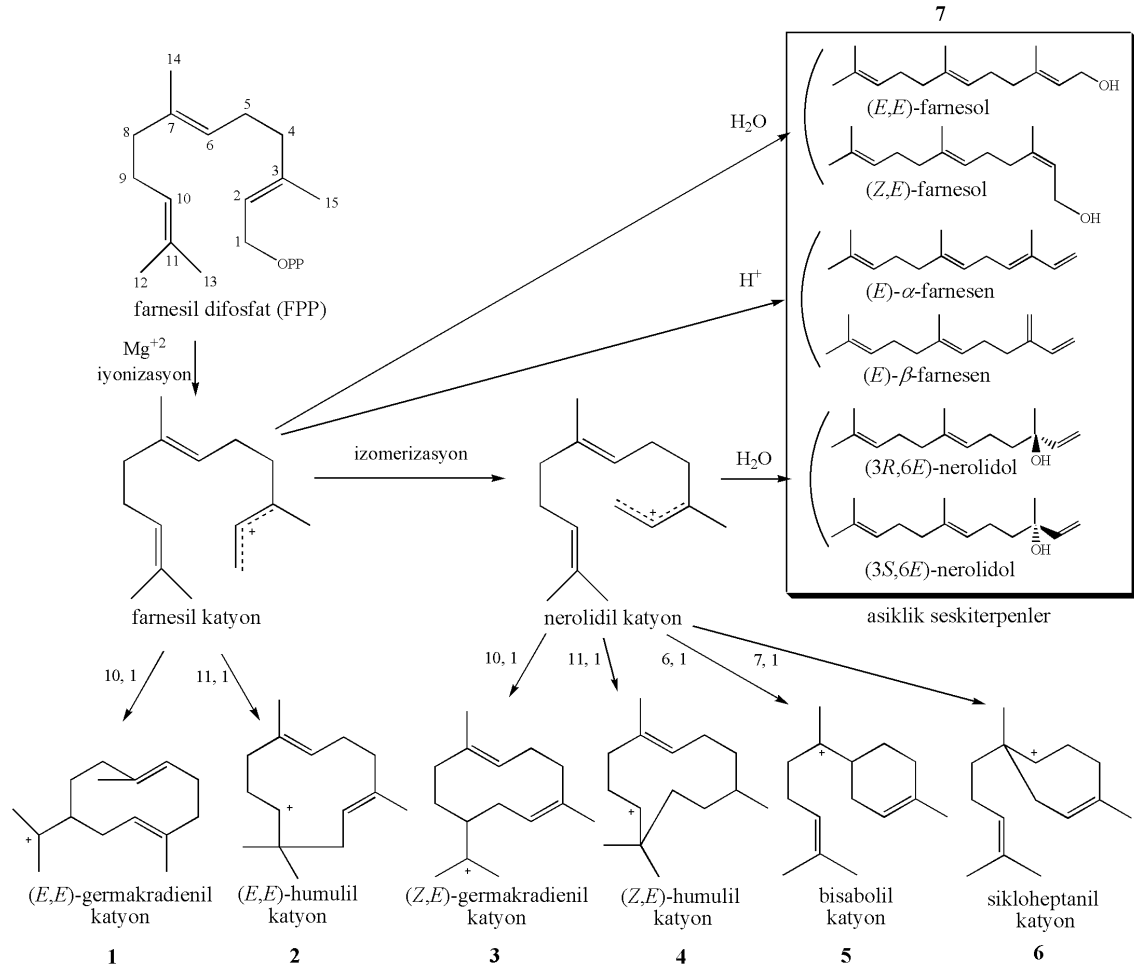
kullanılmaktadır. Son yıllarda biyolojik aktivitelerinden dolayı uçucu yağlar kimyasal ve farmakolojik olarak araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda uçucu yağların; antibakteriyel, antifungal, antiparazitik, antipiretik, antikanser, hipotansif ve sedatif gibi etkileri olduğu gözlenmiştir (Lahlou, 2004; Bartikova vd., 2014; Ni vd., 2021; de Sousa vd., 2023). Terpenoitlerin büyük çoğunluğu bitkilerden ve mantarlardan izole edilmiş olsa da bakteriler de hoş kokulu uçucu metabolitlerin üreticisi olarak bilinirler. Tüm terpenoitler, izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilallil difosfat (DMAPP) adlı evrensel C5 izoprenoit öncüllerinden sentezlenir (Ashour vd., 2010; Reddy vd., 2020). İzoprenoitler canlı organizmalarda yaygın olarak bulunur, yapısal ve biyolojik fonksiyonlar açısından çeşitlidir. Hem IPP hem de onun izomeri DMAPP iki farklı yolla sentezlenir: Bunlar mevalonat (MVA) ve metileritritol fosfat (MEP) yolaklarıdır (Şekil 2.1). MVA yolu tüm ökaryotik canlılarda, arkelerde ve bazı bakterilerde gözlenirken, çoğu bakteri MEP yoluyla izopren sentezler (Chang vd., 2021).



Şekil 2.1. Terpen mevalonat (MVA) ve metileritritol fosfat (MEP) yolakları

İzoprenil transferazları tarafından birleştirilen bu öncüller, farklı uzunluklarda izoprenil difosfat substratlarını oluşturur; örneğin geranil difosfat (GPP, C10), farnesil difosfat (FPP, C15) ve geranilgeranil difosfat (GGPP, C20) tır. Terpen sentazları,

doğrusal izoprenil difosfat substratlarını yapısal olarak çeşitli mono- (C10), seski- (C15) ve diterpen (C20) iskeletlere dönüştürürler (Ashour vd., 2010; Reddy vd., 2020).



Şekil 2.2. Seskiterpenlerin siklizasyon şeması (Durairaj vd., 2019).

Bitkilerde seskiterpenlerin sentezi Şekil 2.2’de görüldüğü üzere, FPP substratındaki difosfat anyonunun metal aracılı olarak uzaklaştırılmasıyla başlatılır ve bu da farnesil kation oluşumuna yol açar. C10-C11 çift bağının siklizasyona uğramasıyla kation 1 veya 2 oluşur; ancak farnesil kationu ayrıca bir cisoid (2Z,6E)-farnesil kationu (nerolidil kation) oluşturmak üzere izomerleşebilir. Nerolidil kation, 3 veya 4 kationlarını oluşturmak için C10-C11 çift bağı üzerindeki bir C1 saldırısına ek olarak, C6-C7 çift bağında 5 veya 6 kationlarını oluşturan siklizasyona da uğrayabilir. Karbokasyonlar, enzimin nihai ürünlerini oluşturmak için çok sayıda modifikasyonlara tabi tutulur. Bu sayısız siklik ürünle birlikte, asiklik seskiterpenler, proton kaybı veya su ilavesi yoluyla farnesil veya nerolidil kationdan da oluşturulabilir. FPP’den türetilen karbokasyonların

şeması (Şekil 2.2), bitkiler tarafından üretilen seskiterpenleri yedi gruba ayırmak için kullanılabilir (Durairaj vd., 2019).

2.7.1. *Matricaria recutita* L. uçucu yağının kimyasal yapısı

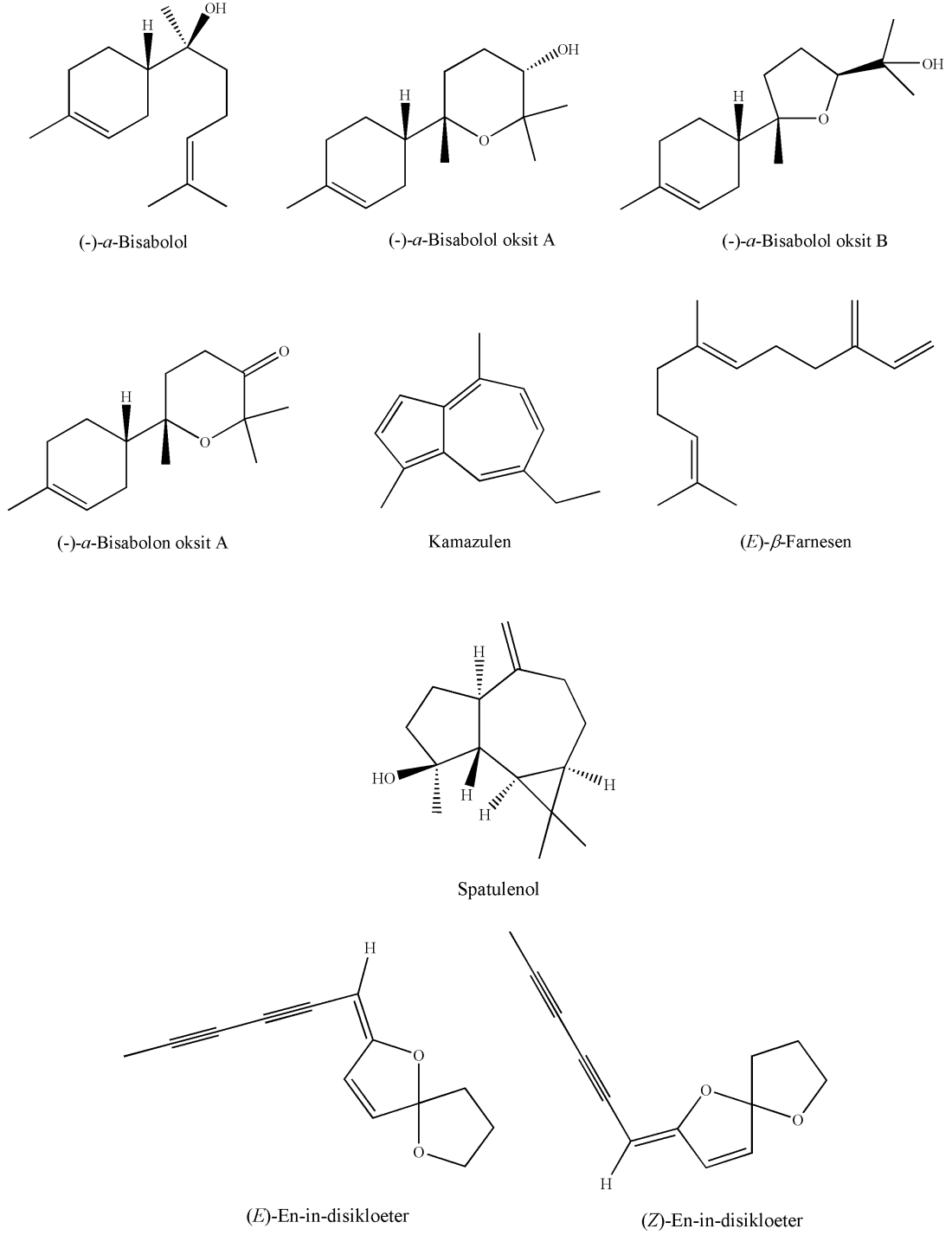
Papatyanın, günümüzde en çok tercih edilen ve dünya genelinde yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitki olması; çiçek kısımları dahil olmak üzere ondan elde edilen uçucu yağın miktarı ve içerdiği bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Salamon, 2007).



Görsel 2.3. *Matricariae aetheroleum*

Papatya uçucu yağında (Görsel 2.3), kamazulen, (-)- α -bisabolol, (-)- α -bisabolol oksitler (A ve B), α -bisabolon oksit A, (E)- β -farnesen, spatulenol, (E)- ve (Z)-en-in-disikloeter, (Şekil 2.3) bitki kaynağına bağlı olarak nispi konsantrasyonları değişen ana bileşenlerdir (Sharafzadeh ve Alizadeh, 2011; Singh ve Aishwarya, 2017).

Avrupa Farmakopesi'ne göre ksilen içerisinde seyreltilen papatya uçucu yağı (test çözeltisi) ve referans çözeltisi [toluen içinde çözülen gayazulen, (-)- α -bisabolol, bornil asetat] silika jel plakasına uygulanır ve etil asetat/toluen 5:95 çözücü sisteminde yürütülerek bileşenler birbirinden ayrılır. Gün ışığında ve reaktif (anisaldehit çözeltisi) uygulaması sonrasında kromatogram profili incelenir. Papatya uçucu yağında sırasıyla başlangıç noktasından bitiş çizgisine (-)- α -bisabolol, en-in-disikloeter, kamazulene ait zonlar ile referans çözeltisinde ise (-)- α -bisabolol, bornil asetat, gayazulene ait zonların karşılaştırılmasıyla bileşenler tanımlanır.



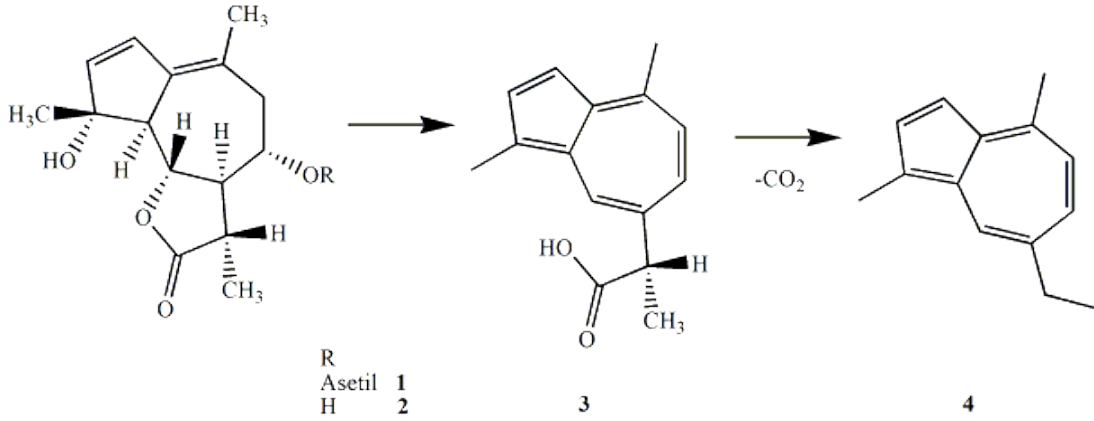
Şekil 2.3. Papatya uçucu yağındaki ana bileşenler

M. recutita'nın hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağdan ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi teknikleri ile kamazulen, bisabolon oksit ve bisabolol oksit A izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları IR, ^1H NMR ve MS yöntemleri ile aydınlatılmıştır (Ashnagar vd., 2009). Slavik vd., (2021) tarafından, *M. recutita*'nın yarı uçucu fraksiyonundan, çözücü destekli aroma buharlaştırma (Solvent

Assisted Flavor Evaporation-SAFE) ve sıvı-sıvı kromatografisinin bir kombinasyonu kullanılarak, seskiterpen ve seskiterpenoit bileşiklerinin izolasyonu için bir yöntem geliştirilmiştir. Sonuç olarak spatulenol, α -bisabolol oksit B, α -bisabolon oksit A, α -bisabolol oksit A, (*E*)- β -farnesen ve (*E/Z*)-en-in-disikloeter yüksek saflıkta izole edilmiştir.

Uçucu yağların verimi, kalitesi ve içeriğindeki kimyasal değişkenlikten sorumlu olan faktörler; edafik olduğu gibi, iklim koşulları ve bitkinin genotipi ile de ilişkilidir (Formisano vd., 2015). Uçucu yağ miktarı ve kalitatif profili ile prokamazulen/kamazulen miktarı daha çok genetik olarak belirlenirken; bisaboloit bileşiklerin daha fazla üretimi genetik faktörlere kıyasla, büyüme koşullarından daha fazla etkilenebilmektedir (Rafieiolhossaini vd., 2010). Önceki ekim tarihlerine göre daha geç ekim nedeniyle yüksek sıcaklıkların etkisine bağlı olarak (*E*)- β -farnesen, α -bisabolol oksit A, α -bisabolon oksit ve spatulenol miktarları artmaktadır (Rafieiolhossaini vd., 2010). Muhtemelen en yüksek (-)- α -bisabolol içeriği ise gün doğumu ve gün batımı zamanlarında papatya çiçeklerinde birikmektedir (Mann ve Staba 1975'ten aktaran Ghasemi vd. 2016). Ayrıca özellikle azotun uçucu yağdaki α -bisabolol ve kamazulen içeriğini artırdığı, ancak bisabolol oksit A ve B içeriğini ise azalttığı bildirilmektedir (Singh vd., 2011).

Kamazulen, papatya uçucu yağının karakteristik mavi renginden (Görsel 2.3) sorumlu olan 14C'lu bir hidrokarbondur. Papatyanın doğal bileşenleri arasında listelenmez ve bitkide doğal olarak bulunan prokürsör matrisinin bir dönüşüm ürünü olarak kabul edilir. Her ne kadar buhar distilasyonu ile uçucu yağın eldesi sırasında, yüksek sıcaklığa bağlı olarak, proazulen olan matrisinin kamazulene dönüştüğü bilinse de kamazulen az miktarda da olsa papatya çiçeği kloroform ekstresinde bulunmaktadır (Berger ve Sicker, 2009). Daha yüksek miktarda kamazulen elde etme yöntemi, renksiz olan matrisinin tamamen koyu mavi renkli kamazulene (%1-15) dönüşmesini sağlayan bitki çiçeklerinin buhar distilasyonudur (Berger ve Sicker, 2009). Uçucu yağ eldesi için *Matricariae flos*'un distilasyonu sırasında, ısıtma ile eş zamanlı olarak azulenlerin oluşumu söz konusudur ve Şekil 2.4'te görüldüğü üzere gerçekleşen reaksiyon; seskiterpen lakton yapısındaki matrisin (1)'in asetik asit ester kısmının hidrolizi ile deasetil matrisin (2) verecek şekildedir. Asidik ortamda hızlı gerçekleşen bu reaksiyon lakton halkasının açılması ve hidroksil gruplarının kaybedilmesi ile kamazulen karboksilik asit (kamazulenik asit) (3) oluşumu ile devam eder ve kamazulen karboksilik asitin (3) dekarboksilasyonu ile kamazulen (4) oluşur (Ramadan vd., 2006).



Şekil 2.4. Matrisinin kamazulen molekülüne dönüşümü (Ramadan vd., 2006).

Kamazulen karboksilik asit, antienflamatuvar aktiviteye sahip doğal bir profendir ve matrisin gibi proazulenik seskiterpen laktonların bir bozunma ürünüdür. Hem kamazulen karboksilik asit hem de proazulenler, *M. recutita*'da doğal olarak bulunurlar (Ramadan vd., 2006).

2.7.2. *Matricaria recutita* L.'nin kemotipleri

Papatya uçucu yağ bileşimlerinin kalitatif ve kantitatif kimyasal özellikleri dikkate alındığında farklı papatya kemotiplerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır (Rubiolo vd., 2006; Salamon, 2009; Salamon vd., 2010). Papatya uçucu yağı Tip A (α -bisabolol oksit B > α -bisabolol oksit A > α -bisabolol); Tip B (α -bisabolol oksit A > α -bisabolol oksit B > α -bisabolol); Tip C (α -bisabolol > α -bisabolol oksit B > α -bisabolol oksit A); Tip D (α -bisabolol oksit B \approx α -bisabolol oksit A \approx α -bisabolol) olmak üzere dört temel kemotipe ayrılmaktadır. Bir bitki türünün farklı kimyasal tiplerinin tanımlanması, uçucu yağdaki kimyasal bileşiklerin kalitatif ve kantitatif bileşimleri açısından farklı olmalarından kaynaklanmaktadır (Salamon vd., 2010). Fakat Avrupa Farmakopesi'nde bisabolol oksitler ya da (-)- α -bisabolol açısından zengin olmak üzere iki farklı tip papatya uçucu yağı karakterize edilmiştir ve papatya uçucu yağının kalitesi bisabolol oksitlerin, (-)- α -bisabololün ve kamazulenin miktarları ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 2.1). Bisabolol oksitler yönünden zengin olan papatya uçucu yağının bileşiminde %29-81 bisabolol oksitler ve $\geq 1,0$ kamazulen bulunması; (-)- α -bisabolol yönünden zengin uçucu yağın bileşiminde ise (-)- α -bisabolol %10-65 ve kamazulen ≥ 1 olması gerekmektedir. Bisabolol oksitlerin ve (-)- α -bisabololün toplam yüzdesi en az 20 olmalıdır (Ph. Eur. 8.0).

Tablo 2.1. Papatya uçucu yağlarının Avrupa Farmakopesi kalitesinde olması için gereken özellikler

	Bisabolol oksitler yönünden zengin papatya uçucu yağı (%)	(-)-α-Bisabolol yönünden zengin papatya uçucu yağı (%)
Bisabolol oksitler	29-81	
(-)- α -Bisabolol		10-65
Kamazulen	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$
Toplam bisabolol oksitler ve (-)- α -bisabolol		≥ 20

Ayrıca papatya çiçeklerinin doğal habitat kaynakları fitokimyasal bileşimlerinden hareketle belirlenebilir:

- Bisabolol açısından zengin tipler; Katalonya/İspanya'da endemik olarak bulunur ve Malta ile Kıbrıs gibi birçok lokal popülasyonda kendiliğinden yetişerek sınırlı miktarda bulunmaktadır.
- Bisabolol oksit A tipleri; Mısır ve Orta Avrupa'dan (örneğin Macaristan, Çek Cumhuriyeti, Slovakya) köken almaktadır.
- Bisabolol oksit B tipleri; Güney Amerika koleksiyonlarından (özellikle Arjantin) gelirken, Şili'de ise bisabolol oksit A tipi baskındır.
- Bisabolon tipleri; Güneydoğu Avrupa ve Türkiye kaynaklıdır.
- Matrisin yönünden fakir veya matrisinden tamamen yoksun olan tipler; Mısır, Balkanlar (Romanya ve Bulgaristan'ın bazı bölgeleri) ve Türkiye'de (Menemen tipi) bulunabilir; bu bölgelerde yetişen tipler genellikle sarımsı-yeşil renkte bir yağa sahiptir (Salamon vd., 2022).

Genel olarak, *M. recutita* kaynağına bağlı olarak çiçek kısımlarından elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimi ve yüzdeleri önemli ölçüde değişebilmektedir. Tablo 2.2'de çeşitli ülkelerden toplanarak elde edilen papatya uçucu yağlarındaki başlıca ana bileşenler referans değerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 2.2. Farklı menşeli papatya türlerinin uçucu yağ bileşimleri ve referansları

Ülke	Ana Bileşen	Referans
Mısır	α -Bisabolol oksit A (%33-50,5), (Z)-en-in-disikloeter (%10-18,7), α -bisabolol oksit B (%8,2-15,4), α -bisabolon oksit A (%5,4-14,6), kamazulen (%1,9-5,2)	Abbas vd., (2021)
	(-)- α -Bisabolol oksit A (%40,1-68,2), (E)- β -farnesen (%2,4-18,2), (-)- α -bisabolon oksit A (%2,7-9,8), (-)- α -bisabolol (%2,1-3,6), kamazulen (%1,7-2,6)	Salamon vd., (2010)
Türkiye	α -Bisabolol (%27,36-38,6), kamazulen (%1,13-1,36)	Ayran vd., (2018)
	Bisabolon oksit (%47,6-2,7), bisabolol oksit A (%27,4-75,4), (E)- β -farnesen (%4,6-1,8), bisabolol oksit B (%2,3-4,1), en-in-disikloeter (%5,6-4,4), kamazulen (%0,4-0,2)	Rezaeih vd., (2015)
İran	Bisabolol oksit A (%7,31-51,31), bisabolon oksit (%8,35-39,97), bisabolol oksit B (%3,18-35,7), (E)- β -farnesen (%2,05-19,68), kamazulen (%6,66-1,05)	Ghasemi vd., (2016)
	α -Bisabolon oksit A (%45,64-65,41), (E)- γ -bisabolen (tespit edilemedi-%42,76), (Z)- γ -bisabolen (tespit edilemedi-%40,08), α -bisabolol oksit B (tespit edilemedi-%21,88), kamazulen (tespit edilemedi-%19,22), α -bisabolol (tespit edilemedi-%2,07)	Piri vd., (2019)
	(E)- β -farnesen (%24,19), gayazulen (%10,57), α -bisabolol oksit A (%10,21), α -farnesen (%8,7), α -bisabolol (%7,27)	Ayoughi vd., (2011)
	α -Bisabolon oksit A (%11,9-63,5), α -bisabolol oksit A (%10,6-37,9), α -bisabolol oksit B (%2,4-23,9), (Z)-en-in-disikloeter (%6,3-9,9), kamazulen (%2,9-8,1)	Mavandi vd., (2019)
Macaristan	α -Bisabolol oksit A (%40,7), kamazulen (%14,3), α -bisabolon oksit A (%12,8), α -bisabolol oksit B (%8,7)	Mavandi vd., (2019)
Almanya	α -Bisabolol oksit A (%39,1), α -bisabolon oksit A (%17,4), α -bisabolol oksit B (%17,1), (Z)-en-in-disikloeter (%10,3)	Mavandi vd., (2019)
	Bisabolol oksit A (%54,1), (Z)-en-in-disikloeter (%19), bisabolol oksit B (%6,7), bisabolon oksit A (%4,5)	Orav vd., (2010)
Estonya	Bisabolol oksit A (%27,5-47,9), bisabolon oksit A (%1,6-17,1), (Z)-en-in-disikloeter (%11,7-14,9), bisabolol oksit B (%9,9-12,3), kamazulen (%3,0-5,4)	Orav vd., (2010)
Yunanistan	Bisabolol oksit A (%41,9), (Z)-en-in-disikloeter (%11,4), bisabolol oksit B (%6,4), kamazulen (%1,5)	Orav vd., (2010)
İskoçya	Bisabolol oksit A (%55,6), (Z)-en-in-disikloeter (%14), bisabolol oksit B (%8), bisabolon oksit A (%7,6), kamazulen (%1,0)	Orav vd., (2010)
İngiltere	Bisabolol oksit A (%56), (Z)-en-in-disikloeter (%13,3), bisabolol oksit B (%7,1), bisabolon oksit A (%4,3), kamazulen (%0,7)	Orav vd., (2010)

Tablo 2.2. (Devam) *Farklı menşeli papatya türlerinin uçucu yağ bileşimleri ve referansları*

Ülke	Ana Bileşen	Referans
Litvanya	Bisabolol oksit A (%51,9), (Z)-en-in-disikloeter (%13), bisabolol oksit B (%7,5), (E)- β -farnesen (%5,3), kamazulen (%1,6)	Orav vd., (2010)
Moldova	α -Bisabolol (%44,2), (Z)-en-in-disikloeter (%13,2), bisabolon oksit A (%12,4), bisabolol oksit A (%9,3), bisabolol oksit B (%6,6), kamazulen (%1,0)	Orav vd., (2010)
Rusya	α -Bisabolol (%23,9), bisabolol oksit A (%16,4), (Z)-en-in-disikloeter (%14,4), bisabolol oksit B (%10,5), (E)-nerolidol (%7,4), kamazulen (%2,9)	Orav vd., (2010)
Çek Cumhuriyeti	α -Bisabolol (%37), (Z)-en-in-disikloeter (%26,1), kamazulen (%9,8), (E)- β -farnesen (%4,5)	Orav vd., (2010)
Ermenistan	Bisabolol oksit B (%27,2), kamazulen (%15,3), bisabolol oksit A (%12,6), (Z)-en-in-disikloeter (%12,6), bisabolon oksit A (%11,2)	Orav vd., (2010)
Ukrayna	Bisabolon oksit A (%24,8), α -bisabolol (%17,1), bisabolol oksit A (%12,3), bisabolol oksit B (%11), (Z)-en-in-disikloeter (%8,8), kamazulen (%3,8)	Orav vd., (2010)
Romanya	Bisabolol oksit A (%70,21), β -farnesen (%6,47), α -bisabolol oksit B (%6,22)	Berechet vd., (2017)
Avusturya	Bisabolol oksit B (%27,5), bisabolol oksit A (%27), α -bisabolol (%6,6), (Z)-spiroeter (%6,1), farnesen (%4,5), kamazulen (%3,5), (E)-spiroeter (%0,6)	Ganzera vd., (2006)

Beş farklı yöntemle (güneş ışığı, gölge, fırın, solar kurutucu ve mikrodalga) kurutulmuş ve taze çiçeklerden elde edilen *M. recutita* (Menşei: Mısır) uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri karşılaştırılmıştır. Çiçeklerdeki yağın en yüksek yüzdesi solar kurutma yöntemiyle elde edilirken, en düşük yağ yüzdesi mikrodalga kurutma sonrasında bulunmuştur ve solar kurutması sonrasında 21 bileşik, mikrodalga kurutma sonrasında 13 bileşik tanımlanmıştır. Yağlarda bulunan en yüksek bileşik grubunu ise seskiterpenler oluşturmaktadır (Abbas vd., 2021). Mısır'da 4 farklı bölgede kültüre alınan papatyalar ile İran'da farklı ekolojik bölgelerde doğal olarak yetişen 20 farklı papatyanın kullanıldığı çalışmada, çiçeklerinden hidrodistilasyon sonucu elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimleri karşılaştırarak kemotipleri belirlemiştir. Uçucu yağların ana bileşenlerinin belirlenmesi, standart bileşiklere [(-)- α -bisabolol, kamazulen, (Z)-en-in-disikloeter, (E)-en-in-disikloeter ve (-)- α -bisabolol oksit A ve B] göre yapılmıştır. Mısır'ın farklı bölgelerinden gelen papatya çiçeklerinden elde edilen uçucu yağlar yüksek miktarda

(-)- α -bisabolol oksit A (%40,1-68,2) içermektedir. Bununla birlikte (-)- α -bisabolol (%2,1-3,6) ve kamazulen (%1,7-2,6) ise çok düşük miktardadır. (-)- α -bisabolol oksit A yönünden zengin olan Mısır menşeli papatya uçucu yağının kemotip B (α -bisabolol oksit A > α -bisabolol oksit B > α -bisabolol) olduğu belirtilmiştir. İran'dan toplanan papatyaların ise yetiştiği çeşitli ekolojik yapılara göre uçucu yağ bileşimlerinin oldukça farklılıklar gösterdiği rapor edilmiştir (Salamon vd., 2010).

Türkiye'nin Konya ve Karaman ekolojik koşullarında yetiştirilen papatya uçucu yağ verimi ve bileşenleri incelenmiştir. Uçucu yağ verimi Konya'da %0,73, Karaman'da ise %0,62 olarak gözlenmiştir. Papatyanın en önemli uçucu yağ bileşeni olan kamazulen içeriği Konya'da %1,13, Karaman'da ise %1,36; α -bisabolol içeriği ise Konya ve Karaman illerinde sırasıyla %38,6 ve %27,36 olarak belirlenmiştir (Ayran vd., 2018). Türkiye'den 2011 ve 2012 yıllarında hasat edilen papatyaların uçucu yağ bileşimi analiz edilmiş ve iklim koşulları, özellikle bağıl nem açısından farklılıklar gösteren her iki yılın hasatındaki uçucu yağ bileşimleri kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırılmıştır. 2011 yılı hasatında 20 farklı bileşen, 2012 yılı hasatında 16 farklı bileşen belirlenmiştir. Uçucu yağdaki ana bileşenlerin miktarları hasat yıllarına (2011-2012) göre değişiklik göstermektedir: Bisabolon oksit (%47,6-2,7), bisabolol oksit A (%27,4-75,4), (*E*)- β -farnesen (%4,6-1,8), bisabolol oksit B (%2,3-4,1), en-in-disikloeter (%5,6-4,4), kamazulen (%0,4-0,2) (Rezaeih vd., 2015).

Salisilik asit ile muamele edilmiş üç *M. recutita* (Menşei: İran) çeşidinin normal ve stres koşullarındaki uçucu yağlarında toplamda 14 bileşik belirlenmiştir. Kamazulen, (-)- α -bisabolol, bisabolol oksit A ve B, farnesen ve α -bisabolon oksit A, en önemli bileşiklerdir. Sonuçlar, çevresel koşulların, kültivarların ve salisilik asit etkilerinin tüm tespit edilen bileşikler üzerinde önemli olduğunu; ancak çevresel koşulların bisabolol oksit A üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir (Ghasemi vd., 2016). İran'da yetişen on iki bitki örneğinden elde edilen uçucu yağların analizinde en çok bulunan bileşik α -bisabolon oksit A (%45,64-65,41) olarak belirlenmiştir. Sarableh adlı yeni bir kimotipe ait örnekte ise (*E*)- ve (*Z*)- γ -bisabolen (%42,76 ve %40,08) baskın bileşiklerdir (Piri vd., 2019). *M. recutita* (Menşei: İran) çiçek başlarından elde edilen uçucu yağ bileşiminde (*E*)- β -farnesen (%24,19), gayazulen (%10,57), α -bisabolol oksit A (%10,21), α -farnesen (%8,7) ve α -bisabolol (%7,27) varlığı ortaya koyulmuştur. Uçucu yağ bileşiminde kamazulen tespit edilememiştir (Ayoughi, 2011). Mavandi vd., (2019) yaptığı çalışmada, İran'da *M. recutita*'nın altı doğal genotipi ve iki ticari çeşidinin

(Almanya, Macaristan) uçucu yağ verimi, içeriği ve yüzde miktarları değerlendirilmiştir. İran menşeli papatyaların uçucu yağlarındaki ana bileşenler α -bisabolon oksit A (%11,9-63,5), α -bisabolol oksit A (%10,6-37,9), α -bisabolol oksit B (%2,4-23,9), kamazulen (%2,9-8,1); Almanya ve Macaristan menşeli olan ticari papatyaların uçucu yağları ise α -bisabolol oksit A (%39,1 ve %40,7) yönünden zengin olarak bulunmuştur.

Estonya'nın 3 farklı bölgesinde yetiştirilen ve Almanya, Yunanistan, İskoçya, İngiltere, Letonya, Moldova, Rusya, Çek Cumhuriyeti, Ermenistan, Ukrayna da dahil olmak üzere 11 farklı ülkeden temin edilen *M. recutita* üzerinde yapılan çalışmada, elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimlerdeki değişimler incelenmiştir. Estonya'nın 3 farklı bölgesinden olmak üzere, Almanya, Yunanistan, İskoçya, İngiltere ve Letonya, Ukrayna ülkelerinden temin edilen *M. recutita*'dan elde edilen uçucu yağlarda yüksek miktarda bulunan bileşik bisabolol oksit A'dır. Moldova, Rusya ve Çek Cumhuriyeti'nden temin edilen bitkinin uçucu yağlarında α -bisabolol baskın bileşiktir. Ermenistan'da yetiştirilen *M. recutita*'nın uçucu yağı bisabolol oksit B, Ukrayna örneği ise bisabolon oksit A yönünden zengindir (Orav vd., 2010).

Romanya'nın dağlık bölgelerinden ağustos ayında hasat edilen *M. recutita* taze çiçekleri kullanılarak elde edilen uçucu yağın bileşenlerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, yağın büyük ölçüde seskiterpenlerden (%91,65), düşük miktarda monoterpenlerden (%3,88) oluştuğu ve bisabolol oksit A (%70,2) yönünden zengin olduğu ortaya konulmuştur. Uçucu yağın bileşiminde kamazulen tespit edilememiştir (Berechet vd., 2017).

Avusturya örneğinde ise uçucu yağ; bisabolol oksitler A ve B (sırasıyla %27,0 ve %27,5), α -bisabolol (%6,6), farnesen (%4,5), kamazulen (%3,5), (*Z*)- (%6,1) ve (*E*)-spiroeter (%0,6) içeriğiyle karakterize edilmiştir (Ganzera vd., 2006).

2.7.3. *Matricaria recutita* L.'nin uçucu yağı ve bileşenlerinin biyolojik aktiviteleri

M. recutita çiçeklerinden buhar distilasyonu yoluyla elde edilen ve birçok farmakopede tanımlanan *Matricariae aetheroleum* farmasötik açıdan, enflamasyon, enfeksiyon ve spazm gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak uygun farmasötik formlarda kullanılmaktadır. Uçucu yağ, seskiterpen lakton yapısındaki matrisinin dönüşüm ürünü olan kamazulen, seskiterpenik hidrokarbon olan (*E*)- β -farnesen, α -bisabolol, bisabolol oksit A ve B, bisabolon oksit A gibi oksijenli seskiterpenler ile karakterizedir. (Rhind, 2012; Schilcher, 2005a; Singh vd., 2011; Srivastava vd., 2010).

(-)- α -Bisabolol, genel olarak antiinflamatuar, antimikrobiyal, nöroprotektif ve dermatolojik etkileri nedeniyle farmasötik ve kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Baylac ve Racine, 2003; Brehm-Stecher ve Johnson, 2003; Leite vd., 2016; Ramazani vd., 2022). α -Bisabololün terapötik ve koruyucu aktivitelere sahip olması nedeniyle kullanılabilir potansiyelde olduğu bildirilmiştir (Eddin vd., 2022). Ayrıca kamazulen de antiinflamatuar aktiviteden sorumlu önemli bir bileşiktir (Safayhi vd., 1994).

2.7.3.1. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Aggag ve Yousef (1972) tarafından yapılan çalışmada papatya uçucu yağının Gram negatif, Gram pozitif bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Papatya uçucu yağının %0,05 v/v'den daha yüksek konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi Gram pozitif bakterilere karşı bakteriyostatik ve bakterisit, *C. albicans*'a karşı da etkili olduğu gözlenmiştir. %0,025'ten daha düşük konsantrasyonlarda ise uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi olmadığı, Gram negatif bakterilere karşı ise tüm konsantrasyonlarda etkisiz olduğu bulunmuştur.

Jamalian vd., (2012) yaptığı araştırma, *M. recutita*'dan elde edilen uçucu yağın patojenik dermatofitler için 2,5 ile 80 $\mu\text{g/mL}$ arasında, fırsatçı saprofitler için ise 15,62 ile 1000 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonlarda kullanıldığında tüm fungusların büyümesini engellediğini göstermiştir.

M. recutita uçucu yağının, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. flavus* ve *Fusarium culmorum*'a karşı büyüme inhibisyonu etkisi incelenmiş ve uçucu yağın 100 $\mu\text{L/mL}$ uygulamasında fungal misel inhibisyonunun en yüksek etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (El-Hefny vd., 2019).

α -Bisabolol oksit A (%48,22) yönünden zengin olan ve diğer ana bileşenleri arasında α -bisabolol oksit B (%23,31), bisabolol (%12,1) ve β -farnesen (%5,21) ve kamazulen (%2,42) bulunan *M. recutita* uçucu yağı, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *A. flavus*, *C. albicans* gibi patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite (MİK: 12,5-10 $\mu\text{g/mL}$) göstermiştir (Roby vd., 2013).

Zu vd., (2010) yaptığı çalışma, *M. recutita* uçucu yağının *Propionibacterium acnes* CMCC 65002 suşuna karşı zayıf antibakteriyel aktivitesi (MİK: 0,125 %v/v) olduğunu göstermiştir.

M. recutita'nın toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyonla elde edilen α -bisabolol oksit (%38) açısından zengin olan uçucu yağın ve içerisinde bulunan ana bileşenlerin Gram pozitif ve Gram negatif patojenik bakterilere karşı aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışma, *B. cereus*'un uçucu yağ ve ana bileşenlerine karşı daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca uçucu yağ bileşiminde bulunan α -bisabolol ve bisabolol oksitler antimikrobiyal aktiviteden sorumlu aktif bileşiklerdir (Kazemi, 2015).

Van Zyl vd., (2006) (-)- α -Bisabolol, *S. aureus* ATCC 25923'a karşı 143,9 mM (siprofloksasin: 0,75 μ M); *B. cereus* ATCC 11778'a karşı >143,9 mM (siprofloksasin: 0,09 μ M); *E. coli* ATCC 11775'ye karşı >143,9 mM (siprofloksasin: 1,81 μ M); *C. albicans* ATCC 10231'a karşı 36,0 mM (amfoterisin B B: 1,4 μ M) değerlerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Oliveira vd., (2017) tarafından, α -bisabololün Broth mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi *E. coli* ATCC 25922 (MİK: \geq 1024 μ g/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (MİK: 161,27 μ g/mL) ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (MİK: \geq 1024 μ g/mL) suşlarına karşı değerlendirilmiştir.

Pauli, (2006) α -bisabolol'ün ergosterol biyosentezini etkileyerek fungal büyümeyi inhibe ettiğini öne sürmüştür. Jahanshiri vd., (2017) tarafından ise, α -bisabolol'ün doza bağlı olarak *Aspergillus fumigatus* büyümesini (%35,53–77,17) ve ergosterol sentezini (%26,31–73,77) güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.

2.7.3.2. Antienflamatuvar aktivite çalışmaları

Lipoksigenazlar (LOXlar), hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan, HEM bulandırmayan demir içeren ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen dioksijenazlardır. Memelilerdeki LOX enzimleri, araşidonik asidin tercihli oksidasyon pozisyonuna göre 5-, 12- ve 15-LOX olarak adlandırılır ve 5-LOX, astım ve inflamasyonda önemli bir rol oynayan bir izoformdur (Mashima ve Okuyama, 2015). WHO monograflarında (1999), bisabolol ve bisabolol oksitin 5-lipoksijenaz (5-LOX)'ı inhibe ettiği ve bisabololün, bisabolol oksitten daha aktif olduğu bildirilmiştir. Baylac ve Racine (2003) tarafından yapılan çalışma göstermiştir ki; papatya uçucu yağı 5-LOX inhibitörüdür ($31 < IC_{50} \leq 50$ ppm). α -Bisabolol ise papatya uçucu yağından daha iyi bir inhibitör ($10 \leq IC_{50} \leq 30$ ppm) olarak ciltte yatıştırıcı özellik göstermektedir; ayrıca farnesol sentetik isomer karışımları da ($10 \leq IC_{50} \leq 30$ ppm) α -bisabolol gibi 5-LOX inhibitörüdür. Seskiterpen alkol içeren uçucu yağların da bu etkiyi gösterdiği saptanmıştır.

Kamazulen ($IC_{50} = 2 \mu M$) araşidonic asidin kimyasal peroksidasyonunu bloke eder ve konsantrasyona bağlı olarak lökotrien-B4 inhibitörüdür (Safayhi vd., 1994).

Papatya uçucu yağının antienflamatuvar etkisi yüksek kamazulen iğeriğiyle olduğu kadar, yüksek (-)- α -bisabolol iğeriğiyle de karakterizedir (Isaac, 1979).

Bazı ęevresel faktörler ve genetik yapının neden olduğu tekrarlayan alerjik bir deri hastalık olan atopik dermatit ve mast hücreleri ile ilişkili diğer hastalıklar için (-)- α -bisabolol umut verici terapötik bir ajan olarak önerilmiştir (Li vd., 2022).

2.7.3.3. Antioksidan aktivite ęalıřmaları

Farklı kemotiplere sahip papatya örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH* (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi kullanılmıştır. Sonuçlar papatya metanol ekstrelerinin papatya uçucu yağından daha yüksek antiradikal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. En yüksek antiradikal aktivite gösteren papatya uçucu yağ değeri 273,5 $\mu mol TE/100 g dw$ iken, yüksek antiradikal aktivite gösteren metanol ekstresi örneğinde bu değer 881,1 $\mu mol TE/100 g dw$ olarak belirlenmiştir. Papatya uçucu yağı örneklerinin serbest radikal süpürücü etkisi zayıf olmasına rağmen; örnekler içindeki indirgeyicilerin kapasitesini belirlemek amacıyla kullanılan FRAP yöntemine göre; papatya uçucu yağının, metanol ekstreleri ile benzer aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Formisano vd., 2015).

Kamazulen yönünden zengin papatya uçucu yağı DPPH serbest radikal süpürme yöntemiyle 350 $\mu g/mL$ 'de %78 etki göstermiştir ve bu değer aynı konsantrasyondaki BHT (%89) standardına yakındır (Farhoudi, 2013). Stanojevic vd., (2017) Yapılan araştırmada, papatya uçucu yağının en iyi antioksidan özelliği DPPH serbest radikal süpürme yöntemiyle 90 dakikalık inkübasyondan sonra 2,07 mg/mL IC_{50} değeri ile gösterilmiştir. β -Karoten testinde ise uçucu yağ, en iyi inhibisyon sonucu olan %82,5'i 120 dakika sonra vererek antioksidan aktiviteyi desteklemiştir (Owlia vd., 2007). DPPH serbest radikal süpürme ve β -karoten/linoleik asit yöntemiyle yapılan başka bir antioksidan aktivite ęalıřmasında, IC_{50} değeri Ayoughi vd., (2011) tarafından $5,63 \pm 0,20 mg/mL$ olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir ęalıřmada (-)- α -bisabololün *in vitro* DPPH radikal süpürücü etkisi $IC_{50} > 449,7 \mu M$ (askorbik asit = 17,03 μM) olarak belirlenmiştir (Van Zyl vd., 2006). Bir diğer ęalıřmada, α -bisabololün *in vitro* DPPH* testinde zayıf antiradikal aktivite ($IC_{50} > 10,000 \mu g/mL$) gösterdiği bildirilmiştir (Ren vd., 2018).

Kolon kromatografisi ile papatya uçucu yağından izole edilen ve saflaştırılan kamazulenin indirgenme gücü ve antioksidan aktivitesi referans antioksidanlar [askorbik asit, α -tokoferol ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)] ile karşılaştırılmıştır. Kamazulen ($IC_{50} = 7,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) α -tokoferolden ($IC_{50} = 238,9 \pm 3,6 \mu\text{g/mL}$) daha yüksek; BHT ($IC_{50} = 6,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) ve askorbik asit ($IC_{50} = 3,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) ile yakın indirgenme gücü göstermiştir. Fosfomolibdenyum yöntemine göre kamazulenin ($IC_{50} = 6,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) toplam antioksidan kapasitesi, tüm referans antioksidan bileşiklerden (askorbik asit- $IC_{50} = 12,8 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$; BHT- $IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ve α -tokoferol- $IC_{50} = 20,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) daha yüksek bulunmuştur. ABTS* ile test edildiğinde kamazulenin ($IC_{50} = 3,7 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), önemli ölçüde yüksek serbest radikal süpürme aktivitede olduğu belirlenmiştir. DPPH* testinde ise etkisiz olduğu bildirilmiş; bu durumun olası nedeni olarak kamazulenin, stabil nitrojen merkezli DPPH radikali ile etkileşime girmesi olarak açıklanmıştır (Capuzzo vd., 2014).

2.7.3.4. Diğer biyolojik aktivite çalışmaları

(-)- α -Bisabolol'ün sıçanlardan elde edilen çeşitli düz kaslar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, (-)- α -bisabolol'ün duodenal şeritler üzerinde gevşetici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. (-)- α -bisabolol duodenumda spontan kasılmaları tamamen azaltırken, idrar kesesi dokusunda amplitüdlerini artırmıştır. Çalışma, (-)- α -bisabolol'ün düz kaslarda biyolojik olarak aktif olduğunu ve voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının bir inhibitörü olabileceğini ortaya koymuştur (De Siqueira vd., 2012).

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, bitkisel kaynaklı uçucu yağların UV filtrasyonu özelliği ile güneşin zararlı ışınlarından koruyucu etkileri araştırılmaktadır. α -Bisabolol oksit A yönünden zengin olan ve bileşiminde (*E*)- β -farnesen ve kamazulen de içeren papatya uçucu yağının kullanıldığı çalışmada, kullanılan diğer uçucu yağlara (karanfil, zencefil, kekik vs.) göre en yüksek SPF (güneş koruma faktörü) değerini papatya uçucu yağı (9,1) göstermiştir. Papatya uçucu yağının yüksek SPF değerinin, konjuge çift bağlar içeren (*E*)- β -farnesen ve kamazulen gibi bileşiklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Alfeetouri vd., 2019).

Ana bileşenleri α -bisabolol oksit A (%28), α -bisabolol oksit B (%17,1), (*Z*)-farnesen (%15,9) ve α -bisabolol (%6,8) olarak belirlenen *M. recutita* uçucu yağının farelerin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisi bazı davranış yöntemleri kullanılarak

araştırılmıştır. Sonuç olarak, papatya uçucu yağının (50 ve 100 mg/kg) etki profili, tipik psikostimülan olan kafeine benzer (Can vd., 2012).

Bisabololün mide asidi miktarında herhangi bir değişiklik meydana getirmeden mideden salgılanan pepsin miktarını azalttığı tespit edilmiş ve bu nedenle mide ve üst bağırsak hastalıklarının tedavisinde önerilmiştir (Mills 1979'dan aktaran Singh vd. 2011).

α -Bisabololün, hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde toksik etkisinin olmadığı, seçici olarak normal sağlıklı hücreleri etkilemeden, kanser hücrelerini apoptoz yoluyla öldürdüğü raporlanmıştır (Darra vd., 2007). Cavalieri vd., (2004) Yaptığı çalışmada α -bisabololün, insan ve ratlardaki glioma hücrelerinde zamana ve doza bağımlı güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Malignite tedavisinde kullanılan sisplatin'in neden olduğu nefrotoksisitenin, (-)- α -bisabolol ile tedavi edilmesi ya da etki mekanizmasının değerlendirilmesini amaçlayan çalışmada, bisabololün sisplatin nedenli hasarı azalttığı gözlenmiştir. Bu koruyucu etkinin sisplatin ile ilişkili enflamasyonun, oksidatif stresin ve DNA hasarının azaltılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Zaaba vd., 2022).

Alzheimer hastalığı beyindeki tubulinin azalması ile karakterizedir. Farmakolojik olarak antihistaminiklere olan benzerliği ve aromatik yapıda olması yanında antioksidant ve antienflamatuvar etkileri ile de bilinen kamazulen ile; 5,5-dimetil-sikloheksan,1,3-dion ve 3-metoksi,2-sikloheksan-1-on'un ayrı ayrı reaksiyonu sonucu sentezlenen bileşiklerin tubulin polimerizasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca tek başına kullanılan kamazulenin de konsantrasyondan bağımsız olarak tubulin polimerizasyonu artırıcı etkiye sahip olması Alzheimer hastalığı için potansiyel kullanıma sahip olabilir (Nezhati vd., 2015).

Sakhteman vd., (2020) tarafından "DruLiTo" yazılımı kullanılarak bisabolol oksit A ve bisabolon oksitin ilaç benzerliği *in silico* yöntem ile incelenmiştir. Bisabolol oksit A'nın aromataz, östrojen, progesteron, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ile asetilkolin ve dopamin reseptörleriyle etkileşime girebileceği bildirilmiştir. Her iki molekülün de ilaç benzeri yapıda ve kan beyin bariyerinden geçebilir olduğu belirtilmiştir.

2.7.4. *Matricaria recutita* L.'nin uçucu yağı ve bileşenlerinin toksisitesi

M. recutita uçucu yağının akut oral toksisitesi (5 g/kg) ratlar üzerinde değerlendirilmiştir. Uygulamayı takiben 14 günlük gözlem süresinde, ratlardan hiçbir

ölmemiş ve LD₅₀ değeri > 5 g/kg olarak rapor edilmiştir. Papatya uçucu yağının tavşanlar üzerinde akut dermal toksisite LD₅₀ değeri > 5 g/kg olarak bildirilmiştir (Johnson Jr. vd., 2018). Fakat papatya uçucu yağının kemotiplerine bağlı olarak farmakolojik ve toksikolojik etkileri değişebilmekte; bu nedenle bileşenlerinin ayrıca araştırılması yanında, özellikle bisabolol oksitler üzerinde daha fazla veriye ihtiyaç vardır (Isaac, 1979).

α -Bisabololün farelerde akut toksisitesine bağlı oral LD₅₀ değeri 15,1 mL/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Erkek ve dişi ratlarda LD₅₀ değerleri sırasıyla 14,9 mL/kg ve 15,6 mL/kg olarak bildirilmiştir (Andersen, 1999). Eddin vd., (2022) raporladığı üzere, aerosol haline getirilmiş α -bisabolole inhalasyon yoluyla maruz kalan ratlarda lezyona veya ölüme neden olmamıştır. Suda yaşayan organizmalar için toksik olabileceği bildirilmiş olsa da α -bisabolol, düşük toksisitesi nedeniyle FDA tarafından GRAS kategorisinde kabul edilmektedir (Ramazani, 2022). Van Zyl vd., (2006) tarafından, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) *in vitro* testi ile (-)- α -bisabololün insan böbrek epitel hücreleri üzerine toksisite profili 41,8 μ M (kinin: 71,20 μ M) olarak belirlenmiştir.

Aliivibrio fischeri biyoluminesans inhibisyon testi ile farnesen izomerleri karışımı ve α -bisabololün *in vitro* toksisitelerinin araştırıldığı çalışmada, 5 mg/mL konsantrasyonda, bakteri biyoluminesansı üzerinde; farnesen izomerleri karışımı %30,15 ve α -bisabolol %10,75 inhibe edici etki göstermiştir (Göger vd., 2018).

2.8. Biyotransformasyon ve Mikrobiyal Transformasyon

Biyotransformasyon, belirli bir başlangıç maddesinin (substrat), doğal ve rekombinant mikroorganizmaların (maya, fungus, bakteri), enzimlerin, canlı hücrelerin katalizör olarak kullanılarak yapısal benzerliğe sahip farklı bir ürüne dönüştürülmesidir, türevlendirilmesidir (Leresche ve Meyer, 2006; Hegazy vd., 2015). Biyotransformasyon, son yıllarda gıda, kiral ilaç endüstrisi, vitaminler, özel kimyasalların üretimi gibi alanlarda önemli bir rol oynamaktadır (Doble vd., 2004; Meghwanshi vd., 2020; Hauer, 2020).

Mikrobiyal transformasyon ise özellikle, mikroorganizmaların (bakteri, fungus, maya) metabolik ve enzimatik aktivitelerinden faydalanarak, biyoaktif substratların kimyasal yapılarını değiştirmeyi hedef alan, reaksiyon ve reaksiyonlar olarak kabul edilir (Cano-Flores vd., 2020). Mikroorganizmalar, çok çeşitli enzimleri üreten kaynaklardan

biridir ve bu enzimlerin çeşitli endüstriyel uygulamaları vardır. Substrata hem de reaksiyona göre enzimler olarak 6 sınıfa ayrılır: oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar (Gurung vd., 2013). Özellikle funguslar, substratların biyotransformasyonu için gerekli olan hücre içi ve hücre dışı çok sayıda enzim üretirler; bunlardan en önemlileri hidrolazlar ve oksidoredüktazlar sınıfına aittir (El-Gendi vd., 2022). Ayrıca mikroorganizmalar büyümek ve çoğalmak için uygun bir indirgenmiş karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar ve normal kültür ortamı koşullarında bu kaynak genellikle karbonhidratlardır; ancak toksik olan moleküllerde dahil olmak üzere diğer karbon kaynaklarını da büyük ölçüde metabolize edebilirler (Doble vd., 2004; Bonnet vd., 2020).

Sentezlenmesi zor olan doğal bileşikler mikroorganizmalar ile biyoteknolojik olarak kolayca türevlendirilebilir ve bu durum aynı zamanda büyük ölçekte üretimi de kolaylaştırır (Pham vd., 2019). Elde edilen metabolitler, substratlarından farklı fiziksel-kimyasal özelliklere, daha etkin biyolojik aktiviteye sahip olabilmektedir (Straathof, 2002; Longo ve Sanroman, 2006). Mikrobiyal transformasyonda; oksidasyon, redüksiyon, hidroliz, izomerizasyon, kondenzasyon, yeni karbon bağlarının oluşumu ve fonksiyonel grupların eklenmesi gibi reaksiyonlar gerçekleşir (Zhan ve Gunatilaka 2006; Smitha vd., 2017).

Mikrobiyal biyotransformasyonun doğal bir fermantasyon yöntemi olması, düşük maliyetli olması, çevre dostu olması, yüksek spesifikliğe sahip olması, geniş kapsamlı olması, bazı bileşiklerin geri kazanımı ve yeniden kullanımı gibi birçok avantajı vardır. Mikroorganizmalar doğada yaygın olarak bulunurlar ve doğal olarak biyotransformasyon süreçlerinde yer alırlar. Elde edilen ürünler, yani transformasyon metabolitleri de doğal kabul edilmektedir. Biyotransformasyon süreci, diğer kimyasal işlemlere göre daha düşük maliyetlidir. Ayrıca, süreçte kullanılan mikroorganizmaların çoğu ucuz ve kolayca elde edilebilir. Mikrobiyal transformasyonda gerçekleşen reaksiyonlar genellikle nötre yakın pH'ta, ortam sıcaklığında ve atmosferik basıncında gerçekleşir. Buna karşılık, kimyasal sentezler sert kimyasal reaktiflerin kullanımını, ekstrem sıcaklık, basınç koşullarını gerektirebilir. Bu nedenlerden dolayı mikrobiyal transformasyon, seskiterpenlerin üretiminde krom ve mangan gibi toksik ağır metallerin kullanımını gerektiren sentetik yöntemlerden daha çevre dostu bir sentez yöntemi olarak önerilmektedir. Ayrıca mikrobiyal biyotransformasyon, çevreye zarar vermeden kirleticilerin degradasyonunu sağlar. Mikrobiyal biyotransformasyon süreçleri, yüksek yanıt özgüllüğüne, enantiyo

seçiciliğe ve bölgesel özgülüğe sahiptir. Böylece yan ürünlerin oluşumunu da en aza indirir. Mikrobiyal biyotransformasyon, birçok farklı yapıdaki bileşiklerin (hidrokarbonlar, farmasotik maddeler gibi) dönüştürülmesinde kullanılabilir. Mikrobiyal biyotransformasyon, bazı bileşiklerin geri kazanımını ve yeniden kullanımına da olanak sağlar. Ayrıca bazı mikroorganizmalar, ağır metal iyonlarının sudan uzaklaştırılmasında kullanılır ve bu sayede ağır metal iyonlarının geri kazanımı da mümkün olur (Gavrilescu ve Chisti, 2005; Hegazy vd., 2015; Smitha vd., 2017; Diep vd., 2018; Cano-Flores vd., 2020; Sambyal ve Singh, 2020; Qin ve Dong, 2023).

2.8.1. Seskiterpenlerin mikrobiyal transformasyonu

Literatürde, monoterpenlerin biyotransformasyonu özellikle son 40 yılda oldukça kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Bhatti vd., 2014; Demirci vd., 2004; Farooq vd., 2002); bununla birlikte α -bisabolol, α -bisabolol oksit A ve B, farnesen gibi parfümeri ve ilaç endüstrisi için değerli olan seskiterpenlerin biyotransformasyonu ile ilgili çalışma nispeten azdır.

Seskiterpenler, birçok bitkide ve canlıda doğal olarak bulunan, üç izopren biriminin kondenzasyonu ile oluşan 15 karbonlu yapıya sahip, biyolojik olarak önemli terpen türevlerinin en geniş sınıfıdır. Seskiterpenlerin kimyasal yapısından yararlanarak, farklı koku-tat ve biyolojik olarak daha aktif bileşiklerin sentezlenmesi için çeşitli mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmektedir (Zhou vd., 2012; Arizmendi vd., 2022; Bhatti vd., 2009).

Mikrobiyal transformasyon, substrat bileşiklerinin suda çözünebilir daha polar metabolitlerini elde etmek için etkili bir yöntemdir (Yang vd., 1999; Park vd., 2022).

Lamare ve Furstoss (1990), mikroorganizmalar tarafından 25'ten fazla seskiterpenoitin biyotransformasyonunu incelemiştir. Seskiterpen hidrokarbonların biyotransformasyonları genellikle çok yavaş ve düşük verimle gerçekleşmektedir. Substrattaki polar bir fonksiyon varlığı, biyotransformasyonun nispeten daha hızlı ve daha yüksek verimle ilerlemesini sağlamaktadır (Abraham vd., 1992).

Asakawa ve Noma (2016) yeşil algler, mantarlar ve memeliler tarafından bisabolol, sedrol, farnesol, santalol, karyofilen, elemol, nerolidol germakron gibi seskiterpenoit yapıdaki moleküllerin biyotransformasyonu hakkında birçok araştırmayı incelemişlerdir. Seskiterpenlerin biyotransformasyonunda özellikle *Glomerella cingulata*, *A. niger*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. fungusları kullanılmıştır (Miyazawa vd., 1995;

Arantes ve Hanson, 2007; García-Granados vd., 2009; Asakawa ve Noma, 2016; ElGamal vd., 2023). Valensiya portakal yağından elde edilen valensen seskiterpeni yeşil algler ve fungi gibi farklı mikroorganizmaların kullanımı ile verimli bir şekilde kozmetik endüstrisinde talep gören pahalı greyfurt aroması olan seskiterpen notkatona dönüştürülebilmektedir (Furusawa vd., 2005).

Seskiterpenler için en yaygın mikrobiyal transformasyon reaksiyonlarından biri, seskiterpen iskeletine bir hidroksil grubu ekleyen dönüşümlerdir. Diğer bir yaygın biyotransformasyon yolu, seskiterpen iskeletinde karbonil gruplarının veya epoksit gruplarının oluşumuyla sonuçlanabilecek oksidasyondur. Moleküle hidrojen atomları ekleyen indirgeme reaksiyonları oluşabilir ve değişmiş stereokimyaya sahip seskiterpenlerin oluşumuyla da sonuçlanabilir (Bhatti vd., 2009; Asakawa ve Noma 2016).

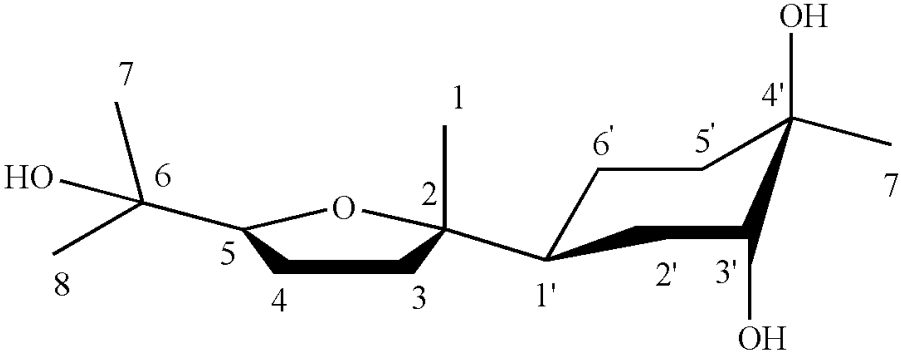
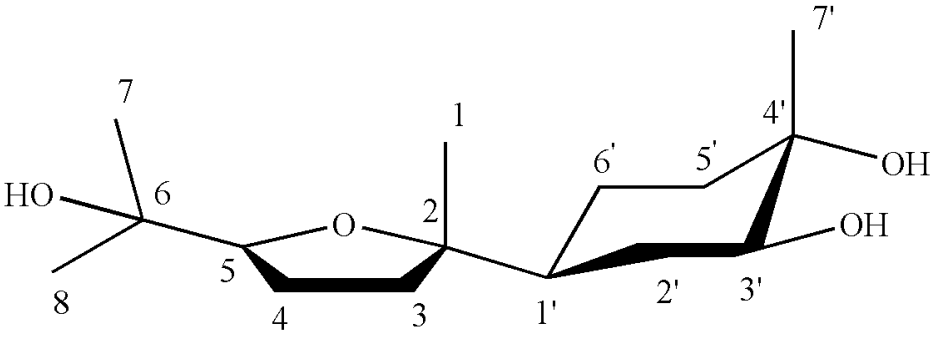
2.8.1.1. (-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu

Levomenol olarak da bilinen (-)- α -bisabolol, esas olarak *M. recutita* L. uçucu yağında bulunan doğal bir monosiklik seskiterpen alkoldür (Schilcher, 2005a). (-)- α -Bisabolol, genel olarak antienflamatuvar, antimikrobiyal ve dermatolojik etkileri nedeniyle farmasötik ve kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Leite vd., 2016; Baylac ve Racine, 2003; Brehm-Stecher ve Johnson, 2003).

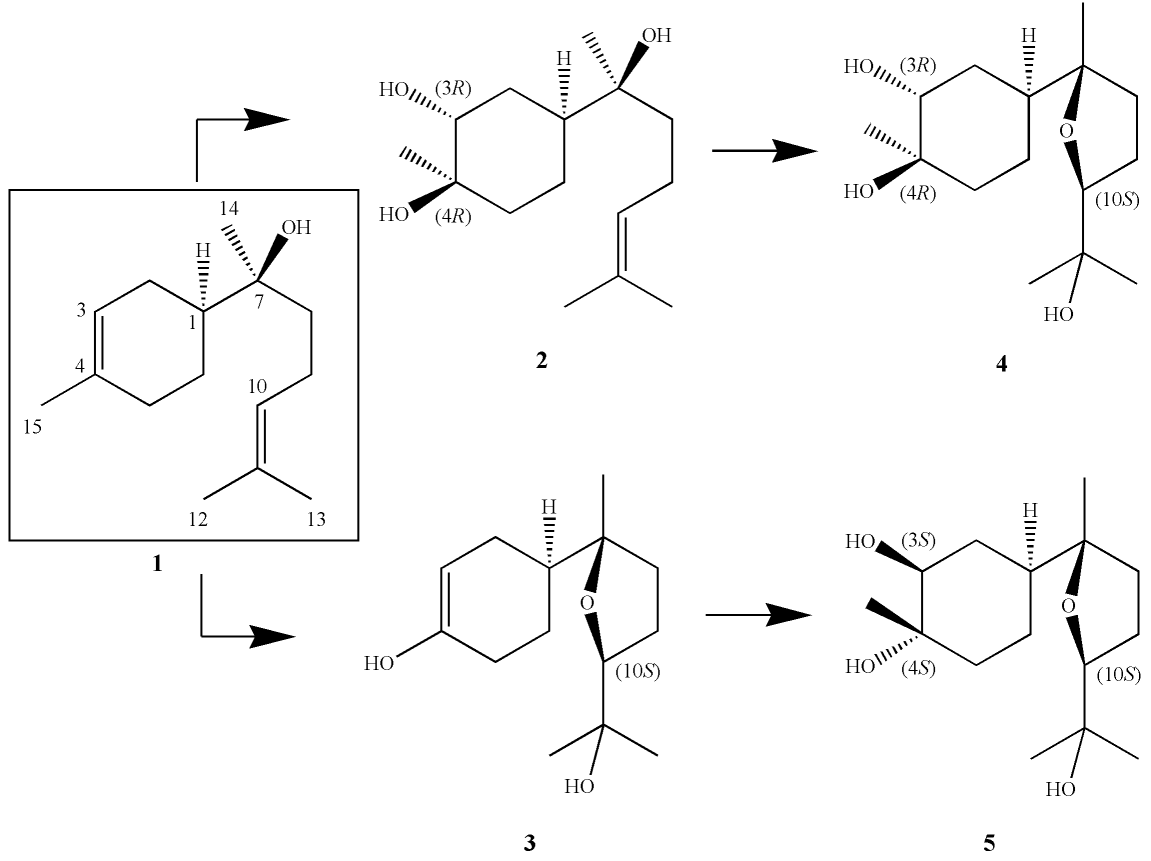
(-)- α -Bisabololün *A. niger* tarafından biyotransformasyonu, (-)- α -bisabolol oksit B (Miyazawa vd., 1990); (-)- α -tetrahidrobisabolen-2,5,6-triol (Miyazawa vd., 1992a) ve 6-metil-2-(4'-metilsikloheksan-1'-il)-2,5-epoksi-heptan-3',4',6-triol (Miyazawa vd., 1992b) ile sonuçlanmıştır.

(-)- α -Bisabololün *Glomerella cingulata* tarafından biyotransformasyonu ile (2*S*,5*S*,1'*S*,3'*R*,4'*R*)-6-metil-2-(4'-metilsikloheksan-1'-il)-2,5-epoksi-heptan-3',4',6-triol majör metabolit olarak oluşmuş (Miyazawa vd., 1993a) ve bu molekülün stereoizomeri olan ikincil majör metabolit de izole edilerek (2*S*,5*S*,1'*S*,3'*S*,4'*S*)-6-metil-2-(4'-metilsikloheksan-1'-il)-2,5-epoksi-heptan-3',4',6-triol tanımlanmıştır (Miyazawa vd., 1993b) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. (-)- α -Bisabololün *G. cingulata* ile biyotransformasyonu sonucu izole edilen metabolitler

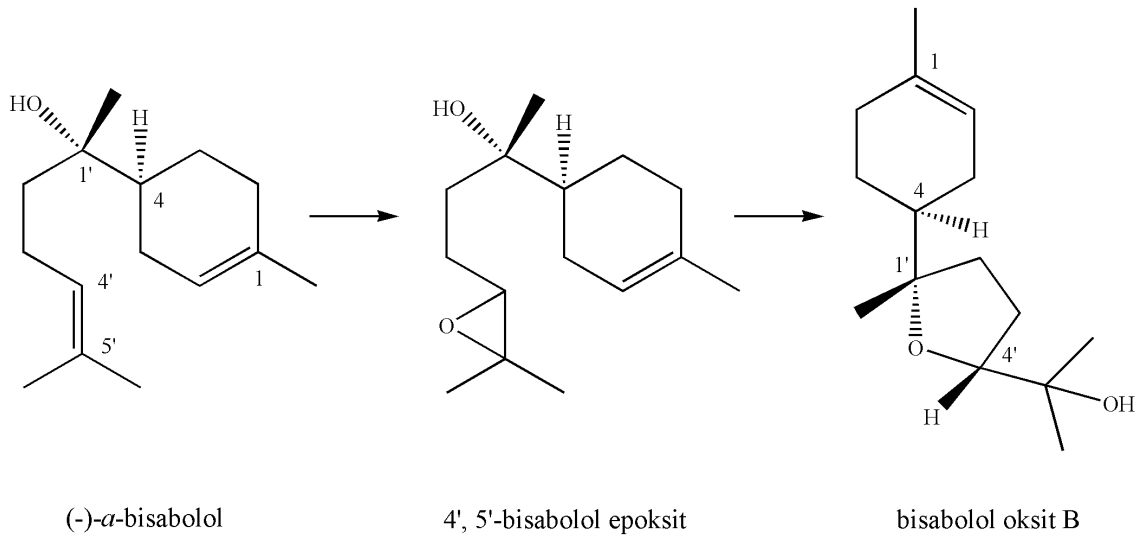
Metabolit	Kaynak
 <p>(2S,5S,1'S,3'R,4'R)-6-metil-2-(4'-metilsikloheksan-1'-il)-2,5-epoksi-heptan-3',4',6-triol</p>	Miyazawa vd., (1993a)
 <p>(2S,5S,1'S,3'S,4'S)-6-metil-2-(4'-metilsikloheksan-1'-il)-2,5-epoksi-heptan-3',4',6-triol</p>	Miyazawa vd., (1993b)

Miyazawa vd., (1995)'nin yaptığı bir çalışmada (-)- α -bisabololün (**1**) *G. cingulata* ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu sonucu önerilen metabolik yolak şu şekildedir: Substrat öncelikle (1S,3R,4R,7S)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol (**2**) ve bisabolol oksit B'ye (**3**) dönüşmüştür. Bileşik (**2**) daha sonra (1S,3R,4R,7S,10S)-3,4-dihidroksi-bisabolol oksit B'ye (**4**), bileşik (**3**) ise (1S,3R,4R,7S,10S)- (**5**) ve (1S,3S,4S,7S,10S)-3,4-dihidroksi-bisabolol oksit B'ye (**4**) dönüşmüştür (Şekil 2.5).



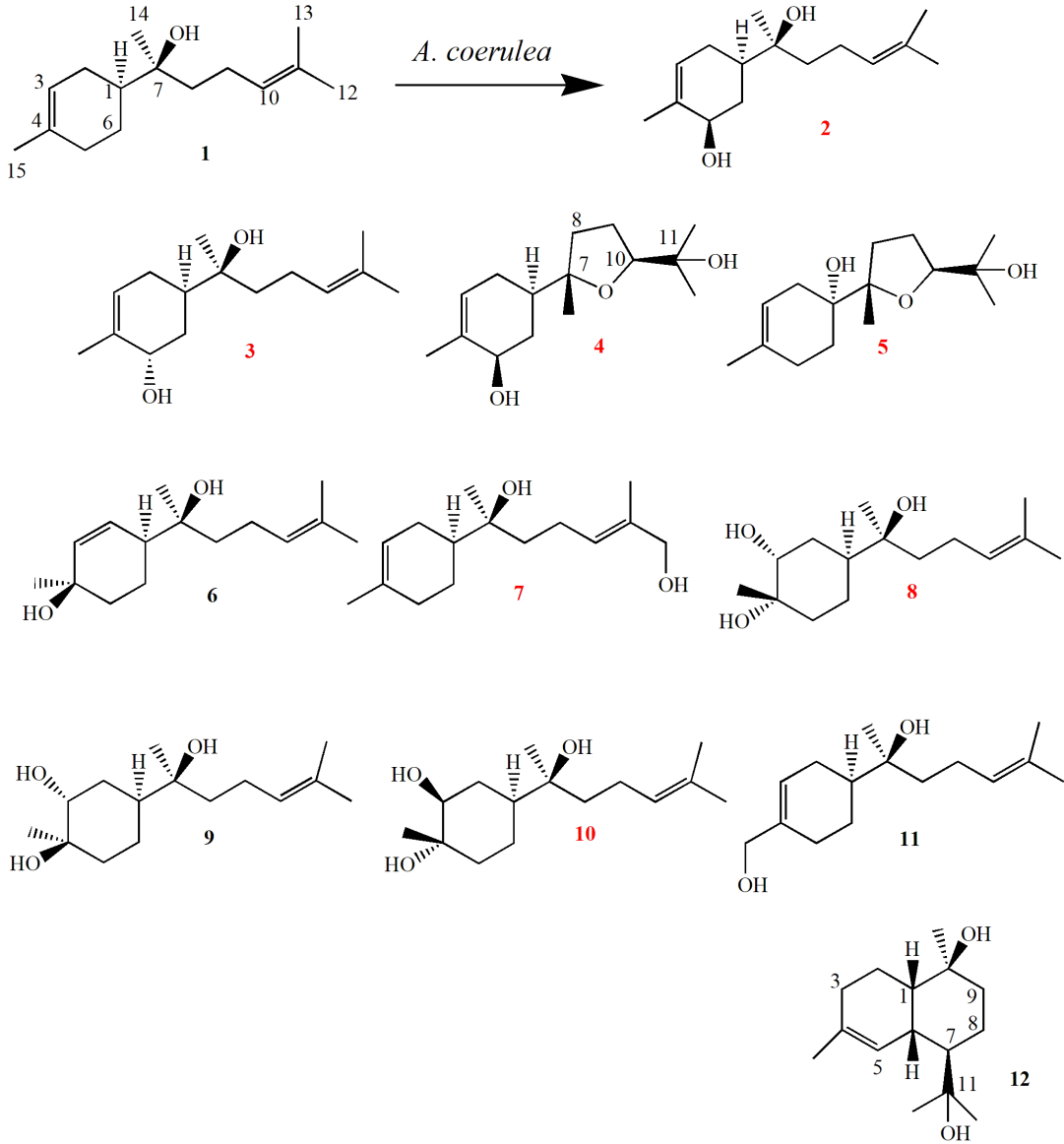
Şekil 2.5. (-)- α -Bisabololün *G. cingulata* ile metabolik yolağı (Miyazawa vd., 1995)

Limberger vd., (2003) yaptığı çalışmada (-)- α -bisabolol, *Bipolaris sorokiniana* biyotransformasyonu ile oksidatif dönüşüm yoluyla bisabolol oksit B'ye dönüşmüştür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. (-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ile bisabolol oksit B'ye dönüşümü (Limberger vd., 2003)

Yeni bir çalışma kapsamında Park vd., (2022) *Absidia coerulea* ile (-)- α -bisabololün (1) biyotransformasyonundan 7 yeni [(1*R*,5*R*,7*S*)-5-hidroksi- α -bisabolol (2); (1*R*,5*S*,7*S*)-5-hidroksi- α -bisabolol (3); (1*R*,5*R*,7*S*,10*S*)-5- hidroksibisabolol oksit B (4); (1*R*,7*S*,10*S*)-1-hidroksibisabolol oksit B (5); 12-hidroksi- α -bisabolol (7); (1*S*,3*R*,4*S*,7*S*)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol (8); (1*S*,3*S*,4*S*,7*S*)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol (10)] ve 4 bilinen [(1*S*,7*S*)-4,7-dihidroksi- α -bisabolol (6); (1*S*,3*R*,4*R*,7*S*)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol (9); 15-hidroksi- α -bisabolol (11); 11-hidroksi-T-muurolol (12)] metabolit olmak üzere toplam 11 metabolit oluşmuştur (Şekil 2.7). Oluşan metabolitler, substrata göre suda daha yüksek çözünürlük sergilemiştir.

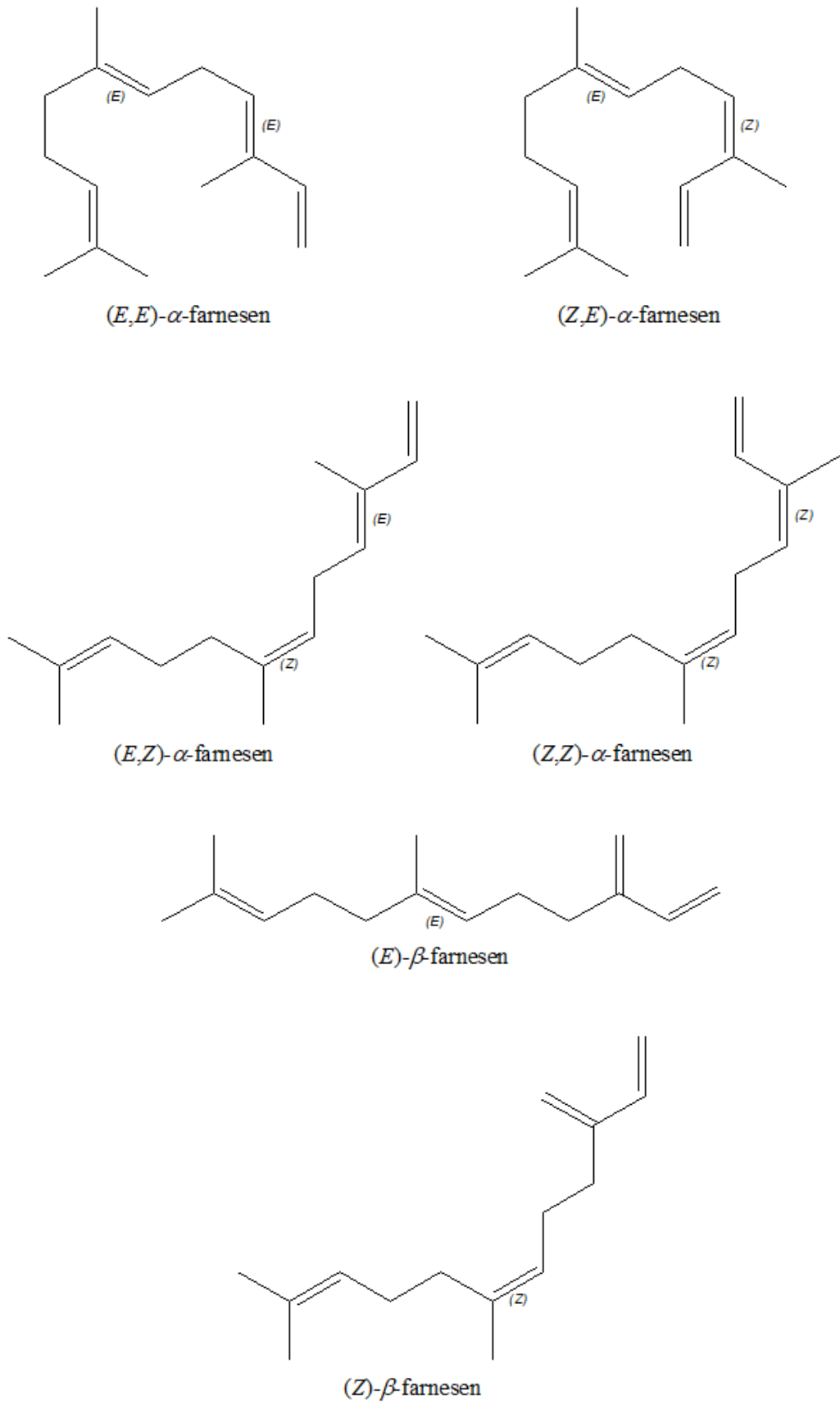


Şekil 2.7. (-)- α -Bisabololün *Absidia coerulea* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler (Park vd., 2022) (yeni metabolitler kırmızı ile renklendirilmiştir)

2.8.1.2. Farnesenin mikrobiyal transformasyonu

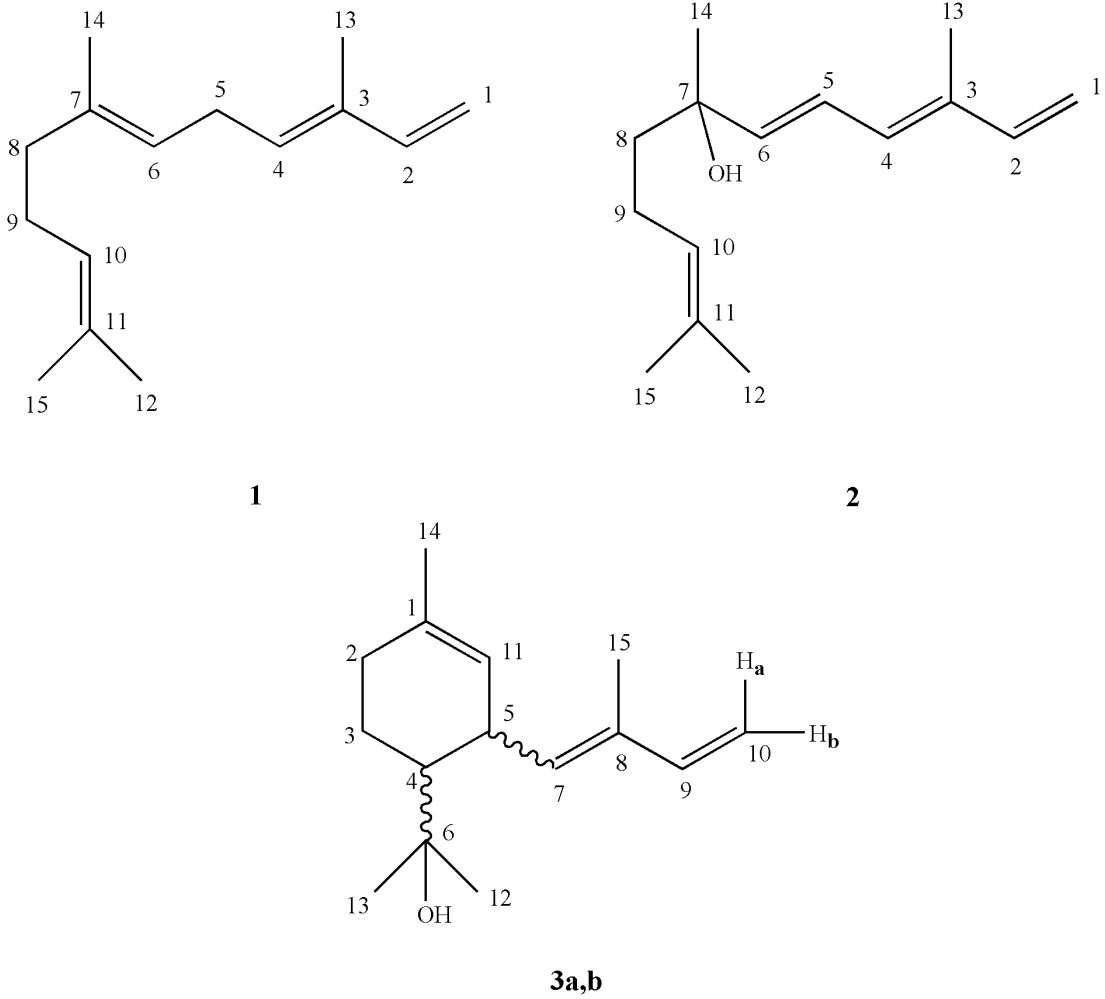
Farnesen ($C_{15}H_{24}$), ilk olarak elma kabuklarından izole edilen asiklik yapıda uçucu bir seskiterpendir (Liu vd., 2022). Özellikle dizel yakıt ve polimer üretimi, ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi alanlarda kullanımı bulunmaktadır (Tang vd., 2021). α -Farnesen (3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodekatetraen) ve β -farnesen (7,11-dimetil-3-metilen-1,6,10-dodekatrien) izomeri olmak üzere, altı stereoizomere [(*E,E*)- α -farnesen, (*E,Z*)- α -farnesen, (*Z,E*)- α -farnesen, (*Z,Z*)- α -farnesen, (*E*)- β -farnesen, (*Z*)- β -farnesen] (Şekil 2.8) sahiptir (Chuang vd., 2021; Liu vd., 2022).

Hasat zamanı ve depolama koşullarına bağlı olarak özellikle elma, armut gibi meyvelerde meydana gelen yüzeysel kabuk yanıklığı gelişiminin nedeni α -farnesenin oksidasyon ürünleridir (Dias vd., 2020). (*E*)- β -farnesen Aphid'ler tarafından bir alarm feromonu olarak salgılanması yanında (Vander moten vd., 2012) bazı bitkilerin (*Polygonum hydropiper*, *Solatum berthaultii*, *M. recutita*) uçucu yağındaki ana bileşendir (Gibson ve Pickett, 1983; Miyazawa ve Tamura, 2007; Ayoughi vd., 2011) ve Aphid'lere karşı dolaylı savunma sağlar; bu nedenle tarımsal koruma ajanı olarak kullanımı önerilmektedir (McPhee, 2013). Sentetik β -farnesen, farklı yöntemlerle üretilir; fakat en yaygın olanı izoprenin trimerizasyonu ve nerolidol ve farnesol gibi seskiterpenik alkollerin dehidrasyonudur. Ancak, sentezlenmesindeki stereo kontrol eksikliği nedeniyle elde edilen ürün, farnesen izomerleri ve yan ürünlerin bir karışımı olarak tanımlanabilir (McPhee, 2013).



Şekil 2.8. Farnesenin stereoizomerleri

Krings vd., (2006) tarafından, farnesenin fungal transformasyonu ile aktif koku alkollerinin üretimi araştırılmıştır. Bu amaçla *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum* ve farklı izole funguslar kullanılmıştır. α -Farnesenin (**1**) tüm dönüşümlerinde yüksek verimli ana oksidasyon ürünü narenciye benzeri kokuya sahip 3,7,11-trimetildodeka-1,3(*E*),5(*E*),10-tetraen-7-ol (**2**) olarak belirlenmiştir. Mangodan izole edilen *A. niger* suşu, α -farnesenden şeftali gibi kokuya sahip yeni doğal bir bileşik olan diastereomerik *p*-ment-1-en-3-[2-metil-1,3-butadienil]-8-ol olarak belirlenen iki farklı terpen alkol (**3a,b**) üretmiştir (Şekil 2.9). β -Farnesenin biyodönüşümü için, test edilen suşların hiçbirinde ara ürünlerin oluşumu gözlenmemiştir. Abraham vd., (1992) tarafından β -farneseni mikroorganizmalarla okside etme çalışmalarında da, substratın tamamen tüketilmesine bağlı olarak hiçbir metabolit tespit edilememiştir. Bu sonucun olası nedeni, konjuge dienin oksijene ve asitlere olan duyarlılığı olarak belirtilmiştir.



Şekil 2.9. α -Farnesenin mikrobiyal transformasyonu sonucu oluşan metabolitler (Krings vd., 2006)

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ ve Standart Maddeler

Farmakope kalitesindeki *Matricaria recutita* L. uçucu yağı Phatrade-Pharaonic Essential Oils (Kahire, Mısır) firmasından ve tez çalışmasında kullanılan standartlar (-)- α -bisabolol (Sigma-Aldrich, $\geq\%95$), (-)- α -bisabolol oksit A (Sigma-Aldrich, $\geq\%95$), kamazulen (Sigma-Aldrich $\geq\%92$ ve ABCR $\%95$), (*E*)- β -farnesen (Sigma-Aldrich, $\geq\%90$), farnesen izomerleri karışımı (Stabilize, Sigma-Aldrich) ticari olarak temin edilmiştir (EK-1).

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler

Deneysel yöntem içerisinde kullanımı belirtilen diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich, Merck, Carlo Erba, Fluka tarafından satın alınmıştır.

3.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Analitik terazi (Radwag AS 310.R2)
- Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific Excella E25)
- Döner buharlaştırıcı (Heidolph veya Buchi)
- Fourier transform infrared spektrometresi (Perkin Elmer Spektrum 100, USA)
- Gaz kromatografisi (Agilent 6890N GC)
- Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi (Agilent 5975 GC-MSD)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR 3001)
- İnkübatör (Heraeus T6 veta MMM-Incucell)
- McFarland densitometre (DEN-1B, Biosan)
- Mikroplaka okuyucu (BioTek PowerWave XS veya BioTek Synergy H1)
- Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (Bruker UltraShield 500)
- Otoklav (Hirayama HV-50)
- Otomatik ince tabaka kromatografi örnekleme cihazı (Camag ATS4)
- Otomatik ve multikanal pipetör seti (Brand ve Eppendorf)
- Pastör fırını (Ecocell)
- pH metre (Heidolph, Germany)

- Polarimetre (Krüss Optronic P8000-T, Germany)
- Sıvı kromatografi iyon tuzaklı uçuş zamanlı kütle spektrometresi (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- Steril kabin (Heal Force)
- Ultra derin dondurucu (New Brunswick Scientific)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Sonorex)
- Ultraviyole ışık kabini (Camag)
- Vakumlu konsantratör (Labconco)
- Vorteks (Ika Genius 3)

3.4. Optik Çevirme Açısı

Optikçe aktif olan standart maddelerin [(-)- α -bisabolol, (-)-bisabolol oksit A] ve kromatografik–spektroskopik teknikler ile yapısı aydınlatılan metabolitin etil asetat içerisindeki bilinen konsantrasyonları; 2,5 mm tüp içerisinde, 25 °C ve 589 nm'deki çevirme açıları, polarimetre cihazında (Krüss Optronic P8000-T, Germany) okunmuş ve özgül çevirme derecesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (3.1).

$$[\alpha]_D^{25} = a / l \times c \quad (3.1)$$

$[\alpha]$; özgül çevirme derecesi,

25; sıcaklık

D ; sodyum lambası

a ; cihazda okunan çevirme açısı,

l ; dm olarak tüpün uzunluğu,

c ; gr/mL olarak örneğin derişimidir.

3.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Sabit faz için alüminyum destek üzerine silikajel 60 GF₂₅₄ 20x20 ebatlarında hazır plaklar (Merck); hareketli faz için etil asetat/toluen 5:95 (Ph. Eur. 8.0), diklorometan (Ashnagar vd., 2009), susuz Na₂SO₄'te kurutulmuş kloroform (Hahn-Deinstrop, 2007), kloroform/toluen 75:25 (Wagner ve Bladt, 1996; Medic-Saric vd., 1997; Ashnagar vd., 2009; Ozdemir vd., 2021) ve ilave olarak kloroform/toluen 90:10, *n*-hekzan/etil asetat 50:50, *n*-hekzan/etil asetat 75:25, *n*-hekzan/etil asetat 90:10, toluen/kloroform 75:25, *n*-hekzan/klorofom 50:50 gibi farklı çözücü sistemleri kullanılmıştır.

UV absorpsiyonu (254/366 nm) olmayan maddelerin belirlenmesinde renk reaktifi olarak vanilin-sülfürik asit veya anisaldehit-sülfürik asit sonrası 100-105 °C’de 3-5 dk’da (Heidolph, MR 3001) görülebilir hale getirilmiştir.

3.5.1. Vanilin-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması

Ashnagar vd., (2009) 8 mL etanolde hazırlanan %5’lik sülfürik asit çözeltisinin ilk sprey olarak plakalara püskürtülmesinin hemen ardından, etanolde hazırlanan %1’lik vanilin çözeltisi ikinci belirteç olarak uygulanmıştır.

3.5.2. Anisaldehit-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması

Anisaldehit-sülfürik asit reaktifi 0,5 mL anisaldehit, 10 mL glasiyel asetik asit, 85 mL metanol ve 5 mL der. sülfürik asit belirtilen sıra ile karıştırılarak hazırlanmış, reaktif kırmızı-viyole renk oluşumuna kadar +4 °C muhafaza edilerek kullanılmıştır (Sakar ve Taner, 1991).

3.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep-İTK)

α -Bisabolol ve farnesen izomerleri karışımı ticari kaynaklardan temin edilerek, kamazulen ve α -bisabolol oksit karışımı (A ve B) ise papatya uçucu yağından Prep-İTK yöntemi ile izolasyon sonucu mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Prep-İTK yönteminde alüminyum destek üzerine silikajel 60 GF₂₅₄ veya cam plakalar kullanılmıştır. Analitik İTK prensibine benzer şekilde gerçekleştirilen yöntemde izole edilecek maddelerin bulunduğu örnekler başlangıç çizgisine spotlar halinde değil, bant şeklinde uygulanmıştır. İzole edilecek maddelerin plakadaki yerleri belirteçler yardımı ile (UV 254-366 nm, reaktif) belirlendikten sonra plakadan kazınmıştır. Silikajel içinde bulunan maddeler uygun çözücü ile çözülerek filtrelenmiş ve silikajelden arındırılmış; döner buharlaştırıcı cihazı (Heidolph veya Buchi) ve azot gazı yardımı ile çözücüsü uzaklaştırılan maddeler izole edilmiştir.

3.7. Gaz Kromatografisi/Alev İyonlaşma Dedektörü (GC/FID) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizi

Mikrobiyal transformasyon deneylerinde kullanılacak papatya uçucu yağının, kullanılacak substratların kalitesini ve bileşiğın yapısını belirlemek için GC/FID ve GC ve GC/MS analiz yöntemleri kullanılmıştır.

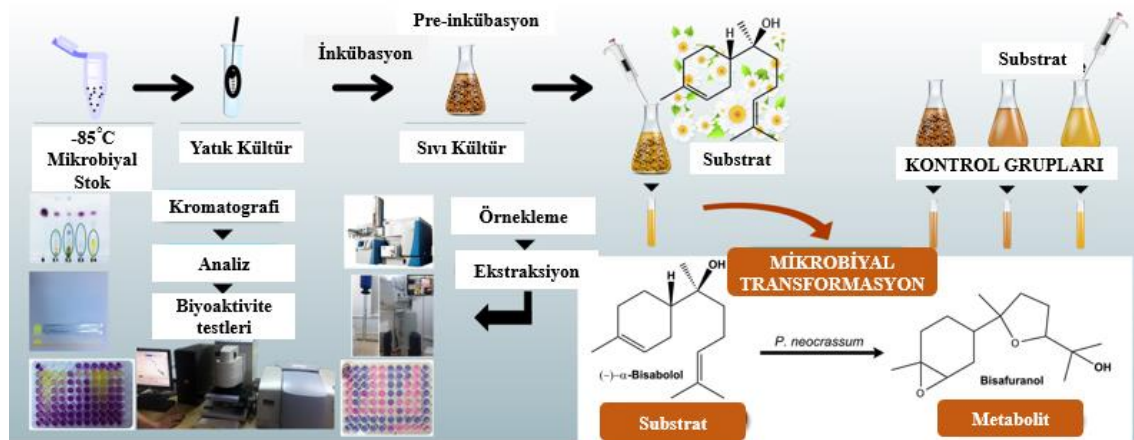
Papatya uçucu yağının GC ve GC/MS analizi eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. FID dedektörü ile uçucu yağ bileşenlerinin bağıl yüzdeleri (%) belirlenmiştir. GC analizleri için Agilent 6890N sistemi kullanılmıştır ve sistem FID detektör sıcaklığı 300 °C dir. HP-Innowax polar kolon (60 m x 0,25 mm çap, 0,25 µm film kalınlığı) kullanılmıştır (Demirci vd., 2015; Firat vd., 2014; Göger vd., 2018).

Mikrobiyal transformasyon deneylerinde kullanılan standartların kromatogram ve spektrumlarını belirlemek için GC ve GC/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Agilent 5975 GC/MSD sisteminde HP-Innowax polar kolon, kolon sıcaklık programı; 60 °C'de 10 dk, 4 °C/dk artışla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dk, 1 °C/dk artışla 240 °C olacak şekilde, taşıyıcı gaz akış hızı 0,8 mL/dk. dir. 70 eV elektron enerjisiyle, 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. GC/MS analizinde maddelerin belirlenmesi için Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi dahil olmak üzere Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 3.1 Kütüphane tarama yazılımları kullanılarak yapılmıştır (İşcan vd., 2012; Demirci vd., 2015; Firat vd., 2021).

3.8. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi

Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopi analizi, Eskişehir Teknik Üniversitesi-Kimya Bölümü Spektroskopi Laboratuvarı'nda, KBr disk tekniği ile Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometre (USA) cihazında gerçekleştirilmiştir (EK-9 - EK-14).

3.9. Mikrobiyal Transformasyon Çalışmaları



Şekil 3.1. Mikrobiyal transformasyon deney prosedürü

3.9.1. Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar, kaynaklarıyla birlikte Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar

No	Mikroorganizma	Suş
1.	<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRL 2999
2.	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 326
3.	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549
4.	<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317
5.	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9807
6.	<i>Penicillium adametzii</i>	NRRL 737
7.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NRRL792
8.	<i>Fusarium culmorum</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. izolat
9.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
10.	<i>Thamnidium elegans</i>	ATCC 18191
11.	<i>Mucor ramannianus</i>	ATCC 1839
12.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. izolat
13.	<i>Rhizopus stolonifer</i>	NRRL 2710
14.	<i>Corynespora cassicola</i>	DSM 62475
15.	<i>Botrytis cinerea</i>	AHU 9424
16.	<i>Penicillium multicolor</i>	Balıkesir Üniv. Fen Fak. izolat
17.	<i>Cunninghamella elegans</i>	Balıkesir Üniv. Fen Fak. izolat
18.	<i>Fusarium solani</i>	Ankara Üniv. Ziraat Fak. izolat
19.	<i>Penicillium neocrassum</i>	NRRL 35639
20.	<i>Penicillium primulinum</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. izolat
21.	<i>Penicillium valentinum</i>	Anadolu Üniv. Fen Fak. izolat
22.	<i>Bacillus velezensis</i>	NRRL B-14580

Saccharomyces cerevisiae maya, *Bacillus velezensis* bakteri, diğeri küf olmak üzere 22 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1 mL %10'luk gliserol içinde -85 °C'de muhafaza edilen stok mikroorganizmalar öncelikle katı besi yeri ortamında geliştirilmiş ve sonrasında sıvı besi yeri ortamına aktarılmıştır.

a) Katı besiyeri

Fungi gelişimi için Sabouraud Glukoz Agar (SDA), Patates Dekstroz Agar (PDA); bakterilerin gelişimi için MHA (Mueller Hinton Agar) hazır besi yeri kullanılmıştır. Ambalaj üzerindeki tarife uygun şekilde hazırlanan besiyerleri 121 °C'de, 1.5 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklav cihazında (Hirayama HV-50) sterilize edilmiştir.

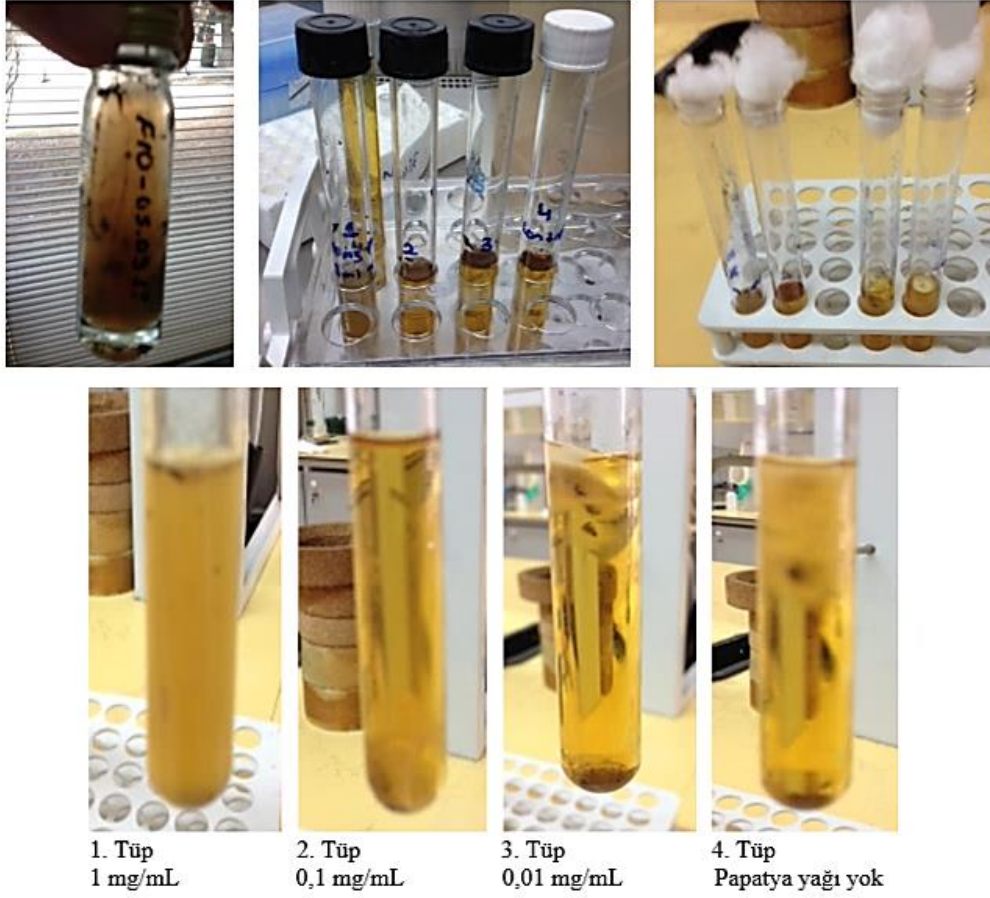
Kültür koleksiyonlarından temin edilen mikroorganizmaların, tüplerde veya Petrilerde hazırlanan besiyeri üzerinde ekimi gerçekleştirilerek inkübe edilmiş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

b) Sıvı besiyeri ortamı

α -Medyum 1 L üzerinden; 20 gr glikoz, 5 gr pepton, 5 gr maya ekstresi, 5 gr NaCl, 5 gr Na₂HPO₄ ve distile su ile hazırlanan çözelti pH metre cihazı ile pH 7'de kontrolü yapıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilerek hazırlanmıştır (Lee vd., 1990).

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar uygun katı besi yeri ortamında (PDA, SDA, MHA) geliştirildikten sonra öze ile, 250 mL'lik Erlenlerin içerisinde bulunan 100 mL steril α -medyum sıvı besi yeri ortamına, aseptik koşullar altında inoküle edilmiştir (Demirci, 2000). Kamazulenin papatya uçucu yağından düşük miktarda izolasyonuna bağlı olarak biyotransformasyon çalışmalarında 50 mL'lik Erlenlerde 20 mL steril α -medyum sıvı besi yeri kullanılmıştır (György vd., 2005). Mikroorganizmalar sıvı besi yerindeki gelişimi için uygun sıcaklıkta (fungi için 27-28 °C, *Bacillus velezensis* için 36 °C), 150 rpm'de, 24-48 saat süresince çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E25) inkübe edilmiştir.

3.9.2. Substrat konsantrasyonunun belirlenmesi



Şekil 3.2. Substrat konsantrasyonu belirlenme yöntemi

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılacak substrat miktarını belirlemek amacıyla, 10 mg papatya uçucu yağı 1 mL asetonda çözülerek (10 mg/mL) vortekslenmiş, aseptik koşullar altında kapaklı 4 tüpten ilk 3 tüpe 9 mL, 4. tüpe 10 mL α -medyum sıvı besiyeri konulmuştur. 10 mg/mL konsantrasyondaki papatya uçucu yağından 1 mL alınarak ilk tüpe eklenmiştir. 1. Tüp 1 mg/mL; 2. tüp 0,1 mg/mL; 3. tüp 0,01 mg/mL olacak şekilde seri dilüsyon gerçekleştirilmiş, 4. tüp ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İnokülasyon (*A. niger*) sonrası vortekslenen tüplerin ağzı pamuk ile kapatılarak çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca 28 °C 160 rpm'de inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların gelişimi kontrol edilerek biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak uygun substrat miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.2). Diğer substratlar ve mikroorganizmalar da benzer yöntem ile test edilmiştir (İşcan, 2009).

3.9.3. Substrat ilavesi, örnekleme ve ekstraksiyon

Mikroorganizmaların gelişiminden sonra biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak substratlar (papatya uçucu yağı, kamazulen, α -bisabolol, α -bisabolol oksit ve farnesen izomerleri karışımı) asetonda çözülerek Erlenlere ilave edilmiş ve kontrol grupları (α -medyum, α -medyum+mikroorganizma+aseton, α -medyum+substrat/aseton) dahil olmak üzere aynı koşullar altında 14 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. 14 gün boyunca, 3. gün, 7. gün ve 14. günlerde aseptik koşullar altında örnekleme yapılmıştır.

Aseptik koşullarda Erlenler içerisindeki sıvı kısımdan 2-3 mL pipetlenerek alınan örnekler, tüplere konularak aynı miktar hacimde etil asetat ile vortekslenmiştir. Etil asetatlı üst faz ayrılarak bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. Toplanan etil asetatlı ekstratlar vakumlu konsantratör (Labconco)'de yoğunlaştırılmış, elde edilen örnekler analitik İTK'da incelenmiştir.

14. gün'de sonlandırılan biyotransformasyonlar, etil asetat ile ekstre edilmiştir. Besi yerindeki kolonilerin Buchner Erleni ve hunisi ile vakum altında filtrelenmesi ardından süzüntü, hacmi kadar etil asetat ile 3 kere ekstre edilmiş birleştirilen ekstratlar susuz Na_2SO_4 'tan geçirilerek düşük basınç altında, 35-40°C'de yoğunlaştırılmıştır. Metabolit karışımını içeren ekstratların, substratı ile karşılaştırmalı ince tabaka kromatogramları incelenmiştir. Ardından dönüşüm gözlenen ekstratların GC/MS analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.9.4. Metabolitlerin izolasyonu ve karakterizasyonu

İTK ve GC/MS analiz sonuçlarının yorumlanmasıyla verimli dönüşümü olan metabolitin preparatif ölçekte üretimi için; mikrobiyal transformasyon deney prosedüründe açıklanan yöntemle çok sayıda Erlen ile gerçekleştirilmiş ve metabolit, ekstrat içerisinde kloroform/toluen 75:25 çözücü sistemi kullanılarak prep-İTK yöntemi ile saflaştırılan metabolitin (%94 GC/FID) spektroskopik (GC/MS, FT-IR, NMR, LC-MS-IT-TOF) teknikler ile yapısı aydınlatılmış, polarimetre cihazı ile optik çevirme açısı ölçülmüştür.

3.9.4.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

1D- (^1H ve ^{13}C -NMR) ve 2D- (COSY, HSQC ve HMBC) NMR analizleri Anadolu Üniversitesi-BİBAM Araştırma Merkezi, Eskişehir’de yapılmıştır. Çözücü olarak dötero kloroform (CDCl_3), düşük miktardaki maddelerin analizi için uygun olan dış çapı 5 mm, iç çapı 2.160 ± 0.013 , cam kalınlığı 1.4, MHz 500 NMR tüpü kullanılmıştır. Maddelerin 1D- ve 2D-NMR spektrumları Bruker 500 MHz Ultrashield sıvı NMR spektrometresiyle kaydedilmiştir. Kimyasal kayma değerleri ppm olarak verilmiştir.

3.9.4.2. Sıvı kromatografisi iyon tuzaklı/uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-MS-IT-TOF)

α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu sonucunda kromatografik olarak saflaştırılan metabolitin yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu, Anadolu Üniversitesi-DOPNA Laboratuvarı’nda, LC-MS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazında Elektron Sprey İyonizasyon (ESI) iyonlaştırma tekniği kullanılarak negatif ve pozitif modda alınmıştır.

3.10. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Papatya uçucu yağı, α -bisabolol, α -bisabolol oksit A, kamazulen, (*E*)- β -farnesenin ve mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan substratlar (α -bisabolol, bisabolol oksitler, kamazulen, farnesen izomerleri karışımı) ile ekstre edilen metabolit karışımlarının *in vitro* olarak antioksidan (DPPH radikal süpürücü), antimikrobiyal (mikrodilüsyon yöntemi) etkileri, UV-spektrofometrik yöntemle siklooksijenaz-1 (COX-1), 5-lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyon deneyleri olmak üzere biyoaktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3.10.1. In vitro antioksidan aktivite

Kumarasamy vd., (2007) yöntemi, test edilecek örneklerin 1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH*) serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Yöntem, serbest radikalın antioksidan varlığında rengini kaybetmesi prensibine dayanmaktadır. Test örnekleri için DMSO’da stok çözeltiler hazırlanmış ve DMSO kontrol olarak kullanılmıştır. 96 kuyucuklu U plakaları kullanarak, hazırlanmış stok çözeltilerden 200 μL kuyucuklara eklenmiş ve ilk sıradan başlamak üzere alınan 100 μL madde, 100 μL DMSO bulunan kuyucuklar boyunca, seri dilüsyon yapılmıştır. MeOH

içinde 80 µg/mL DPPH çözeltisi hazırlanarak her bir kuyucuğa aynı miktarda (100 µL) eklenmiştir. Yalnızca DPPH (200 µL), DPPH (100 µL +DMSO µL) ve yalnızca DMSO (200 µL) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Standart madde askorbik asit (C vitamini) de pozitif kontrol olarak aynı prosedür ile mikropalakalara uygulanmıştır. Plakalar hafifçe çalkalanarak karışımın homojen olması sağlanmış, 30 dk oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Mikroplaka okuyucu ile UV 517 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Her örnek için radikal süpürme kabiliyeti yüzde inhibisyon (%I) olarak hesaplanmıştır (3.2).

$$(\%I) = [(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100 \quad (3.2)$$

Abs_{kontrol}, sadece DPPH çözeltisi ve DMSO karışımının absorbansıdır. Abs_{örnek}, test örneği ve DPPH çözeltisi karışımının absorbansıdır.

Konsantrasyona bağlı DPPH % inhibisyon grafiği dikkate alınarak örneklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri, radikalın %50'sini inhibe etmek için gereken örnek konsantrasyonudur.

3.10.2. *In vitro* antimikrobiyal aktivite

Tablo 3.2. Antibakteriyel aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Kaynak
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919

Papatya uçucu yağı, bileşenleri ve ekstre edilen metabolit karışımlarının Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919) ve Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) olmak üzere 7 adet insan patojen bakteri suşlarına (Tablo 3.2) karşı antibakteriyel etkisi mikrodilüsyon yöntemi (İşcan vd., 2002;

Kırmızıbekmez vd., 2009) kullanılarak test edilmiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) mg/mL cinsinden belirlenmiştir.

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI veya eski adıyla NCCLS) tarafından yayınlanan aerobik mikroorganizmalar için kullanılan mikrobrot dilüsyon tekniği (M-100-S16) ve fungi için kullanılan mikrobrot dilüsyon tekniği (M-27-A2) protokollerinde bazı değişiklikler yapılmak suretiyle değerlendirilmiştir.

Test edilecek maddelerin miktarlarına bağlı olarak, Tween 80'li su ile hazırlanan %10'luk DMSO çözeltisi ile her maddenin bilinen konsantrasyonlarda stok çözeltisi hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu U plakaların tüm kuyucuklarına 100 µL Tween 80 konulmuştur. İlk sıradaki kuyucuklara hazırlanan stok çözeltiden 100 µL ilave edilmiştir. İlk sıradaki kuyucuklardan (100 µL Tween 80 + 100 µL stok çözeltisi) çok kanallı pipet yardımı ile 100 µL alarak 2. sıraya eklenmiş ve bu şekilde seri dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. -85 °C de muhafaza edilen kültürler canlandırılmak üzere, içinde MHA bulunan Petrilere ekilmiş (Bkz. Gereçler ve Yöntemler) ve 37°C de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde gelişen tekli kolonilerden alınarak Mueller Hinton Broth (MHB) sıvı besi yeri bulunan tüplere aktarılmıştır ve hücre yoğunluğu McFarland densitometre (DEN-1B, Biosan) cihazı ile ölçülerek %0,85'lik NaCl çözeltisi ile 0,5 MF-birime ayarlanmıştır. McFarland ayarlaması yapılan MHB sıvı besi yerinde bulunan mikroorganizmalar 100 µL alınarak tüm kuyucuklara eklenmiştir. Pozitif (amoksisilin ve kloramfenikol; 0,128 mg/mL) ve negatif kontrol grupları da dahil olmak üzere 37 °C 24 saat inkübe edilmiştir. 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan resazurin çözeltisi her kuyucuğa 20 µL ilave edilerek 37 °C 3 saat beklenmiştir. Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksit), canlı mikroorganizmalar tarafından metabolize edildiğinde mavi renkten pembe renkli resorufine dönüşen bir indikatördür. Antimikrobiyal maddenin mikroorganizmalar üzerindeki etkisini değerlendirmek için resazurin kullanılarak renk değişimi değerlendirilmiş ve üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki konsantrasyon, minimum inhibe edici konsantrasyon olarak (MİK) mg/mL olarak belirlenmiştir. Deney prosedüründe tüm maddelerin uygun sterilizasyon işlemleri (filtreleme veya otoklavlama) gerçekleştirilmiş ve deney aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Papatya uçucu yağı, bileşenleri ve ekstre edilen metabolit karışımlarının antikandidal aktivitesini belirlemek için Tablo 3.3'te verilen standart suş ve klinik izolatlardan seçilmiş 4 adet *Candida* suşu kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Antikandidal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Kaynak
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida glabrata</i>	Klinik izolat
<i>Candida utilis</i>	NRRL Y-900
<i>Candida krusei</i>	NRRL Y-7179

Test edilecek maddelerin antikandidal aktivitesini belirlemek için antibakteriyel aktivitedeki deney prosedürüne benzer şekilde mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (İşcan vd., 2002; Kırmızıbekmez vd., 2009). Kandidaların kültür ortamı için “Roswell Park Memorial Institute” tarafından geliştirilmiş RPMI-1640 besi yeri, pozitif kontrol grubu olarak standart madde amfoterisin B ve nistatin kullanılmıştır. Maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) mg/mL cinsinden belirlenmiştir.

3.10.3. *In vitro* antiinflamatuvar aktivite

3.10.3.1. 5-Lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon

Test edilecek maddelerin *in vitro* antiinflamatuvar aktivitesi 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibitör etkisi ile spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Deneyde Baylac ve Racine, (2003) tarafından geliştirilen makro yöntemin, modifiye edilerek mikroya uyarlanması sonucu geliştirilen spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (Demirci vd., 2018).

0,1 M K₂HPO₄ tamponu hazırlanmış ve pH 8,80’e ayarlanmıştır. Soya fasulyesi 5-LOX enziminin (EC 1.13.11.12) 5 mg’ı 4,3 mL tampon içinde çözülmüş ve hazırlanan enzim çözeltisi -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Substrat olarak kullanılan linoleik asitin 95 mg’ı 100 mL etanolde çözülerek 3,5 mL Tween-20 ilave edilmiştir. Hazırlanan çözülden etanol tamamen uzaklaştırılarak 100 mL tampon eklenmiş ve -20 °C’de kahverengi şişede muhafaza edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılacak olan standart inhibitör Nordihidroguairatik asit (NDGA)’in, saf DMSO içindeki farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri (1 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL) olmak üzere test edilecek maddeler %2,5’lik DMSO ile 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. 1940 µL K₂HPO₄ tamponu 40 µL test maddeleri ve 20 µL lipoksijenaz enzimi 10 dakika 25°C’de inkübe edilmiştir. Her

kuyucuğa bu karışımdan 300 µL eklendikten sonra 7,5 µL substrat ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Mikroplaka okuyucuda (BioTek PowerWave-Gen 5 yazılım) 20 saniye çalkalama işleminden sonra 234 nm’de 10 dk boyunca kinetik okuma programı ile absorpsiyon değerleri okunmuştur. Enzim inhibisyonu (%) olarak hesaplanmıştır (3.3).

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A-B) / A] \times 100 \quad (3.3)$$

A: Test numunesi olmadan enzim absorbansı

B: Enzimin test numunesi ile absorbansı

3.10.3.2. Siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon

Test edilecek örneklerin COX-1 enzim inhibisyonu “Cayman COX Kolorimetrik İnhibitör Tarama Test Kiti” ile *in vitro* ortamda COX-1’in peroksidaz bileşeninin ölçümüne dayalıdır. Peroksidaz aktivitesi, *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamin (TMPD)’in oksitlenme ürününün 590 nm’de kolorimetrik ölçümüne dayalı olarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Konsantre tampon çözeltisi 0,1 M Tris-HCl, pH 8 olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiştir. Konsantre Hem çözeltisine (88 µL) 1,912 mL hazırlanan tampon eklenerek ile dilüe edilmiştir. Kit içerisinde bulunan COX-1 (koyun) solüsyonundan 120 µL alınarak 360 µL tampon ile karıştırılarak buzda muhafaza edilmiştir. Substrat olarak kullanılacak olan araşidonik asit çözeltisinin hazırlanması için, araşidonik asitin etanoldeki çözeltisini içeren solüsyondan 100 µL alınarak eş değer miktarda 0,1 M KOH ile karıştırılmış ve son konsantrasyon 1,1 mM olarak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiştir. COX-1 inhibisyon aktivitesi için kontrol edilecek örnekler %10 DMSO’da çözülerek belirli konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Pozitif kontrol grubu için NDGA kullanılmıştır.

- Arka plan kuyucuklarında; 160 µL tampon, 10 µL Hem, 10 µL çözücü, 20 µL kolorimetrik substrat (TMPD), 20 µL araşidonik asit olacak şekilde (test edilecek örnekler ve enzim yok),
- %100 başlangıç aktivitesi kuyucuklarında; 150 µL tampon, 10 µL Hem ve 10 µL COX-1 enzimi, 10 µL çözücü, 20 µL kolorimetrik substrat (TMPD), 20 µL araşidonik asit olacak şekilde (test edilecek örnekler yok),
- İnhibitör kuyucuklarında; 150 µL tampon, 10 µL Hem, 10 µL COX-1 enzimi, 10 µL test edilecek örnek çözeltileri, 20 µL kolorimetrik substrat (TMPD), 20 µL araşidonik asit olacak şekilde plaka dizaynı yapılmıştır.

Tüm kuyucuklara TMPD çözeltisi ve araşidonik asit çözeltisi eklenmeden önce plaka dikkatlice çalkalanarak 25 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Sırasıyla 20 µL TMPD çözeltisi ve 20 µL araşidonik asit çözeltisi eklendikten sonra ise yine birkaç saniye çalkalanıp 25 °C’de 2 dk inkübe edilerek absorbans değerleri 590 nm’de okunmuştur.

Her numunenin ortalama absorbansı belirlenmiştir. Arka plan kuyucuklarının absorbansı, %100 başlangıç aktivitesinin ve inhibitör kuyucuklarının absorbansından çıkarılmıştır. % inhibisyon (%I) değerini hesaplamak için her bir inhibitör test örneği %100 başlangıç aktivitesi örneğinden çıkarıldıktan sonra %100 başlangıç aktivite değerine bölünmüş ve 100 katı hesaplanmıştır.

3.11. *In silico* Toksikite

α -Bisabolol, α -bisabolol oksitler (A ve B), α -bisabolon oksit A, (*E*)- β -farnesen, kamazulen ve α -bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan ve bisafuranol olarak adlandırılan metabolitin ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/) web sunucusu ile *in silico* toksisite değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tüm moleküller ProTox-II web sunucusu ara yüzünde bulunan SMILES (Basitleştirilmiş Moleküler Girdi Hattı Giriş Sistemi) dizesi girilerek, karakterize edilen metabolit “bisafuranol” ise molekül çizimi ile sisteme yüklenmiştir. Moleküllerin toksisite tahmin sonuçlarından, oral letal dozu (LD₅₀) mg/kg ve toksisite sınıfı verileri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Toksisite sınıfları:

- Sınıf I: yutulması halinde ölümcül (LD₅₀ ≤ 5)
- Sınıf II: yutulması halinde ölümcül (5 < LD₅₀ ≤ 50)
- Sınıf III: yutulduğunda toksik (50 < LD₅₀ ≤ 300)
- Sınıf IV: yutulması halinde zararlı (300 < LD₅₀ ≤ 2000)
- Sınıf V: yutulması halinde zararlı olabilir (2000 < LD₅₀ ≤ 5000)
- Sınıf VI: toksik olmayan (LD₅₀ > 5000) olarak gruplandırılmıştır (http-1).

4. BULGULAR VE YORUM

4.1. *M. recutita* Uçucu Yağının GC/MS ve GC/FID Analizleri

Avrupa Farmakope kalitesindeki ticari olarak temin edilen papatya uçucu yağı sırasıyla GC/MS ve GC/FID ile analitik kalite doğrulamasından sonra kullanılmıştır. Ana bileşenler α -bisabolol oksit A (%47,7) ve B (%6,2), (*E*)- β -farnesen (%21,5), α -bisabolon oksit A (%5,7), kamazulen (%4,1) ve α -bisabolol (%2,1) olarak Tablo 4.1’de elde edilen sonuçlar tarafımızdan bildirilmiştir (Firat vd., 2014).

Tablo 4.1. Papatya uçucu yağı ana bileşenlerinin GC/FID ve GC/MS sonuçları

RT (dk)	Bileşen	Relatif %	Molekül ağırlığı	BP (m/z)	Kütle spektrumu
33,662	(<i>E</i>)- β -Farnesen	21,5	204	69	EK-2
46,384	α -Bisabolol oksit B	6,2	238	143	EK-3
47,453	α -Bisabolon oksit A	5,7	236	93	EK-4
48,065	α -Bisabolol	2,1	222	109	EK-5
52,726	Kamazulen	4,1	184	169	EK-6
52,957	α -Bisabolol oksit A	47,7	238	143	EK-7

RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **Relatif %:** FID kromatogramlarından ayrılmış bileşiklerin hesaplanan göreceli yüzde miktarları, **BP: Base Peak:** temel pik

Avrupa Farmakopesi’nde bisabolol oksitler ya da (-)- α -bisabolol açısından zengin olmak üzere iki farklı tip papatya uçucu yağı tanımlanmıştır ve papatya uçucu yağının kalitesi bisabolol oksitlerin, (-)- α -bisabololün ve kamazulenin miktarları ile ilişkilendirilmiştir. Bisabolol oksitler yönünden zengin olan papatya uçucu yağı bileşiminde; %29-81 aralığında bisabolol oksitleri ve en az %1 kamazulen içermesi gerekmektedir (Ph. Eur. 8.0). GC/FID ve GC/MS analizi gerçekleştirilen papatya uçucu yağının farmakope kalitesinde, kamazulen içeren (%4,1) ve bisabolol oksitler (bisabolol oksit A %47,7; bisabolol oksit B %6,2) yönünden zengin uçucu yağ sınıfına girdiği belirlenmiştir. Ayrıca papatya uçucu yağı 4 temel kemotip ile ilişkilendirilmiş, Mısır menşeli papatya uçucu yağının kemotip B (α -bisabolol oksit A > α -bisabolol oksit B > α -bisabolol) olduğu belirtilmiştir (Salamon vd., 2010). *M. recutita* uçucu yağı Phatrade-Pharaonic Essential Oils (Kahire, Mısır) firmasından temin edilmiştir. Analiz sonuçları

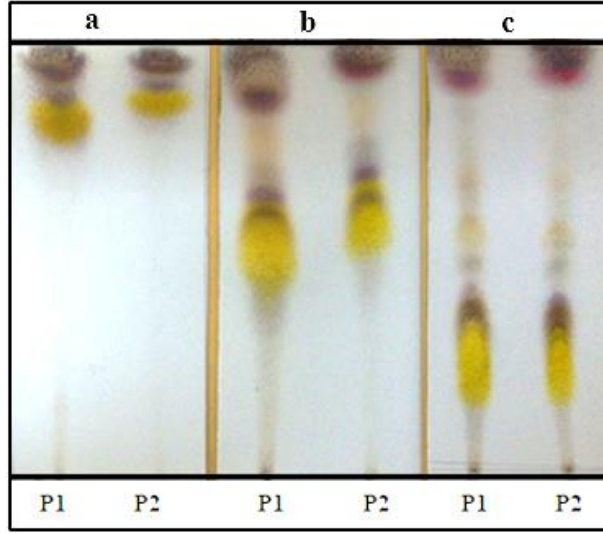
da Mısır menşeli papatya uçucu yağının α -bisabolol oksit A yönünden zengin kemotip B olduğunu desteklemektedir.

Göger vd., (2018) tarafından, deneysel çalışmalarda kullandığımız aynı uçucu yağın GC/MS ve GC/FID analizleri sonucunda, ana bileşenlerine ek olarak, düşük miktarda (%0,1-1,9) 17 farklı bileşen daha tanımlanmıştır (EK-8).

4.2. *M. recutita* Uçucu Yağı ve Ana Bileşenlerinin İTK Analizi ve İzolasyonu

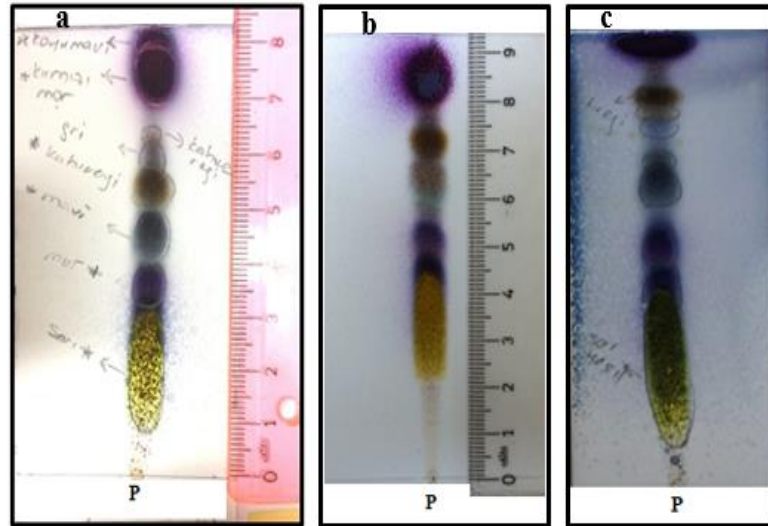
İTK analizlerinin, papatya uçucu yağından izolasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi yanı sıra, mikrobiyal transformasyon çalışmalarında da oldukça önemli bir yeri vardır. Hangi maddelerin mikroorganizma tarafından substrat olarak kullanılmış ve hangi maddelerin kontrol grubu profillerinden farklı özellik gösteren dönüşüm ürünleri olduğunun belirlenmesi ve bu metabolitlerin yapıları aydınlatılmadan önce yorumlanmasında ve NMR analizi için gerekli olan yüksek saflıkta izole metabolitin elde edilebilmesi, yeterli miktara sahip olmayan maddelerin neler olabileceğinin tartışılabilmesi için İTK kromatogram profilinde maddelerin belirlenmesi gerekmektedir.

Ticari olarak temin edilen farmakope kalitesindeki papatya uçucu yağının ana bileşenlerinin belirlenmesi ve izolasyonu amacıyla İTK analizleri yapılmıştır. Schilcher, (1987), papatya uçucu yağı için en uygun İTK'nın yayınlanmış çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması ile bulunabileceğini savunmaktadır. Etil asetat/toluen 5:95 (Ph. Eur. 8.0), diklorometan (Ashnagar vd., 2009), susuz Na₂SO₄'te kurutulmuş kloroform (Hahn-Deinstrop 2007), kloroform/toluen 75:25 (Wagner ve Bladt, 1996; Medic-Saric vd., 1997; Ashnagar vd., 2009; Ozdemir vd., 2021) ve ilave olarak *n*-hekzan/etil asetat 50:50, *n*-hekzan/etil asetat 75:25, hekzan/etil asetat 90:10, toluen/kloroform 75:25, *n*-hekzan/kloroform 50:50 farklı çözücü sistemleri kullanılarak İTK yapılmıştır (Şekil 4.1-4.3). Tüm plaklar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/366 nm dalga boyunda incelenmiştir. (Şekil 4.3). UV absorpsiyonu olmayan maddeler, renk reaktifi olarak vanilin-sülfürik asit, ısıtma (100-105 °C'de 3-5 dk) sonrasında değerlendirilmiştir.

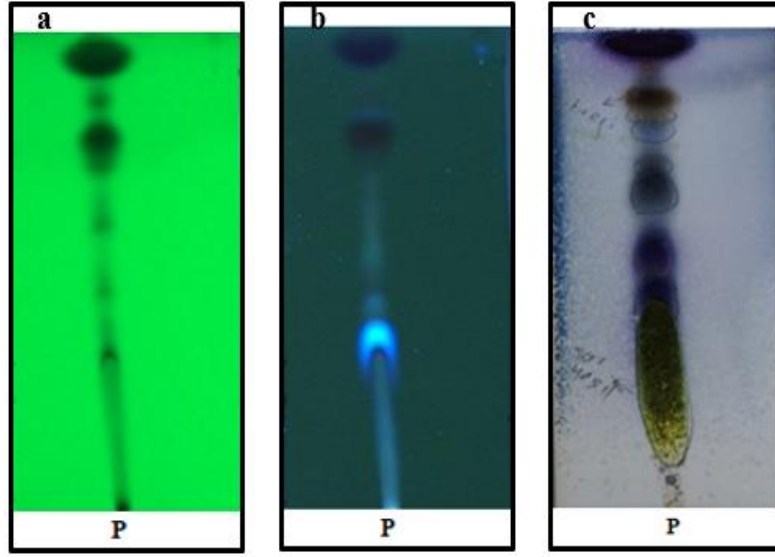


Şekil 4.1. Papatya uçucu yağının farklı çözücü sistemlerindeki İTK kromatogramları-I [Papatya uçucu yağı (P1), Metanolde çözülmüş papatya uçucu yağı (P2), n-hekzan/etil asetat 50:50 (a), n-hekzan/etil asetat 75:25 (b), n-hekzan/etil asetat 90:10 (c); reaktif: vanilin-sülfürik asit]

Deneysel çalışmalarımızda kullanılmak üzere en uygun çözücü/çözücü sistemi olarak; klorofom/toluen 75:25 (Şekil 4.2a), susuz Na_2SO_4 'te kurutulmuş kloroform (Şekil 4.2b), diklorometan (Şekil 4.2c) olarak belirlenmiştir.

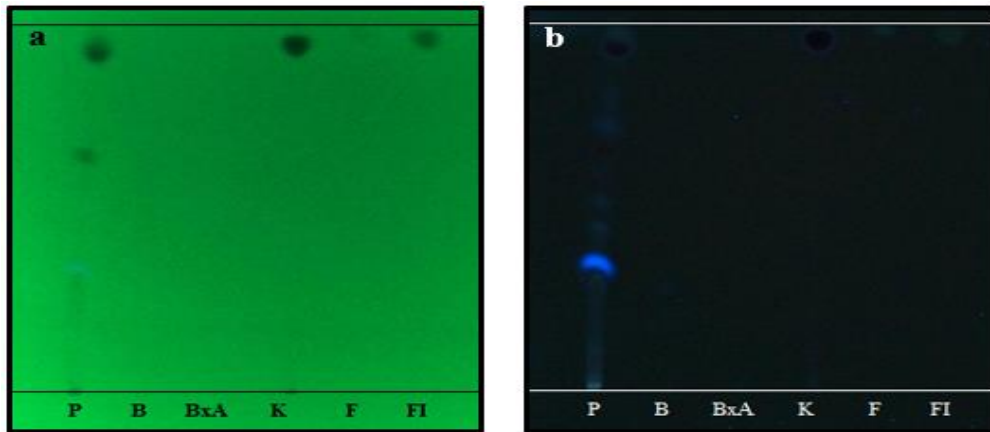


Şekil 4.2. Papatya uçucu yağının farklı çözücü sistemlerindeki İTK kromatogramları-II [klorofom/toluen 75:25 (a); susuz Na_2SO_4 'te kurutulmuş kloroform (b); diklorometan (c); reaktif: vanilin-sülfürik asit]

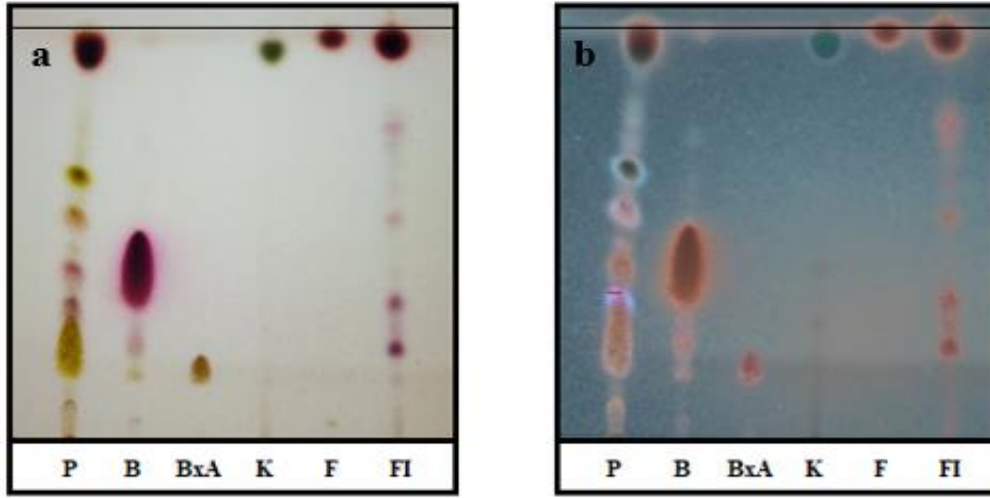


Şekil 4.3. Papatya uçucu yağının diklorometan çözücü sistemi ile İTK kromatogramları [254 nm'de (a); 366 nm'de (b); vanilin-sülfürik asit reaktifi ve ısı muamelesi sonrası gün ışığında (c)]

Papatya uçucu yağı ve standart maddeler [(-)- α -bisabolol, α -bisabolol oksit A, kamazulen, (E)- β -farnesen ve farnesen izomerleri karışımı] EtOH'da çözülerek (1:1 v/v) silika jel GF254 İTK plakasına, 4 μ L uygulanmıştır. Uygun çözücü sistemi (kloroform/toluen 75:25) ile develope edilip, plakalar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/366 nm dalga boyunda incelenmiştir (Şekil 4.4). UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak anisaldehit-sülfürik asit ve ısı (100-105 °C de 3-5 dk) kullanılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Papatya uçucu yağı ve standart maddelerin İTK kromatogramları-I [254 nm'de (a); 366 nm'de (b); papatya uçucu yağı (P); (-)- α -bisabolol (B); bisabolol oksit A (BxA); kamazulen (K); (E)- β -farnesen(F); farnesen izomerleri karışımı (FI); çözücü sistemi kloroform/toluen 75:25]



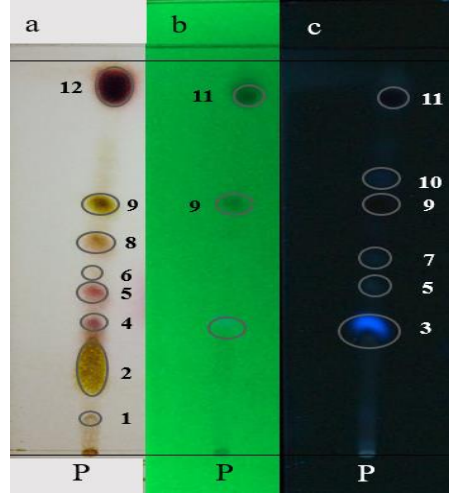
Şekil 4.5. Papatya uçucu yağı ve standart maddelerin İTK kromatogramları-II [anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ve ısı muamelesi sonrası gün ışığında (a); reaktif ve ısı muamelesi sonrası 366 nm'de (b); papatya uçucu yağı (P); (-)- α -bisabolol (B); α -bisabolol oksit A (BxA); kamazulen (K); (E)- β -farnesen (F); farnesen izomerleri karışımı (FI); çözücü sistemi klorofom/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

Şekil 4.5a'da verilen kromatograma göre (-)- α -bisabolol (B), α -bisabolol oksit A (BxA), kamazulen (K) ve (E)- β -farnesen (F) standart maddeleri için R_f değerleri (Tablo 4.2) hesaplanmıştır.

Tablo 4.2. Papatya uçucu yağı ana bileşenlerinin R_f değerleri

Spot	Bileşen	R_f	Görünüş
B	(-)- α -Bisabolol	0,40	Mor-menekşe spot
BxA	α -Bisabolol oksit A	0,17	Sarı-yeşil spot
K	Kamazulen	0,95	Mavi-yeşil spot
F	(E)- β -Farnesen	0,98	Koyu kırmızı-mor spot

Şekil 4.6'da verilen papatya uçucu yağı İTK kromatogramına göre de spotların R_f değerleri hesaplanmıştır. Standart maddelerin hesaplanan R_f değerine göre, papatya uçucu yağının İTK profilinde bisabolol oksit (A ve B), α -bisabolol, kamazulen, (E)- β -farnesen spotları belirlenmiştir (Tablo 4.2).

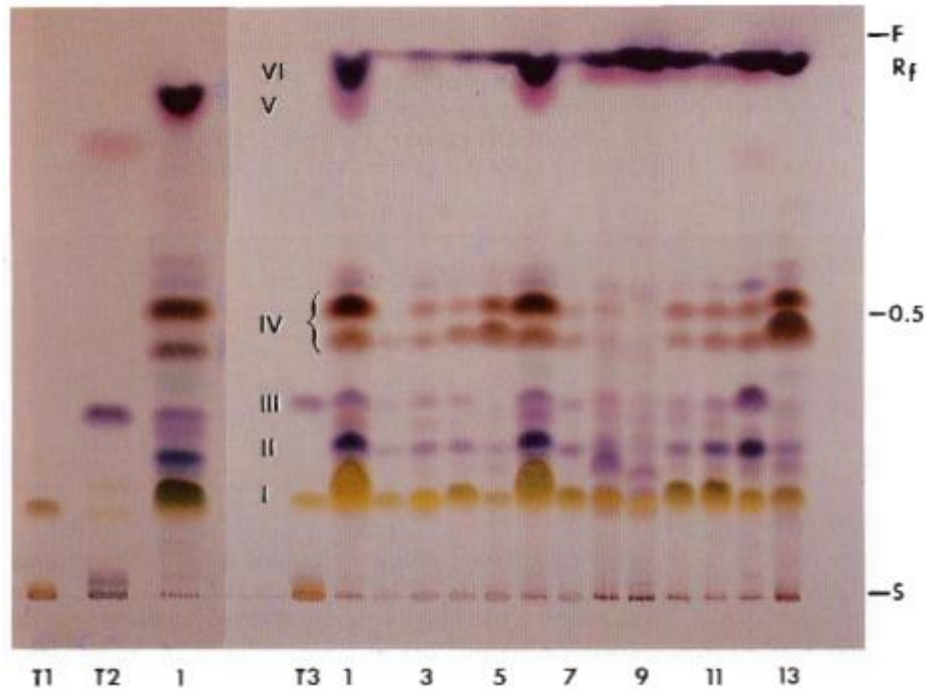


Şekil 4.6. *Papatya uçucu yağı İTK profilinde gözlenen spotlar [anisaldehyt-sülfürik asit reaktifi ve ısı muamelesi sonrası gün ışığında (a); 254 nm'de (b); 366 nm'de (c); çözücü sistemi klorofom/toluen 75:25]*

Tablo 4.3. *Papatya uçucu yağı İTK kromatogramında gözlenen spotlar*

Spot	Bileşen	R_f			Görünüş
		Gün ışığı	254 nm	366 nm	
1		0,1	-	-	Kirli sarı
2	Bisabolol oksitler	0,22	-	-	Büyük Sarı-yeşil
3		-	0,35	0,35	Güçlü mavi floresans
4		0,32	-	-	Mor-menekşe
5	α -Bisabolol	0,41	-	0,41	Mor-menekşe
6		0,43	-	-	Silik renk
7		-	-	0,52	Mavi floresans
8		0,53	-	-	Açık kahverengi
9		0,63	0,63	0,63	Sarı-yeşil-kahverengi ve floresans özellik
10		-	-	0,72	Mavi floresans
11	Kamazulen	-	0,93	0,93	Mavi-siyah floresans
12	(<i>E</i>)- β -Farnesen ve kamazulen	0,96	-	-	Koyu kırmızı

Literatüre göre; papatya uçucu yağının toluen/etil asetat 93:7 çözücü sisteminde vanilin-sülfürik asit reaktifi ile gerçekleştirilen İTK kromatogram profilinde (Şekil 4.7) sarı-yeşil renkli bisabolol oksitler ($R_f = 0,2$); mor renkli spatulenol ($R_f = 0,25$) ve bisabolol ($R_f = 0,35$); kahverengi renkli poliinler ($R_f = 0,5-0,6$); kırmızı-mor renkli azulen ($R_f = 0,95$) ve mavi-mor renkli farnesen ($R_f = 0,99$) dir (Wagner ve Bladt, 1996). Ramos vd., (2004) tarafından, toluen/etil asetat (70:30) çözücü sistemi ile gerçekleştirilen papatya uçucu yağının İTK analizinin Wagner ve Bladt, (1996) verileri ile örtüştüğünü bildirilmiştir.

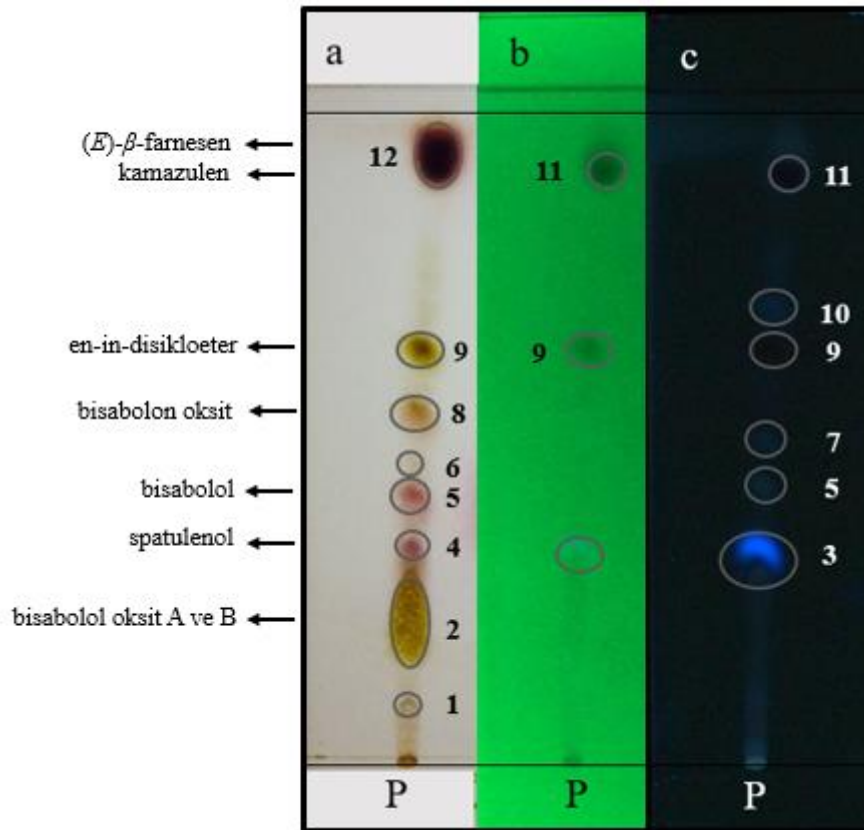


Şekil 4.7. Farklı tip papatya uçucu yağlarının İTK profili (Wagner ve Bladt, 1996) (Toluene/etil asetat 93:7 çözücü sistemi ile vanilin-sülfürik asit reaktifi ve ısı muamelesi sonrası gün ışığında. **T1** bisabolol oksit A; **T2** bisabolol ($R_f 0,35$) ve azulen ($R_f 0,85$); **T3** bisabolol oksit A ve bisabolol; **I** bisabolol oksit A/B; **II** spatulenol; **III** bisabolol; **IV** poliinler, **V** azulen, **VI** farnesen)

Diklorometan ardından dietil eter çözücülerini kullanılarak, ardışık olarak ince tabaka ve kolon kromatografisi ile ayrılan üç fraksiyon ($R_f = 0,30, 0,75$ ve $0,93$), ^1H NMR, IR ve MS spektrumlarına göre sırasıyla bisabolol oksit A, bisabolon oksit, kamazulen olarak tanımlanmıştır (Ashnagar vd., 2009). Farklı çözücü sistemlerinin kullanıldığı papatya uçucu yağının İTK'sında, en iyi çözücü sistemleri kloroform/toluen (75:25) ve kloroform/toluen/etil asetat (65:30:5) olarak belirlenmiştir. Kloroform/toluen (75:25) çözücü sisteminde; bisabolol oksit A ve B ($R_f = 0,12$), bisabolol ($R_f = 0,26$), kamazulen

($R_f = 0,69$), farnesen ($R_f = 0,74$) gözlenmektedir (Medic-Saric vd., 1997). *n*-Hekzan'da çözünen papatya uçucu yağının kloroform/toluen (75:25) çözücü sistemi ile devlepe edilmesiyle gerçekleştirilen İTK'da; kamazulen ($R_f = 0,74$), (*Z*)-en-in-disikloeter ($R_f = 0,6$) belirlenmiştir (Ozdemir, 2021; Ph. Eur. 8.0). Schilcher, (1987) tarafından, papatya uçucu yağının İTK analizi için çözücü sistemi olarak benzen/etil asetat 95:5 önerilmiştir. Ayrıca diklorometan/etil asetat 98:2; kloroform/benzen 75:25 çözücü sistemlerinin de uygun olduğu belirtilmiştir. Yüksek derecede toksik olan benzen yerine sonuçları değiştirmeyen toluenin de kullanılabilir olduğu; fakat süper akışkanlaştırıcı bu çözücü sistemiyle kromatogram profilinin bozulmaması için maksimum konsantrasyon miktarına dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Schilcher, 1987).

Kalitatif olarak incelenen papatya uçucu yağı ve ana bileşenlerinin kromatografik profili (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) ve hesaplanan R_f değerleri (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3) literatür bilgileri ile benzerlik göstermektedir. Buna göre papatya uçucu yağının ince tabaka kromatogram profilindeki maddelerin neler olabileceği değerlendirilmiştir (Şekil 4.8).



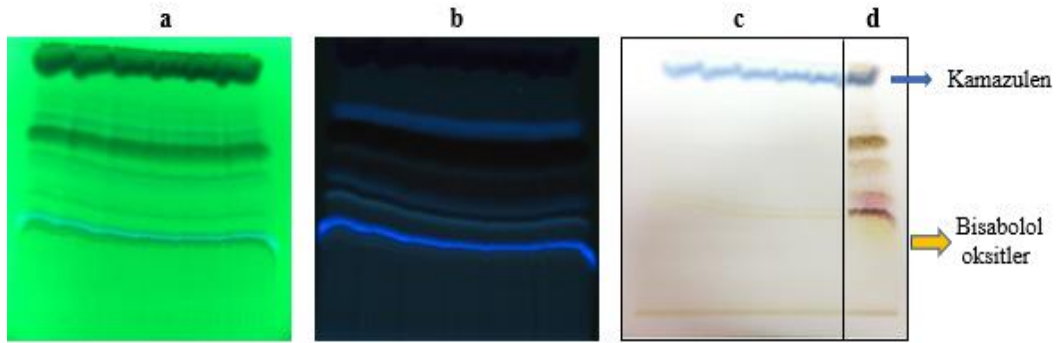
Şekil 4.8. Papatya uçucu yağının İTK profilindeki spotların belirlenmesi

Papatya uçucu yağının kloroform/toluen 75:25 çözücü sistemi ile gerçekleştirilen İTK'sında UV 366 nm'de 3 nolu spot ($R_f = 3,5$) parlak mavi-mor renkli şiddetli floresans özellik göstermektedir (Şekil 4.8). Mavi floresans özellik bileşiğin kumarin yapısında olduğunu düşündürmektedir. Kumarinler, belirli koşullar altında floresans özellik gösteren maddelerdir, UV 366 nm'de gözlemlenebilir (Wagner ve Bladt, 1996) ve umbelliferon, herniarin, skopoletin gibi bileşikler papatya uçucu yağında bulunan doğal kumarinlerdir (Petruřová-Poracká vd., 2013; Kim vd., 2014; Mukhammadieva ve Saidova 2022).

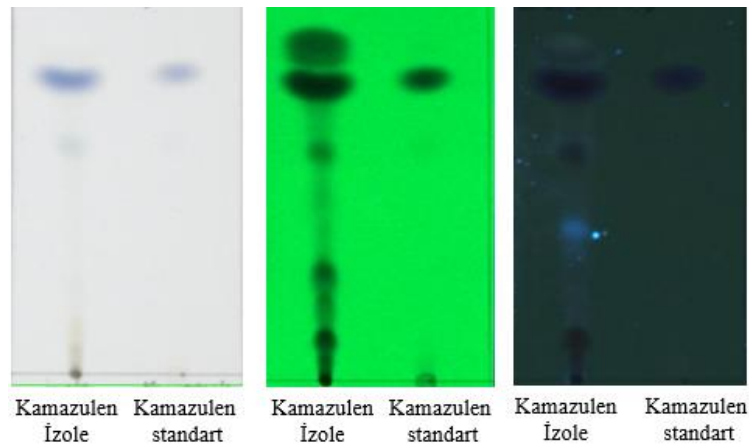
Papatya uçucu yağ bileşenleri listesinde, sıklıkla adı geçen en-in-disikloeterin (Sharafzadeh ve Alizadeh, 2011; Singh ve Aishwarya, 2017) İTK plakasında literatür kromatogram profili ile örtüşen (Ph. Eur. 8.0; Wagner ve Bladt, 1996; Schilcher, 1987) 9 nolu spot olabileceği düşünülmüştür. Göger vd., (2018) tarafından papatya uçucu yağının bileşenlerinin detaylandırıldığı GC/FID ve GC/MS analiz sonuçlarında; (Z)-en-in-disikloeter ve (E)-en-in-disikloeter tanımlanmamıştır (EK-8). Redaelli vd., (1981) tarafından, papatya uçucu yağında bu iki spiro eterin ayrımı için en uygun teknikler İTK, Kieselgel kolon kullanımı ile sıvı kromatografisi ve gaz-likit kromatografisi (GLC) olarak bildirilmiş, bu nedenle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nin uygun bir teknik olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca GC analizinde dedekte edilebilmesi için kolonun özelliği; OV 101, 50 m uzunluğunda kapiler kolon olmalıdır (Schilcher vd., 2005b). Bu nedenle uçucu yağın GC/FID ve GC/MS analizlerinde (Z)-en-in-disikloeter ve (E)-en-in-disikloeter poliiinlerin varlığı belirlenememiş olabilir (EK-8). Fakat papatya uçucu yağının İTK profili literatür ile karşılaştırıldığında, 9 nolu spotun varlığı uçucu yağ içerisindeki poliiinlere işaret etmektedir (Ph. Eur. 8.0; Wagner ve Bladt, 1996; Schilcher, 1987). Ayrıca bitkide (E)- formu (Z)- formundan daha bol miktarda bulunur (Ma vd., 2007). Buna göre belirgin sarı-yeşil-kahverengi 9 nolu spotun (E)-en-in-disikloeter olma ihtimali yüksektir ve yeri kromatogramda belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca en-in-disikloeterler; α -bisabolol ve oksitlerinin aksine UV altında floresans özellik gösterirler (Redaelli vd., 1981). GC ve GC/MS analizinde papatya uçucu yağın ana bileşenlerinden biri olduğu yayınlanan (Firat vd., 2014) bisabolon oksit A (%5,7)'nin da İTK plakasındaki yeri, spiro eterlerin aksine, UV'de herhangi bir floresans özellik göstermemesi ve Schilcher, (1987) tarafından belirtildiği üzere bisabolol ile poliiinler arasındaki 8 nolu spot olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).

İTK profilinde literatürle örtüşen, bisabolol oksitlerin üzerinde yer alan gün ışığında mor renkli spot ($R_f = 0,32$) spatulanol varlığını düşündürmesine rağmen GC ve GC/MS analiz sonuçlarında spatulanol varlığı bildirilmemiştir (Göger vd., 2018). Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılan papatya uçucu yağının kontrol grubu (besi yerinde papatya uçucu yağı var, mikroorganizma yok) ile karşılaştırmalı GC/MS analizlerinde kontrol grubunda düşük miktarda spatulanol ($M^+ 220$, temel pik: 205) varlığı belirlenmiştir. Böylece spatulenolün İTK palağında 4 nolu spot olarak yeri işaretlenmiştir (Şekil 4.8). 1 nolu spot ise Schilcher, (1987) kromatogram verilerine göre matrisin varlığını düşündürmektedir.

Papatya uçucu yağından kamazulen ve bisabolol oksitlerin izolasyonu için, uçucu yağ EtOH'ta çözülerek (1:1 v/v), kloroform/toluen (75:25) çözücü sistemi ile prep-İTK yapılmıştır (Şekil 4.9).

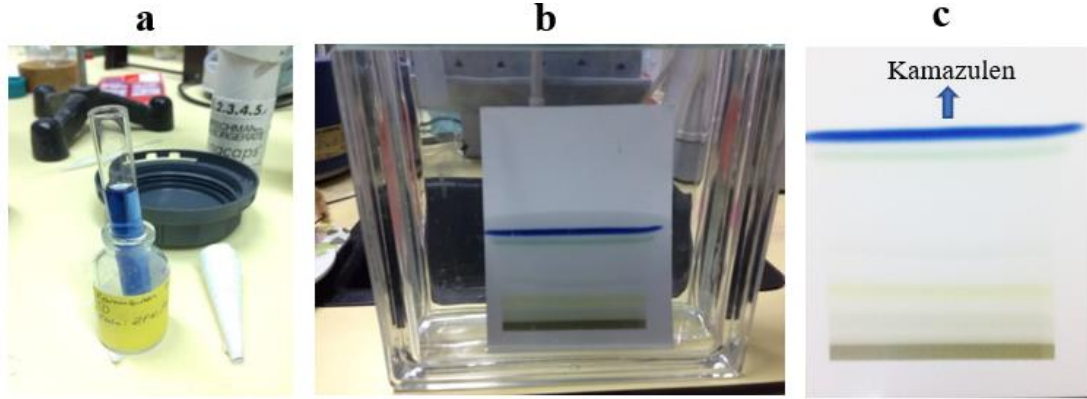


Şekil 4.9. Papatya uçucu yağının prep-İTK kromatogramı [254 nm'de (a); 366 nm'de(b); gün ışığında (c) anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ve ısı muamelesi sonrası gün ışığında (d), çözücü sistemi kloroform/toluen 75:25]



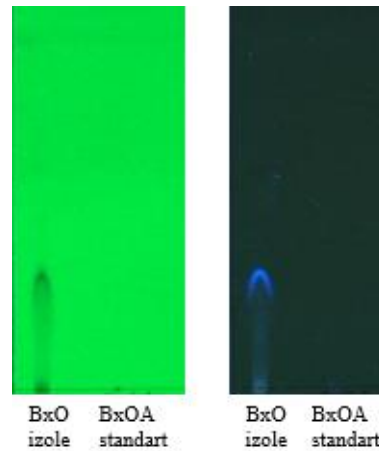
Şekil 4.10. İzole edilen kamazulen ve standart madde kamazulenin İTK profili (çözücü sistemi: aseton/n-hekzan 1,5:98,5)

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere papatya uçucu yağından prep-İTK yöntemi ile izole edilen kamazulenin standart kamazulen ile karşılaştırmalı İTK analizinde (çözücü sistemi: aseton/*n*-hekzan 1,5:98,5) gün ışığında görünmeyen, 254 nm ve 366 nm’de farklı spotlar gözlenmiştir (Şekil 4.10). Plakada gözlenen safsızlıklar nedeniyle literatür doğrultusunda (Dzido ve Tuzimski, 2008), aseton/*n*-hekzan 1,5:98,5 çözücü sistemi ile yeniden prep-İTK yapılmış ve kamazulen izole edilebilmiştir (Şekil 4.11)



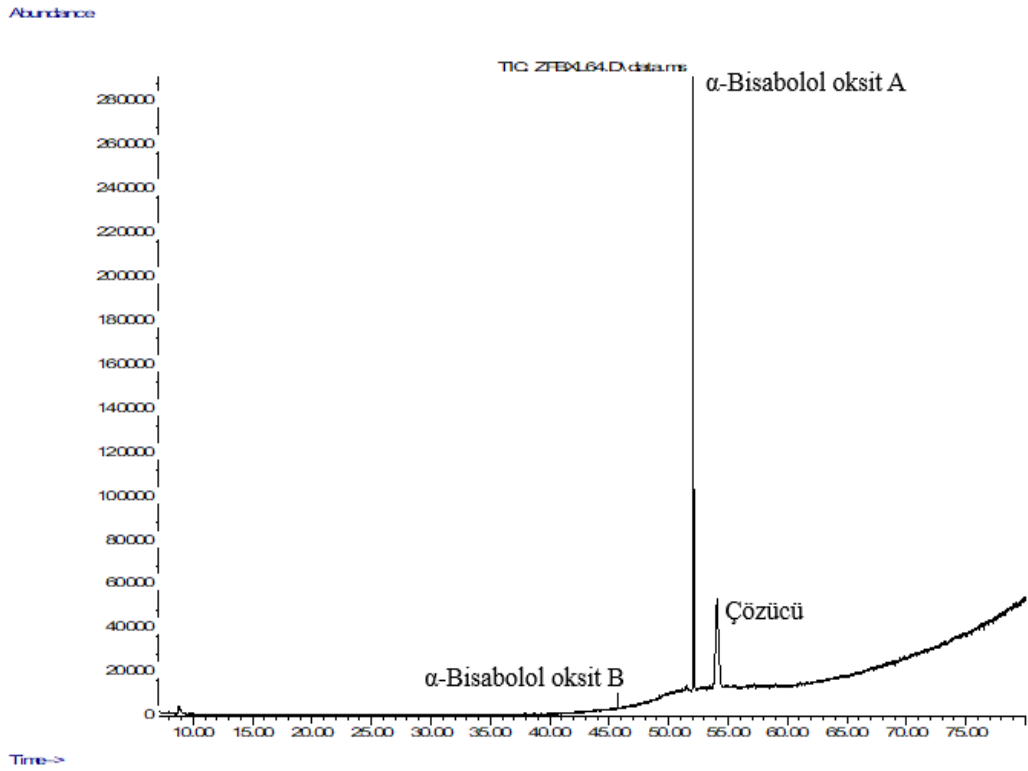
Şekil 4.11. Kamazulenin prep-İTK ile izolasyonu [kamazulen-etanol çözeltisi (a); aseton/*n*-hekzan 1,5:98,5 çözücü sisteminde geliştirilen kamazulen (b); kamazulenin gün ışığında görüntülenmiş İTK kromatogramı (c)]

Kloroform/toluen 75:25 çözücü sistemi ile papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitlerin (A ve B) ise kloroform/*n*-hekzan 95:5 çözücü sistemi kullanılarak yeniden İTK’sı yapılmıştır (Şekil 4.12).



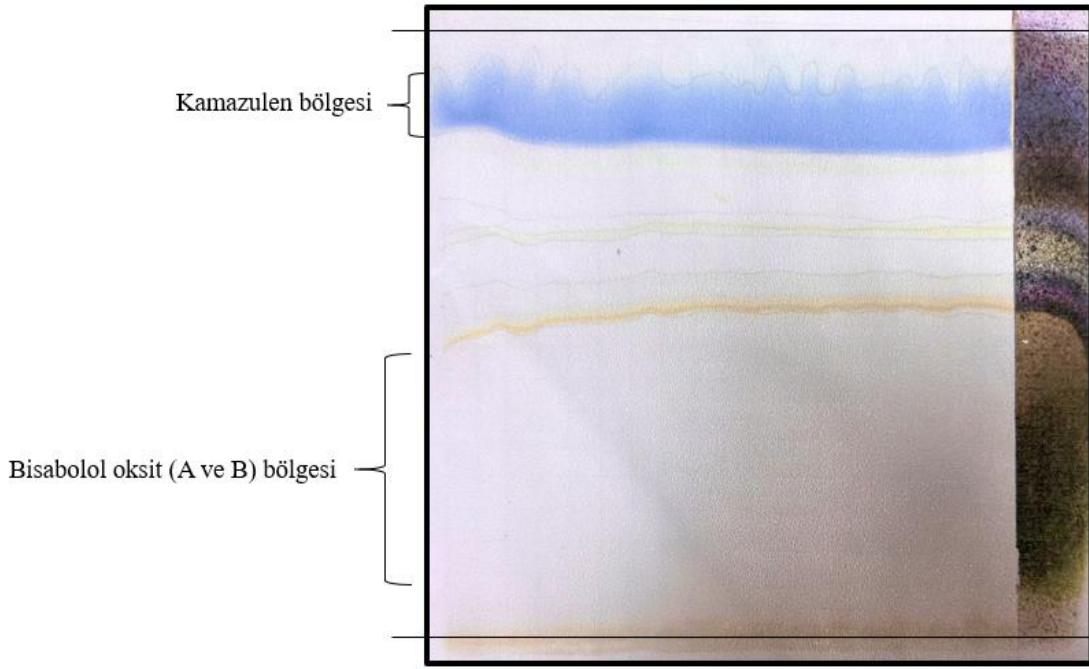
Şekil 4.12. Papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitler (BxO) ve bisabolol oksit A standardının (BxOA) İTK profili (Çözücü sistemi kloroform/*n*-hekzan 95:5)

Bisabolol oksit A ve B'nin birleşerek tek renkte büyük bir spot olarak gözlenmesinden (Şekil 4.8) dolayı ayrımı güç olmaktadır. Ayrıca preparatif İTK'da, UV 366 nm'de floresans özellik gösteren ve GC/MS analizlerinde belirlenemeyen kumarin (Wagner ve Bladt; 1996, Petruřová-Poracká vd., 2013; Kim vd., 2014; Mukhammadieva ve Saidova 2022) ile de yakın bantları nedeniyle bisabolol oksit A yüksek saflıkta izole edilememiştir (Şekil 4.12); fakat uçucu yağımızın bisabolol oksit A yönünden zengin olması nedeniyle bisabolol oksit A miktarının B'den daha yüksek olması durumu dikkate alınarak kloroform/toluen 75:25 çözücü sisteminde prep-İTK ile izolasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve mikrobiyal transformasyon çalışmalarında bisabolol oksit karışımı (α -bisabolol oksit A-%87 GC ve α -bisabolol oksit B-%2 GC) olarak kullanılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitlerin (A ve B) GC kromatogramı

Ayrıca %100 konsantrasyonda papatya uçucu yağından diklorometan çözücü sistemi kullanılarak da prep-İTK yapılmış; kamazulen ve bisabolol oksitlerin (A ve B) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Papatya uçucu yağının prep-İTK kromatogramı (Bölgelerin belirlenmesi için vanilin-sülfürik asit reaktifi kullanılmıştır.)

Deneysel çalışmalarda kullandığımız papatya uçucu yağı Avrupa Farmakopesi'ne göre bisabolol oksitlerce zengin yağ sınıfına girmektedir ve α -bisabolol miktarı (%2,1) düşüktür. Bu nedenle (-)- α -bisabolol ticari kaynaktan (Sigma-Aldrich, \geq %95) temin edilerek biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Literatürde; α -farnesenin mikrobiyal transformasyonu sonucu tanımlanan metabolitler olduğu halde, β -farnesenin substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda hiçbir metabolit tespit edilememiştir (Abraham vd., 1992; Krings vd., 2006). Bu nedenle β -farnesenin uçucu yağdan izolasyonu yerine, ticari olarak temin edilen farnesen izomerleri karışımı tercih edilmiş ve GC/MS analizi (Tablo 4.4) sonrasında substrat olarak biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Kamazulen ve bisabolol oksitler (A ve B)'in ise, papatya uçucu yağından izole edilerek mikrobiyal transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

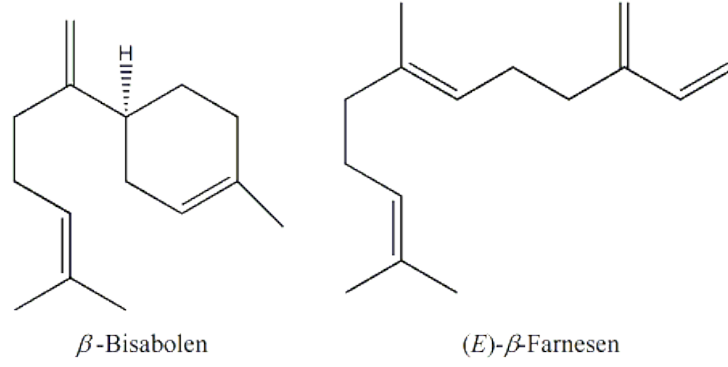
Tablo 4.4. *Farnesen izomerleri karışımı GC/MS sonuçları*

Uçucu bileşen	RT (dk)	%
(Z)- β -farnesen	32,08	6
(E)-β-farnesen	33,04	10
γ -kurkumen	33,84	2
bergamoten	33,95	4
α -farnesen	34,68	8
(Z,E)- α -farnesen	34,79	5
β-bisabolen	34,91	17
(Z)- γ -bisabolen	34,99	4
β -kurkumen	35,29	1
(E,E)-α-farnesen	35,47	12
γ -bisabolen	35,77	4
(E)-α-bisabolen	36,23	15
(Z)-nerolidol	42,15	0,3
(E)-nerolidol	43,14	0,4
α -bisabolol	47,44	2
Tanımlanamayan seskiterpenler (M ⁺ 204)		9

RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **%:** yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı

Ticari olarak temin edilen farnesen izomerleri karışımında GC/MS analizinde görüldüğü üzere asiklik seskiterpen yapıdaki farnesen izomerleri [(Z)- β -farnesen, (E)- β -farnesen, α -farnesen, (Z,E)- α -farnesen, (E,E)- α -farnesen]'nin yanı sıra, monosiklik yapıda [γ -kurkumen, β -kurkumen, β -bisabolen, (Z)- γ -bisabolen, γ -bisabolen, (E)- α -bisabolen], bisiklik yapıda (bergamoten) seskiterpenlere ve monosiklik seskiterpen alkollere [(Z)-nerolidol, (E)-nerolidol, α -bisabolol] de rastlanmaktadır (Tablo 4.4).

Görece en yüksek miktarda bulunan bileşik β -bisabolen (~%17) dir. (E)- β -farnesen ise görece ~%10 miktarda karışımda bulunmaktadır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. β -Bisabolen ve (E)- β -farnesenin moleküler yapısı

4.3. Standartların Optik Çevirme Açılıarı

Deneysel çalışmalarda kullanılan optikçe aktif olan standart maddelerin [(-)- α -bisabolol, (-)- α -bisabolol oksit A] hesaplanan özgül çevirme dereceleri (Bkz. Gereçler ve Yöntemler) Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. *Optikçe aktif standart maddelerin özgül çevirme dereceleri*

Madde	$[\alpha]_D^{25}$
(-)- α -Bisabolol	-59,3°
(-)- α -Bisabolol oksit A	-78,3°

Vanillosmopsis erythropappa'dan izole edilen (-)- α -bisabololün özgül çevirme derecesi -57,7° iken *M. recutita*'dan izole edilen (-)- α -bisabololün ise -55,4° olarak bildirilmiştir. (-)- α -Bisabolol oksit A'nın özgül çevirme derecesi -42,2°'dir (Schilcher vd., 2005a). Deneyde ölçümlendiğimiz standart madde (-)- α -bisabololün özgül çevirme derecesi (-59,3°) literatür ile örtüşmektedir.

4.4. Substrat Konsantrasyonu

Papatya uçucu yağının, bisabolol, bisabolol oksit, kamazulen ve farnesen izomerlerinin biyotransformasyonunda, substrat olarak eklenecek maddelerin mikroorganizmalar için en uygun gelişim konsantrasyonunu bulmak için yapılan çalışmada, mikroorganizmaların az gelişim gösterdiği 1 mg/mL ile kontrol grubuna yakın gelişim gösteren 0,1 mg/mL arasında olmak üzere; 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir (Bkz. Gereçler ve Yöntemler).

4.5. *M. recutita* Uçucu Yağının Mikrobiyal Transformasyonu

Papatya uçucu yağının Tablo 3.1’de verilen mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşan metabolit karışımları ekstre edilerek kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak İTK ile incelenmiştir (EK-15). Papatya uçucu yağ bileşenlerinden farklı olduğu analiz edilen metabolitlerin GC/MS verileri Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. *Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları*

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>A. parasiticus</i>	A1	75,02	143	178	15	EK-16
	B1	47,23	93	207	2	EK-17
	B2	54,81	141	177	2	EK-18
	B3	59,66	141	177	1	EK-19
<i>A. niger</i> NRRL 326	B4	59,98	93	250	2	EK-20
	B5	64,78	143	195	3	EK-21
	B6	68,21	109	234	10	EK-22
	B7	77,99	87	236	3	EK-23
<i>A. niger</i> ATCC 10549	C1	59,25	143	198	16	EK-24
	C2	66,16	143	213	9	EK-25
	C3	75,26	141	194	6	EK-26
	C4	76,65	143	175	65	EK-27

Tablo 4.6. (Devam) *Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları*

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>P. adametzi</i>	D1	55,46	143	279	2	EK-28
	D2	57,34	143	177	2	EK-29
	D3	59,58	141	177	2	EK-30
	D4	60,44	143	221	1	EK-31
	D5	61,76	84	194	4	EK-32
	D6	69,14	143	177	6	EK-33
	D7	69,55	141	212	16	EK-34
	D8	73,09	143	221	4	EK-35
	D9	73,44	143	175	1	EK-36
	D10	73,65	143	218	1	EK-37
<i>F. culmorum</i>	E1	53,85	143	143	1	EK-38
	E2	59,97	93	250	2	EK-39
	E3	61,84	84	194	3	EK-40
	E4	69,87	141	212	30	EK-41
	E5	71,08	143	256	12	EK-42
	E6	76,82	81	302	25	EK-43
<i>S. cerevisiae</i>	F1	45,72	143	236	2	EK-44
	F2	48,02	143	222	2,	EK-45
	F3	49,79	143	185	1	EK-46
<i>T. elegans</i>	G1	76,27	141	212	15	EK-47
<i>M. ramannianus</i>	H1	65,44	143	153	6	EK-48
<i>T. harzianum</i>	I1	69,39	143	180	3	EK-49
<i>C. cassicola</i>	J1	91,72	45	195	14	EK-50
	J2	98,14	45	212	48	EK-51

Tablo 4.6. (Devam) *Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları*

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>B. cinerea</i>	K1	45,72	94	236	3	EK-52
	K2	53,32	143	143	1	EK-53
	K3	55,43	143	143	3	EK-54
	K4	57,31	143	177	4	EK-55
	K5	59,55	141	177	5	EK-56
	K6	60,42	143	177	2	EK-57
	K7	61,72	84	194	8	EK-58
	K8	69,11	143	175	11	EK-59
	K9	73,05	143	175	9	EK-60
	K10	73,40	143	161	3	EK-61
	K11	74,73	143	177	3	EK-62
<i>C. elegans</i>	L1	66,23	143	254	86	EK-63
	L2	71,57	143	195	3	EK-64
<i>P. neocrassum</i>	M1	54,23	143	177	8	EK-65
	M2	55,93	141	151	16	EK-66
	M3	65,45	143	153	57	EK-67
<i>P. primulinum</i>	N1	71,83	45	193	1	EK-68
	N2	72,79	143	241	6	EK-69
	N3	73,16	45	256	2	EK-70
	N4	75,65	45	192	1	EK-71
	N5	76,45	141	196	3	EK-72
	N6	77,04	45	178	2	EK-73
	N7	88,21	143	237	35	EK-74
	N8	88,72	143	241	10	EK-75

Tablo 4.6. (Devam) *Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları*

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>P. valentinum</i>	O1	64,96	143	239	15	EK-76
	O2	70,75	143	163	3	EK-77
	O3	75,19	143	221	2	EK-78
<i>B. velezensis</i>	P1	49,84	125	202	3	EK-79
<i>A. flavus</i>	R1	46,92	134	236	1	EK-80
	S1	46,12	94	236	11	EK-81
	S2	47,30	93	274	1	EK-82
	S3	48,41	143	159	1	EK-83
	S4	52,78	143	143	3	EK-84
	S5	54,08	143	143	2	EK-85
	S6	56,09	143	143	10	EK-86
<i>R. stolonifer</i>	S7	73,59	120	143	2	EK-87

RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **BP:** temel pik, ^aspektrumda gözlenen en ağır m/z değeri **%:** yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı (%1'den düşük olan metabolitler dikkate alınmamıştır.)

Papatya uçucu yağının biyotransformasyonu sonucu oluşan ve papatya uçucu yağ bileşenlerinden farklı metabolitlerin NMR için gerekli olan saflıkta izolasyonu gerçekleştirilemediğinden karakterizasyonu yapılamamıştır. GC/MS spektrumunda çoklu parçalanma reaksiyonları düşük moleküler ağırlıklı bölgede gözlenen iyonların oluşumuna yol açtığından ve genellikle moleküler iyon pikinin (M⁺) spektrum verilerinde tespit edilememesinden dolayı (Hou ve Dickschat, 2020) oluşan metabolitlerin yalnızca GC/MS analizi ile yorumlanması yeterli olmayacaktır. Fakat temel pik m/z 143 olan metabolitlerin oluşumunda, papatya uçucu yağında bulunan ana bileşenlerinden α -bisabolol oksitler A ve B (%47,7 ve %6,2) ve α -bisabolol (%2,1)'ün substrat olarak kullanılmış olabileceği söylenebilir. Ayrıca uçucu yağ bileşiminde bulunan α -bisabolon oksit A (%5,7)'da, türevi ürünlerini vermek amacıyla mikroorganizmalar tarafından kullanılıyor olabilir. Konu ile ilgili destekleyici açıklamalar α -bisabololün, bisabolol

oksitlerin ve farnesen izomerleri karışımının biyotransformasyon çalışmalarında yapılmıştır.

Daha önce de belirtildiği üzere, papatya uçucu yağının GC/MS ve GC/FID ile doğrulanan ana bileşenleri α -bisabolol oksit A (%47,7) ve B (%6,2), (*E*)- β -farnesen (%21,5), bisabolon oksit A (%5,7), kamazulen (%4,1) ve α -bisabolol (%2,1) dür (Tablo 4.1). Uçucu yağın mikrobiyal transformasyonu sonrası elde edilen ekstrelere ait GC/MS analiz verilerinde, uçucu yağda bulunmayan yeni oluşan metabolitlere yer verilmiştir (Tablo 4.6). Fakat biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan uçucu yağın bileşimindeki ana maddelerin yüzdelere göre, görece azalan α -bisabolol ve (*E*)- β -farnesen miktarına karşılık, görece artan/azalan α -bisabolol oksit A, α -bisabolol oksit B ve α -bisabolon oksit A miktarlarına bağlı olarak, uçucu yağdaki bileşiklerin mikroorganizmalar aracılığıyla, α -bisabolol oksit A, α -bisabolol oksit B ve α -bisabolon oksit A'ya dönüşümü söz konusu olabilir. Oluşan bu oksitlerin de türevlerini vermek üzere mikroorganizmalar tarafından dönüştürülüyor olması muhtemeldir (Horn vd., 1988; Wagner vd., 2005; Avonto vd., 2013; Miyazawa vd., 1995; Park vd., 2022). Bisaboloid tip (α -bisabolol, α -bisabolol oksit A, α -bisabolol oksit B ve α -bisabolon oksit A) seskiterpenler arasında gerçekleşen olası dönüşümün; deneysel verilere göre ve literatür ile desteklenerek, öngörülen yolağının nasıl olabileceğini tartışabilmek için α -bisabolol ve bisabolol oksitlerin (A ve B) mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılmış olması önem arz etmektedir. Fakat (*E*)- β -farnesenin biyotransformasyonda substrat olarak kullanılmış olup olmayacağına dair; literatür bilgileri (Abraham vd., 1992; Krings vd., 2006) ve biyotransformasyon çalışmalarında (*E*)- β -farnesen yerine, farnesen izomerleri karışımını (Tablo 4.4) kullanmış olmamız nedeniyle yetersizdir. Papatya uçucu yağının biyotransformasyon çalışmalarında görece azalan (*E*)- β -farnesen miktarı, Abraham vd., (1992)'nin de bildirdiği üzere, β -farnesenin mikroorganizmalar tarafından tamamen tüketilmesi ihtimalini desteklemektedir.

4.6. α -Bisabololün Mikrobiyal Transformasyonu

α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu Tablo 3.1’de listelenen mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen metabolit karışımlarının ekstreleri metabolit varlığını doğrulamak için kontrol grupları ile İTK’da incelenmiştir (EK-88, EK-89). Kromatogram profilinde dönüşüm olduğu belirlenen ekstreler GC/MS ile analiz edilmiştir. α -Bisabololden farklı olduğu analiz edilen metabolitlerin GC/MS verileri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7. α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>A. flavus</i>	BA1	52,23	94	203	5	EK-91
	BA2	52,35	94	218	8	EK-92
	BA3	55,17	99	218	28	EK-93
<i>T. elegans</i>	BB1	44,80	143	238	10	α-Bisabolol oksit B (Firat vd., 2021)
	BB2	51,12	143	238	20	α-Bisabolol oksit A (Firat vd., 2021)
	BB3	53,95	94	168	7	EK-94
	BB4	74,83	143	178	10	EK-95
<i>M. ramannianus</i>	BC1	66,61	143	195	20	EK-96
	BC2	79,24	143	195	45	EK-97
<i>T. harzianum</i>	BD1	66,09	143	239	44	EK-98
<i>P. neocrassum</i>	BE1	54,24	143	239	94	Bisafuranol* (Firat vd., 2021)
<i>C. cassiicola</i>	BF1	46,41	143	238	7	α-Bisabolol oksit B
	BF2	53,08	94	133	2	EK-99
	BF3	53,21	45	133	3	EK-100
	BF4	61,04	45	177	2	EK-101
	BF5	63,09	45	159	2	EK-102

Tablo 4.7. (Devam) α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>P. primulinum</i>	BG1	56,20	99	194	3	EK-103
	BG2	65,14	143	254	50	EK-104
	BG3	75,12	109	222	2	EK-105
<i>P. valentinum</i>	BH1	46,42	143	238	1	α-Bisabolol oksit B
	BH2	72,44	109	202	3	EK-106
<i>R. stolonifer</i>	BI1	46,87	143	177	2	EK-107
	BI2	48,21	143	220	2	EK-108
	BI3	48,42	143	177	1	EK-109
	BI4	52,79	143	238	7	α-Bisabolol oksit A
	BI5	60,07	143	195	1	EK-110
	BI6	62,55	109	238	3	EK-111
	BI7	66,03	69	220	5	EK-112
	BI8	68,71	109	238	6	EK-113

RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **BP:** temel pik, ^aspektrumda gözlenen en ağır m/z değeri **%:** yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı (%1'den düşük olan metabolitler dikkate alınmamıştır.)
*izolasyonu ile karakterize edilen metabolit

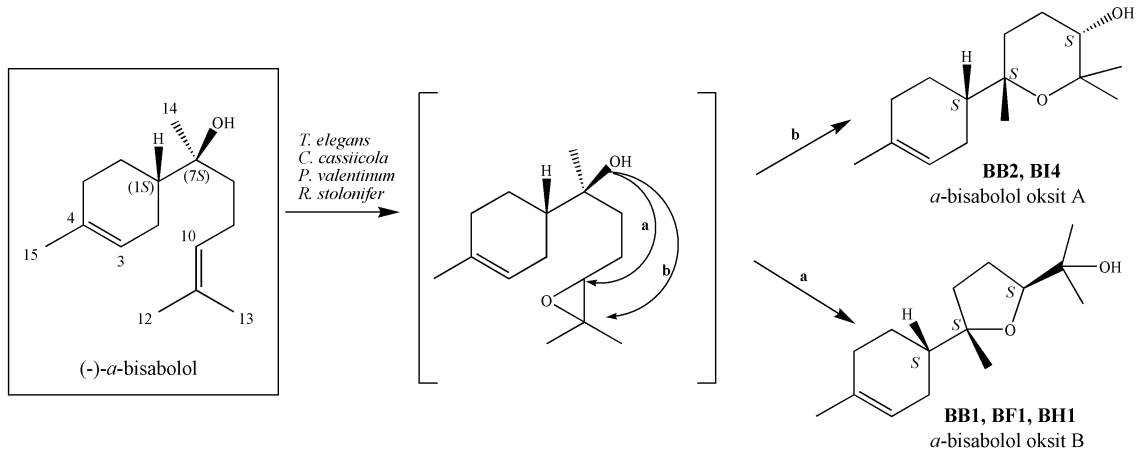
Tablo 4.7'de görüldüğü üzere *A. flavus* (**BA1-BA3**), *T. elegans* (**BB1-BB4**), *M. ramannianus* (**BC1, BC2**), *T. harzianum* (**BD1**) ve *P. neocrassum* (**BE1**), *C. cassiicola* (**BF1-BF5**), *P. primulinum* (**BG1-BG3**), *P. valentinum* (**BH1, BH2**) ve *R. stolonifer* (**BI1, BI8**) mikroorganizmaları tarafından üretilen metabolitlerin GC/MS analizleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

α -Bisabololden dönüştürülen **BB1, BB2** metabolitleri (*T. elegans*), **BF1** metaboliti (*C. cassiicola*), **BH1** metaboliti (*P. valentinum*) ve **BI4** metaboliti (*R. stolonifer*) GC ve GC/MS analiz sonucu Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi dahil olmak üzere Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 3.1 Kütüphane tarama yazılımları kullanılarak α -bisabolol oksit B (**BB1, BF1, BH1**) ve α -bisabolol oksit A (**BB2, BI4**) olarak tanımlanmıştır.

α -Bisabolol oksit B (**BB1**, **BF1**, **BH1**): EI-MS (70 eV): m/z (%) 238 (2) $[M]^+$, 220 (5), 205 (3), 179 (27), 161 (55), 143 (100), 134 (39), 125 (34), 107 (24), 105 (74), 95 (27), 85 (58), 71 (35), 59 (47), 43 (55). Veriler Miyazawa vd., (1995) çalışması ile uyumludur.

α -Bisabolol oksit A (**BB2**, **BI4**): EI-MS (70 eV): m/z (%) 238 (1) $[M]^+$, 220 (2), 180 (3), 159 (3), 143 (100), 134 (18), 125 (36), 107 (26), 93 (37), 81 (12), 71 (24), 59 (17), 43 (40). Veriler Hashidoko vd., (1991) çalışması ile uyumludur.

(-)- α -Bisabololün *T. elegans* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan **BB1**, **BB2** metabolitleri sırasıyla α -bisabolol oksit B ve α -bisabolol oksit A olarak tanımlanarak tarafımızdan raporlanmıştır (Firat vd., 2021). Ayrıca (-)- α -bisabololün *C. cassiicola*, *P. valentinum* ve *R. stolonifer* ile biyotransformasyonu da α -bisabolol oksit B (**BF1**, **BH1**) ve α -bisabolol oksit A (**BI4**) metabolitlerinin oluşumuna yol açmıştır (Şekil 4.16).

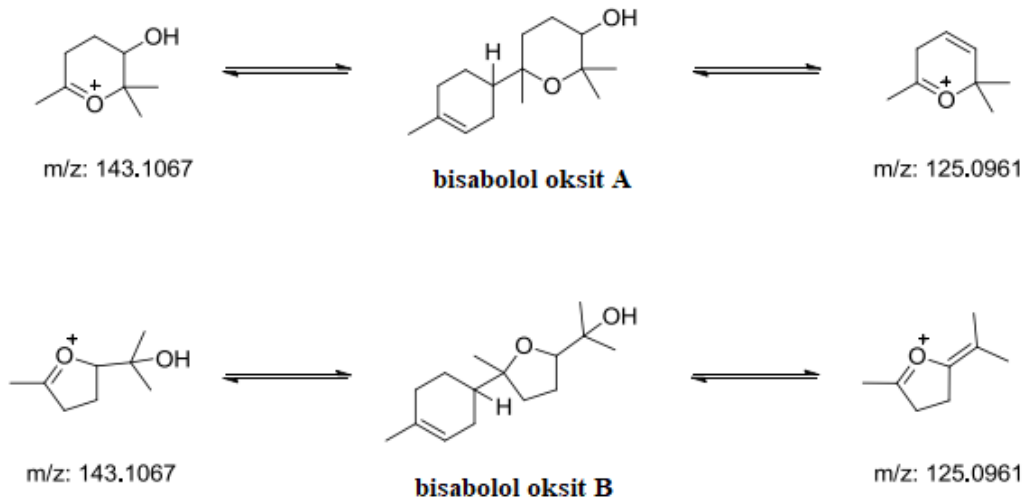


Şekil 4.16. **BB2**, **BB1** (*T. elegans*), **BF1** (*C. cassiicola*), **BH1** (*P. valentinum*), **BI4** (*R. stolonifer*) metabolitlerinin oluşum yolağı (Miyazawa vd., 1995; Talapatra ve Talapatra, 2015)

Fungusların oksidasyon, redüksiyon, izomerizasyon reaksiyonlarını enzimatik olarak gerçekleştirebildiği iyi bilinmektedir (Fazius vd., 2012; Sultana ve Saify, 2013; Hang vd., 2016; Liu vd., 2019). Daha önceki raporlara göre, *Thamnidium elegans*, *Corynespora cassiicola*, *Rhizopus* spp. allilik hidroksilaz aktivitesi nedeniyle biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Binder ve Popp 1980; Abraham vd., 1987; Martin, 2010). Ayrıca α -bisabolol'ün allilik hidroksilasyonları ile bisabolol oksitlerinin oluşabileceği bildirilmiştir (Avonto vd., 2013; Park vd., 2022). (-)- α -bisabolol'ün sudaki zayıf çözünürlüğü farmasötik uygulamalarını sınırlamaktadır. Mikrobiyal transformasyonun daha polar metabolitler oluşturmak için yararlı bir yaklaşım olduğu kabul edilmektedir (Park vd., 2022).

Temel iyon piki m/z 143 olan metabolitler:

Tablo 4.7. incelendiğinde α -bisabololün biyotransformasyonunda gözlenen, m/z 143 temel pike sahip bisabolol oksit A ve B türevi metabolitlerin çok sayıdaki mikroorganizma tarafından üretildiğini görmüş olmak şaşırtıcı değildir (Miyazawa vd., 1990; Miyazawa vd., 1995; Limberger vd., 2003; Fırat vd., 2021; Park vd., 2022). Bisabolol oksitler ve türevi bileşiklerin m/z 143 temel pikine ilave m/z 125, 107 ve 71 fragment piklerinin gözlenmesi tipiktir (Şekil 4.17; Avonto vd., 2013).

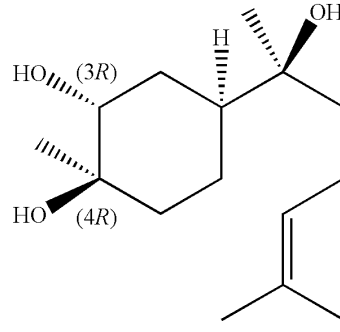


Şekil 4.17. Bisabol oksit A ve B için önerilen moleküler parçalanma mekanizması (bisabolol oksit A ve B ile bunların türevlerinde karakteristik m/z 143 ve 125 piklerinin oluşumu) (Avonto vd., 2013).

Temel iyon piki m/z 109 olan metabolitler:

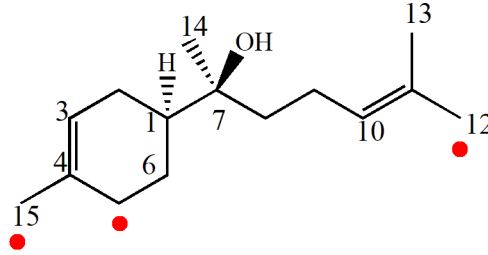
(-)- α -bisabolol biyotransformasyonunda **BG3** (*P. primulinum*), **BH2** (*P. valentinum*), **BI6** ve **BI8** (*R. stolonifer*) oluşan metabolitlerin kütle spektrumunda temel pik m/z 109 olarak gözlenmektedir (Tablo 4.7).

Miyazawa vd., (1995)'nin bildirdiği üzere, *G. cingulata* ile α -bisabololün biyotransformasyonu sonucunda izole edilen, bir molekül suyun uzaklaşması ile spektrumda gözlemlenen m/z 238 ($M^+ - H_2O$) iyon piki ile temel iyon piki m/z 109 olmak üzere, 254 molekül ağırlığına sahip bileşik; (1*S*,3*R*,4*R*,7*S*)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol olarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. (1S,3R,4R,7S)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol

Yakın zamanda Park vd., (2022) tarafından bildirilen, α -bisabololün *A. coerulea* ile biyotransformasyonu çalışmasında (1S,3R,4R,7S)- ve (1S,3S,4S,7S)-3,4-dihidroksi- α -bisabolol metabolitleri oluşmuştur. Ayrıca α -bisabolol yapısında herhangi bir çift bağın modifikasyonu olmaksızın hidroksillenmiş metabolitleri (Şekil 4.19) tanımlanmıştır (Park vd., 2022).

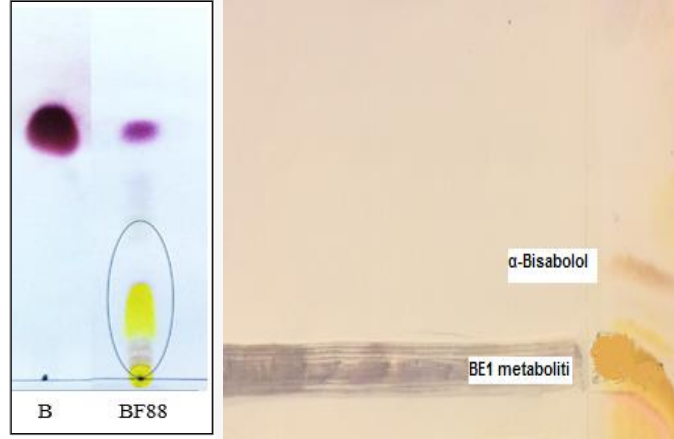


Şekil 4.19. α -Bisabololün çift bağ üzerinden olmayan hidroksillenme pozisyonları (Park vd. 2022).

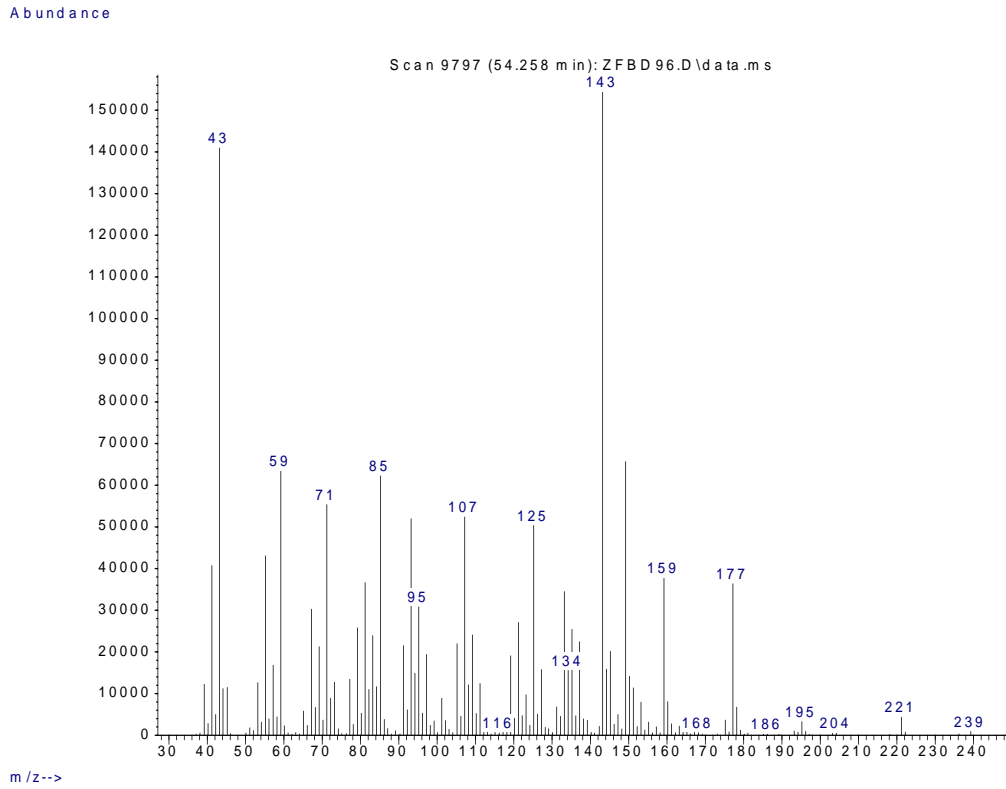
BI6 ve **BI8** metabolitlerine ait spektrumda görüldüğü üzere temel iyon piki m/z 109 olmak üzere, moleküler iyon piki olduğu düşünülen m/z 238 ve bir molekül su kaybı ile m/z 220 ($M^+ - H_2O$) fragmentleri gözlenmektedir (EK-111, EK-113). **BG3** ve **BH2** metabolitlerinin polar kolonda alıkonma zamanları dikkate alınarak, moleküler iyon pikinin spektrumda dedekte edilemediği söylenebilir (EK-105, EK-106). **BI6** ve **BI8** metabolitlerinin kütle spektrumunda gözlenen m/z 238 molekül iyon piki, α -bisabololün hidroksillenmesi ile oluşan monohidroksi- α -bisabolol yapısını düşündürmektedir. α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan **BI6**, **BI8**, **BG3**, **BH2** metabolitlerinin molekül kütlelerine göre monohidroksi- (m/z 238) ve/veya dihidroksi- (m/z 254) yapılarının oluşmuş olması muhtemeldir (Miyazawa vd., 1995; Park vd. 2022).

İzole edilen metabolit BE1'in karakterizasyonu:

P. neocrassum tarafından dönüştürülen metabolit **BE1**, kromatografik tekniklerle saflaştırılmış (%94 GC/FID, EK-114; Şekil 4.20) ve spektroskopik tekniklerle yapısı aydınlatılmıştır.



Şekil 4.20. **BE1** metabolitinin İTK profili ve prep-İTK ile izolasyonu [α -Bisabolol (**B**) ve onun *P. neocrassum* ile biyotransformasyon ekstresi (**BF88**); çözücü sistemi kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehyt-sülfürik asit]

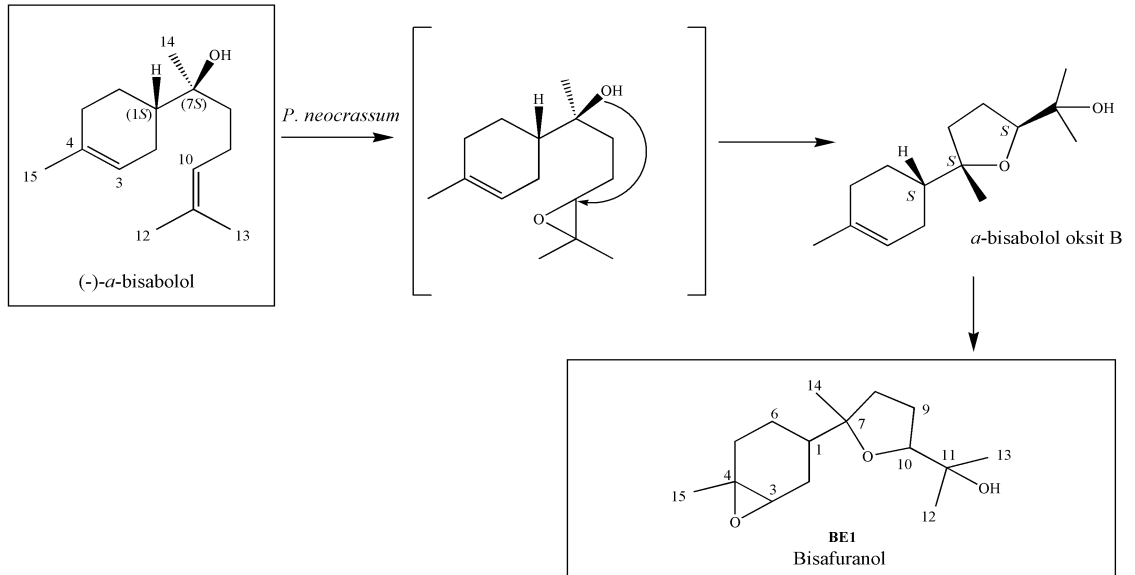


Şekil 4.21. **BE1** metabolitinin kütle spektrumu (GC/MS data)

α -Bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonrası elde edilen ekstre, kloroform/toluen 75:25 ile developpe edilerek prep-İTK ile açık sarımsı renkte yağimsı bir bileşik (metabolit **BE1**) izole edilmiştir. Yeni metabolit **BE1**'in, GC-FID, GC-MS, NMR ve FT-IR yöntemleriyle incelenerek "bisabolol oksit B türevi" C₁₅H₂₆O₃ molekül formülüne sahip bir bileşik olduğu hipotez edilmiştir. Moleküler iyon piki *m/z* 254, 239 [M⁺-CH₃] iyonu olarak gözlemlenen metil kaybı ve *m/z* 143 temel piki ile karakterizedir.

BE1 metaboliti için, detaylarına "Gereçler ve Yöntemler" kısmında değinilen 1D- (¹H- ve ¹³C-NMR) ve 2D- (COSY, HSQC ve HMBC) NMR; FT-IR, LC-MS-IT-TOF analizleri gerçekleştirilmiştir ve polarimetre cihazı ile ölçülen çevirme açısı ile özgül çevirme derecesi hesaplanmıştır.

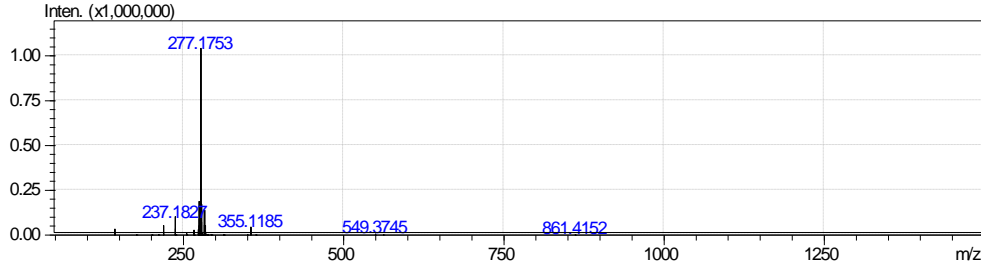
2-(5-metil-5-(6-metil-7-oksabisiklo[4.1.0]heptan-3-il)tetrahidrofuran-2-il)propan-2-ol (bisafuranol, **BE1**): Açık sarı yağimsı madde, anisaldehit/sülfürik asit reaktifi ile görselleştirilen renk: sarıdır; [α]_D²⁵ = -6.6 (c 0.01, EtOAc); HR-MS [ESI-TOF]: *m/z* [M + Na]⁺ hesaplanan C₁₅H₂₆O₃Na: 277.1774; bulunan: 277.1753. FT-IR (KBr): 3710, 2925, 1455, 1379, 1261, 1081, 1021 cm⁻¹, EI-MS (70 eV): *m/z* (%) 239 (1) [M⁺-CH₃], 221(3), 195(2), 177(26), 159(25), 149(43), 143(100), 133(22), 125(32), 119(12), 107(32), 93(31), 85(35), 71(30), 59(32), 43(72); ¹H-, ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz) detaylar Şekil 4.21, Şekil 4.23, Şekil 4.29 ve Tablo 4.8'de, verilmiştir.



Şekil 4.22. **BE1** (*P. neocrassum*) metabolitinin oluşum yolağı (Miyazawa vd., 1995; Talapatra ve Talapatra, 2015)

Şekil 4.22'de görüldüğü üzere α -bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonunda, α -bisabololün epoksidasyonu sonucu **BE1**'in epoksit ara ürünü ve ardından 7-OH'nin 10,11-çift bağına nükleofilik saldırısıyla tetrahidrofuran halkası oluşmuştur. Bu oluşum, literatürden de (Hashidoko vd., 1991) teyit edildiği üzere, m/z 143'teki temel iyon piki olarak gözlenmektedir. Oluşan α -bisabolol oksit B'nin siklohekzen halkasında C-3, C-4 çift bağının epoksidasyonu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 4.22).

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HR-MS) analizinde $[M + Na]^+$ 277.1753 (hesaplanan: 277.1774) iyon piki (Şekil 4.23) ve NMR verilerinin (Tablo 4.8) incelenmesi sonucunda, iki doymamışlık derecesine sahip metabolitin, moleküler formülü $C_{15}H_{26}O_3$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. **BE1** metabolitinin HR-ESI-MS spektrumu

1H -NMR spektrumunda, δ_H 1.31, 1.20, 1.12 ve 1.08'de dört adet üçüncül metil grubuna ait sinyaller ve δ_H 3.76 (t, 7.2 Hz) ve 2.99 (brd, 5.4 Hz) değerlerine sahip izole oksimetin rezonansları bulunmaktadır. ^{13}C NMR spektrumunda, dört metil, beş metilen, üç metin ve üç kuarterner karbon olmak üzere toplamda 15 karbon sinyali görülmektedir. δ_H 3.76 (t, $J = 7.2$ Hz) sinyaliyle birlikte, δ_H 1.75 (m)/1.50 (m) ve 1.85 (m)/1.72 (m) olarak iki eşit olmayan CH_2 sinyali, tetrahidrofuran halkasının varlığını göstermektedir. Diğer doymamışlık, üç farklı substitüentin bulunduğu bir siklohekzen yapısından kaynaklanmaktadır. Bu bilgiye, COSY spektrumunda aynı spin sisteminde gözlenen δ_H 2.99 (brd, $J = 5.4$ Hz), δ_H 1.58 (m) sinyallerine ilave δ_H 1.99 (m), 1.52 (m)/1.20 ve 2.04 (m)/1.63 olarak belirlenen üç adet CH_2 sinyaliyle ulaşılmıştır. 59.2 ve 57.7'deki karbon sinyalleri, siklohekzen yapıdaki bir epoksi fonksiyonu için karakteristiktir. Metil gruplarının konumları ve iki halkanın birbirine bağlanması, HMBC spektrumu kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.8). C-3 ile Me-15 arasındaki uzun mesafe ilişkisi, Me-15'in bağlanma noktasının C-4 ile olduğunu gösterir şekildedir. Benzer şekilde, C-10 ile

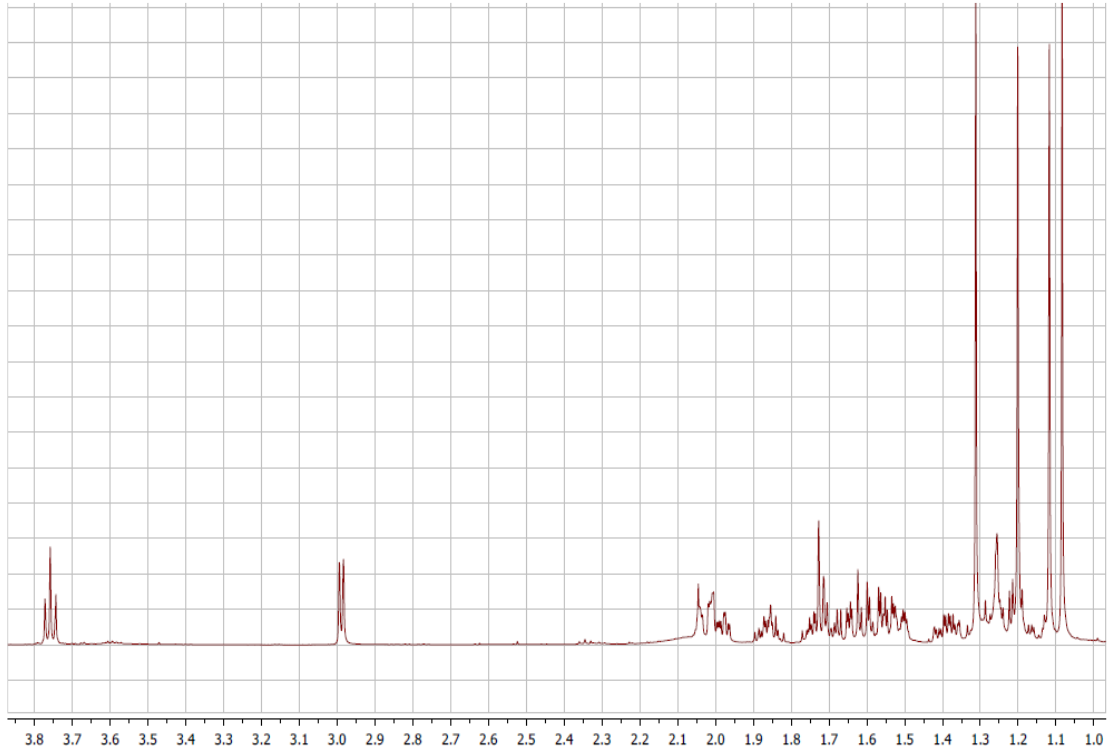
Me-12 ve Me-13 arasındaki uzun mesafeli uzaklık eşleşmesi, her iki metil grubunun C-11'e bağlandığına işaret etmektedir. C-1 ve Me-14 arasındaki belirgin çapraz-pik, Me-14'ün C-7'de konumlandığını göstermektedir. C-1, C-3, C-4, C-7 ve C-10'daki mutlak konfigürasyonlar, izole edilen metabolitin düşük miktarlarına bağlı olarak NMR verilerinin düşük kalitesi nedeniyle belirlenememiştir (Şekil 4.24-Şekil 4.28).

Tablo 4.8. Metabolit BE1 için ^{13}C ve ^1H NMR verileri ve önemli HMBC bağlantıları

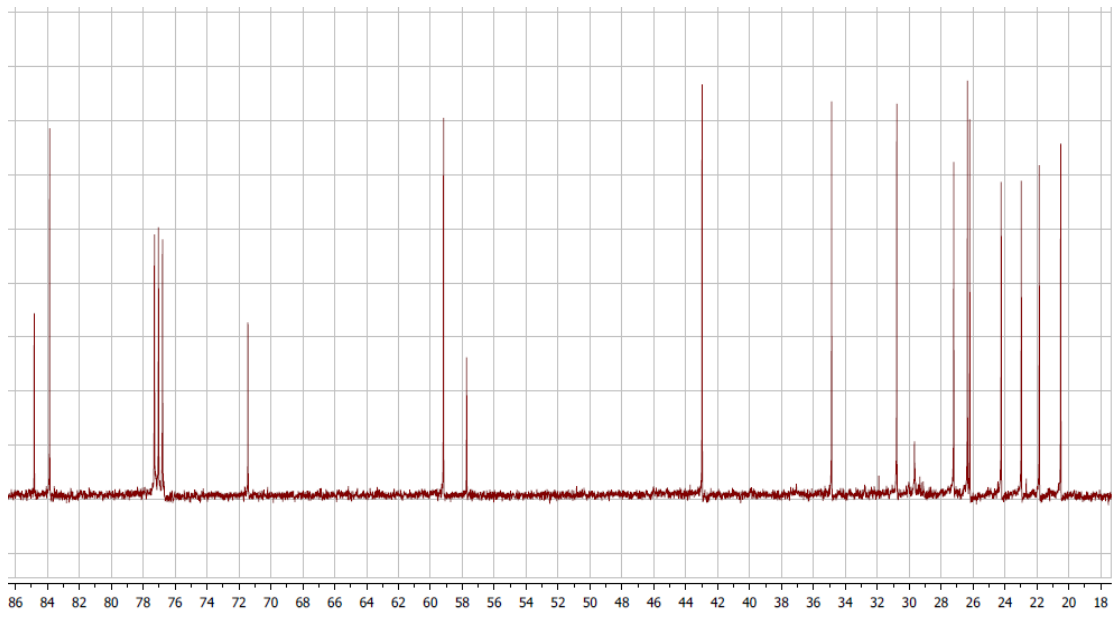
Pozisyon	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (C→H)
1	43.0	1.58 m	H ₂ -2, H-3, H ₃ -14
2	26.3	1.99 m	
3	59.2	2.99 brd (5.4)	H-1, H ₃ -15
4	57.7	-	
5	30.8	2.04 m 1.63 m	H ₃ -15
6	20.5	1.52 m 1.20 m	
7	84.8	-	H ₃ -14
8	34.8	1.75 m 1.50 m	H ₃ -14
9	26.2	1.85 m 1.72 m	
10	83.8	3.76 t (7.2)	H ₃ -12, H ₃ -13
11	71.4	-	H ₂ -9, H ₃ -12, H ₃ -13
12	24.2	1.12 s	
13	27.2	1.20 s	
14	21.8	1.08 s	
15	22.9	1.31 s	

Sinyaller COSY, HSQC ve HMBC yardımıyla saptanmıştır.

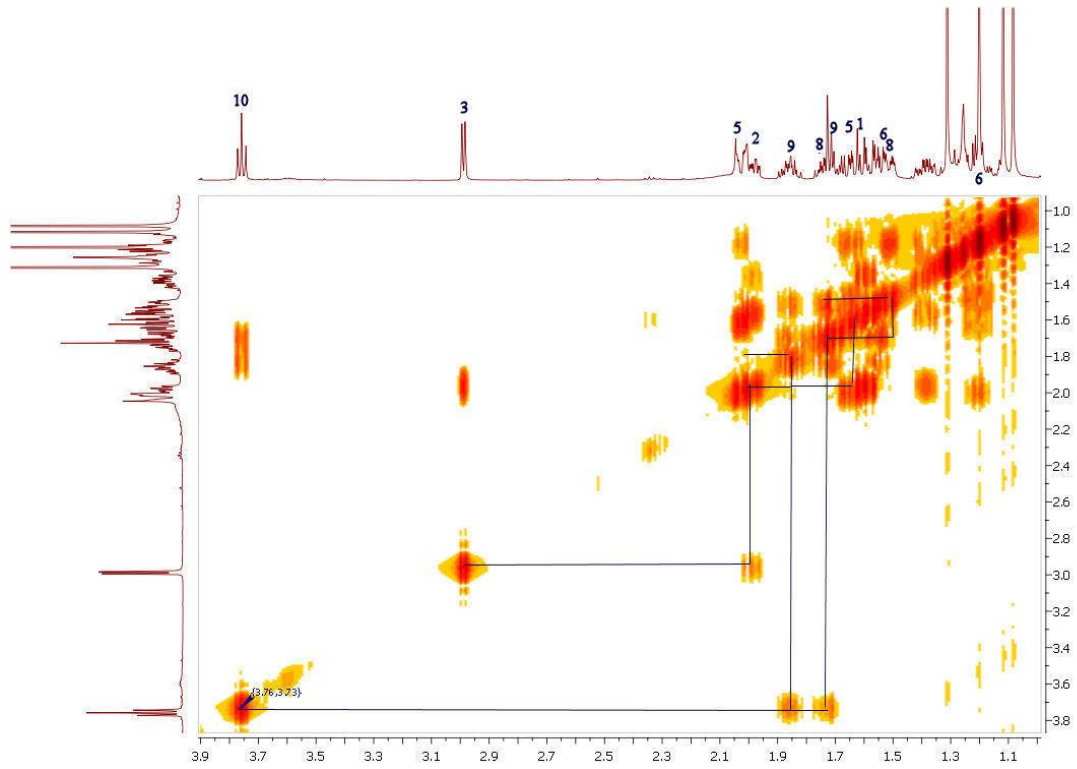
s; singlet, d; doublet, t; triplet, m; multiplet, br; broad.



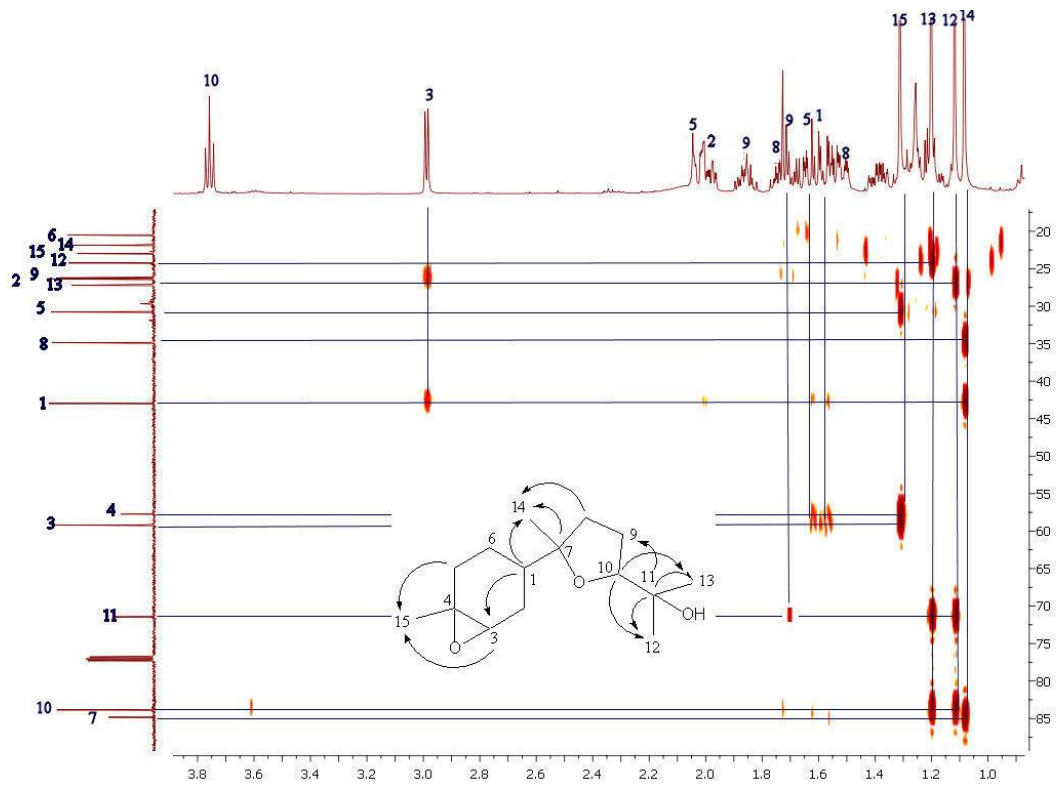
Şekil 4.24. BE1 metabolitinin ^1H NMR spektrumu



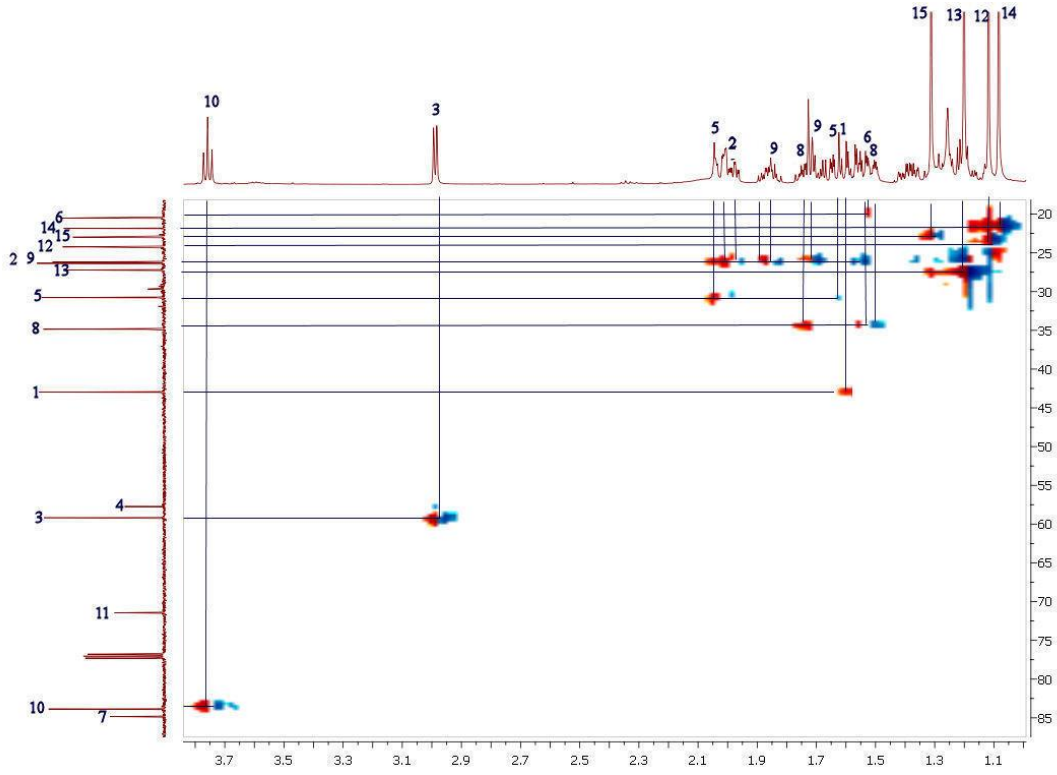
Şekil 4.25. BE1 metabolitinin ^{13}C NMR spektrumu



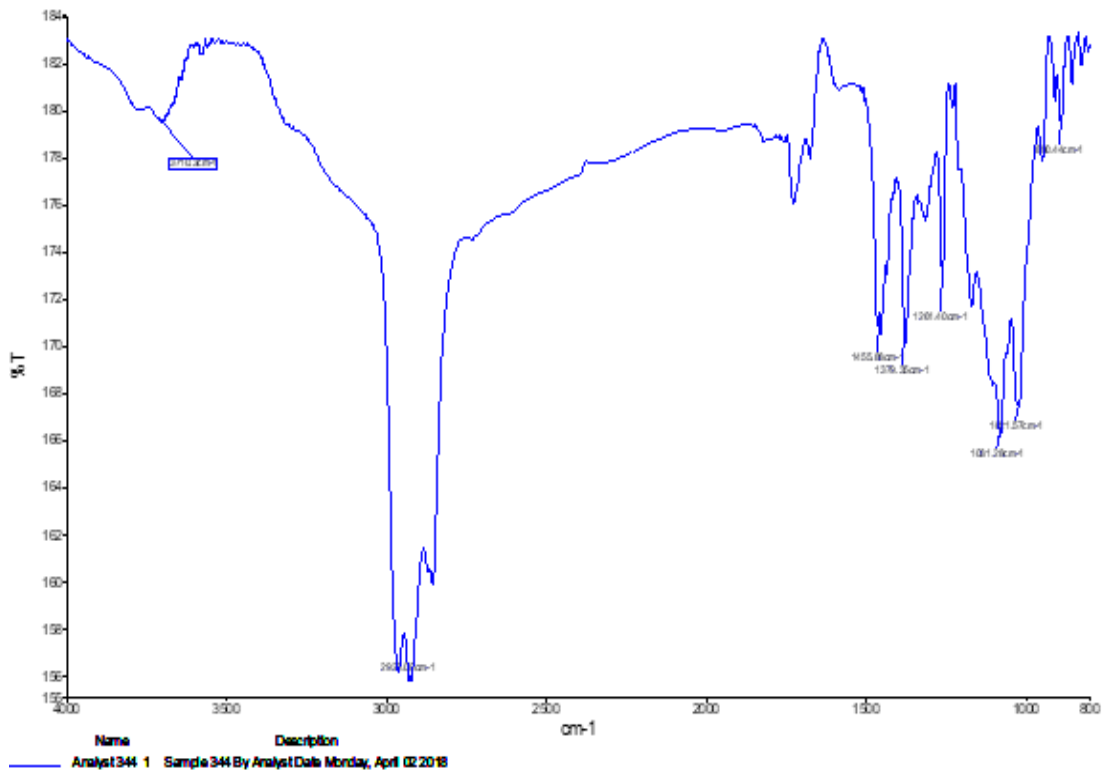
Şekil 4.26. BE1 metabolitinin 2D ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 4.27. BE1 metabolitinin 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektrumu



Şekil 4.28. BE1 metabolitinin 2D ^1H - ^{13}C HSQC spektrumu



Şekil 4.29. BE1 metabolitinin FT-IR spektrumu

BE1 metabolitinin FT-IR spektrumunda, O-H için geniş bir bant olarak 3710 cm^{-1} 'de, C-H gerilme titreşimi için 2925 cm^{-1} 'de, metil gruplarının C-H bükülmesi 1455 ve 1379 cm^{-1} 'de, C-O için ise sırasıyla 1261, 1081 ve 1021 cm^{-1} 'de absorpsiyon görülmektedir (Şekil 4.29).

α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan **BE1** metaboliti bildiğimiz kadarıyla ilk kez bu tez kapsamında karakterize edilmiş 2-(5-metil-5-(6-metil-7-oksabisiklo[4.1.0]heptan-3-il)tetrahidrofuran-2-il)propan-2-ol (akronim: bisafuranol) olarak adlandırılmış ve tarafımızdan yayınlanmıştır (Firat vd., 2021).

Bisabolol oksit B ve türevleri gibi 2,5-disübstitüe tetrahidrofuran iskeletine sahip yapılar, daha az yaygın doğal ürünlerdir (Avonto vd., 2013). Bu tür iskeletlere sahip bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik potansiyelleri çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir (Voelker vd., 2009; Liu vd., 2020). Ayrıca, 2,5-disübstitüe tetrahidrofuran iskeleti, sentetik organik kimya çalışmalarında önemli bir hedef olmuştur, çünkü bu yapıya sahip bileşiklerin sentezi ve işlevselleştirilmesi çeşitli sentetik yöntemlerin geliştirilmesine ilham vermiştir (Shin vd., 2005; Freifeld vd., 2006; Jalce vd., 2009; Sheikha, 2014).

4.7. α -Bisabolol oksitlerin (A ve B) Mikrobiyal Transformasyonu

Bölüm 4.2'de açıklandığı üzere papatya uçucu yağından izole edilen α -bisabolol oksitler (A ve B) mikrobiyal transformasyon çalışmalarında substrat olarak kullanılmıştır. α -Bisabolol oksitler 10 mg/mL asetonda çözülerek 22 mikroorganizma (Tablo 3.1) ile dönüştürülmüştür. Biyotransformasyon sonucu ekstre edilen metabolit karışımlarının İTK analizi gerçekleştirilmiştir (EK-115). İTK profilinde substrattan farklı spotlara sahip ekstreler GC/MS ile analiz edilmiş; fakat metabolit varlığı dedekte edilememiştir. Analiz için gereken madde konsantrasyonunun düşük olabileceği düşünülerek, papatya uçucu yağından izole edilen α -bisabolol oksitler 50 mg/mL konsantrasyonda asetonda çözülerek *P. chrysogenum* mikroorganizması ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş ve oluşan metabolitler GC/MS ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir.

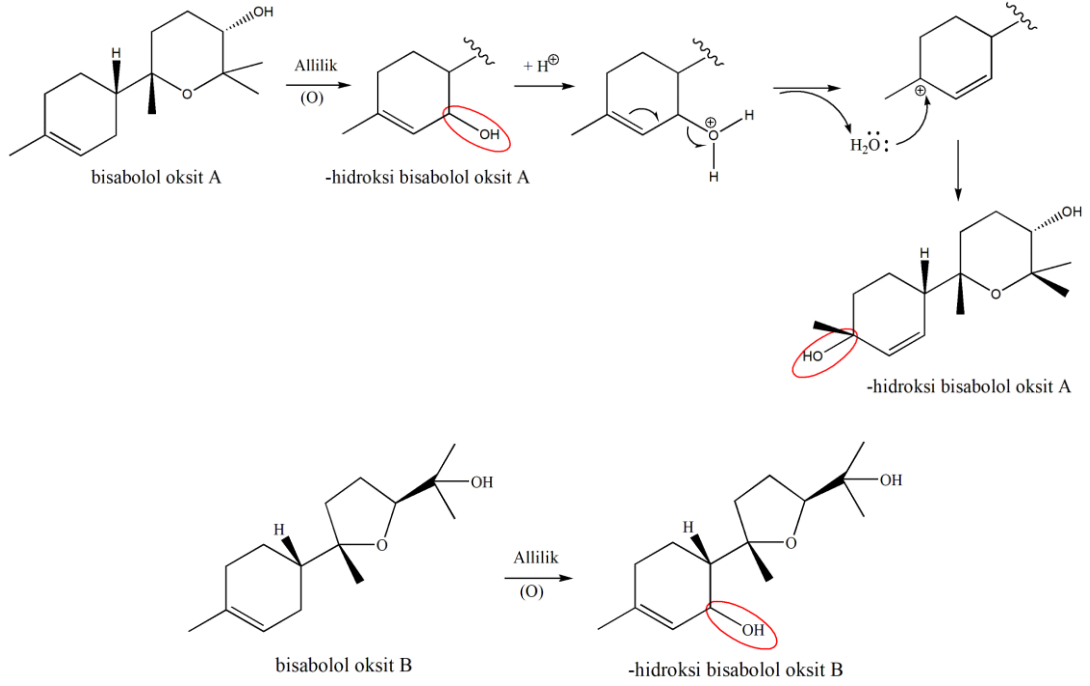
Tablo 4.9. α -Bisabolol oksitlerin biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>P. chrysogenum</i>	BoA1	46,11	94	236	2	EK-116
	BoA2	47,31	93	193	1	EK-117
	BoA3	53,89	143	154	2	EK-118
	BoA4	56,10	143	143	1	EK-119
	BoA5	63,61	143	239	5	EK-120
	BoA6	64,57	143	213	2	EK-121
	BoA7	69,52	109	238	8	EK-122
	BoA8	73,58	143	221	2	EK-123

RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **BP:** temel pik, ^aspektrumda gözlenen en ağır m/z değeri **%:** yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı (%1'den düşük olan metabolitler dikkate alınmamıştır.)

α -Bisabolol oksitlerin *P. chrysogenum* ile biyotransformasyonu sonrası elde edilen ekstre GC/MS ile analiz edilmiş ve analiz verilerine göre; α -bisabolol oksit A ~%48 (GC) ve α -bisabolol oksit B ~%6 (GC) olmak üzere, 8 adet metabolit (BoA1-BoA8) oluşumu tespit edilmiştir. Oluşan metabolitlerin düşük konsantrasyonları (%1-8) nedeniyle izolasyonu ve tanımlanması mümkün olamamıştır.

P. chrysogenum ile oluşan metabolitlerin görece miktarlarının oldukça düşük (%1-8) olduğu gözlenmektedir (Tablo 4.9). Temel iyon piki m/z 143 olan metabolitler (**BoA3-BoA6** ve **BoA8**); papatya uçucu yağı ve bisabolol biyotransformasyonunda açıklandığı üzere bisabolol oksit türevi yapılara işaret etmektedir. Bildiğimiz kadarıyla bisabolol oksitlerin substrat olarak kullanıldığı biyotransformasyon çalışması daha önce gerçekleştirilmemiştir; fakat α -bisabolol üzerinden mikrobiyal transformasyon ile bisabolol oksit A ve B'ye ve türevlerine dönüşümü raporlanmıştır (Miyazawa vd., 1995; Limberger vd., 2003; Firat vd., 2021; Park vd., 2022). α -Bisabolol bir çok bitkide yaygın olarak bulunurken, furano ve pirano türevleri (bisabolol oksitler) daha az yaygın olan doğal ürünlerdir (Avonto vd., 2013). Avonto vd., (2013) papatya metanol ekstresinden izole edilen bisabolol oksitlerin oluşumu ve türevlendirilmesinin olası yolağını tartıştığı çalışmada, bisabolol oksit A ve B'nin enzimatik oksidasyon ile türevlerine dönüşebileceği belirtilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Bisabolol oksitlerin önerilen enzimatik oksidasyonu (Avonto vd., 2013)

P. chrysogenum ile gerçekleştirilen α -bisabolol oksit karışımının biyotransformasyonunda oluşan **BoA3-BoA6** ve **BoA8** metabolitleri Şekil 4.30'da açıklandığı üzere bisabolol oksitlerin hidroksillenmesi ile oluşan oksidasyon ürünleri olabilir. GC/MS kütüphanesi kullanılarak bilinen molekül spektrumları ile karşılaştırılmasında, **BoA3-BoA6** metabolitlerinin, α -bisabolol oksit A yapısına daha benzer moleküller olduğunu göstermiştir.

Alıkonma zamanı RT: 46,11 dk, temel piki m/z 94 ve spektrumda gözlenen en ağır m/z değeri 236 olan, oldukça düşük verimle oluşan (%2) **BoA1** metaboliti (Tablo 4.9); papatya uçucu yağının *B. cinerea* ve *R. stolonifer* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan, sırasıyla **K1** (RT: 45,72 dk, BP: 94, M⁺ 236, %3) ve **S1** (RT: 46,12 dk, BP: 94, M⁺ 236, %11) metabolitlerine oldukça benzerdir (Tablo 4.6). Ayrıca α -bisabololün biyotransformasyonunda da temel pik m/z 94 olan fakat moleküler iyon piki spektrumda tespit edilemeyen metabolitlere (**BA1, BA2, BB3, BF2**) rastlanmaktadır.

4.8. Farnesen İzomerleri Karışımının Mikrobiyal Transformasyonu

Farnesen izomerleri karışımının GC/MS'de analiz edilen bileşenleri Tablo 4.4'te detaylandırıldığı üzere, ana bileşenleri β -bisabolen (%17) (*E*)- α -bisabolen (%15), (*E,E*)- α -farnesen (%12), (*E*)- β -farnesen (%10), α -farnesen (%8), (*Z*)- β -farnesen (%6),

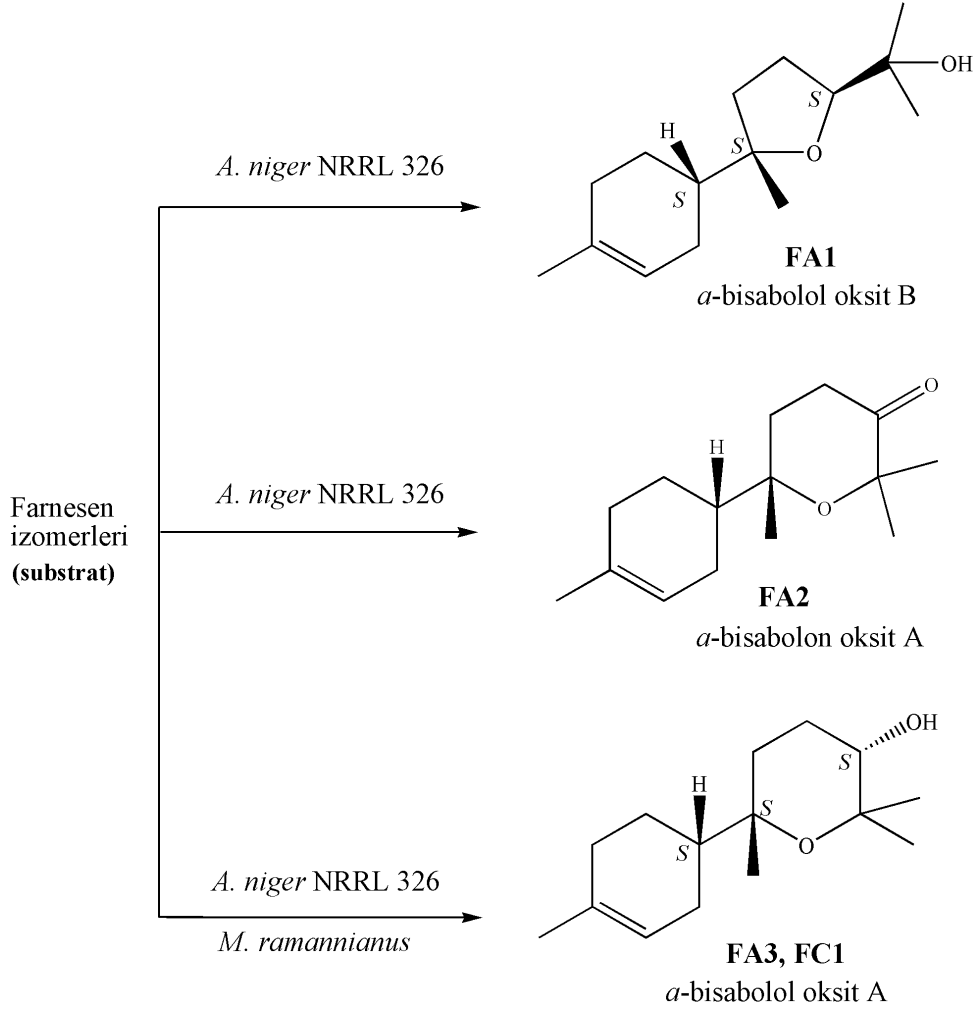
(*Z,E*)- α -farnesen (%5) dir. Ayrıca karışımda ~%3 seskiterpen alkol [~%1 nerolidol ve ~%2 α -bisabolol) analiz edilmiştir (Tablo 4.4). Karışımın 22 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyon potansiyeli araştırılmıştır. Ekstre edilen metabolit karışımları İTK ile analiz edilmiştir (EK-89) ve *A. niger* NRRL 326, *A. flavus*, *M. ramannianus*, *R. stolonifer* mikroorganizmaları ile oluşan metabolitlerin GC/MS analizi sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. *Farnesen izomerleri karışımının biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin GC/MS analiz sonuçları*

Mikroorganizma	Metabolit	RT (dk)	BP (<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>) ^a	%	Kütle spektrumu
<i>A. niger</i> NRRL 326	FA1	46,37	143	238	2	α -Bisabolol oksit B
	FA2	47,45	93	236	1	α -Bisabolon oksit A Şekil 4.32
	FA3	52,93	143	238	16	α -Bisabolol oksit A
<i>A. flavus</i>	FB1	65,15	109	238	62	EK-124
<i>M. ramannianus</i>	FC1	52,93	143	238	11	α -Bisabolol oksit A
<i>R. stolonifer</i>	FD1	48,73	132	284	4	EK-125

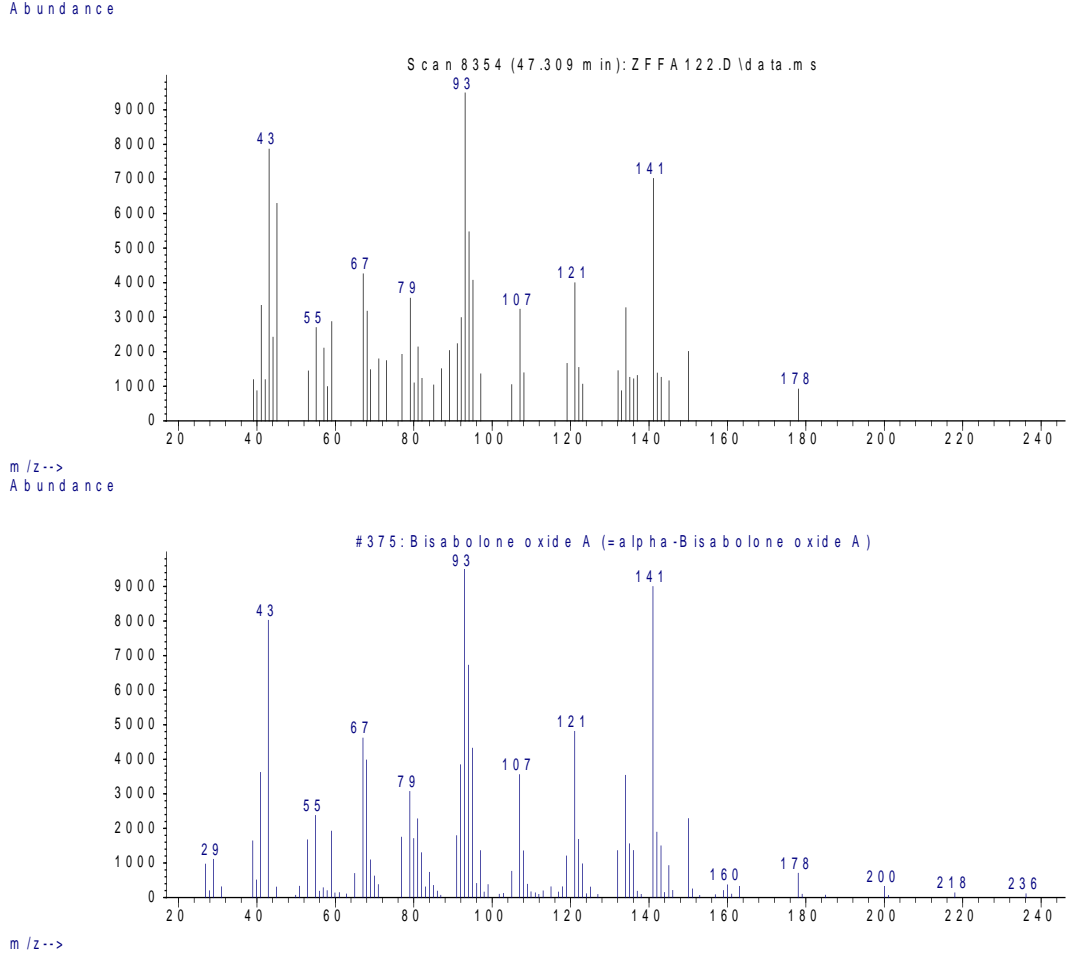
RT: alıkonma zamanı, **dk:** dakika, **BP:** temel pik, ^aspektrumda gözlenen en ağır *m/z* değeri **%:** yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı (%1'den düşük olan metabolitler dikkate alınmamıştır.)

GC ve GC/MS analiz sonuçlarına göre; farnesen izomerlerinin biyotransformasyonu sonucu oluşan 6 metabolitten 4'ü (**FA1**, **FA2**, **FA3**, **FC1**) tanımlanmıştır (Tablo 4.10). Substratın *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonunda oluşan metabolitler; α -bisabolol oksit B (**FA1**), α -bisabolon oksit A (**FA2**) ve α -bisabolol oksit A (**FA3**) olarak belirlenmiştir. Ayrıca α -bisabolol oksit A (**FC1**), *M. ramannianus* mikroorganizması tarafından da üretilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Farnesen izomerleri karışımının *A. niger* NRRL 326 ve *M. ramannianus* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler

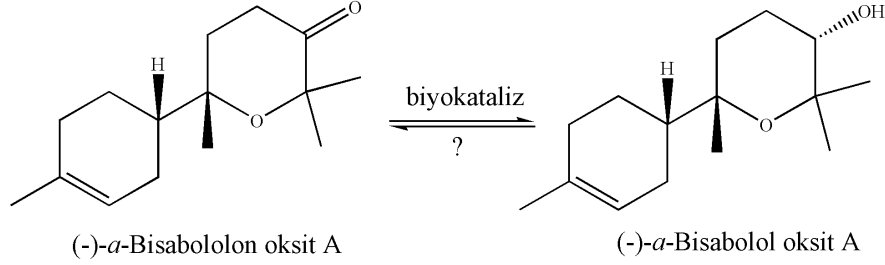
Substrat karışımında hem asiklik hem de monosiklik yapıda seskiterpenlerin bulunması nedeniyle *α*-bisabolol oksit A, B ve *α*-bisabolon oksit A oluşumuna öncü olan substratların varlığını belirlemek zordur. Abraham vd., (1992) tarafından, *β*-farnesenin mikrobiyal transformasyon çalışmaları için uygun bir substrat olmadığı bildirilmiştir. *β*-Farneseni mikroorganizmalarla okside etme çalışmalarında substratın tamamen tüketilmesine bağlı olarak hiçbir metabolit tespit edilememiştir. Bu sonucun olası nedeni, konjuge dienin oksijene ve asitlere olan duyarlılığı olarak belirtilmiştir (Abraham vd., 1992). Fakat *α*-farnesen ve farnesen sülfonların substrat olarak kullanıldığı mikrobiyal transformasyon çalışmaları vardır (Abraham vd., 1992; Krings vd., 2006). *α*-Farnesenin mikroorganizmalar ile transformasyon potansiyelinin araştırıldığı çalışmada, seskiterpen alkollerin ve siklik terpenlerin oluşumu bildirilmiştir (Krings vd., 2006).



Şekil 4.32. *A. niger* NRRL 326 ile oluşan FA2 metaboliti ve bisabolon oksit A'nın GC/MS spekturumu

Bisaboloitlerin biyosentezi ile ilgili papatya üzerinde yapılan genetik çalışmalar, bisabolol oksit A'dan biyosentez yolu ile bisabolon oksit A'nın enzimler aracılığıyla oluşabileceği önerilmektedir (Horn vd., 1988; Wagner vd., 2005). Bu bilgi ışığında, *A. niger* NRRL 326 mikroorganizmasının farnesen izomerleri karışımından bisabolol oksit A ve B metabolitlerini ürettiği, bu dönüşüm için substrat karışımındaki hangi bileşiği kullandığı bilinmemekle birlikte, oluşan α -bisabolol oksit A üzerinden, mikrobiyal enzimler aracılığıyla, α -bisabolon oksit A oluşumuna neden olduğu söylenebilir. Bir diğer yaklaşım ise mikroorganizmalar aracılığıyla bisabolon oksit A'nın, bisabolol oksit A'ya dönüşümüdür. Bildiğimiz kadarıyla α -bisabolon oksit A'nın biyotransformasyonuna ait bir çalışma bildirilmemiştir; fakat siklik ketonların mikroorganizmalar ve izole enzimler ile siklik alkollere dönüşümü geçmiş çalışmalarda raporlanmıştır (Keppler vd., 2005; Moore vd., 2007; Javidnia vd., 2016). Bu nedenle bisabolon oksit A, mikroorganizmalar

aracılığıyla bisabolol oksit A'ya dönüştürülmüş olabilir. Fakat bu iki yaklaşımdan (Şekil 4.33) birini desteklemek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.



Şekil 4.33. Bisabolon oksit A ve bisabolol oksit A'nın olası biyotransformasyonu

4.9. Kamazulenin Mikrobiyal Transformasyonu

Papatya uçucu yağından izole edilen kamazulenin biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar (Tablo 3.1) ile dönüşüm potansiyeli araştırılmıştır. Elde edilen ekstralar İTK'da incelenmiş ve GC/MS ile analiz edilmiştir; analiz sonucu metabolit oluşumuna rastlanmamıştır. Ayrıca kamazulenin biyotransformasyonu ile ilgili geçmiş bir çalışma raporuna da rastlanmamıştır.

4.10. *In vitro* Biyolojik Aktivite Testleri

4.10.1. *M. recutita* uçucu yağı ve bileşenlerinin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi

Papatya uçucu yağı, ana bileşenlerinin (standart maddeler; α -bisabolol, (*E*)- β -farnesen, α -bisabolol oksit A ve kamazulen) ve pozitif kontrolün (askorbik asit) DPPH radikal süpürme kabiliyeti spektrofotometrik olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.11). Tez kapsamında gerçekleştirilen anitoksidan aktivite çalışmasının sonuçları, tarafımızdan Firat vd., (2018)'de yayınlanmıştır.

Tablo 4.11'e göre papatya uçucu yağı ve ana bileşenlerinin DPPH serbest radikal süpürme etkinliklerinin kamazulen > α -bisabolol oksit A > papatya uçucu yağı > (*E*)- β -farnesen > α -bisabolol, şeklinde olduğu görülmektedir. Yüksek antioksidan aktivite gösteren pozitif kontrol askorbik asitin IC₅₀ değeri 0,015 mg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar kamazulenin DPPH* testinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Kamazuleni sırasıyla α -bisabolol oksit A ve papatya uçucu yağı takip etmektedir. Deneysel çalışmalarda kullandığımız papatya uçucu yağı [α -bisabolol oksit A %47,7; (*E*)- β -farnesen %21,5; kamazulen %4,1; α -bisabolol %2,1] kamazulen içerikli

ve α -bisabolol oksit A yönünden zengindir. Kamazulenin ($IC_{50} = 0,27$ mg/mL) ve α -bisabolol oksit A'nın ($IC_{50} = 1,50$ mg/mL) yüksek antioksidan etkisi, papatya uçucu yağının antioksidan aktivitesine ($IC_{50} = 2,20$ mg/mL) katkıda bulunmaktadır.

Ayrıca α -bisabolol ve α -bisabolol oksit A'nın moleküler yapısı ile ilgili yapılan çalışmada; α -bisabolol oksit A'nın, α -bisabololden biraz daha asidik bir alkol olduğu ve yapısındaki hidroksil grubunun, çevresinde sterik engel oluşturan hacimli gruplar olmadığı için kolaylıkla hidrojen bağları oluşturabildiği belirtilmiştir (Ortiz vd., 2016).

Tablo 4.11. Papatya uçucu yağı ve bileşeninin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi

Madde	DPPH
	IC_{50} (mg/mL)
Papatya uçucu yağı	2,20
α -Bisabolol	43,88
α -Bisabolol oksit A	1,50
(E)- β -Farnesen	7,45
Kamazulen	0,27
Askorbik asit (referans)	0,015

Önceki çalışmalarda, kamazulen yönünden zengin papatya uçucu yağının [kamazulen (%31,2), 1,8-sineol (%15,2), β -pinen (%10,11), α -pinen (%8,14), α -bisabolol (%7,45) ve terpinen-4-ol (%4,11)] DPPH serbest radikal süpürme yöntemiyle 350 μ g/mL'de %78 etki gösterdiği ve bu değer aynı konsantrasyondaki BHT (%89) standardına yakın olduğu bildirilmiştir (Farhoudi, 2013). Stanojevic vd., (2017) tarafından, ana bileşenleri β -farnesen (%29,8), α -farnesen (%9,3), α -bisabolol ve onun oksitleri (%15,7), kamazulen (%6,4), germakren D (%6,2) ve spiroeter (5.6 %) olarak tanımlanan papatya uçucu yağının en iyi antioksidan özelliği DPPH* süpürme yöntemiyle 90 dakikalık inkübasyondan sonra 2,07 mg/mL IC_{50} değeri ile gösterilmiştir. Ayoughi vd., (2011) tarafından bileşimi Tablo 2.2'de verilen papatya uçucu yağının DPPH* süpürme IC_{50} değeri $5,63 \pm 0,20$ mg/mL olarak belirlenmiştir.

Bisabolol'ün dikkate değer bir antioksidan olduğu iddia edilmesine rağmen, deneysel sonuçlar (-)- α -bisabololün *in vitro* DPPH* süpürmede ($IC_{50} >449,7$ μ M; askorbik asit =17,03 μ M) zayıf etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Van Zyl vd., 2006).

Yapılan bir başka çalışma da bu veriyi desteklemektedir: α -Bisabolol *in vitro* DPPH* testinde zayıf antiradikal aktivite göstermektedir ($IC_{50} > 10,000 \mu\text{g/mL}$) (Ren vd., 2018).

Doğal bir azulen türevi olan kamazulenin önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtilmiştir (Rekka vd., 1996). Capuzzo vd. (2014) tarafından kamazulenin DPPH* süpürme testinde etkisiz olduğu, ABTS* ile test edildiğinde ise yüksek serbest radikal süpürme aktivitesine sahip ($IC_{50} = 3,7 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca tarafımızdan papatya uçucu yağı ve ana bileşenlerinin antioksidan aktivite sonuçlarının bildirildiği çalışma (Firat vd., 2018), uçucu yağın toplam aktivitesinden sorumlu olabilecek α -bisabolol oksit A ve (*E*)- β -farnesen bileşenlerinin *in vitro* antioksidan aktivitesine ilişkin ilk rapordur.

4.10.2. *M. recutita* uçucu yağının ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi

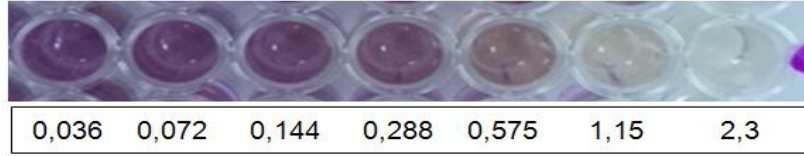
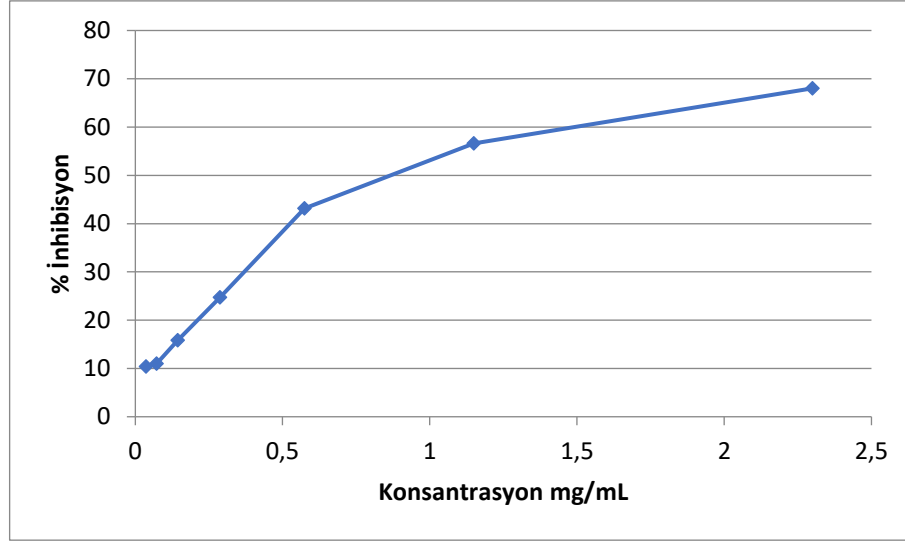
Papatya uçucu yağının Tablo 3.1'de listelenen mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu sonucu dönüşüm olduğu tespit edilen ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi araştırılmıştır. Konsantrasyona bağlı DPPH % inhibisyon grafiği dikkate alınarak papatya uçucu yağının ve metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12).

Antioksidan aktivite sonuçlarda görüldüğü gibi (Tablo 4.12) papatya uçucu yağı ve farklı mikroorganizmalarla elde edilen metabolit karışımlarının DPPH radikalini süpürücü etkisi askorbik asite ($IC_{50} = 0,015 \text{ mg/mL}$) göre daha düşüktür. Fakat papatya uçucu yağı ($IC_{50} = 2,20 \text{ mg/mL}$) ve metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin IC_{50} değerleri (0,45 ile 7,63 mg/mL) karşılaştırıldığında *A. flavus* ($IC_{50} = 7,63 \text{ mg/mL}$), *R. stolonifer* ($IC_{50} = 7,57 \text{ mg/mL}$), *C. elegans* ($IC_{50} = 5,37 \text{ mg/mL}$) ve *C. cassiicola* ($IC_{50} = 4,72 \text{ mg/mL}$) ile oluşan metabolit karışımları hariç tüm test edilen ekstrelerin papatya uçucu yağına yakın ya da daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle papatya uçucu yağının *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonu sonucu metabolit karışımlarını içeren ekstrenin 0,45 mg/mL olan IC_{50} değeri, papatya uçucu yağı IC_{50} değerinden yaklaşık 5 kat daha yüksek DPPH radikal süpürücü etkiye sahiptir.

Tablo 4.12. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi

Madde	IC ₅₀ (mg/mL)
Papatya uçucu yağı	2,20
<i>A. parasiticus</i> metabolit karışımları	2,19
<i>A. niger</i> NRRL 326 metabolit karışımları	0,45
<i>A. niger</i> ATCC 10549 metabolit karışımları	1,65
<i>P. adametzii</i> metabolit karışımları	0,57
<i>F. culmorum</i> metabolit karışımları	2,28
<i>T. elegans</i> metabolit karışımları	2,47
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	0,51
<i>T. harzianum</i> metabolit karışımları	2,76
<i>B. cinerea</i> metabolit karışımları	0,68
<i>S. cerevisiae</i> metabolit karışımları	1,38
<i>C. elegans</i> metabolit karışımları	5,37
<i>P. neocrassum</i> metabolit karışımları	1,07
<i>B. velezensis</i> metabolit karışımları	1,89
<i>A. flavus</i> metabolit karışımları	7,63
<i>C. cassicola</i> metabolit karışımları	4,72
<i>P. primulinum</i> metabolit karışımları	1,66
<i>P. valentinum</i> metabolit karışımları	1,97
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	7,57
Askorbik asit (referans)	0,015

DeneySEL çalışma örneği olarak Şekil 4.34'te papatya uçucu yağının *B. cinera* mikroorganizması ile biyotransformasyonu sonucu ekstre edilen metabolit karışımlarının konsantrasyona karşı- % inhibisyon grafiği ve mikroplaka kuyucuklarında konsantrasyona bağlı renk açılması verilmiştir.



Şekil 4.34. *B. cinerea* ekstresinin DPPH radikal süpürücü etkisi [Ekstrenin farklı konsantrasyonlarının 517 nm'de ölçülen DPPH absorpsiyona bağlı %inhibisyon grafiği (üstte) ve ekstenin farklı konsantrasyonlarda (mg/mL) DPPH* ile reaksiyonu sonucu mikropalakada gözlenen renk değişimi (altta)]

4.10.3. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi

α -Bisabololün Tablo 3.1'de listelenen mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu sonucu dönüşüm olan ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkisi araştırılmıştır. Konsantrasyona bağlı DPPH* %inhibisyon grafiği dikkate alınarak α -bisabololün ve metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.13).

Tablo 4.13'te görüldüğü üzere α -bisabolol ve farklı mikroorganizmalarla elde edilen metabolit karışımlarının DPPH radikalini süpürücü etkisi askorbik asit standartlarına göre daha düşüktür. Fakat α -bisabolol (IC₅₀ = 43,88 mg/mL) ve metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında tüm test edilen ekstrelerin α -bisabololden çok daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmektedir. *A. flavus* ve *C. cassiicola* metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin yeterli konsantrasyonları bulunmadığından IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır. En yüksek antioksidan etkiyi, α -bisabololün *T. harzianum* (IC₅₀ = 1,45 mg/mL) ile

biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit karışımları ekstresi göstermektedir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin DPPH* testi ile belirlenen antioksidan aktivitesi

Madde	IC ₅₀ (mg/mL)
α -Bisabolol	43,88
<i>A. flavus</i> metabolit karışımları	*
<i>T. elegans</i> metabolit karışımları	2,13
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	1,93
<i>T. harzianum</i> metabolit karışımları	1,45
<i>P. neocrassum</i> metabolit karışımları	2,11
<i>C. cassicola</i> metabolit karışımları	*
<i>P. primulinum</i> metabolit karışımları	2,47
<i>P. valentinum</i> metabolit karışımları	2,08
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	11,3
Askorbik asit (referans)	0,015

* IC₅₀ değeri belirlenememiştir.

α -Bisabololün funguslar ile mikrobiyal transformasyonu sonucu moleküle -OH grubunun eklenmesi ve molekülün bisiklik oksitlerine dönüşümü tipiktir (Miyazawa vd., 1990, Miyazawa vd., 1992a, Miyazawa vd., 1992b, Miyazawa vd., 1993a; Miyazawa vd., 1993b; Miyazawa vd., 1995; Limberger vd., 2003; Firat vd., 2021; Park vd., 2022). Bisabololün zayıf antioksidan aktivitesine karşılık (Van Zyl vd., 2006; Firat vd., 2018; Firat vd., 2021) bisabolol oksit A'nın (IC₅₀ = 1,50 mg/mL) ölçülediğimiz yüksek DPPH radikal süpürücü etkisi; metabolit karışımlarının α -bisabolole göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermesi durumunu desteklemektedir.

4.10.4. *M. recutia* uçucu yağı ve bileşenlerinin antimikrobiyal etkisi

Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919) ve Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567,

Salmonella typhimurium ATCC 13311) olmak üzere 7 adet bakterileri suşuna karşı papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel etkisi ve 4 adet *Candida* suşuna karşı antikandidal etkisi mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak test edilmiş, minimum inhibisyon konsantrasyonları mg/mL cinsinden belirlenmiştir (Tablo 4.14, Tablo 4.15). Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel ve antikandidal aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen deney prosedürü “gereçler ve yöntemler” kısmında açıklandığı şekilde ve test edilecek maddelerin elde bulunan miktarlarına bağlı olarak hazırlanan konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. *P. acnes* ve *S. epidermidis*, akne gibi cilt hastalıklarıyla ilişkili fırsatçı patojenlerdir. Bu nedenle antibakteriyel aktivite testi içerisine bu bakteri suşları da eklenmiştir.

Tablo 4.14. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)]

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve bileşenleri					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	α -Bisabolol	α -Bisabolol oksit A	(E)- β -Farnesen	Kamazulen	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>5	>0,1	>1,5	>1	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	5	0,1	0,38	0,5	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>5	>0,1	>1,5	>1	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC13311	>5	5	>0,1	>1,5	>1	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,5	0,62	0,1	>1,5	>1	\leq 0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>5	>0,1	>1,5	>1	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	5	1,25	0,1	>1,5	>1	\leq 0,0002	0,002

Papatya uçucu yağı ve bisabolol, farmakolojik etkileri yanında güvenli kabul edilen ve çeşitli kozmetik ürünlerin formülasyonlarına katılan bileşenlerdir (Schilcher, 2005a; Johnson Jr vd., 2018). Ayrıca her ikisi de antimikrobiyal etkileri ile anılır (Roby vd., 2013; Kazemi, 2015).

Tablo 4.14’te görüldüğü üzere; papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel etkisi amoksisilin ve kloramfenikol standartları ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

Fakat test edilen maddeler kendi aralarında karşılaştırıldığında; papatya uçucu yağının, diğer bakteri suşlarına kıyasla *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e karşı nispeten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu söylenebilir (sırasıyla MİK: 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL). α -Bisabololün *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e karşı papatya uçucu yağından daha etkili olduğu görülmektedir (sırasıyla MİK: 0,62 mg/mL ve 1,25 mg/mL). α -Bisabolol oksit A ise her iki bakteri suşuna karşı (sırasıyla MİK: 0,1 mg/mL ve 0,1 mg/mL), papatya uçucu yağı ve α -bisabololden daha etkilidir. (*E*)- β -Farnesen (MİK: >1,5 mg/mL) ve kamazulenin (MİK: >1 mg/mL) test edilen konsantrasyonlarında *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e karşı etkisiz olduğu gözlenmektedir (Tablo 4.14).

S. aureus bakterisine karşı papatya uçucu yağı 5 mg/mL konsantrasyonda etkisiz bulunurken, α -bisabololün zayıf etkili (MİK: 5 mg/mL), α -bisabolol oksit A (MİK: 0,1 mg/mL) ve (*E*)- β -Farnesenin (MİK: 0,38 mg/mL) nispeten daha yüksek etkiye sahip olduğu söylenebilir. Kamazulen ise 1 mg/mL konsantrasyonda, *S. aureus* (MİK: 0,5 mg/mL) hariç, test edilen tüm bakteri suşlarına karşı etkisizdir (Tablo 4.14).

Maddelerin Gram negatif bakteriler üzerinde test edilen konsantrasyonlarda etkisiz olduğu, içlerinden *S. typhimurium*'a karşı yalnızca α -bisabololün nispeten zayıf etkili (MİK: 5 mg/mL) olduğu söylenebilir (Tablo 4.14).

Literatür araştırmasında; Aggag ve Yousef (1972) tarafından papatya uçucu yağının Gram negatif bakterilere karşı tüm konsantrasyonlarda etkisiz olduğu bildirilmiştir. Antibakteriyel aktivite sonuçlarımız bu bilgiyi desteklemektedir. Yapılan bir başka çalışmada, α -Bisabolol oksit A (%48,22) yönünden zengin olan ve diğer ana bileşenleri arasında α -bisabolol oksit B (%23,31), bisabolol (%12,1) ve β -farnesen (%5,21) ve kamazulen (%2,42) bulunan *M. recutita* uçucu yağı, *E. coli* O157 (MİK: 12,5 μ g/mL), *B. cereus* ATCC 11778 (MİK: 10 μ g/mL), *S. aureus* ATCC 13565 (MİK: 10 μ g/mL) patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Roby vd., 2013). Fakat çalışmada standart antimikrobiyal madde ile karşılaştırma yapılmamıştır. Zu vd., (2010) tarafından çeşitli uçucu yağların *P. acnes* CMCC 65002 suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı çalışmada antibakteriyel standart madde kullanılmamıştır ve en yüksek inhibisyon etkisi gösteren *Thymus vulgaris* uçucu yağına (MİK 0,016 %v/v) karşılık *M. recutita* uçucu yağı (0,125 %v/v) daha zayıf etki göstermiştir. Bir başka çalışmada, α -bisabolol oksit (%38) yönünden zengin ve diğer ana bileşenleri kamfen (%9,11), sabinen (%4,87), limonen (%6), 1,8-sineol (%7,12), kamfor (%6,54) ve α -pinen (%6) olduğu bildirilen papatya uçucu yağının; *S. aureus* (MİK: 0,011 μ g/mL), *B. cereus* (MİK:

0,022 µg/mL) ve *B. subtilis* (MİK: 0,03 µg/mL) patojenlerine karşı etkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada bisabololün ve bisabolol oksitin *S. aureus* (sırasıyla MİK: 1,5 µg/mL ve 0,5 µg/mL), *B. cereus* (sırasıyla MİK: 1,5 µg/mL ve 0,5 µg/mL) ve *B. subtilis* (sırasıyla MİK: 1 µg/mL, 0,5 µg/mL)'e karşı antimikrobiyal etkisi bildirilmiştir (Kazemi, 2015). Fakat çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kaynağı bildirilmemiş ve bisabolol oksit ifadesi ile A ve B ayrımı yapılmamıştır

Van Zyl vd., (2006) bildirdiği üzere; (-)- α -bisabolol, *S. aureus* ATCC 25923'a karşı 143,9 mM (siprofloksasin: 0,75 µM); *B. cereus* ATCC 11778'a karşı >143,9 mM (siprofloksasin: 0,09 µM); *E. coli* ATCC 11775'ye karşı >143,9 mM (siprofloksasin: 1,81 µM); değerlerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu değerler antibakteriyel standart maddeler ile karşılaştırıldığında, (-)- α -bisabololün test edilen konantrasyonlarının etkisiz olduğunu göstermektedir. Oliveira vd., (2017) tarafından, α -bisabololün Broth mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi *E. coli* ATCC 25922 (MİK: ≥ 1024 µg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (MİK: 161,27 µg/mL) ve *P. aeruginosa* ATCC 9027 (MİK: ≥ 1024 µg/mL) suşlarına karşı belirlenmiştir.

Uçucu yağların deney esnasında buharlaşma durumu ve lipofilik özellikleri nedeniyle sulu bir ortamda biyoaktivitelerini belirleme güçlüklerinden kaynaklı olarak aktivitelerinin düşük gözlenmesi söz konusu olabilmektedir (Das vd., 2019). Ayrıca çözücü ajanların (DMSO, etanol, metanol vs.) kullanımı, uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerinin kesin olarak belirlenmesini sınırlamaktadır (Alastruey-Izquierdo vd., 2012). Ana bileşenleri bisabolon (%21,83), (*E*)- β -farnesen (%17,93), bisabolol oksit A (%10,48), bisabolol oksit B (%7,57) ve kamazulen (%3,19) olan papatya uçucu yağının *E. coli* PMC 201, *P. aeruginosa* PMC 103, *B. subtilis* SZMC 0209, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 1001 mikroorganizmalarına karşı, yeni bir yaklaşım olan Pickering nanoemülsiyonu yöntemine ek olarak, Tween 80 ve etanolik çözeltilerinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Papatya uçucu yağının Tween 80'li stabilizatör kullanılarak gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite sonuçlarında; *E. coli* (MİK₉₀: 3,29 µg/mL), *P. aeruginosa* (MİK₉₀: 2,48 µg/mL), *S. aureus* (MİK₉₀: 2,33 µg/mL) ve *B. subtilis* (MİK₉₀: 2,67 µg/mL) üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Vankomisin standardının ise bahsi geçen mikroorganizmalara karşı MİK₉₀ değeri 0,09 µg/mL ile 0,47 µg/mL arasında değişmektedir. Pickering nanoemülsiyonu yönteminde ise papatya uçucu yağının çok daha düşük kosantrasyonlarda etki gösterdiği bildirilmiştir (Das vd., 2019).

Tablo 4.15. Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)]

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve bileşenleri					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	α -Bisabolol	α -Bisabolol oksit A	(E)- β -Farnesen	Kamazulen	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	>5	>0,1	>1,5	>1	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	5	>0,1	>1,5	>1	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	5	0,1	>1,5	>1	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	5	>5	>0,1	>1,5	>1	0,002	0,004

Tablo 4.15'te görüldüğü üzere; papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antikandidal etkisi amfoterisin B ve nistatin standartları ile karşılaştırıldığında anlamlı değildir. Fakat *C. utilis* patojenine karşı α -bisabolol oksit A (MİK: 0,1 mg/mL), papatya uçucu yağı (MİK: 5 mg/mL) ve α -bisabolole (MİK: 5 mg/mL) oranla çok daha yüksek etki göstermektedir. Papatya uçucu yağı ve α -bisabolol *C. glabrata*'ya karşı nispeten zayıf etkili (MİK: 5 mg/mL) iken, test edilen diğer bileşenlerin çalışılan konsantrasyonlarında *C. glabrata* üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca papatya uçucu yağı *C. krusei* patojeni üzerinde düşük antikandidal aktivite (MİK: 5 mg/mL) göstermektedir (Tablo 4.15).

Das vd., (2019) bildirdiği üzere, papatya uçucu yağı Tween 80'li stabilizatör varlığında *C. albicans* (MİK₉₀: 4,89 μ g/mL; kaspofungin: 0,98 μ g/mL) üzerinde etki göstermektedir. Van Zyl vd., (2006) yaptığı çalışmada, α -bisabolol *C. albicans* ATCC 10231'a karşı 36,0 mM (amfoterisin B: 1,4 μ M) değerinde zayıf etki göstermiştir.

4.10.5. *M. recutita* uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisi

Papatya uçucu yağının ve mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit karışımlarına ait ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, minimum inhibisyon konsantrasyonları mg/mL cinsinden belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.16 ile Tablo 4.22 arasında verilmiştir.

Tablo 4.16. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>A. parasiticus</i> metabolitleri	<i>A. niger</i> NRRL 326 metabolitleri	<i>A. niger</i> ATCC 10549 metabolitleri	<i>P. adametzi</i> metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>0,2	>0,1	0,14	>0,32	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	>5	>0,2	>0,1	0,56	>0,32	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,5	>0,2	>0,1	0,56	>0,32	≤0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,2	>0,1	0,56	>0,32	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	5	>0,2	>0,1	0,56	>0,32	≤0,0002	0,002

A. niger ATCC 10549 metabolit karışımlarının *S. aureus* (MİK: 0,14 mg/mL), *S. typhimurium* (MİK: 0,56 mg/mL), *S. epidermidis* (MİK: 0,56 mg/mL), *B. cereus* (MİK: 0,56 mg/mL), *P. acnes* (MİK: 0,56 mg/mL) bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisi papatya uçucu yağına göre daha yüksektir (Tablo 4.16).

B. cinerea metabolitlerinin de *E. coli* (MİK: 0,58 mg/mL), *S. aureus* (MİK: 0,02 mg/mL), *E. aerogenes* (MİK: 0,29 mg/mL), *S. typhimurium* (MİK: 0,29 mg/mL), *S. epidermidis* (MİK: 0,29 mg/mL), *B. cereus* (MİK: 0,29 mg/mL), *P. acnes* (MİK: 0,04

mg/mL) patojenlerine karşı antibakteriyel etkisi papatya yağından daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.18).

Tablo 4.17. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım

Mikroorganizmalar	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>F. culmorum</i> metabolitleri	<i>C. cassicola</i> metabolitleri	<i>P. primulinum</i> metabolitleri	<i>M. ramannianus</i> metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,25	0,02	0,04	>0,2	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>0,25	0,08	>0,3	>0,2	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,25	>0,3	>0,3	>0,2	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	>5	>0,25	>0,3	>0,3	>0,2	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,5	>0,25	>0,3	>0,3	>0,2	≤0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,25	>0,3	>0,3	>0,2	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	5	>0,25	>0,3	>0,3	>0,2	≤0,0002	0,002

Tablo 4.18. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 3. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>S. cerevisiae</i> Metabolitleri	<i>T. elegans</i> Metabolitleri	<i>T. harzianum</i> Metabolitleri	<i>B. cinerea</i> Metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,25	>0,4	>0,22	0,58	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>0,25	>0,4	>0,22	0,02	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,25	>0,4	>0,22	0,29	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	>5	>0,25	>0,4	>0,22	0,29	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,5	>0,25	>0,4	>0,22	0,29	≤0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,25	>0,4	>0,22	0,29	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	5	>0,25	>0,4	>0,22	0,04	≤0,0002	0,002

Tablo 4.19. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 4. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>P. neocrassum</i> metabolitleri	<i>P. valentinum</i> metabolitleri	<i>B. velezensis</i> metabolitleri	<i>C. elegans</i> metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,3	>0,38	>0,4	>0,42	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>0,3	0,19	>0,4	0,21	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,3	>0,38	>0,4	>0,42	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	>5	>0,3	>0,38	>0,4	>0,42	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,5	>0,3	0,38	>0,4	>0,42	≤0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,3	>0,38	>0,4	>0,42	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	5	>0,3	0,05	>0,4	>0,42	≤0,0002	0,002

Papatya uçucu yağının *E. coli*'ye karşı MİK değeri 5mg/mL'den büyüktür. Fakat papatya uçucu yağının *C. cassiicola*, *P. primulinum* ve *B. cinerea* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin MİK değerleri sırasıyla 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,58 mg/mL'dir. Diğer biyotransformasyon ekstrelerinin test edilen konsantrasyonlarda *E. coli* üzerinde etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.16-Tablo 4.19).

P. acnes patojenine karşı en etkili ekstreler *P. valentinum* (MİK: 0,05 mg/mL) *B. cinerea* (MİK: 0,04 mg/mL) ve *A. niger* ATCC 10549 (MİK: 0,56 mg/mL) ile gerçekleştirilen biyotransformasyon ekstrelerine aittir (Tablo 4.16-Tablo 4.19).

S. aureus üzerinde ise en etkili biyotransformasyon ekstresinin *B. cinerea* (MİK: 0,02 mg/mL)'ya ait olduğu görülmektedir. Diğer etkili ekstreler ise *C. cassiicola* (MİK: 0,08 mg/mL), *A. niger* ATCC 10549 (MİK: 0,14 mg/mL) *P. valentinum* (MİK: 0,19 mg/mL) ve *C. elegans* (MİK: 0,21 mg/mL)'a aittir. Papatya uçucu yağı ise *S. aureus*'a karşı test edilen tüm konsantrasyonlarda (MİK: >5 mg/mL) etkisizdir (Tablo 4.16-Tablo 4.19).

Tablo 4.20. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları						Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>A. parasiticus</i> metabolitleri	<i>A. niger</i> NRRL 326 metabolitleri	<i>A. niger</i> ATCC 10549 metabolitleri	<i>P. adametzi</i> metabolitleri	<i>F. culmorum</i> metabolitleri	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	>0,25	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	>0,25	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	>0,25	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	5	>0,2	>0,1	>0,56	>0,32	>0,25	0,002	0,004

Tablo 4.21. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları						Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>C. cassicola</i> metabolitleri	<i>P. primulinum</i> metabolitleri	<i>S. cerevisiae</i> metabolitleri	<i>T. elegans</i> metabolitleri	<i>T. harzianum</i> metabolitleri	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	>0,3	>0,3	>0,25	>0,4	>0,22	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	>0,3	0,3	>0,25	>0,4	>0,22	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	>0,3	0,3	>0,25	>0,4	>0,22	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	5	>0,3	0,3	>0,25	>0,4	>0,22	0,002	0,004

Tablo 4.22. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 3. kısım

Mikroorganizma	Papatya uçucu yağı ve metabolit karışımları					Antibiyotikler	
	Papatya uçucu yağı	<i>B. cinerea</i> metabolitleri	<i>P. neocrassum</i> metabolitleri	<i>P. valentinum</i> metabolitleri	<i>B. velezensis</i> metabolitleri	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	0,58	>0,3	>0,38	>0,4	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	0,58	>0,3	0,38	>0,4	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	0,58	>0,3	0,38	>0,4	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	5	0,58	>0,3	0,19	>0,4	0,002	0,004

Tablo 4.20-Tablo 4.22 incelendiğinde, test edilen tüm maddeler arasında en yüksek antikandidal etkiye sahip olan ekstre, papatya uçucu yağının *P. valentinum* ile biyotransformasyonu sonucunda oluşan metabolit karışımlarına aittir ve *C. krusei* üzerinde nispeten yüksek (MİK: 0,19 mg/mL) etkilidir. Ayrıca bu ekstre, *C. glabrata* (MİK: 0,38mg/mL) ve *C. utilis* (MİK: 0,38 mg/mL) patojenleri üzerinde de etkilidir.

B. cinerea'ya ait metabolit karışımları tüm *Candida* türlerine karşı (MİK: 0,58 mg/mL) papatya uçucu yağından daha yüksek antikandidal aktivite göstermiştir (Tablo 4.22). *P. primulinum* metabolit karışımlarının da, *C. glabrata* (0,3 mg/ml), *C. utilis* (0,3 mg/mL), *C. krusei* (0,3 mg/mL) suşlarına karşı papatya uçucu yağına göre daha güçlü antikandidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (Tablo 4.21).

4.10.6. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisi

α -Bisabolol ve mikroorganizmalar ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit karışımlarına ait ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, minimum inhibisyon konsantrasyonları mg/mL cinsinden belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.23-Tablo 4.26'da verilmiştir.

Tablo 4.23. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım

Mikroorganizma	α -Bisabolol ve metabolit karışımları				Antibiyotikler	
	α -Bisabolol	<i>T. elegans</i> metabolitleri	<i>M. ramannianus</i> metabolitleri	<i>T. harzianum</i> metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,4	>0,2	>0,22	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5	>0,4	0,1	>0,22	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,4	>0,2	>0,22	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	5	>0,4	>0,2	>0,22	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,62	>0,4	>0,2	0,11	\leq 0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,4	>0,2	>0,22	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	1,25	>0,4	>0,2	>0,22	\leq 0,0002	0,002

Tablo 4.24. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım

Mikroorganizma	α -Bisabolol ve metabolit karışımları				Antibiyotikler	
	α -Bisabolol	<i>P. neocassum</i> metabolitleri	<i>C. cassicola</i> metabolitleri	<i>P. primulinum</i> metabolitleri	Amoksisilin	Kloramfenikol
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>5	>0,3	>0,3	>0,3	0,008	0,004
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5	>0,3	0,15	>0,3	0,001	0,004
<i>E. aerogenes</i> NRRL 3567	>5	>0,3	>0,3	>0,3	0,032	0,002
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	5	>0,3	>0,3	>0,3	0,0005	0,008
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,62	>0,3	>0,3	>0,3	\leq 0,0002	0,002
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	>5	>0,3	>0,3	>0,3	0,004	0,008
<i>P. acnes</i> ATCC 6919	1,25	>0,3	0,04	0,15	\leq 0,0002	0,002

Tablo 4.25. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 1. kısım

Mikroorganizma	α -Bisabolol ve metabolit karışımları				Antibiyotikler	
	α -Bisabolol	<i>T. elegans</i> metabolitleri	<i>M. ramannianus</i> metabolitleri	<i>T. harzianum</i> metabolitleri	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	>0,4	>0,2	>0,22	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	>0,4	>0,2	>0,22	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	0,4	>0,2	>0,22	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	>5	>0,4	>0,2	>0,22	0,002	0,004

Tablo 4.26. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçları [MİK (mg/mL)] 2. kısım

Mikroorganizma	α -Bisabolol ve metabolit karışımları				Antibiyotikler	
	α -Bisabolol	<i>P. neocraassum</i> metabolitleri	<i>C. cassiicola</i> metabolitleri	<i>P. primulinum</i> metabolitleri	Amfoterisin B	Nistatin
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>5	>0,3	>0,3	>0,3	0,032	0,004
<i>C. glabrata</i> klinik izolat	5	>0,3	>0,3	0,3	0,016	0,002
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	5	0,3	>0,3	0,3	0,002	0,001
<i>C. krusei</i> NRRL Y-7179	>5	>0,3	>0,3	0,3	0,002	0,004

S. aureus patojenine karşı α -bisabolol nispeten zayıf etkili (MİK: 5 mg/mL) iken *M. ramannianus*'a ve *C. cassiicola*'ya ait dönüşüm ürünleri (sırasıyla MİK 0,1 mg/mL, 0,15 mg/mL) α -bisabololden daha yüksek antibakteriyel etki göstermektedir (Tablo 4.23, Tablo 4.24). α -Bisabololün *T. harzianum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolit karışımları *S. epidermidis* (MİK: 0,11 mg/mL) üzerine α -bisabololden (MİK: 0,62 mg/mL) daha etkilidir. *P. acnes* patojenine karşı ise *C. cassiicola*'ya (MİK: 0,04

mg/mL) ve *P. primulinum*'a (MİK: 0,15 mg/mL) ait ekstreler α -bisabololden (MİK: 1,25 mg/mL) daha yüksek etki göstermektedir (Tablo 4.23, Tablo 4.24).

α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin antikandidal etki sonuçlarına bakıldığında ise; *P. primulinum*'a ait metabolit karışımları *C. glabrata* ve *C. utilis* ve *C. krusei* patojenlerine karşı 0,3 mg/mL MİK değeri ile, α -bisabololden (MİK: 5 - >5 mg/mL) daha yüksek antikandidal aktivite sergilemiştir. *T. elegans* ve *P. neocrassum* ait metabolit karışımları da, sırasıyla MİK: 0,4 mg/mL ve MİK: 0,3 mg/mL konsantrasyonlarda *C. utilis* patojeni üzerinde etkili bulunmuştur (Tablo 4.25, Tablo 4.26).

4.10.7. *M. recutita* uçucu yağı ve bileşenlerinin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi

M. recutita uçucu yağı ve bileşenlerinin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi gereçler ve yöntemler kısmında açıklandığı üzere, mikro düzeylerde spektrofotometrik yöntemle kinetik olarak ölçülmüş, 20 μ g/mL konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri hesaplanarak Tablo 4.27'de verilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan NDGA (Nordihidroguaiaretik asit)'nin da 20 μ g/mL, 12 μ g/mL, 8 μ g/mL, 4 μ g/mL, 2 μ g/mL ve 0,5 μ g/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin %inhibisyon sonuçlarına göre IC₅₀ değeri (3,11 μ g/mL) hesaplanmıştır.

Tablo 4.27. *Papatya* uçucu yağı ve bileşenlerinin 5-LOX inhibisyon sonuçları

Papatya uçucu yağı ve bileşenleri	Konsantrasyon (μ g/mL)	%İnhibisyon
Papatya uçucu yağı	20	12,21
α -Bisabolol	20	19,65
(<i>E</i>)- β -Farnesen	20	18,89
Kamazulen	20	14,50
α -Bisabolol oksit A	2	*
NDGA (referans)	IC ₅₀ = 3,11 μ g/mL	

* Belirlenememiştir.

Papatya uçucu yağının 5-LOX % inhibisyon değeri (%12,21), aynı konsantrasyondaki (20 µg/mL) bileşenlerinden daha düşük çıkmıştır. 5-LOX % inhibisyon değeri en yüksek olan madde α -bisabololdür (Tablo 4.27). Test bileşenleri arasında standart madde α -bisabolol oksit A'da vardır; fakat elde bulunan miktar üzerinden hesaplanan son hacimde (2 µg/mL) 5-LOX inhibisyon etkisi belirlenememiştir.

Sonuçlar literatür ile uyumludur: WHO monograflarında (1999), bisabolol ve bisabolol oksitin 5-lipoksijenaz (5-LOX)'ı inhibe ettiği ve bisabololün, bisabolol oksitten daha aktif olduğu bildirilmiştir. Baylac ve Racine (2003)'nin yaptığı çalışma göstermiştir ki; papatya uçucu yağı 5-LOX inhibitörüdür ($31 < IC_{50} \leq 50$ ppm). α -Bisabolol ise papatya uçucu yağından daha iyi bir inhibitör ($10 \leq IC_{50} \leq 30$ ppm) olarak ciltte yatıştırıcı etki göstermektedir.

α -Bisabololü (%19,65), papatya uçucu yağından (%12,21) daha yüksek 5-LOX inhibitörü olarak bulmuş olmamız literatür (Baylac ve Racine, 2003) ile örtüşmektedir (Tablo 4.27).

Kamazulen ($IC_{50} = 2$ µM) araşidonik asidin kimyasal peroksidasyonunu bloke eder ve konsantrasyona bağlı olarak lökotrien-B4 inhibitörüdür (Safayhi vd., 1994). Papatya uçucu yağının antienflamatuvar etkisi yüksek kamazulen içeriğiyle olduğu kadar, yüksek α -bisabolol içeriğiyle de karakterizedir (Isaac, 1979). Deney sonuçlarımız göstermiştir ki kamazulenin de papatya uçucu yağından (%12,21) daha yüksek 5-LOX inhibitor etkisi (%13,93) vardır. Papatya uçucu yağının içindeki bileşenlerin varlığı ve miktarı yağın farmakolojik özelliklerine de etki etmektedir. α -Bisabolol ve kamazulen yönünden zengin olan papatya uçucu yağının daha yüksek 5-LOX inhibisyon aktivitesi gösterebileceği söylenebilir (Isaac, 1979; Salamon, 2010). Bunu destekleyen bir çalışma, α -bisabololün daha yüksek seviyelerini içeren uçucu yağın (*Salvia runcinata*'dan) 22,5 µg/mL'lik IC_{50} değeri ile iyi bir 5-LOX inhibitörü olduğunu göstermiştir (Kamatou ve Viljoen, 2010).

Deneysel çalışmalarda kullandığımız papatya uçucu yağı bisabolol oksit A yönünden zengindir ve α -bisabolol miktarı düşüktür. Isaac (1979) bildirdiğine göre (-)- α -bisabololün antienflamatuvar etkisi yüksektir; fakat oksitleri ile ilgili farmakolojik araştırmalara ihtiyaç vardır.

(E)- β -Farnesen (%18,89) ise aynı konsantrasyonda α -bisabolole (%19,65) oldukça yakın 5-LOX %inhibisyon etkisi göstermektedir (Tablo 4.27). Ultraviyole ışıkla ışınlanan kobaylarda, (-)- α -bisabolol, farnesen ve daha ayrıntılı olarak tanımlanmayan "bisabolol monoksit" ile birlikte deri sıcaklığında bir azalma gözlenmiştir (Isaac, 1979). Tablo 4.27

sonuçlarına göre, papatya uçucu yağının 5-LOX inhibisyonu üzerinden gerçekleşen antienflamatuvar aktivitesinde, α -bisabolol ve kamazulenle beraber (*E*)- β -farnesenin de sorumlu olduğu söylenebilir. Fakat β -farnesenin *in vitro* 5-LOX inhibisyon etkisi ($IC_{50} >100 \mu M$; AA861: 5-LOX inhibitörü: $3.0 \times 10^{-2} \mu M$) düşük bildirilmiştir (An vd., 2011). (*E*)- β -Farnesenin LOX inhibisyon aktivitesi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

4.10.8. *M. recutita* uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi

Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 20 $\mu g/mL$ konsantrasyondaki 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi Tablo 4.28’de verilmiştir. Papatya uçucu yağının, *A. parasiticus*, *A. niger* NRRL 326 ve *T. harzianum* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin düşük konsantrasyonları nedeniyle 5-LOX inhibisyon %’si belirlenememiştir.

Tablo 4.28. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları

Madde	Konsantrasyon ($\mu g/mL$)	%İnhibisyon
Papatya uçucu yağı	20	12,21
<i>C. cassicola</i> metabolit karışımları	20	11,73
<i>P. primulinum</i> metabolit karışımları	20	13,64
<i>P. adametzii</i> metabolit karışımları	20	19,23
<i>F. culmorum</i> metabolit karışımları	20	30,06
<i>C. elegans</i> metabolit karışımları	20	19,23
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	20	26,53
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	20	21,95
<i>P. neocrassum</i> metabolit karışımları	20	9,34
<i>P. valentinum</i> metabolit karışımları	20	8,54
<i>B. velezensis</i> metabolit karışımları	20	7,11
<i>B. cinerea</i> metabolit karışımları	10	4,96
<i>A. niger</i> ATCC10549 metabolit karışımları	10	11,25
<i>A. flavus</i> metabolit karışımları	20	9,66
<i>S. cerevisiae</i> metabolit karışımları	20	15,25
<i>T. elegans</i> metabolit karışımları	20	15,00
NDGA (referans)	$IC_{50} = 3,11 \mu g/mL$	

Papatya uçucu yağının 5-LOX inhibisyon değeri %12,21 iken biyotransformasyon sonucu elde edilen metabolit karışımlarından *F. culmorum* mikroorganizmasına ait aynı konsantrasyondaki (20 µg/mL) ekstenin bu değeri %30,06 dır. Papatya uçucu yağının *F. culmorum* (%30,06), *M. ramannianus* (%26,53), *R. stolonifer* (%21,95), *P. adametzii* (%19,23), *C. elegans* (%19,23) fungusları kullanarak gerçekleştirilen biyotransformasyonu ile substratına göre 5-LOX %inhibisyonu nispeten daha yüksek metabolitler ekstre edilebilir.

20 µg/mL konsantrasyonda en düşük 5-LOX inhibisyon değeri *B. velezensis* metabolit karışımlarını içeren ekstre (%7,11) aittir. *B. velezensis* biyotransformasyon çalışmalarında kullandığımız tek bakteri türüdür. Kullanılan tek maya türü olan *S. cerevisiae*'nin ürettiği metabolit karışımlarının 5-LOX inhibisyon değeri ise aynı konsantrasyonda %15,25'tir.

4.10.9. α - Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi

α - Bisabololün çeşitli mikroorganizmalar ile mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerinden test edilenlerin 20 µg/mL konsantrasyonlarındaki 5-LOX %inhibisyon değerleri Tablo 4.29'da verilmiştir.

Tablo 4.29. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları

Madde	Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon
α - Bisabolol	20	19,65
<i>A. flavus</i> metabolit karışımları	20	18,98
<i>T. elegans</i> metabolit karışımları	20	13,26
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	20	0,46
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	20	3,32
<i>C. cassiicola</i> metabolit karışımları	20	3,94
<i>P. neocrassum</i> metabolit karışımları	20	0,21
<i>P. primulinum</i> metabolit karışımları	20	13,98
<i>P. valentinum</i> metabolit karışımları	20	12,98
NDGA (referans)	IC ₅₀ = 3,11 µg/mL	

Substrat α - bisabololün 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 5-LOX inhibisyon %'si 19,65 iken, metabolit karışımlarının inhibisyon yüzdeleri 0,21 ile 18,98 arasında değişmektedir. *P. neocrassum* tarafından üretilen ve bisafuranol içeren ekstre, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda 5-LOX inhibisyonuna bağlı antienflamatuvar aktivitesi en zayıf olan test maddesidir (%0,21).

α -Bisabolol ile biyotransformasyon çalışmalarının, daha düşük 5-LOX inhibisyon etkisine sahip metabolitlerin oluşumunu desteklediği söylenebilir. Bu yaklaşım, biyotransformasyon çalışmalarında kullandığımız mikroorganizmalar için geçerlidir.

4.10.10. α -Bisabolol oksitlerin mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi

Ticari olarak temin edilen α -bisabolol oksit A maddesinin 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son konsantrasyonunda 5-LOX inhibisyon aktivitesi belirlenememiştir. Papatya uçucu yağından izole ettiğimiz α -bisabolol oksitlerin (A ve B) ise *P. chrysogenum* ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu sonucu ekstre edilen metabolit karışımları 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda nispeten yüksek 5-LOX inhibisyon etkisi (%24,76) göstermiştir (Tablo 4.30).

Tablo 4.30. α -Bisabolol oksitlerin mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonucu

Madde	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%inhibisyon
α -Bisabolol oksit A (standart)	2	*
<i>P. chrysogenum</i> metabolit karışımları	20	24,76
NDGA (referans)	$\text{IC}_{50} = 3,11 \mu\text{g}/\text{mL}$	

* Belirlenememiştir.

4.10.11. Farnesen izomerleri karışımının ve mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyon etkisi

Farnesen izomerleri karışımına (%13,93) ait 5-LOX inhibisyon etkisi papatya uçucu yağı (%12,21) ile benzerlik göstermektedir (Tablo 4.27). Farnesen izomerleri karışımı ile gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin tümü

20 µg/mL konsantrasyonda substratına göre daha yüksek 5-LOX inhibisyon etkisi (%14,10-%23,70) göstermiştir (Tablo 4.31).

Tablo 4.31. *Farnesen izomerleri ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon sonuçları*

Madde	Konsantrasyon (µg/mL)	%inhibisyon
Farnesen izomerleri karışımı	20	13,93
<i>A. niger</i> NRRL 326 metabolit karışımları	20	23,70
<i>A. flavus</i> metabolit karışımları	20	15,53
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	20	19,76
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	20	14,10
NDGA (referans)	IC ₅₀ = 3,11 µg/mL	

4.10.12. *M. recutita* uçucu yağı ve bileşenlerinin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi

Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin COX-1 enzim inhibisyon aktivitesini belirlemek için yapılan çalışma, “Gereçler ve Yöntemler” bölümünde detaylandırıldığı üzere Cayman COX kolorimetrik inhibitör tarama test kiti ile gerçekleştirilmiştir. Test edilen bileşiklerin COX-1 %inhibisyon değerleri hesaplanmıştır Referans madde olarak NDGA kullanılmıştır (Tablo 4.32).

Tablo 4.32. *Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin COX-1 inhibisyon sonuçları*

Papatya uçucu yağı ve bileşenleri	Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon
Papatya uçucu yağı	50	0
α - Bisabolol	50	8,70
(<i>E</i>)- β -Farnesen	50	15,94
Kamazulen	50	8,69
α -Bisabolol oksit A	50	0
NDGA (referans)	50	100

Tablo 4.32’de görüldüğü üzere papatya uçucu yağı COX-1 inhibisyon etkisi olmayan test maddesidir. Aynı şekilde α -Bisabolol oksit A’nın da 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda COX-1 inhibisyon etkisi yoktur. Papatya uçucu yağının diğer bileşenlerine baktığımızda en yüksek aktiviteyi (*E*)- β -farnesenin gösterdiği (%15,94) görülmektedir.

Papatya ekstresi uygulaması, RAW 264.7 makrofajlarında LPS (lipopolisakkarit) kaynaklı prostaglandin E₂ salınımını inhibe etmek şeklindedir. Bu etkinin, papatya ekstresinin (suda) COX-2 enzim aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca papatya ekstresi, COX-1 ifadesini etkilemeden LPS kaynaklı COX-2 mRNA ve protein ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Veriler, papatyanın steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaçlara atfedilene benzer bir etki mekanizması ile çalıştığını göstermektedir (Srivastava vd., 2009). Bu durum papatyanın su ekstresi bileşenleri açısından benzerlik gösteren papatya uçucu yağının düşük COX-1 inhibisyon aktivitesini kısmen açıklamaktadır. Fabian vd., (2011)’nin papatya uçucu yağının *in vivo* anti-enflamatuar aktivitesi ile ilgili yaptığı çalışma, Srivastava vd., (2009) çalışmasını destekler niteliktedir.

Siklooksijenaz (COX), araşidonik asitten prostaglandin sentezini katalize eden ana enzimdir. Böylece organizmada farklı işlevlere sahip farklı prostanoidler oluşur. COX’in farklı izoformları vardır, ancak en çok çalışılanlar COX-1 ve COX-2’dir (Moro vd, 2017; Egbuta vd., 2022). COX-1, gastrointestinal mukoza, trombositler, endotel, böbrekler ve uterus dahil olmak üzere çoğu dokuda yaygın olarak eksprese edilen ağırlıklı olarak yapıcı bir enzimdir ve temel olarak doku homeostazında yer aldığı için “temizlik” rolünü üstlenir (Tomić vd., 2017). COX-1, prostaglandinlerin sürekli üretilmesinde ve normal fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynarken, COX-2, enflamasyon ve ağrı gibi durumlarda artmış aktivite gösterir (Hussain vd., 2003; Moro vd, 2017). COX-1 inhibitörleri, COX-1 enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini azaltır ve bu nedenle ağrı, enflamasyon ve ateş gibi durumlarda etkili olabilirler. Ancak, COX-2 inhibitörleri gibi selektif olmadıkları için, mide ve gastrointestinal sistemdeki prostaglandinlerin üretimini de azaltarak yan etkilere neden olabilirler (Guzmán vd., 2004). Bu bilgiler ışığında, COX-1 %inhibisyon aktivite sonuçları değerlendirildiğinde papatyaya atfedilen anti-enflamatuar aktivitenin COX-1 inhibisyonuna neden olmadan, COX-2 inhibisyonu üzerinden gerçekleşmesi muhtemeldir. Bunu destekler nitelikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada ana bileşenleri; %47,9 α -bisabolol oksit A, %16,8 α -bisabolol,

%13,8 (*Z*)- β -farnesen, %5,8 α -bisabolol oksit B ve %4,7 α -bisabolen oksit A olduğu analiz edilen papatya uçucu yağının COX-1 ve COX-2 IC₅₀ değerleri sırasıyla 39,05 ve 11,83 μ g/mL olarak bildirilmiştir (Biltekin vd., 2023). Sonuçlar papatya uçucu yağının COX-2 üzerinde seçici inhibisyon etkisini göstermektedir.

Aynı zamanda papatya uçucu yağının kemotiplerine bağlı olarak değişen aktivitesi söz konusudur (Isaac, 1979). Deneysel çalışmalarda kullandığımız bisabolol oksit A yönünden zengin papaya uçucu yağının düşük antienflamatuvar etkisini (COX-1 inhibisyonu üzerinden) destekler nitelikte, bisabolol oksit A'nın da test edilen konsantrasyonda (50 μ g/mL) COX-1 inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.32).

Kamazulenin ve α -bisabololün, antienflamatuvar etkiden sorumlu COX-2 ve LOX inhibisyonuna atıfta bulununan raporlar vardır (Baylac ve Racine, 2003; Ma vd., 2020; Isaac, 1979). Moleküler docking modeli ile α -bisabololün ve α -bisabolol oksit A'nın COX-1 ve COX-2 bağlanma afiniteleri karşılaştırılmıştır: Sonuçlar α -bisabololün hem COX-1 hem de COX-2 afinitesinin α -bisabolol oksit A'dan daha yüksek olduğunu göstermiştir (Ortiz vd., 2016). Yapılan bir başka moleküler docking analiz çalışmasında β -farnesenin (-7,894 kcal/mol) COX-1 etkileşim enerjisi, α -bisabololden (-7,427 kcal/mol) daha düşük gözlenmiştir (Boukhatem ve Belhadj, 2023). Bu veri, β -farnesenin COX-1 inhibisyon etkisini α -bisabololden yüksek bulmamız durumunu *in silico* yöntem ile açıklamaktadır.

4.10.13. *M. recutita* uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi

Tablo 4.33. Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen bazı ekstrelerin COX-1 inhibisyon sonuçları

Madde	Konsantrasyon (μ g/mL)	%inhibisyon
Papatya uçucu yağı	50	0
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	50	0
<i>T. harzianum</i> metabolit karışımları	50	0
<i>R. stolonifer</i> metabolit karışımları	50	30,43
NDGA (referans)	50	100

Papatya uçucu yağı ve biyodönüşüm ekstrelerinden bazıları ile COX-1 inhibisyon aktivitesi kontrol edilmiştir. Tablo 4.33’de görüldüğü üzere *R. stolonifer* metabolit karışımlarını içeren ekstre %30,43 COX-1 inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Papatya uçucu yağının ise bu konsantrasyonda (50 µg/mL) etkisi yoktur.

Ayrıca Tablo 4.28’de görüldüğü üzere *R. stolonifer* metabolit karışımlarını içeren ekstre %21,95’lik 5-LOX inhibisyonu ile papatya uçucu yağının (%12,21) inhibisyon yüzdesinden neredeyse 2 kat daha etkindir. Papatya uçucu yağının *R. stolonifer* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolit ürünlerinin LOX-5 ve COX-1 üzerinden aynı konsantrasyondaki papatya uçucu yağına göre yüksek antienflamatuvar etki gösterdiği söylenebilir.

4.10.14. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen ekstrelerin siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibisyon etkisi

Tablo 4.34. α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyon sonucu elde edilen bazı ekstrelerin COX-1 inhibisyon sonuçları

Madde	Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon
α -Bisabolol	50	8,70
<i>P. neocrassum</i> metabolit karışımları	50	0
<i>M. ramannianus</i> metabolit karışımları	50	27,54
<i>P. primulinum</i> metabolit karışımları	50	0
NDGA (referans)	50	100

Tablo 4.34’te görüldüğü üzere, α -bisabololün %8,70 COX-1 inhibisyon aktivitesi gösterdiği konsantrasyonda, *P. neocrassum* (bisafuranol içeren ekstre) ve *P. primulinum*’a ait ekstreler inhibisyon etkisi göstermemiştir. Fakat *M. ramannianus*’a (%27,54) ait ekstre ise, aynı konsantrasyondaki substrat α -bisabololden (%8,70) yaklaşık 3 kat daha etkili bir COX-1 inhibitörüdür. Oysa 5-LOX inhibisyon etkisi sonuçlarının verildiği Tablo 4.29’da görüldüğü üzere α -bisabololün %19,65 5-LOX inhibisyon etkisi gösterdiği konsantrasyonda, *M. ramannianus*’a (%0,46) ait metabolit karışımlarının neredeyse inhibisyon etkisi yoktur.

4.11. Moleküllerin *In silico* Toksikite Değerlendirmesi

α -Bisabolol, α -bisabolol oksitler (A ve B), α -Bisabolon oksit A, (*E*)- β -farnesen, kamazulen ve α -bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan ve “bisafuranol” olarak adlandırılan **BE1** metabolitinin ProTox-II web sunucusu ile toksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Moleküllerin tahmini oral letal dozu (LD₅₀) mg/kg ve toksisite sınıfı Tablo 4.35’te verilmiştir.

Tablo 4.35. *In silico* oral toksisite tahmin sonuçları

Molekül	Tahmini LD ₅₀ (mg/kg)	Tahmini toksisite sınıfı	Ortalama benzerlik (%)	Tahmin doğruluğu (%)
α -Bisabolol	2830	V	100	100
α -Bisabolol oksit A	8000	VI	77,07	69,26
α -Bisabolol oksit B	5000	V	77,08	69,26
α -Bisabolon oksit A	5000	V	74,77	69,26
(<i>E</i>)- β -Farnesen	5000	V	88,22	70,97
Kamazulen	1220	IV	100	100
Bisafuranol	2130	V	82,72	70,97

Sınıf IV: Yutulduğunda zararlı (300 < LD₅₀ ≤ 2000), Sınıf V: Yutulduğunda zararlı olabilir (2000 < LD₅₀ ≤ 5000), Sınıf VI: Toksik olmayan (LD₅₀ > 5000)

Tablo 4.35'te görüldüğü üzere, α -bisabolol ve kamazulenin tahmini LD₅₀ değeri sırasıyla 2830 mg/kg ve 1220 mg/kg olarak belirlenmiştir ve her ikisi de %100 ortalama benzerlik ve tahmin doğruluğuna sahiptir. Bu nedenle, toksisite sınıfı α -bisabolol için V, kamazulen için IV olarak belirlenmiştir. α -Bisabolol oksit A (LD₅₀: 8000 mg/kg) ve α -bisabolol oksit B (LD₅₀: 5000 mg/kg), ~%77 ortalama benzerlik ve %69,26 tahmin doğruluğu ile sırasıyla sınıf VI ve sınıf V olarak değerlendirilmiştir. α -Bisabolon oksit A'nın %74,77 ortalama benzerlik ve %69,26 tahmin doğruluğu ile LD₅₀ değeri 5000 mg/kg (toksikite sınıfı: V) dir. (*E*)- β -Farnesenin (LD₅₀: 5000 mg/kg) ise %88,22 ortalama benzerlik ve %70,97 tahmin doğruluğu ile toksisite sınıfı V olarak görülmektedir (Tablo 4.35).

α -Bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bisabolol oksit B'ye benzer yapıda “bisafuranol” olarak adlandırdığımız metabolitin ProTox-II web

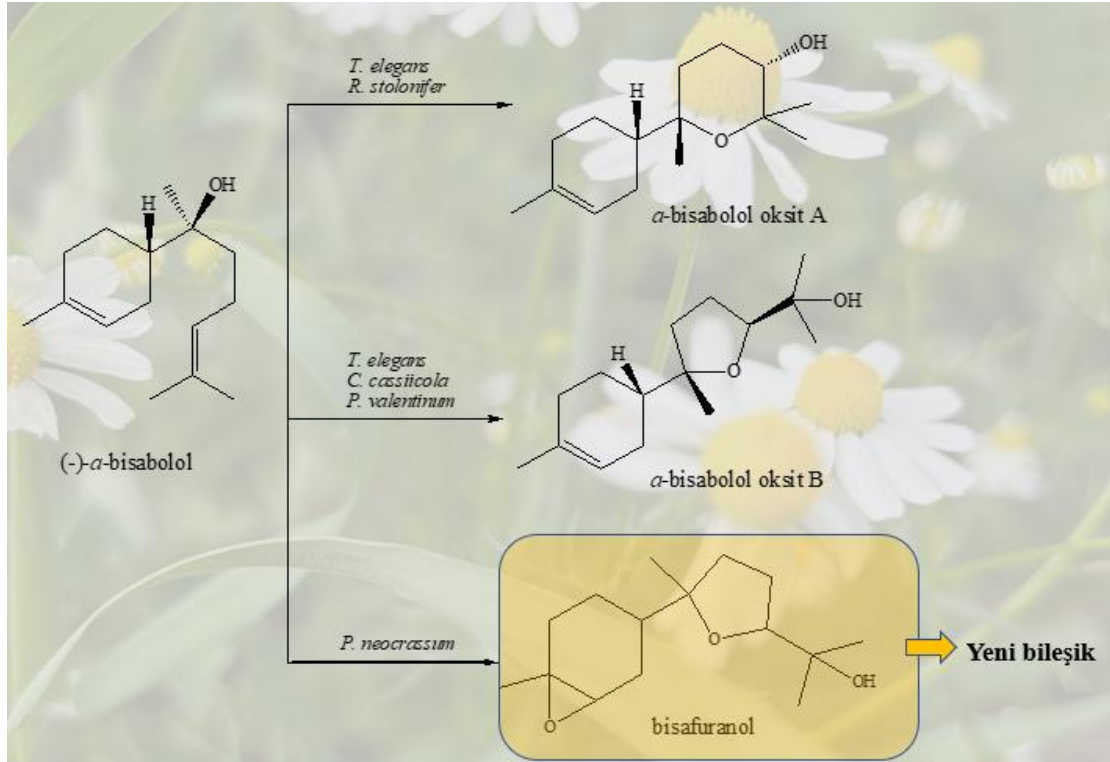
sunucusu ile oral toksisite değerlendirmesi sonucu; %82,72 ortalama benzerlik ve %70,97 tahmini doğruluk ile LD₅₀ değeri 2130 mg/kg olarak, sınıf V'te değerlendirilmiştir (Tablo 4.35). Toksikite tahmini sonucuna gore “bisafuranol”un, oral toksisitesinin olmadığı ve kısmen guvenli olduğu kabul edilebilir.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Tez kapsamında papatya uçucu yağının ve α -bisabololün, bisabolol oksitlerin, farnesen izomerleri karışımının ve kamazulenin mikroorganizmalar ile biyotransformasyon potansiyelleri incelenmiştir. α -Bisabolol hariç kullanılan tüm substratların mikrobiyal transformasyonu ilk kez bu çalışma ile yapılmıştır.

(-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ile oluşan **BB1** (*T. elegans*), **BF1** (*C. cassiicola*), **BH1** (*P. valentinum*) metabolitleri α -Bisabolol oksit B; **BB2** (*T. elegans*), **BI4** (*R. stolonifer*) metabolitleri ise α -Bisabolol oksit A olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.1).

(-)- α -Bisabololün yüksek verimli dönüşüm ürünü **BE1** metaboliti *P. neocrassum* tarafından üretilmiş, kromatografik tekniklerle saflaştırılmış (%94 GC/FID) ve yapısı spektroskopik tekniklerle aydınlatılmıştır. α -Bisabololün biyotransformasyonu ile oluşan **BE1** metaboliti ilk kez bu tez kapsamında 2-(5-metil-5-(6-metil-7-oksabisiklo[4.1.0]heptan-3-il)tetrahidrofuran-2-il)propan-2-ol karakterize edilmiş; “bisafuranol” olarak adlandırılmıştır (Şekil 5.1)

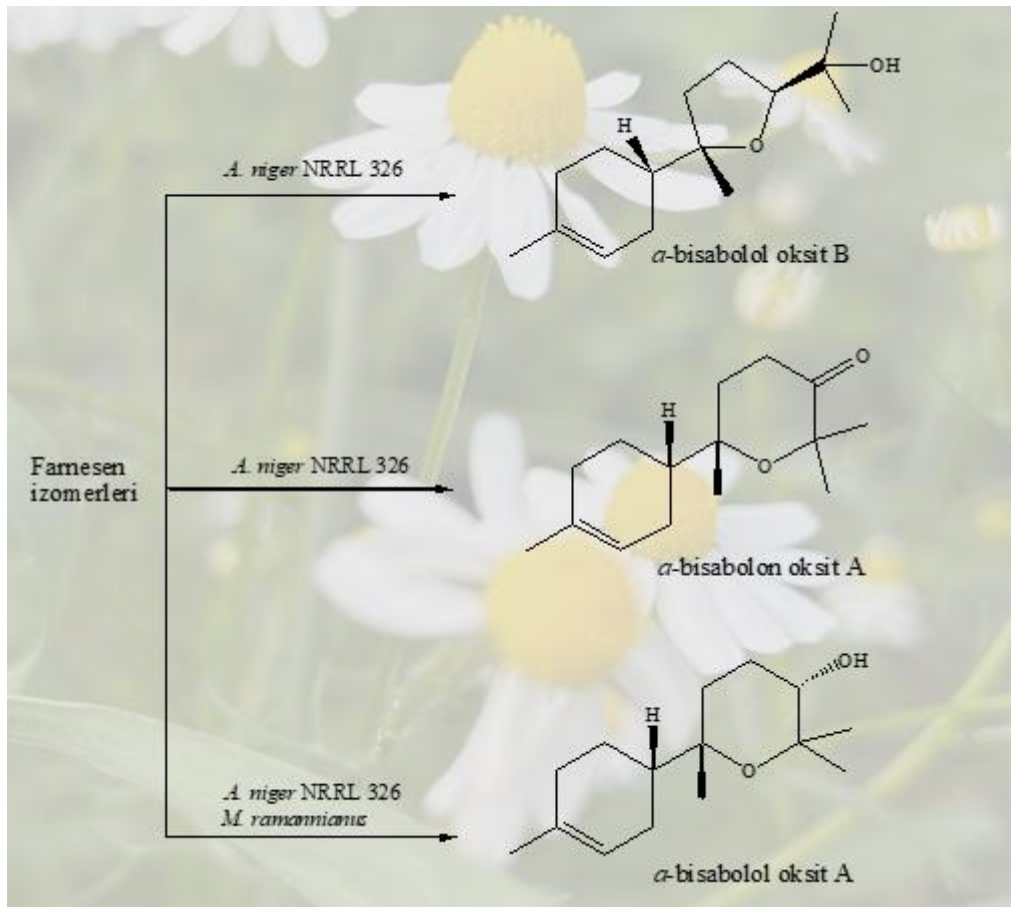


Şekil 5.1. (-)- α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ile oluşan metabolitler

Kimyasal sentez yöntemine göre daha çevreci, ucuz ve yüksek seçilimli bir yöntem olarak karşımıza çıkan mikroorganizmalar aracılığıyla, doğada yaygın bulunan

bisabololden yola çıkarak, bisabolol oksit B yapısındaki “bisafuranol”ün sentezlenmiş olması doğal ürünler kimyasında önemli bir yaklaşım olduğu gibi, farmakolojik etkileri üzerinde daha fazla araştırmaya değer bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Farnesen izomerlerinin biyotransformasyonu sonucu oluşan 6 metabolitten 4’ü (**FA1**, **FA2**, **FA3**, **FC1**) tanımlanmıştır. Substratın *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonunda oluşan metabolitler; α -bisabolol oksit B (**FA1**), α -bisabolon oksit A (**FA2**) ve α -bisabolol oksit A (**FA3**) olarak belirlenmiştir. Ayrıca α -bisabolol oksit A (**FC1**), *M. ramannianus* mikroorganizması tarafından da üretilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Farnesen izomerleri karışımının mikrobiyal transformasyonu ile oluşan metabolitleri

Papatya uçucu yağından izole edilen bisabolol oksitlerin ise *P. chrysogenum* ile biyotransformasyonu sonucu bisabolol oksit türevi sekiz adet metabolit oluşumu analiz edilmiştir. Fakat metabolitlerin düşük miktarları nedeniyle izole edilerek kesin yapıları karakterize edilememiştir. Papatya uçucu yağından izole edilerek kullanılan kamazulenin de mikrobiyal transformasyon potansiyeli araştırılmış fakat test edilen hiçbir mikroorganizma ile dönüşümü tespit edilememiştir.

Tez kapsamında toplamda on metabolit tanımlanmış olup dokuz tanesi bilinen olmak üzere bir tanesi yeni bileşik (bisafuranol) olarak literatüre kazandırılmıştır.

Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin DPPH* testi ile antioksidan aktivite çalışmasında, kamazulenin ($IC_{50} = 0,27$ mg/mL) en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. α -Bisabolol oksit A ve (*E*)- β -farnesenin de görece yüksek olan radikal süpürücü etki değerleri göz önünde bulundurulduğunda (sırasıyla $IC_{50} = 1,50$ mg/mL, 7,45 mg/mL) deneysel çalışmalarda kullandığımız papatya uçucu yağın toplam antioksidan aktivitesinden sorumlu bileşiklerin kamazulenle beraber, α -bisabolol oksit A ve (*E*)- β -farnesen olabileceği söylenebilir.

Papatya uçucu yağının *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonu sonucu metabolit karışımlarını içeren ekstrenin ($IC_{50} = 0,45$ mg/mL) papatya uçucu yağından ($IC_{50} = 2,20$ mg/mL) yaklaşık 5 kat daha yüksek DPPH radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

α -Bisabololden ($IC_{50} = 43,88$ mg/mL) mikroorganizmalar aracılığıyla üretilen bisabolol oksitlerin ve onların türevlerinin bulunduğu ekstrelerin antioksidan aktivitesi substratından çok daha yüksek ($IC_{50} = 2,47-1,45$ mg/mL) antioksidan aktivite göstermiştir. Bulunan yüksek antioksidan etkinliği, bisabololün biyotransformasyon ile DPPH radikal süpürücü etkisi daha yüksek olan oksitlerine dönüşümü ile açıklanabilir. α -Bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan ve bisafuranol içeren ekstrenin ($IC_{50} = 2,11$ mg/mL) DPPH* testinde α -bisabololden ($IC_{50} = 43,88$ mg/mL) yaklaşık 20 kat daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde α -bisabolol oksit A'nın *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e (sırasıyla MİK: 0,1 mg/mL ve 0,1 mg/mL) karşı α -bisabololden (sırasıyla MİK: 0,62 mg/mL ve 1,25 mg/mL) ve papatya uçucu yağından (sırasıyla MİK: 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL) nispeten daha etkili olduğu söylenebilir. Antikandidal aktivite çalışmalarında ise *C. utilis* patojenine karşı α -bisabolol oksit A (MİK: 0,1 mg/mL), papatya uçucu yağı (MİK: 5 mg/mL) ve α -bisabolole (MİK: 5 mg/mL) oranla daha yüksek etki göstermektedir.

Papatya uçucu yağı ve mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, en çok metabolit (11 adet) oluşumunu sağlayan *B. cinerea*'ya ait ekstrenin (MİK: 0,02-0,58 mg/mL) test edilen tüm patojenler üzerindeki etkisi papatya uçucu yağından (MİK: 2,5- >5 mg/mL) daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca *B. cinera*'ya ait metabolit karışımları test edilen tüm *Candida*

türlerine karşı (MİK: 0,58 mg/mL) papatya uçucu yağından (MİK: 5- >5 mg/mL) daha yüksek antikandidal aktivite göstermiştir. Ayrıca papatya uçucu yağının *C. cassiicola* ile biyotransformasyonu sonucu ekstre edilen metabolit karışımlarının Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* patojenine karşı gösterdiği nispeten yüksek etkisi (metabolit estresi MİK: 0,02 mg/mL; papatya uçucu yağı MİK: >5 mg/mL; amoksisilin MİK: 0,008 mg/mL) kayda değerdir.

α -Bisabolol ve mikrobiyal transformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı çalışmada *C. cassiicola*'ya ait ekstre (MİK: 0,04 mg/mL) *P. acnes*'e karşı, α -bisabololden (MİK: 1,25 mg/mL) daha etkili bulunmuştur. Bisafuranol içeren ekstrenin ise *C. utilis* üzerindeki (MİK: 0,3 mg/mL) antikandidal etkisi hariç; test edilen patojenler üzerinde, test edilen konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktivitesi gözlenmemiştir (MİK > 0,3 mg/mL).

Papatya uçucu yağı ve bileşenlerinin antiinflamatuvar aktivitesini belirlemek için yapılan 5-LOX, COX-1 inhibisyon sonuçlarında; bisabolol oksit A yönünden zengin olan papatya uçucu yağının 5-LOX inhibisyon aktivitesi (%12,21), aynı konsantrasyondaki bileşenlerinden daha düşük çıkmıştır. 5-LOX inhibisyon etkisi en yüksek olan maddenin α -bisabolol (%19,65) olduğu gözlenmiştir. (*E*)- β -farnesen (%18,89) ve kamzulen (%14,50) de 5-LOX inhibitörüdür. Papatya uçucu yağının ve α -bisabolol oksit A'nın test edilen konsantrasyonda COX-1 inhibisyon etkisi gözlenmezken, en yüksek aktiviteyi (*E*)- β -farnesen (%15,94) göstermiştir. α -Bisabolol (%8,70) ise aynı konsantrasyondaki kamazulen (%8,69) ile eşit değerde COX-1 inhibisyon etkisi sergilemiştir. COX-1'in ağrı, ateş, analjezi, nöroenflamasyon ve özellikle kanser gibi hastalıkların patofizyolojisine dahil olması nedeniyle COX-1 seçilimli inhibisyon etkisi gösteren doğal ürünlerin araştırılması önem arz etmektedir.

α -Bisabololün mikrobiyal transformasyonu ise 5-LOX inhibisyon etkisi daha düşük metabolitlerin oluşumuna neden olmaktadır. α -bisabololün 5-LOX inhibisyon etkisinin % 19,65 olduğu konsantrasyonda, bisafuranol içeren ekstrenin etkisi neredeyse yoktur (%0,21). Ayrıca bu ekstrenin 50 μ g/mL konsantrasyonda COX-1 inhibisyon etkisi de gözlenmemiştir.

Farnesen izomerleri karışımı ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmasında elde edilen ekstrelerin 5-LOX inhibisyon etkileri (%14,10-%23,70) substratından (%13,93) daha yüksek çıkmıştır.

α -Bisabololün *P. neocrassum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bisabolol oksit B'ye benzer yapıda "bisafuranol" olarak adlandırdığımız metabolitin ProTox-II web sunucusu ile oral toksisite değerlendirmesi sonucu; %82,72 ortalama benzerlik ve %70,97 tahmini doğruluk ile LD₅₀ değeri 2130 mg/kg olarak, sınıf V'de değerlendirilmiştir. Toksikite tahmini sonucuna göre bisafuranolün, oral toksisitesinin olmadığı ve kısmen güvenli olduğu kabul edilebilir.

KAYNAKÇA

- Abad, A., Nouri, M., Gharjanie, A. and Tavakoli, F. (2011). Effect of *Matricaria chamomilla* hydroalcoholic extract on cisplatin-induced neuropathy in mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 (2), 126-131.
- Abbas, A.M., Seddik, M.A., Gahory, A.A., Salaheldin, S. and Soliman, W.S. (2021). Differences in the aroma profile of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) after different drying conditions. *Sustainability*, 13 (9), 5083.
- Abraham, W. R., Washausen, P. and Kieslich, K. (1987). Microbial Hydroxylation of Cedrol and Cedrene. *Z. Naturforsch*, 42c, 414-419.
- Abraham, W.R., Arfmann, H.A. and Giersch, W. (1992). Microbial Hydroxylation of precursors of sinensal. *Z. Naturforsch.*, 47c, 851-858.
- Aggag, M.E. and Yousef, R.T. (1972). Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Plant Med.*, 22 (7), 140-144.
- Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Arendrup, M.C., Lass-Florl, C., Hope, W.W., Perlin, D.S., Rodriguez-Tudela, J.L. and Cuenca-Estrella, M. (2012). Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST Methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2509-2512.
- Alfeetouri, O. H., Mosa, F. A., and Jibreel, W. A. (2019). Determination of Sun Protection Factor (SPF) of Some Botanical Oils by Ultraviolet Spectrophotometry. *Libyan Conference on Chemistry and Its Applications (LCCA)*, 1 (1), 52- 58.
- An, R.B., Na, M.K., Min, B.S., Chang, H.W. and Bae, K.H. (2011). Anti-inflammatory activity of compounds from the whole plant of *Patrinia saniculaefolia*. *Natural Product Sciences*, 17 (2), 90-94.
- Andersen, F.A. (1999). Final report on the safety assessment of bisabolol. *International Journal of Toxicology*, 18 (3), 33-40.
- Arantes, S. and Hanson, J.R. (2007). The Biotransformation of Sesquiterpenoids by *Mucor plumbeus*. *Current Organic Chemistry*, 11 (8), 657-663.
- Arizmendi, N., Alam, S.B., Azyat, K., Makeiff, D., Befus, A.D. and Kulka, M. (2022). The complexity of sesquiterpene chemistry dictates its pleiotropic biologic effects on inflammation. *Molecules*, 27 (8), 2450.

- Arslan, D. (2019). Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde aktarlarda satılan papatya türlerinin tespitine yönelik bir araştırma. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 28 (2), 53-58.
- Asakawa, Y. and Noma, Y. (2016). Biotransformation of sesquiterpenoids, ionones, damascones, adamantanes, and aromatic compounds by green algae, fungi, and mammals. K. H.C. Başer and G. Buchbauer (Eds.). (2016). In *Handbook of Essential Oils* (2nd ed., pp. 907-1010). Boca Raton, London, New York: CRC Press.
- Ashnagar, A., Gharib Naseri, N. and Alavi, S.Y. (2009). Isolation and identification of the major chemical components in the capitula of *Matricaria chamomilla* grown in Khuzestan province of Iran. *Asian Journal of Chemistry*, 21 (7), 4981-4986.
- Ashour, M., Wink, M. and Gershenzon, J. (2010). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. M. Wink (Ed), In *Annual plant reviews Volume 40: Biochemistry of plant secondary metabolism* (2nd ed., pp. 258-303). Oxford, UK: WileyBlackwell.
- Avallone, R., Zanolli, P., Puia, G., Kleinschnitz, M., Schreier, P. and Baraldi, M. (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical pharmacology*, 59 (11), 1387-1394.
- Avonto, C., Wang, M., Chittiboyina, A.G., Avula, B., Zhao, J. and Khan, I.A. (2013). Hydroxylated bisabolol oxides: evidence for secondary oxidative metabolism in *Matricaria chamomilla*. *Journal of Natural Products*, 76 (10), 1848-1853.
- Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H. (2011). Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. *J. Agr. Sci. Tech.*, 13 (1), 79-88.
- Ayran, İ., Çelik, S.A., Kan, A. and Kan, Y. (2018). Essential oil yield and compositions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) cultivated in different provinces of Turkey. *International Journal of Agricultural, Environmental and Food Sciences*, 2 (1), 202-203.
- Bartikova, H., Hanusova, V., Skalova, L., Ambroz, M. and Bousova, I. (2014). Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14 (22), 2478-2494.

- Başer, K.H.C. and Demirci, F. (2007). Chemistry of essential oils. R.G. Berger (Ed.), In *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability* (pp. 43-86). Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Baylac, S. and Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13 (2-3), 138-142.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye 'de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Benítez, G.; González-Tejero, M.R. and Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J. Ethnopharmacol.*, 129 (1), 87-105.
- Berechet, M.D., Manaila, E., Stelescu, M.D. and Craciun, G. (2017). The composition of essential oils obtained from *Achillea millefolium* and *Matricaria chamomilla* L., originary from Romania. *Revista de Chimie*, 68 (12), 2787-2795.
- Berger, S. and Sicker, D. (2009). *Classics in spectroscopy: Isolation and structure elucidation of natural products*. John Wiley and Sons.
- Bhatti, H.N., Khan, S.S., Khan, A., Rani, M., Ahmad, V.U. and Choudhary, M.I. (2014). Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytomedicine*, 21, 1597-1626.
- Bhatti, H.N., Zubair, M., Rasool, N., Hassan, Z. and Ahmad, V.U. (2009). Microbial transformation of sesquiterpenoids. *Natural Product Communications*, 4 (8), 1155-1168.
- Biltekin, S.N., Karadağ, A.E., Demirci, F. and Demirci, B. (2023). *In vitro* anti-inflammatory and anticancer evaluation of *Mentha spicata* L. and *Matricaria chamomilla* L. essential oils. *ACS Omega*, 8 (19), 17143-17150.
- Binder, M. and Popp, A. (1980). Microbial transformation of cannabinoids. Part 3: Major metabolites of (3R,4R)- Δ^1 -tetrahydrocannabinol. *Helv Chim Acta*, 63, 2515-2518.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D. and Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*, 34, 100622.

- Boukhatem, B.S. and Belhadj, A.-E. (2023). *In silico* anti-inflammatory activity of lavender (*Lavandula officinalis*) essential oil bioactive compounds: Molecular docking analysis of COX-1 and COX-2, and ADMET prediction. *AIMS Allergy and Immunology*, 7 (2), 132-153.
- Brehm-Stecher, B.F. and Johnson, E.A. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (10), 3357-3360.
- Can, Ö.D., Özkaya, Ü.D., Kıyan, H.T. and Demirci, B. (2012). Psychopharmacological profile of chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 19 (3-4), 306-310.
- Cano-Flores, A., Gómez, J., Escalona-Torres, I.S. and Velasco-Bejarano, B. (2020). Microorganisms as biocatalysts and enzyme sources. M. Blumenberg, M. Shaaban and A. Elgaml (Eds.), In *Microorganisms* (pp. 1–33). London, UK: IntechOpen.
- Capuzzo, A., Occhipinti, A. and Maffei, M.E. (2014). Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. *Natural Product Research*, 28 (24), 2321-2323.
- Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., Carcereri de Prati, A., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R. and Suzuki, H. (2004). Alpha-bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315 (3), 589-594.
- Chang, H.-Y., Cheng, T.-H. and Wang, A. H.-J. (2021). Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life*, 73 (1), 40–63.
- Chuang, C.W., Wen, C.H., Wu, T.J., Li, C.C., Chiang, N.T., Ma, L.T., ... Chu, F.H. (2021). Sesquiterpene synthases of *Zanthoxylum ailanthoides*: Sources of unique aromas of a folklore plant in Taiwan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (42), 12494-12504.
- Darra, E., Lenaz, G., Cavalieri, E., Fato, R., Mariotto, S., Bergamini, C., Carcereri de Prati, A., Perbellini, L., Leoni, S. and Suzuki, H. (2007). Alpha-bisabolol: Unexpected plant-derived weapon in the struggle against tumour survival? *The Italian Journal of Biochemistry*, 56 (4), 323-328.

- Das, M. (2015). *Traditional herbal medicines for modern times: chamomile medicinal, biochemical, and agricultural aspects*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group, LLC.
- Das, S., Horváth, B., Šafranko, S., Jokić, S., Széchenyi, A. and Kőszegi, T. (2019). Antimicrobial activity of chamomile essential oil: Effect of different formulations. *Molecules*, 24 (23), 4321.
- De Siqueira, R.J.B., Freire, W.B.S., Vasconcelos-Silva, A.A., Fonseca-Magalhães, P.A., Lima, F.J.B., Brito, T.S., Mourão, L.T.C., Ribeiro, R.A., Lahlou, S. and Magalhães, P.J.C. (2012). *In-vitro* characterization of the pharmacological effects induced by (-)- α -bisabolol in rat smooth muscle preparations. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90 (1), 23-35.
- De Sousa, D.P., Damasceno, R.O.S., Amorati, R., Elshabrawy, H.A., de Castro, R.D., Bezerra, D.P., Nunes, V.R.V., Gomes, R.C. and Lima, T.C. (2023). Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, 13, 1144.
- Demirci, F. (2000). *Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Demirci, F., Noma, Y., Kırimer, N. and Başer, K.H.C. (2004). Microbial transformation of (-)-carvone. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59, 389-392.
- Demirci, F., Bayramic, P., Göger, G., Demirci, B. and Baser, K.H.C. (2015). Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *NVEO*, 2 (2), 39-44.
- Demirci, F., Karaca, N., Tekin, M. and Demirci, B. (2018). Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 122, 117-121.
- Dias, C., L. Amaro, A., C. Salvador, Â., Silvestre, A.J., Rocha, S.M., Isidoro, N. and Pintado, M. (2020). Strategies to preserve postharvest quality of horticultural crops and superficial scald control: From diphenylamine antioxidant usage to more recent approaches. *Antioxidants*, 9 (4), 356.
- Diep, P., Mahadevan, R. and Yakunin, A.F. (2018). Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 157.

- Doble, M., Kruthiventi, A. K. and Gaikar, V.G. (Eds.). (2004). *Biotransformations and Bioprocesses*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.
- Durairaj, J., Di Girolamo, A., Bouwmeester, H.J., de Ridder, D., Beekwilder, J. and van Dijk, A.D.J. (2019). An analysis of characterized plant sesquiterpene synthases. *Phytochemistry*, 158, 157-165.
- Dvořáková, M., Valterová, I. and Vaněk, T. (2007). Biotransformation of a monoterpene mixture by *in vitro* cultures of selected conifer species, *Nat. Prod. Comm.*, 2 (3), 233-238
- Dzido, T.H. and Tuzimski, T. (2008). Chambers, sample application, and chromatogram development. M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma and T. Kowalska (Eds.), In *Thin layer chromatography in phytochemistry* (119-174). Boca Raton: CRC Press.
- Eddin, L.B, Jha, N.K., Goyal, S.N., Agrawal, Y.O., Subramanya, S.B., Bastaki, S.M.A. and Ojha, S. (2022). Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of α -bisabolol. *Nutrients*, 14 (7), 1370.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L. and Jouad, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (2-3), 97-103.
- Egbuta, M.A., McIntosh, S., Waters, D.L.E., Vancov, T. and Liu, L. (2022). *In vitro* anti-inflammatory activity of essential oil and β -bisabolol derived from cotton gin trash. *Molecules*, 27 (2), 526.
- El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J.C.G., Charfi, S., Candela Castillo, M.E., Lamarti, A. and Arnao, M.B. (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, 12 (4), 479.
- ElGamal, R.A., Galala, A.A., Abdel-Kader, M.S., Badria, F.A. and Soliman, A.F. (2023). Microbial Transformation of the Sesquiterpene Lactone, Vulgarin, by *Aspergillus niger*. *Molecules*, 28 (9), 3729.
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E.M., El-Maradny, Y.A. and El-Fakharany, E.M. (2022). A comprehensive insight into fungal enzymes: Structure, classification, and their role in mankind's challenges. *J. Fungi (Basel)*, 8 (1), 23.

- EL-Hefny, M., Abo Elgat, W.A.A., Al-Huqail, A.A. and Ali, H.M. (2019). Essential and recovery oils from *Matricaria chamomilla* flowers as environmentally friendly fungicides against four fungi isolated from cultural heritage objects. *Processes*, 7, 809.
- Engels, G. and Brinckmann, J. (2015). Chamomile: *Matricaria chamomilla*. *HerbalGram*, 108, 8-17.
- Fabian, D., Juhás, Š., Bukovská, A., Bujňáková, D., Grešáková, Ľ. and Koppel, J. (2011). Anti-inflammatory effects of chamomile essential oil in mice. *Slovak Journal of Animal Science*, 44 (3), 111-116.
- Farhoudi, R. (2013). Chemical constituents and antioxidant properties of *Matricaria recutita* and *Chamaemelum nobile* essential oil growing wild in the South West of Iran. *JEOP*, 16 (4), 531-537.
- Farooq, A., Tahara, S., Choudhary, M.I., Atta-ur-Rahman, Ahmed, Z., Başer, K.H.C. and Demirci, F. (2002). Biotransformation of (-)- α -pinene by *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 303-306.
- Fazius, F., Shelest, E., Gebhardt, P. and Brock, M. (2012). The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Molecular Microbiology*, 86 (6), 1508-1530.
- Firat, Z., Demirci, F. and Demirci, B. (2014). Antioxidant activity of chamomile essential oil. 45th *International Symposium on Essential Oils*, Istanbul, Turkey, Sep. 7-11, 2014, p.257. K.H.C. Başer (Ed.).
- Firat, Z., Demirci, F. and Demirci, B. (2018). Antioxidant activity of chamomile essential oil and main components. *NVEO*, 5 (1), 11-16.
- Firat, Z., Demirci, F., Demirci, B., Kırmızıbekmez, H. and Başer, K.H.C. (2021). Microbial transformation of (-)- α -bisabolol towards bioactive metabolites. *Rec. Nat. Prod.*, 15 (6), 593-601.
- Formisano, C., Delfino, S., Oliviero, F., Tenore, G.C., Rigano, D. and Senatore, F. (2015). Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Industrial Crops and Products*, 63, 256-263.

- Franke, R. (2005). Plant sources. R. Franke and H. Schilcher (Eds.), In *Chamomile: Industrial profiles* (pp. 39-54). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Freifeld, I., Holtz, E., Dahmann, G. and Langer, P. (2006). Diversity-oriented synthesis of 2,5-disubstituted tetrahydrofurans based on a "cyclization-hydrogenation-substitution" strategy. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006 (14), 3251-3258.
- Furusawa, M., Hashimoto, T., Noma, Y. and Asakawa, Y. (2005). Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene, by biotransformation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53 (11), 1513-1514.
- Ganzer, M., Schneider, P. and Stuppner, H. (2006). Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences*, 78 (8), 856-861.
- García-Granados, A., Rivas, F., Martínez, A. and Parra, A. (2009). Biotransformations of Sesquiterpenoids by Rhizopus Species. *Current Organic Chemistry*, 13, 1182-1193.
- Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005). Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23 (7-8), 471-499.
- Ghaffari, F. and Moein, E. (2013). The chamomile in Islamic and Iranian traditional medicine context. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine*, 4 (1), 79-85.
- Ghasemi, M., Jelodar, N. B., Modarresi, M., Bagheri, N. and Jamali, A. (2016). Increase of chamazulene and α -bisabolol contents of the essential oil of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) using salicylic acid treatments under normal and heat stress conditions. *Foods*, 5 (3), 56.
- Gibson, R.W. and Pickett, J.A. (1983). Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature*, 302(5909), 608-609.
- Gosztola, B. (2012). *Morphological and chemical diversity of different chamomile (Matricaria recutita L.) populations of the great Hungarian plain*. Doctoral thesis. Budapest: University of Budapest.

- Göger, G., Demirci, B., Ilgin, S. and Demirci, F. (2018). Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents. *Industrial Crops and Products*, 120, 279-285.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L. and Kaushik, D. (2010). Pharmacological potential of *Matricaria recutita*—A review. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, 2, 12-16.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 329121.
- Guzmán, A., Díaz, E., Trejo, B.E. and López-Muñoz, F.J. (2004). Synthesis of potential anti-inflammatory compounds, selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Revista de la Sociedad Química de México*, 48 (4), 230-234.
- Güzel, Y., Güzelşemme, M. and Miski, M. (2015). Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 118-152.
- György, Z., Tolonen, A., Neubauer, P. and Hohtola, A. (2005). Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycoside production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 129-135.
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied thin-layer chromatography best practice and avoidance of mistake*. (2nd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Hang, L., Liu, N. and Tang, Y. (2016). Coordinated and Iterative Enzyme Catalysis in Fungal Polyketide Biosynthesis. *ACS Catalysis*, 6 (9), 5935-5945.
- Hashidoko, Y., Tahara, S., Iwaya, N. and Mizutani, J. (1991). Highly oxygenated bisabolonoids in *Rosa rugosa* leaves. *Z. Naturforsch*, 46c, 357-363.
- Hauer, B. (2020). Embracing nature's catalysts: A viewpoint on the future of biocatalysis. *ACS Catalysis*, 10 (15), 8418-8427.
- Hegazy, M.F., Mohamed, T.A., ElShamy, A.I., Mohamed, A.H., Mahalel, U.A., Reda, E.H., Shaheen, A.M., Tawfik, W.A., Shahat, A.A., Shams, K.A., Abdel-Azim, N.S. and Hammouda, F.M. (2015). Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *Journal of Advanced Research*, 6 (1), 17-33.

- Honermeier, B., Ali, S., Leschhorn, B., Mahmood, A., Ijaz, M., Russo, M., Shafiee-Hajiabad, M., Ullah, H., and Zeller, S. (2013). Cultivation of medicinal and spice plants in Germany – A review. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15 (6), 1379-1388.
- Horn, W., Franz, C. and Wickell, I. (1988). Zur genetik der bisaboloide bei der kamille. *Plant Breeding*, 101 (4), 307-312.
- Hou, A. and Dickschat, J.S. (2020). On the mass spectrometric fragmentations of the bacterial sesterterpenes sestermobaraenes A–C. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16, 2807-2819.
- Hussain, T., Gupta, S. and Mukhtar, H. (2003). Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Letters*, 191 (2), 125-35.
- Isaac, O (1979). Pharmakologische untersuchungen von kamillen-inhaltsstoffen. II. neue untersuchungen zur antiphlogistischen wirkung des (-)- α -bisabolols und der bisabololoxide. [Pharmacological investigations with compounds of chamomile II. new investigations on the antiphlogistic effects of (-)- α -bisabolol and bisabolol oxides]. *Planta Medica*, 35 (2), 125-140.
- İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H.C. and Demirci, F. (2002). Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (14), 3943-3946.
- İşcan, G. (2009). *Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- İşcan, G., Kirimer, N., Demirci, F., Demirci, B., Noma, Y. and Başer, K.H.C. (2012). Biotransformation of (-)-(*R*)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. *Chem Biodivers*, 9 (8), 1525-1532.
- İşcan, G., Köse, Y.B. ve Demirci, F. (2019). *Bitkisel drogların makroskopik ve mikroskopik özellikleri*. Antalya: Antalya Eczacı Odası Akademisi Yayınları.
- Jahanshiri, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Asghari-Paskiabi, F., Saghiri, R. and Razzaghi-Abyaneh, M. (2017). α -Bisabolol inhibits *Aspergillus fumigatus* Af239 growth via affecting microsomal Δ^{24} -sterol methyltransferase as a crucial enzyme in ergosterol biosynthesis pathway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33 (3), 55.

- Jalce, G., Franck, X. and Figadère, B. (2009). Diastereoselective synthesis of 2,5-disubstituted tetrahydrofurans. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20 (22), 2537-2581.
- Jamalian, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Jaimand, K., Pashootan, N., Amani, A. and Razzaghi-Abyaneh, M. (2012). Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *Journal of Mycology and Medical*, 22 (4), 308-315.
- Javidnia, K., Faghieh-Mirzaei, E., Miri, R., Attarroshan, M. and Zomorodian, K. (2016). Stereoselective reduction of prochiral ketones by plant and microbial biocatalysts. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78 (1), 73-79.
- Johnson Jr, W., Boyer, I., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., ... Heldreth, B. (2018). Amended safety assessment of *Chamomilla recutita*-derived ingredients as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 37 (3), 51-79.
- Kamatou, G.P.P. and Viljoen, A.M. (2010). A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (1), 1-7.
- Kazemi, M. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria chamomilla*. *International Journal of Food Properties*, 18 (8), 784-1792.
- Keppler, A.F., Porto, A.L.M., Schoenlein-Crusius, I.H., Comasseto, J.V., and Andrade, L.H. (2005). Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 967-975.
- Khan, I.A. and Abourashed, E.A. (2010). *Leung's encyclopedia of common natural ingredients, used in food, drugs, and cosmetics*. (3rd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.
- Kırmızıbekmez, H., Demirci, B., Yeşilada, E., Başer, K.H.C. and Demirci, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Turkey. *Natural Product Communications*, 4, 1001-1006.

- Kim, D., Xuan, Q.P., Moon, H., Jun, Y.W. and Ahn, K.H. (2014). Synthesis of benzocoumarins and characterization of their photophysical properties. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 3 (12), 1089-1096.
- Krings, U., Hardebusch, B., Albert, D., Berger, R.G., Maroä stica, M., Jr. and Pastore, G.M. (2006). Odor-active alcohols from the fungal transformation of α -farnesene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (24), 9079-9084.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L. and Sarker, S.D. (2007). Screening seeds of some scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 21 (5), 615-621.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18 (6), 435-448.
- Lamare, V. and Furstoss, R. (1990). Bioconversion of sesquiterpenes. *Tetrahedron*, 46 (12), 4109-4132.
- Lee, I.-S., ElSohly, H.N. and Hufford, C.D. (1990). Microbial metabolism studies of the antimalarial drug arteether. *Pharmaceutical Research*, 7, 199-203.
- Leite, G.O., Dubois, A.F., Seeger, R.L., Boligon, A.A., Costa, J.G.M., Lugokenski, T.H., Campos, A.R., Fachineto, R., Kamdem, J.P., Rocha, J.B.T. and Wanger, C. (2016). In vitro antioxidant activity investigation of *Vanillomopsis arborea* Baker aqueous extracts, essential oil and isolated compound: (-)- α -bisabolol. *Pharmacologia*, 7, 193-201.
- Leresche, J.E. and Meyer, H.-P. (2006). Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research and Development*, 10 (3), 572-580.
- Li, G., Wu, H., Sun, L., Cheng, K., Lv, Z., Chen, K., Qian, F. and Li, Y. (2022). (-)- α -Bisabolol alleviates atopic dermatitis by inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in mast cell. *Molecules*, 27 (13), 3985.
- Limberger, R.P., Ferreira, L., Castilhos, T., Aleixo, A.M., Petersen, R.Z., Germani, J.C., Zuanazzi, J.A., Fett-Neto, A.G. and Henriques, A.T. (2003). The ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (-)- α -bisabolol as exogenous substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61 (6), 552-555.
- Ling, S. P., Su, S.S., Zhang, H.M., Zhang, X.S., Liu, X.Y., Pan, G.F. and Yuan, Y. (2014). Molecular cloning and characterization of the full-length Hsp90 gene from *Matricaria recutita*. *Genetics and Molecular Research*, 13 (4), 10994-11003.

- Liu, J.-J., Zhang, G.-C., Kwak, S., Oh, E. J., Yun, E. J., Chomvong, K., Cate, J.H.D. and Jin, Y.-S. (2019). Overcoming the thermodynamic equilibrium of an isomerization reaction through oxidoreductive reactions for biotransformation. *Nature Communications*, 10, 1356.
- Liu, Y., Ding, L., Zhang, Z., Yan, X. and He, S. (2020). New antifungal tetrahydrofuran derivatives from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. LS78. *Fitoterapia*, 146, 104677.
- Liu, Y., Wang, Z., Cui, Z., Qi, Q. and Hou, J. (2022). Progress and perspectives for microbial production of farnesene. *Bioresource Technology*, 347, 126682.
- Longo, M.A. and Sanromán, M.A. (2006). Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (3), 335-353.
- Ma, C.-M., Winsor, L. and Daneshtalab, M. (2007). Quantification of spiroether isomers and Herniarin of different parts of *Matricaria matricarioides* and flowers of *Chamaemelum nobile*. *Phytochemical Analysis*, 18 (1), 42-49.
- Ma, D., He, J. and He, D. (2020). Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84 (2), 402-410.
- Martin, G.D.A. (2010). Biotransformation Reactions by *Rhizopus* spp. *Current Organic Chemistry*, 14, 1-14.
- Mashima, R. and Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, 6, 297-310.
- Mavandi, P., Assareh, M.H., Dehshiri, A., Rezadoost, H. and Abdossi, V. (2019). Flower biomass, essential oil production and chemotype identification of some Iranian *Matricaria chamomilla* Var. *recutita* (L.) accessions and commercial varieties. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22 (5), 1228-1240.
- McKay, D.L. and Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.*, 20 (7), 519-530.
- McPhee, D. (2013). The development of catalytic processes from terpenes to chemicals. P. Imhof, and J.C. Van der Waal (Eds.), In *Catalytic process development for renewable materials* (pp. 51-79). Weinheim: John Wiley and Sons.

- Medic-Saric, M., Stanic, G., Males, Z. and Stanic, S. (1997). Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) essential oil. *Journal of Chromatography A*, 776, 355-360.
- Meghwanshi, G.K., Kaur, N., Verma, S., Dabi, N.K., Vashishtha, A., Charan, P.D., Purohit, P., Bhandari, H.S., Bhojak, N., and Kumar, R. (2020). Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67 (4), 586-601.
- Mikhak, A., Sohrabi, A., Kassae, M.Z. and Feizian, M. (2017). Synthetic nanozeolite/nanohydroxyapatite as a phosphorus fertilizer for German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 95, 444-452.
- Miyazawa, M., Funatsu, Y. and Kameoka, H. (1990). Biotransformation of (-)- α -bisabolol to (-)- α -bisabolol oxide B by *Aspergillus niger*. *Chemical Express*, 5, 589-592.
- Miyazawa, M., Funatsu, Y. and Kameoka, H. (1992a). Biotransformation of (-)- α -bisabolol to (-)- α -tetrahydrobisabolol-2,5,6-triol by *Aspergillus niger*. *Chemical Express*, 7, 217-220.
- Miyazawa, M., Funatsu, Y. and Kameoka, H. (1992b). Biotransformation of (-)- α -bisabolol to 6-methyl-2-(4'-methylcyclohexan-1'-yl)-2,5-epoxyheptane-3',4',6-triol by *Aspergillus niger*. *Chemical Express*, 7, 573-576.
- Miyazawa, M., Nankai, H. and Kameoka, H. (1993a). Biotransformation of (-)- α -bisabolol to (2*S*,5*S*,1'*S*,3'*R*,4'*R*)-6-methyl-2-(4'-methylcyclohexane-1'-yl)-2,5-epoxy-heptane-3',4',6-triol by *Glomerella cingulata*. *Chemical Express*, 8, 149-152.
- Miyazawa, M., Nankai, H. and Kameoka, H. (1993b). Biotransformation of (-)- α -bisabolol to (2*S*,5*S*,1'*S*,3'*S*,4'*S*)-6-methyl-2-(4'-methylcyclohexane-1'-yl)-2,5-epoxy-heptane-3',4',6-triol by *Glomerella cingulata*. *Chemical Express*, 8, 401-404.
- Miyazawa, M., Nankai, H. and Kameoka, H. (1995). Biotransformation of (-)- α -bisabolol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry*, 39 (5), 1077-1080.

- Miyazawa, M. and Tamura, N. (2007). Components of the essential oil from sprouts of *Polygonum hydropiper* L. ('Benitade'). *Flavour and fragrance journal*, 22(3), 188-190.
- Moore, J.C., Pollard, D.J., Kosjek, B. and Devine, P.N. (2007). Advances in the enzymatic reduction of ketones. *Accounts of Chemical Research*, 40 (12), 1412-1419.
- Moro, M.G., Vargas Sánchez, P.K., Lupepsa, A.C., Baller, E.M. and Nobre Franco, G.C. (2017). Cyclooxygenase biology in renal function-literature review. *Revista Colombiana de Nefrología*, 4 (1).
- Mukhammadieva, M.M. and Saidova, M.K. (2022). Pharmacological action of the components of chamomile pharmacy and its use in cosmetics. *World Bulletin of Public Health (WBPH)*, 17, 90-93.
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G. and Rebelo Gomes, L. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124 (2), 270-283.
- Nezhati, M.N., Riazi, G. H. and Ahmadi, S. (2015). Synthesis of new chamazulene derivatives and the study of their effects on tubulin polymerization. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 33 (1), 284-289.
- Ni, Z.-J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J.-G., Hu, F. and Wei, Z.-J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 78–89.
- Novaković, M., Bukvicki, D., Vajsa, V., Tesević, V., Milosavljević, S., Marin, P. and Asakawa, Y. (2018). Microbial transformation of *Calamintha glandulosa* essential oil by *Aspergillus niger*. *Natural Product Communications*, 13 (4), 479-482.
- Oliveira, F.S., Freitas, T.S., Cruz, R.P.D., Costa, M.D.S., Pereira, R.L.S., Quintans-Júnior, L. J., ... Coutinho, H.D.M. (2017). Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, 1111-1118.

- Orav, A., Raal, A. and Arak, E. (2010). Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries. *Natural Product Research*, 24 (1), 48-55.
- Ortiz, M.I., Fernández-Martínez, E., Soria-Jasso, L.E., Lucas-Gómez, I., Villagómez-Ibarra, R., González-García, M.P., Castañeda-Hernández, G. and Salinas-Caballero, M. (2016). Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 78, 248-256.
- Owlia, P., Rasooli, I. and Saderi, H. (2007). Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla*. L. *Res. J. Bio. Sci.*, 2(2), 155-160.
- Ozdemir, M., Suzgec-Selcuk, S., Mataracı-Kara, E. and Ozbek-Celik, B. (2021). Pharmacopoeia researches and antimicrobial activity studies on *Matricaria chamomilla* L. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 11 (4), 801-808.
- Park, J., Han, F., Lee, I.-S. (2022). Biotransformation of (-)- α -bisabolol by *Absidia coerulea*. *Molecules*, 27(3), 881.
- Pauli, A. (2006). α -Bisabolol from chamomile - A specific ergosterol biosynthesis inhibitor? *International Journal of Aromatherapy*, 16 (1), 21-25.
- Petronilho, S., Maraschin, M., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. and Rocha, S.M. (2011). Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Ind. Crops Prod.*, 34, 1482–1490.
- Petruřová-Poracká, V., Repčák, M., Vilková, M. and Imrich, J. (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry*, 141 (1), 54-59.
- Ph. Eur. 8.0. (2014). *European Pharmacopoeia*. (Eighth Edition). Strasbourg: Council of Europe.
- Pham, J.V., Yilma, M.A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J.R., Kim, E., Cho, H.J., Reynolds, J.M., Song, M.C., Park, S.R. and Yoon, Y.J. (2019). A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1404

- Piri, E., Sourestani, M.M., Khaleghi, E., Mottaghipisheh, J., Zomborszki, Z.P., Hohmann, J. and Csupor, D. (2019). Chemo-diversity and antiradical potential of twelve *Matricaria chamomilla* L. populations from Iran: Proof of ecological effects. *Molecules*, 24 (7), 1315.
- Purnamawati, S., Indrastuti, N., Danarti, R. and Saefudin, T. (2017). The role of moisturizers in addressing various kinds of dermatitis: A review. *Clinical Medicine and Research*, 15 (3-4), 75-87.
- Qin, D. and Dong, J. (2023). Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products. *Molecules*, 28 (6), 2619.
- Rafieiolhossaini, M., Sodaieizadeh, H., Adams, A., De Kimpe, N. and Van Damme, P. (2010). Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium. *Industrial Crops and Products*, 31 (1), 145-152.
- Ramadan, M., Goeters, S., Watzer, B., Krause, E., Lohmann, K., Bauer, R., Hempel, B. and Imming, P. (2006). Chamazulene carboxylic acid and matricin: A natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. *Journal of Natural Products*, 69 (7), 1041-1045.
- Ramazani, E., Akaberi, M., Emami, S.A. and Tayarani-Najaran, Z. (2022). Pharmacological and biological effects of alpha-bisabolol: An updated review of the molecular mechanisms. *Life Sciences*, 304, 120728.
- Ramos, M.B.M., Vieira, M.C., Heredia Z., N.A., Siqueira, J.M., and Ziminiani, M.G. (2004). Produção de capítulos florais em função de populações de plantas e da incorporação ao solo de cama-de-aviário. *Horticultura Brasileira*, 22 (3), 566-572.
- Razmjoo, K., Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M.R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *Intern. J. Agric. and Biol.*, 10, 45-454.
- Redaelli, C., Formentini, L. and Santaniello, E. (1981). High-performance liquid chromatography of cis- and trans-en-in-dicycle ethers (Spiro ethers) in *Matricaria chamomilla* L. flowers and in chamomile extracts. *Journal of Chromatography*, 209, 110-112.

- Reddy, G.K., Leferink, N.G.H., Umemura, M., Ahmed, S.T., Breitling, R., Scrutton, N.S. and Takano, E. (2020). Exploring novel bacterial terpene synthases. *PLoS One*, 15 (4).
- Reichling, J. and Beiderbeck, R. (1991). *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Camomile in vitro culture and the production of secondary metabolites. Y.P.S. Bajaj (Ed.), In *Biotechnology in agriculture and forestry 15, medicinal and aromatic plants III*. (pp. 156-175). Berlin: Springer-Verlag.
- Rekka, E.A., Kourounakis, A.P. and Kourounakis, P.N. (1996). Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 92 (3), 361-364.
- Ren, G., Xue, P., Sun, X. and Zhao, G. (2018). Determination of the volatile and polyphenol constituents and the antimicrobial, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activities of the bioactive compounds from the by-product of *Rosa rugosa* Thunb. var. plena Regal tea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18 (1), 307.
- Rezaei, K.A.P., Gurbuz, B., Uyanik, M., Rahimi, A. ve Arslan, N. (2015). Volatile constituents variability in *Matricaria chamomilla* L. from Ankara, Turkey. *TEOP*, 18 (1), 255-260.
- Rhind, J.P. (2012). The essential oils, absolutes and resinoids of aromatherapy. S. Dragon (Ed.), In *Essential oils: A handbook for aromatherapy practice* (pp. 111-255). Jessica Kingsley Publishers.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445.
- Rubiolo P, Belliardo F, Cordero C, Liberto E, Sgorbini B. and Bicchi C. (2006) Headspace-solid-phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). *Phytochemical Analysis*, 17, 217-225.
- Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E.R. and Ammon, H.P. (1994). Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B₄ formation. *Planta medica*, 60 (5), 410-413.

- Sakar, M.K. ve Taner, M. (1991). *Fitokimyasal analizler: Tanım, miktar tayini ve izolasyon*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- Sakhteman, A., Pasdaran, A., Afifi, M. and Hamedi, A. (2020). An assay on the possible effect of essential oil constituents on receptors involved in women's hormonal health and reproductive system diseases. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 25, 1-9.
- Salamon, I. (2004). The Slovak gene pool of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) and comparison in its parameters. *Horticultural Science (Prague)*, 31 (2), 70-75.
- Salamon, I. (2007). Effect of internal and external factors on yield and qualitative quantitative characteristics of Chamomile essential oil. *Acta Horticulturae*, 749.
- Salamon, I. (2009). Chamomile biodiversity of the essential oil qualitative-quantitative characteristics, B. Sener (Ed). In *Inovations in chemical biology* (pp. 83-90). The Netherlands: Springer.
- Salamon, I., Ghanavati, M. and Khazaei, H. (2010). Chamomile biodiversity and essential oil qualitative-quantitative characteristics in Egyptian production and Iranian landraces. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22 (1), 59-64.
- Salamon, I., Kryvtsova, M. and Hrytsyna, M. (2022). Chemotype determination of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in Ukraine. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 68 (4), 35-36.
- Salamon, I., Ibraliu, A. and Kryvtsova, M., (2023). Essential oil content and composition of the chamomile inflorescences (*Matricaria recutita* L.) belonging to central Albania. *Horticulturae*, 9, 47.
- Sambyal, K. and Singh, R.V. (2020). Production aspects of testosterone by microbial biotransformation and future prospects. *Steroids*, 159, 108651.
- Schilcher, H. (1987). *Die Kamille, handbuch für ärzte, apotheker und andere naturwissenschaftler*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Schilcher, H. (2005a). Legal situation of German chamomile: monographs. R. Franke and H. Schilcher (Eds.), In *Chamomile industrial profiles* (pp. 7-38). Boca Raton, FL: CRC Press.

- Schilcher, H. (2005b). Traditional use and therapeutic indications. R. Franke and H. Schilcher (Eds.), In *Chamomile: industrial profiles* (pp. 265-274). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Schilcher, H., Imming, P. and Goeters, S. (2005a). Active chemical constituents of *Matricaria chamomilla* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. R. Franke and H. Schilcher (Eds.), In *Chamomile industrial profiles* (pp. 55-76). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Schilcher, H., Imming, P. and Goeters, S. (2005b). Chemical analysis of the active principles of chamomile. R. Franke and H. Schilcher (Eds.), In *Chamomile industrial profiles* (pp. 221-244). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sharafzadeh, S. and Alizadeh, O. (2011). German and Roman chamomile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (10), 1-5.
- Sharifi-Rad, M., Nazaruk, J., Polito, L., Morais-Braga, M.F.B., Rocha, J.E., Coutinho, H.D.M., Salehi, B., Tabanelli, G., Montanari, C., Contreras, M.D.M., Yousaf, Z., Setzer, W.N., Verma, D.R., Martorell, M., Sureda, A. and Sharifi-Rad, J. (2018). *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiological Research*, 215, 76-88.
- Sheikha, N.S. (2014). Synthetic endeavours towards oxasqualenoid natural products containing 2,5-disubstituted tetrahydrofurans – eurylene and teurilene. *Natural Product Reports*, 31 (9), 1175-1188.
- Shin, C., Chavre, S.N., Pae, A.N. and Cha, J.H. (2005). Highly stereoselective synthesis of 2,5-disubstituted 3-vinylidene tetrahydrofurans via prins-type cyclization. *Organic Letters*, 7 (15), 3283-3285.
- Shipochliev, T., Dimitrov, A. and Aleksandrova, E. (1981). Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Preventive Veterinary Medicine*, 18 (6), 87-94.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N. and Srivastava, M.K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy reviews*, 5 (9), 82-95.
- Singh, C.E. and Aishwarya, J. (2017). Chamomile an ancient aromatic plant - A review. *Journal of Ayurveda Medical Sciences*, 2 (4), 251-255.
- Slavik, B., Roehrer, S., Loos, H.M., Minceva, M. and Buettner, A. (2021). Isolation of sesquiterpenoids from *Matricaria chamomilla* by means of solvent assisted flavor evaporation and centrifugal partition chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413 (17), 4387-4396.

- Smitha, M.S., Singh, S. and Singh, R. (2017). Microbial biotransformation: A process for chemical alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 4 (2), 47-51.
- Srivastava, J.K., Pandey, M. and Gupta, S. (2009). Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sciences*, 85 (19-20), 663-669.
- Srivastava, K.J., Shankar, E. and Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Mol. Med. Report*, 3 (6), 895-901.
- Stanojevic, L.P., Marjanovic-Balaban, Z.R., Kalaba, V.D., Stanojevic, J.S. and Cvetkovic, D.J. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19 (8), 2017-2028.
- Straathof, A.J.J. (2002). The production of fine chemicals by biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 548-556.
- Sultana, N. and Saify, Z.S. (2013). Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28 (6), 1113-1128.
- Talapatra, S.K. and Talapatra, B. (2015). Sesquiterpenoids (C₁₅). S.K. Talapatra and B. Talapatra (Eds.), In *Chemistry of plant natural products stereochemistry, conformation, synthesis, biology, and medicine* (pp. 403-468). Heidelberg: Springer.
- Tang, R., Wen, Q., Li, M., Zhang, W., Wang, Z. and Yang, J. (2021). Recent advances in the biosynthesis of farnesene using metabolic engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (51), 15468-15483.
- Tomić, M., Micov, A., Pecikoza, U. and Stepanović-Petrović, R. (2017). Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. In *Clinical uses of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and potential benefits of NSAIDs modified-release preparations* (pp. 1-29). Academic Press.
- Trease, G.E. and Evans, W.C. (2002). *Trease and Evans pharmacognosy*. (15th edition). London: WB Saunders.
- Tucakov, J. (1957). The areas and the exploitation of the *Matricaria chamomilla* L. in Jugoslavia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2, 161-173.

- Unani Pharmacopoeia Committee. (2007). Gul-e-Babuna (flower). In *The Unani Pharmacopoeia of India*. Part 1. Vol 2. New Delhi, India: Government of India, Ministry of Health and Family Welfare, Department of Ayurveda, Yoga and Naturopathy, Unani, Siddha and Homoeopathy (AYUSH), 39-40.
- Urdang, G. (1948). The origin and development of the essential oil industry. E. Guenther (Ed.), In *The essential oils* (pp. 1-13). Toronto, New York, London: D. Van Nostrand Company, Inc.
- Vandermoten, S., Mescher, M.C., Francis, F., Haubruge, E. and Verheggen, F.J. (2012). Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42 (3), 155-163.
- Van Zyl, R.L., Seatlholo, S.T. and Van Vuuren, S.F. (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 129-133.
- Voelker, T., Xia, H., Fandrick, K., Johnson, R., Janowsky, A. and Cashman, J.R. (2009). 2,5-Disubstituted tetrahydrofurans as selective serotonin re-uptake inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (5), 2047-2068.
- Wagner, C., Marquard, R.A., Friedt, W. and Ordon, F. (2005). Genetic analysis of (-)- α -bisabolol and chamazulene content in tetraploid Camomile (*Chamomille recutita* (L.) Rausch.) and identification of molecular markers. A. Jatisatienr, T. Paratasilpin, S. Elliott, V. Anusarnsunthorn, D. Wedge, L.E. Craker and Z.E. Gardner (Eds.), In *Proc. WOCMAP III, Vol 2: Conservation cultivation and sustainable use of MAPs* (pp. 676). Acta Hort. ISHS.
- Wagner, H. and Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas* (2nd ed.). Berlin: Springer.
- World Health Organization. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants: Volume 1. Geneva: World Health Organization.
- Wu, H., Yang, K., Dong, L., Ye, J., and Xu, F. (2022). Classification, distribution, biosynthesis, and regulation of secondary metabolites in *Matricaria chamomilla*. *Horticulturae*, 8 (2), 1135.
- Xu, J., Xue, C., Xue, D., Zhao, J., Gai, J., Guo, N. And Xing, H. (2013). Overexpression of GmHsp90s, a heat shock protein 90 (Hsp90) gene family cloning from soybean, decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8 (7), e69810.

- Yang, H.-J., Kim, H.J., Whang, Y.-A., Choi, J.-K. and Lee, I.-S. (1999). Microbial transformation of the sweet sesquiterpene (+)-hernandulcin. *Natural Product Sciences*, 5 (3), 151-153.
- Yazdi, H., Seifi, A., Changizi, S., Khorri, V., Hossini, F., Davarian, A., Jand, Y., Enayati, A., Mazandarani, M. and Nanvabashi, F. (2017). Hydro-alcoholic extract of *Matricaria recutita* exhibited dual anti-spasmodic effect via modulation of Ca²⁺ channels, NO and PKA₂-kinase pathway in rabbit jejunum. *Avicenna journal of phytomedicine*, 7 (4), 334-344.
- Zaaba, N.E., Beegam, S., Elzaki, O., Yasin, J., Nemmar, B.M., Ali, B.H., Adeghate, E. and Nemmar, A. (2022). The nephroprotective effects of α -bisabolol in cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Biomedicines*, 10 (4), 842.
- Zhan, J. and Gunatilaka, L. (2006). Microbial transformation of amino- and hydroxyanthraquinones by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Journal of Natural Products*, 69 (10), 1525-1527.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T. and Luo, C. (2012). Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants. A.-u.-Rahman (Ed.), In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 37, pp. 67-114). Oxford, UK: Elsevier.
- Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X. and Wu, N. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15 (5), 3200-3210.

http-1: https://tox-new.charite.de/protox_II/ (Erişim tarihi: 23.05.2023)

EKLER

EK-1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Standart Maddelerin Kimyasal Özellikleri

(-)- α -Bisabolol

\geq %95 (GC)

Sinonimleri: (-)- α -Bisabolol; (-)-6-Metil-2-(4-metil-3-siklohekzen-1-il)-5-hepten-2-ol;
Levomenol

Ampirik Formülü: C₁₅H₂₆O

Molekül Ağırlığı : 222,37

(-)- α -Bisabolol oksit A

\geq %95 (GC)

Sinonimleri: (3*S*,6*S*)-Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-[(1*S*)-4-metil-3-siklohekzen-1-il]-2H-
piran-3-ol

Ampirik Formülü: C₁₅H₂₆O₂

Molekül Ağırlığı: 238,37

Kamazulen

\geq %92(GC) Sigma-Aldrich ve %95(GC) ABCR

Sinonimleri: 7-Etil-1,4-dimetilazulen

Ampirik Formülü: C₁₄H₁₆

Molekül Ağırlığı: 184,28

(*E*)- β -Farnesen

\geq %90 (GC)

Sinonimleri: *trans*- β -Farnesen, *trans*-7,11-dimetil-3-metilen-1,6,10-dodekatrien

Stereoizomerleri: *cis*- β -Farnesen, (*Z,E*)- β -Farnesen, (*E,Z*)- β -Farnesen

Ampirik Formülü: C₁₅H₂₄

Molekül Ağırlığı: 204,35

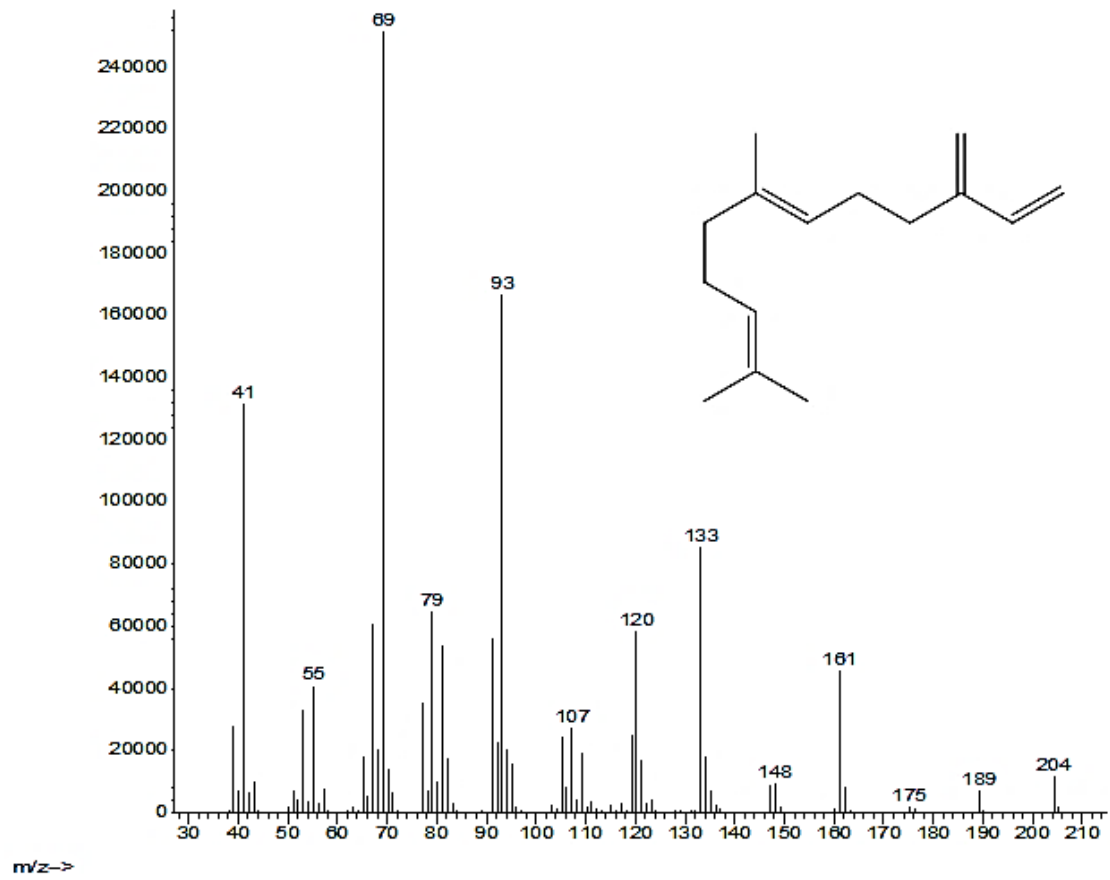
Farnesen izomerleri karışımı

Stabilize

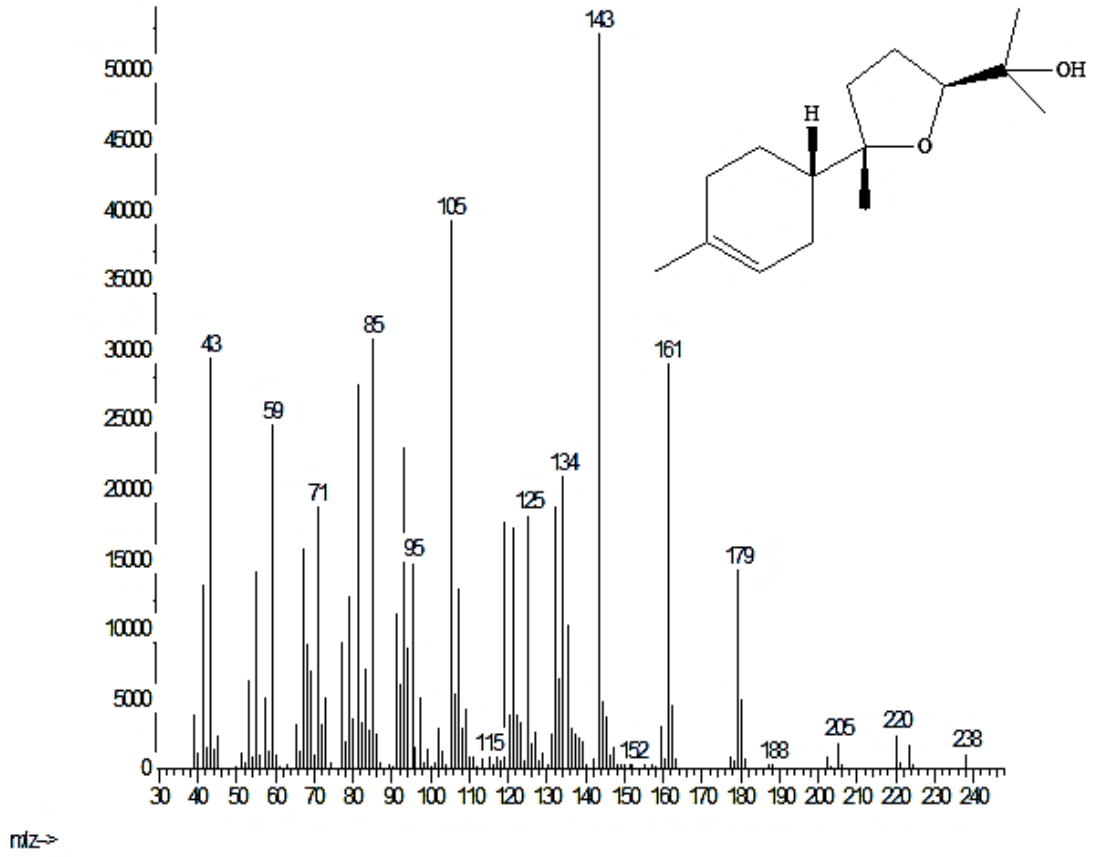
Ampirik Formülü: C₁₅H₂₄

Molekül Ağırlığı: 204,35

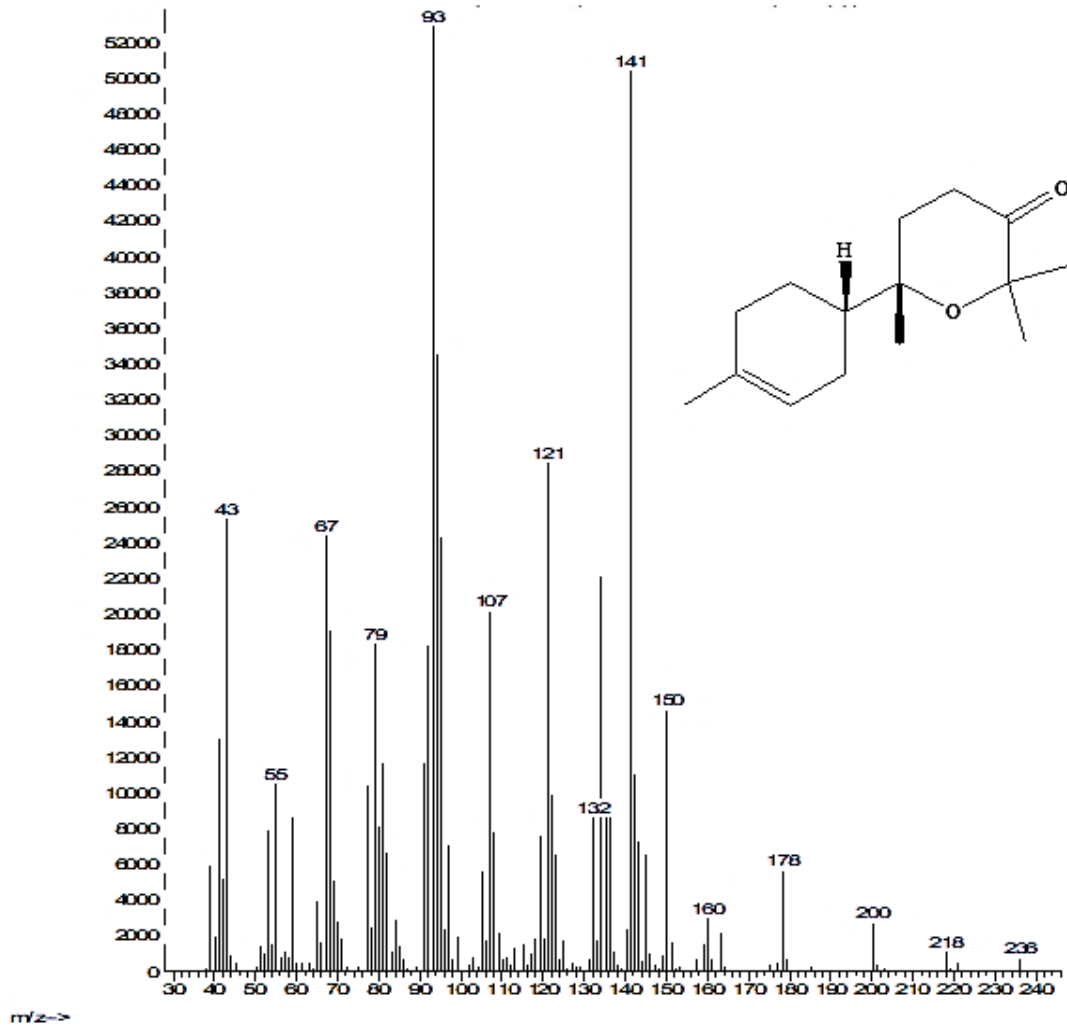
EK-2. (*E*)- β -Farnesenin GC/MS Spektrum



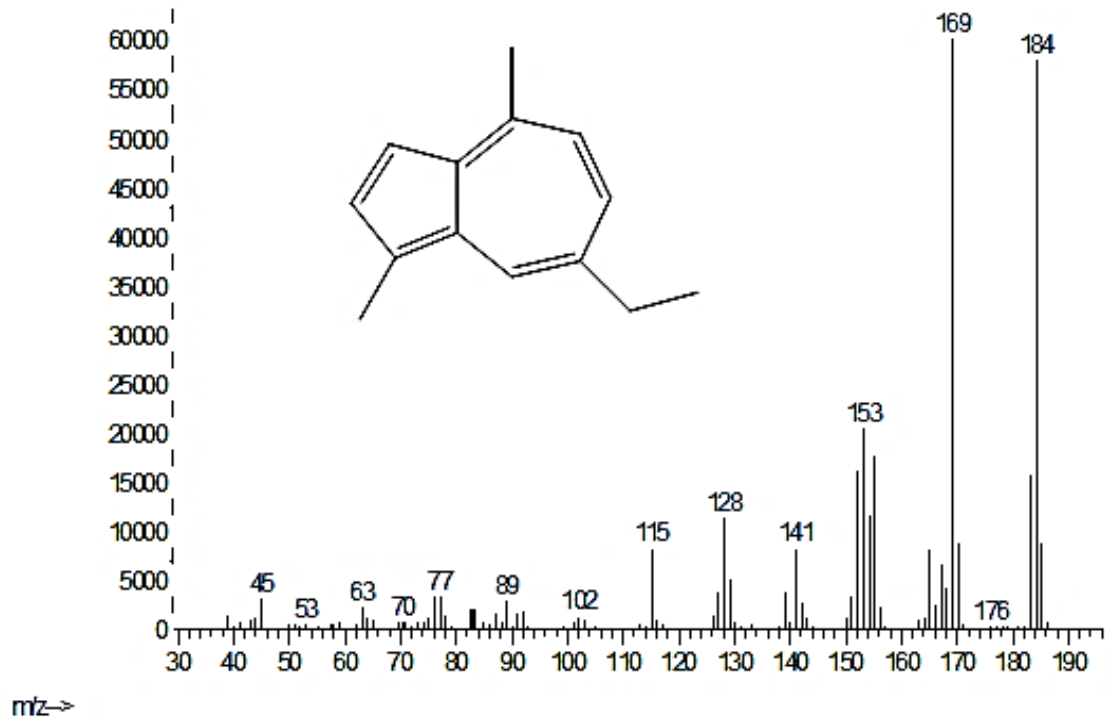
EK-3. α -Bisabolol oksit B'nin GC/MS Spektrumu



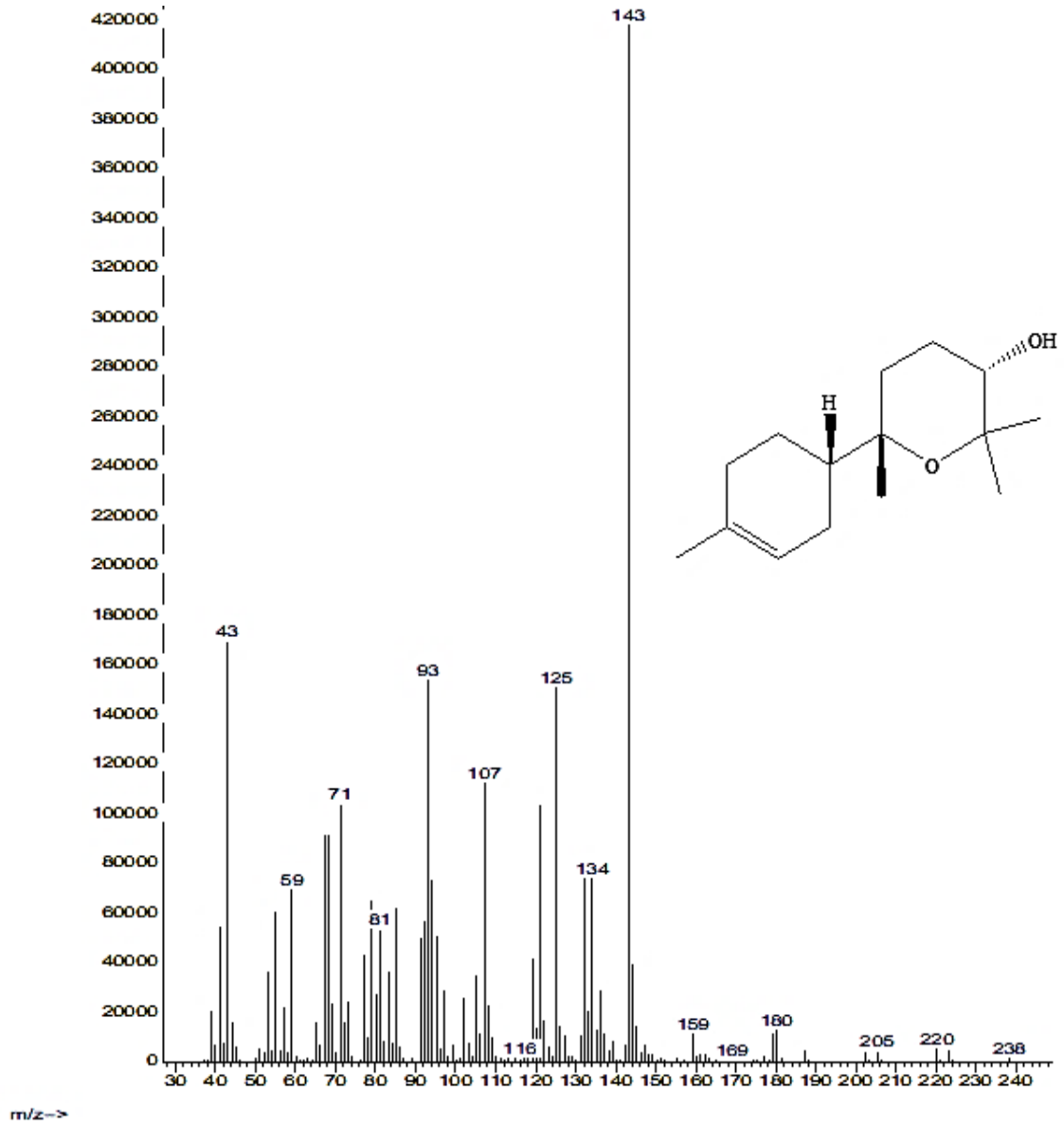
EK-4. α -Bisabolon oksit A'nın GC/MS Spektrumu



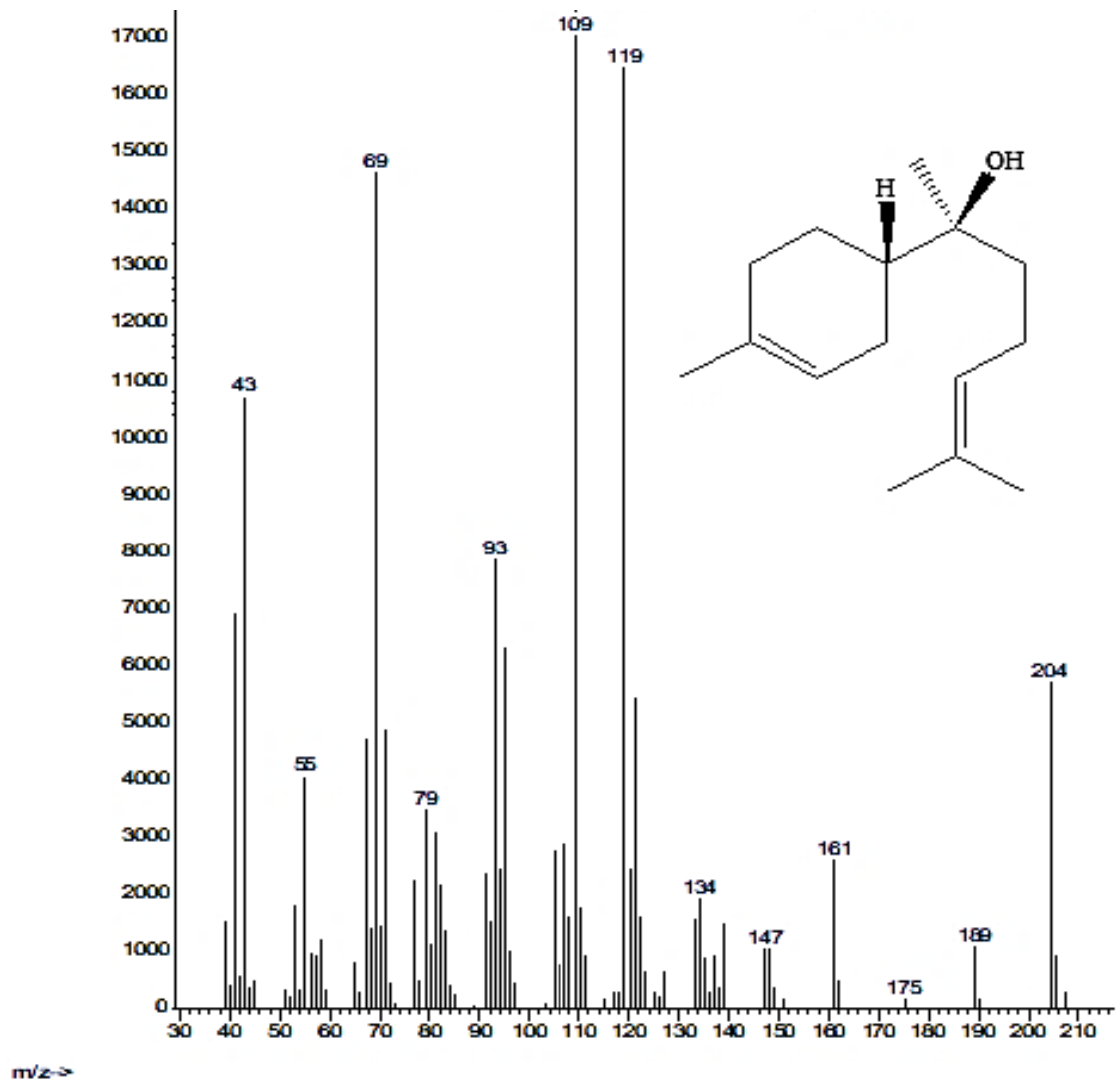
EK-5. Kamazulenin GC/MS Spektrumu



EK-6. α -Bisabolol oksit A'nin GC/MS Spektrumu



EK-7. α -Bisabololün GC/MS Spektrumu

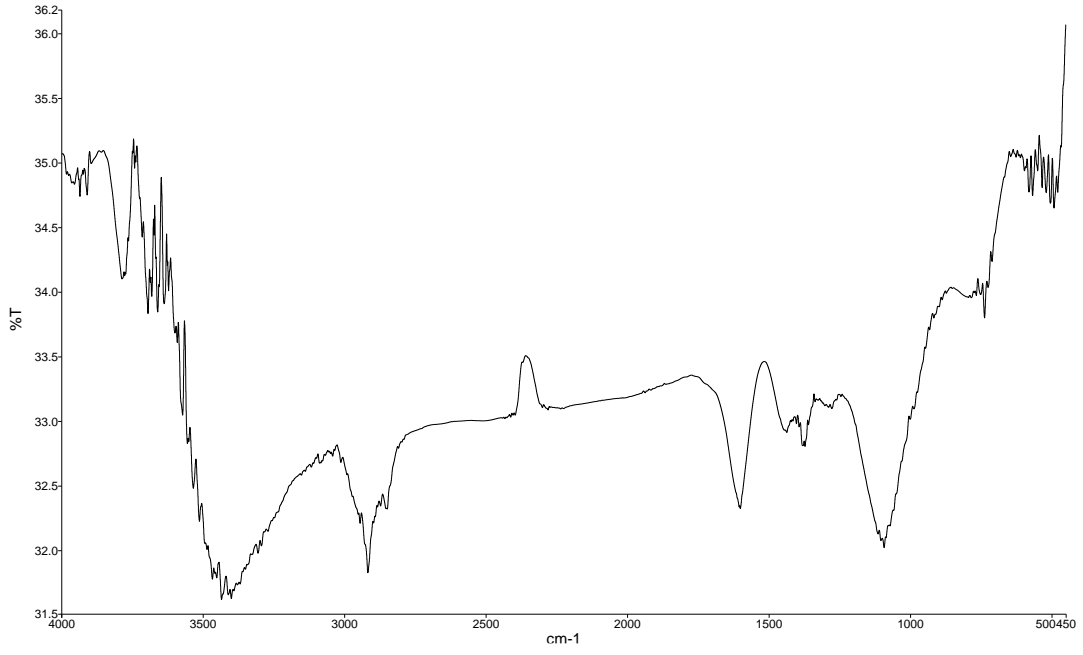


EK-8 Papatya Uçucu Yağındaki Diğer Bileşenler (Göger vd., 2018)

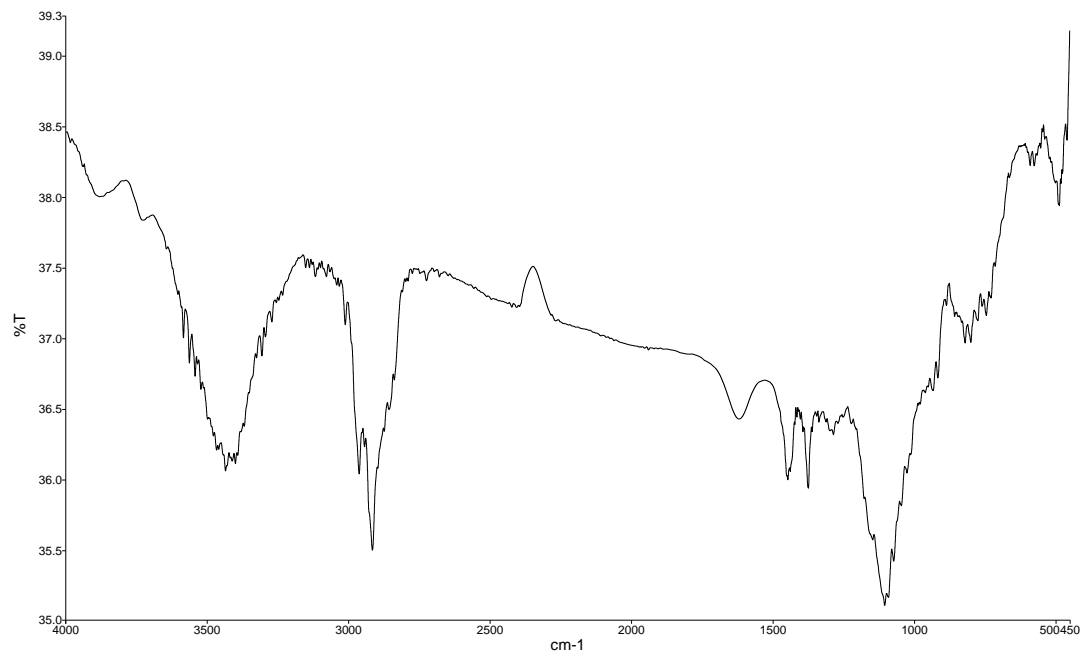
No	Uçucu bileşen	Relatif %	No	Uçucu bileşen	Relatif %
1	γ -Terpinen	0,1	11	α -Murolen	0,4
2	(<i>E</i>)- β -Osimen	0,3	12	Bisiklogermakren	1,2
3	Artemisia keton	0,3	13	(<i>E-E</i>)- α -Farnesen	0,9
4	β -Elemen	0,1	14	δ -Kadinen	0,3
5	Artemisia alkol	0,1	15	γ - Kadinen	0,2
6	β -Karyofillen	0,1	16	Dekanoik asit	0,5
7	Alloaromadendren	0,1	17	Pentakosan	1,0
8	γ -Murolen	0,2			
9	Leden	0,2			
10	Germakren D	1,9			

Relatif %: FID kromatogramlarından ayrılmış bileşiklerin hesaplanan göreceli yüzde miktarları

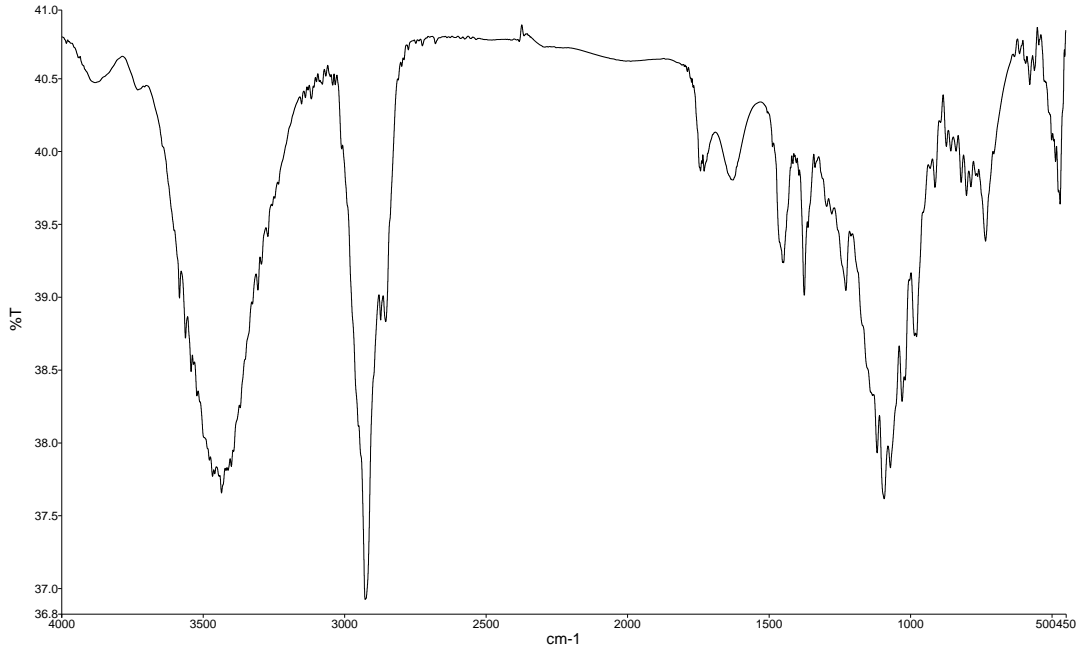
EK-9. Papatya Uçucu Yağının FT-IR Spektrumu



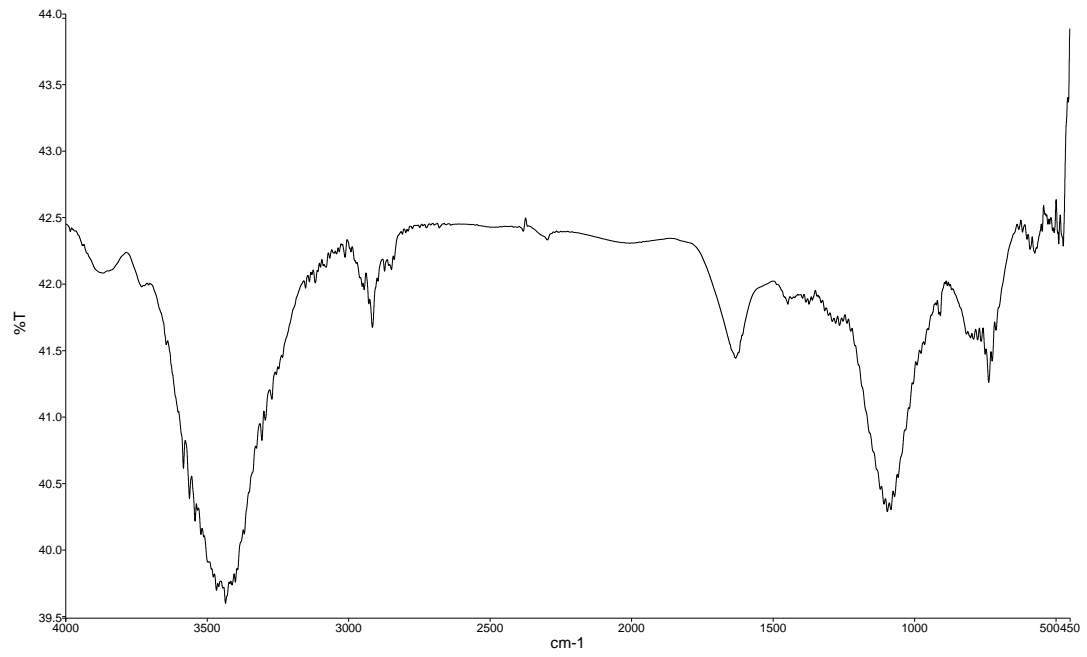
EK-10. α -Bisabololün FT-IR Spektrumu



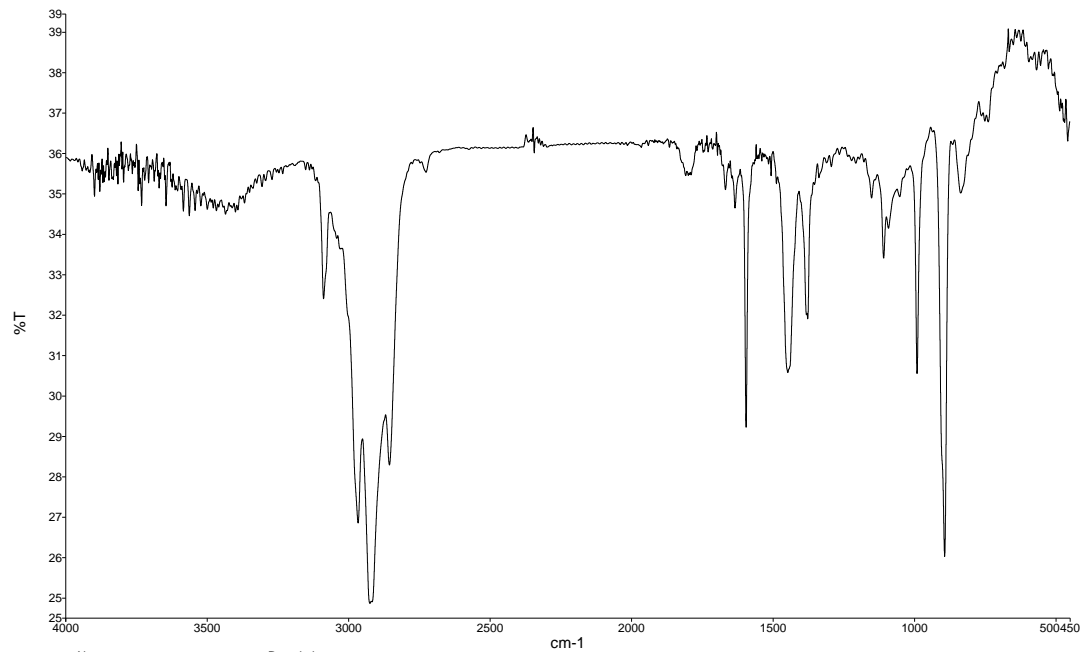
EK-11. α -Bisabolol oksit A'nin FT-IR Spektrumu



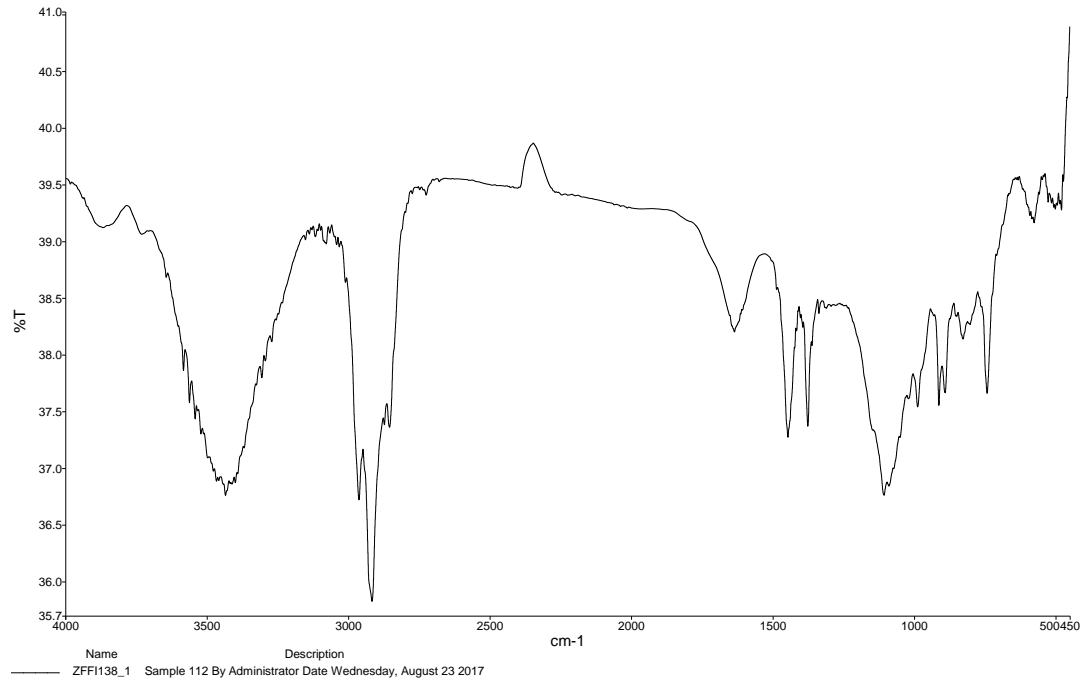
EK-12. Kamazulenin FT-IR Spektrumu



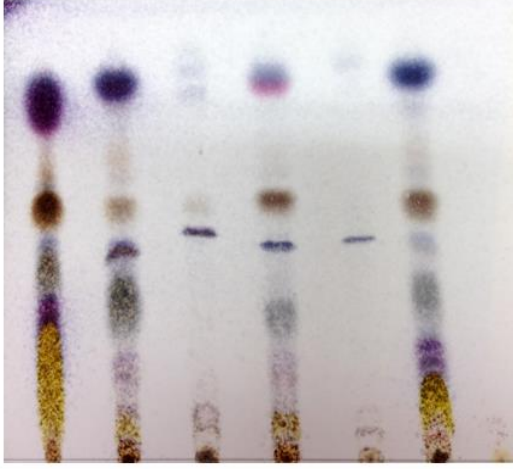
EK-13. (*E*)- β -Farnesenin FT-IR Spektrumu



EK-14. Farenzen İzomerlerinin FT-IR Spektrumu

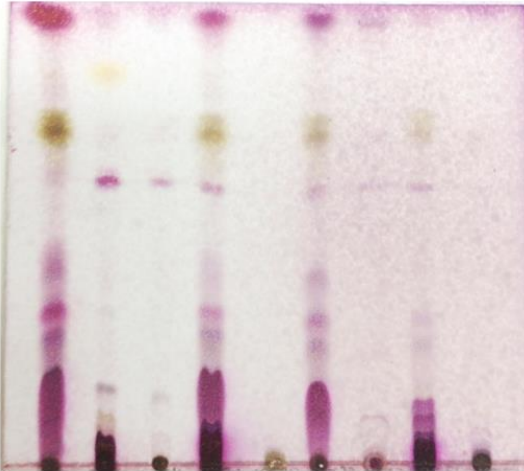


EK-15. Papatya Uçucu Yağı ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



P PF10 KF10 PF24 KF24 PB29 KB29

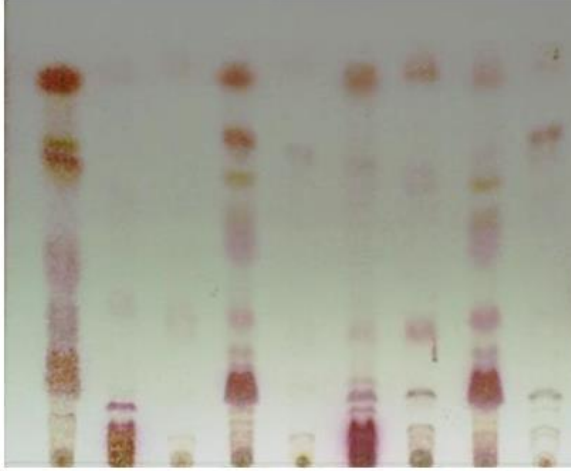
[Papatya uçucu yağı (**P**) ve onun *A. niger* NRRL 326 (**PF10**), *F. culmorum* (**PF24**), *B. velezensis* (**PB29**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF10**, **KF24**, **KB29** kontrol grupları; çözücü sistemi: diklorometan; reaktif: vanilin-sülfürik asit]



P PF11 KF11 PF20 KF20 PF27 KF27 PF54 KF54

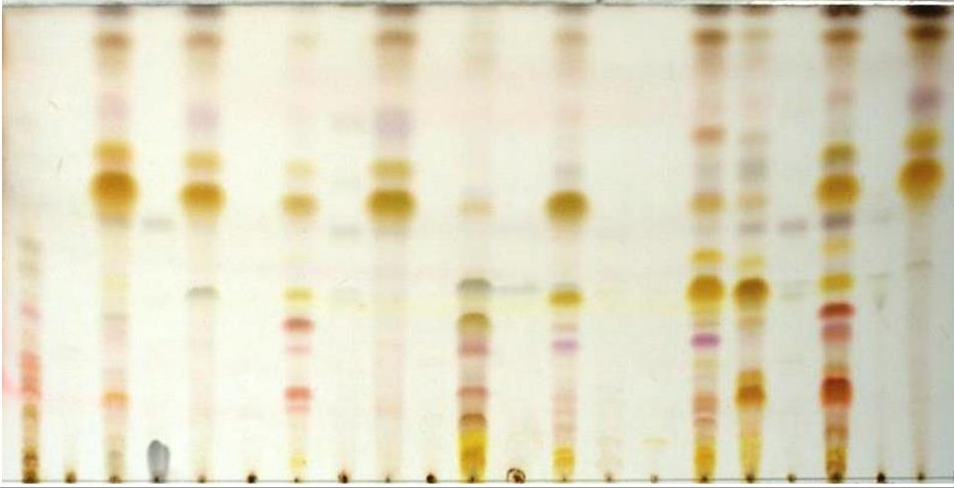
[Papatya uçucu yağı (**P**) ve onun *A. niger* ATCC 10549 (**PF11**), *P. adametzii* (**PF20**), *S. cerevisiae* (**PF27**), *B. cinerea* (**PF54**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF11**, **KF20**, **KF27**, **KF54** kontrol grupları; çözücü sistemi: diklorometan; reaktif: anisaldehyt-sülfürik asit]

EK-15. (Devam) Papatya Uçucu Yağı ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



P PF12 KF12 PF15 KF15 PF39 KF39 PF75 KF75

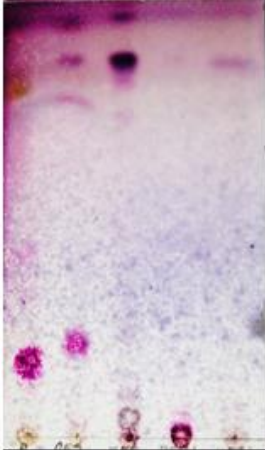
[Papatya uçucu yağı (**P**) ve onun *A. alliaceus* (**PF12**), *A. flavus* (**PF15**), *R. stolonifer* (**PF39**), *F. solani* (**PF75**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF12**, **KF15**, **KF39**, **KF75** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]



PF11 KF11 PF21 KF21 PF34 KF34 PF36 KF36 PF37 KF37 PF46 KF46 PF66 KF66 KF88 PF88 PF91 KF91 PF92 KF92 P

[Papatya uçucu yağı (**P**) ve onun *A. niger* ATCC 10549 (**PF11**), *P. chrysogenum* (**PF21**), *T. elegans* (**PF34**), *M. ramannianus* (**PF36**), *T. harzianum* (**PF37**), *C. cassicola* (**PF46**), *P. multicolor* (**PF66**), *P. neocrassum* (**PF88**), *P. primulinum* (**PF91**), *P. valentinum* (**PF92**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF11**, **KF21**, **KF34**, **KF36**, **KF37**, **KF46**, **KF66**, **KF88**, **KF91**, **KF92** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 90:10; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

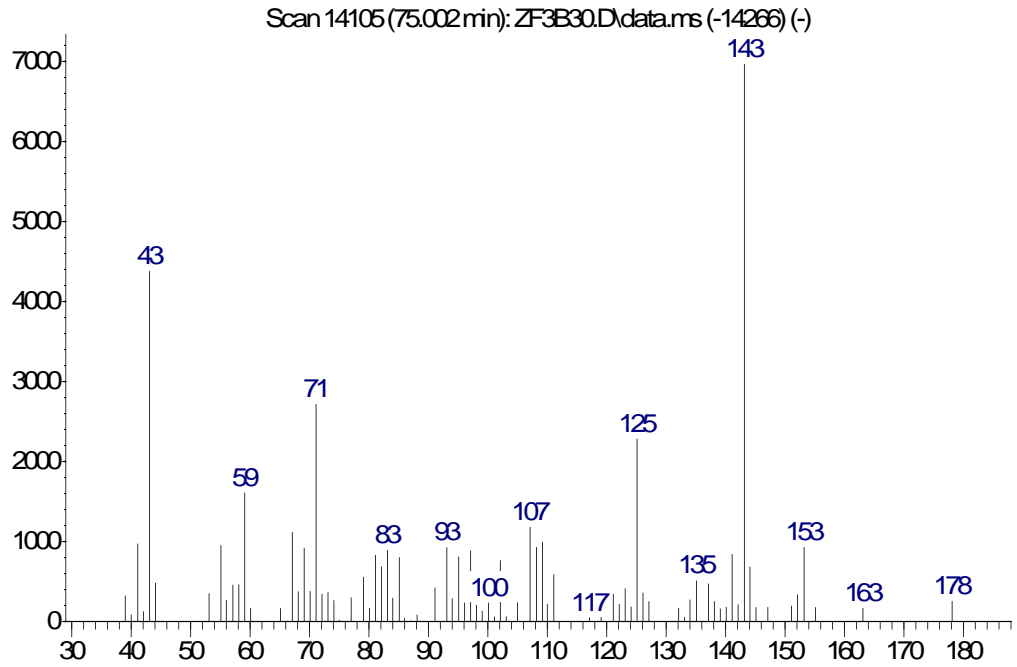
EK-15. (Devam) Papatya Uçucu Yağı ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



[Papatya uçucu yağı (**P**) ve onun *A. parasiticus* (**PF9**) ve *C. elegans* (**PF74**) biyotransformasyon ekstraları; **KF9**, **KF74** kontrol grupları; çözücü sistemi: diklorometan; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

EK-16. A1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

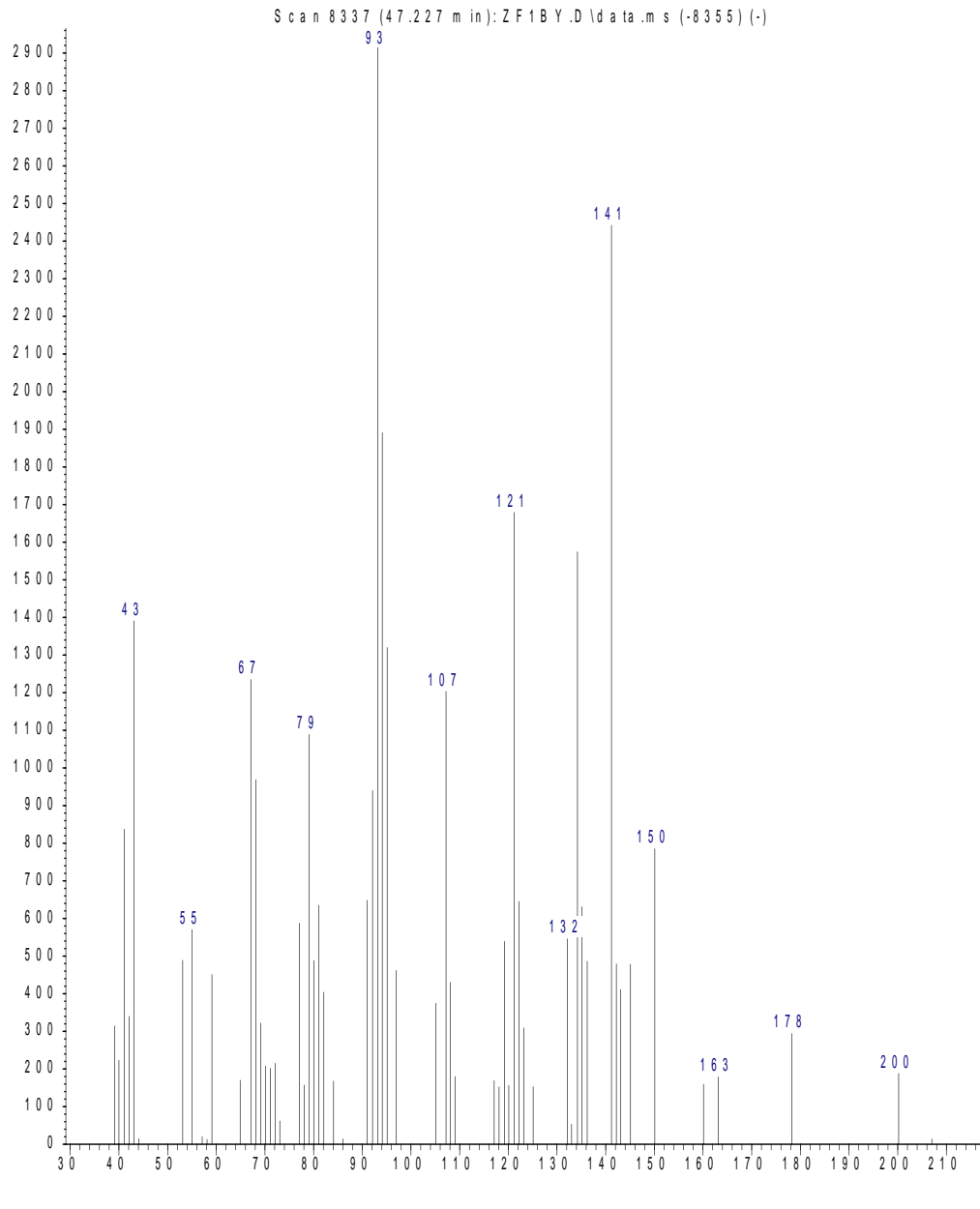
Abundance



m/z->

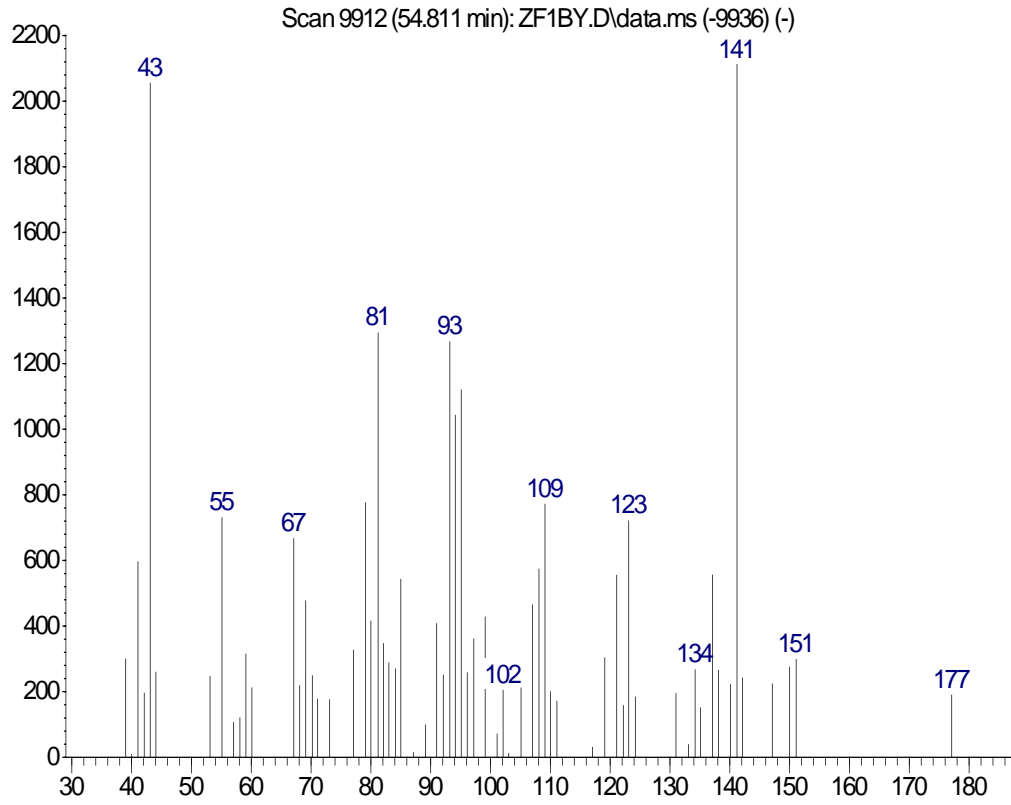
EK-17. B1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-18. B2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

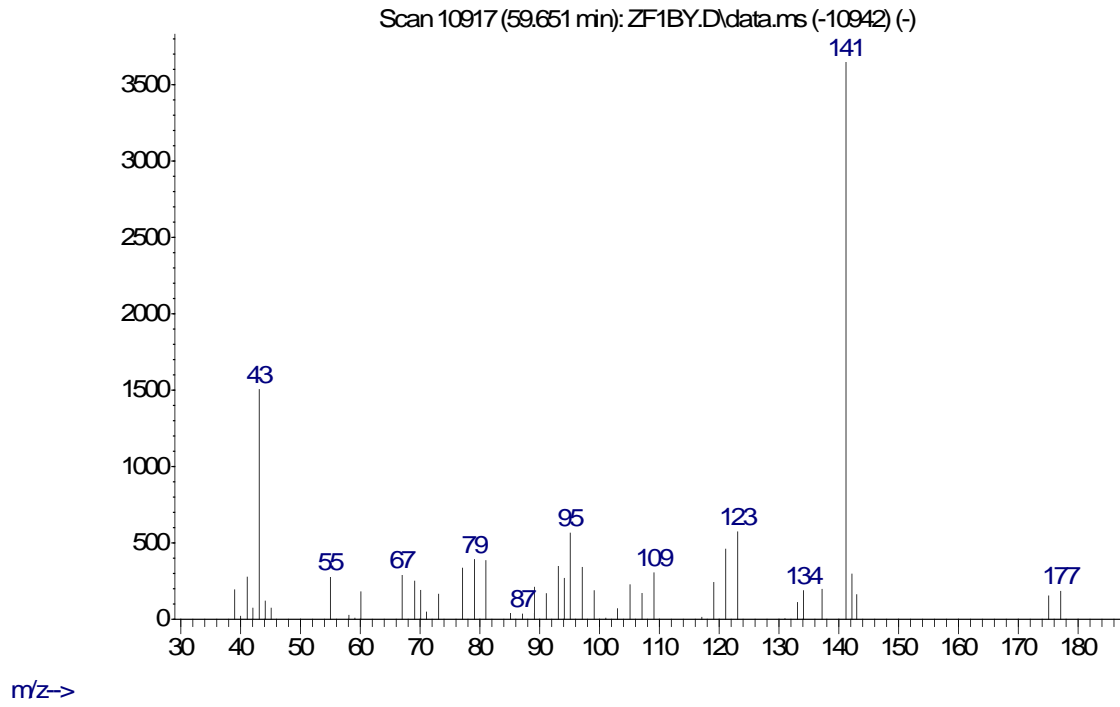
Abundance



m/z-->

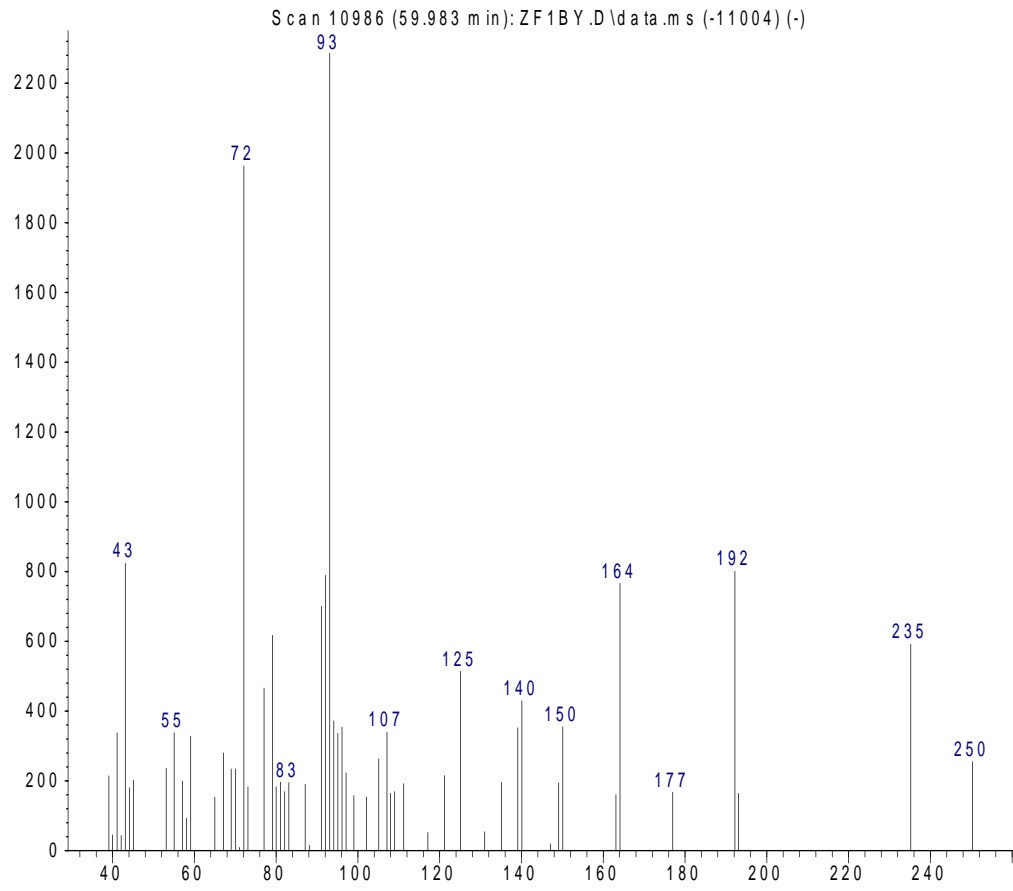
EK-19. B3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-20. B4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

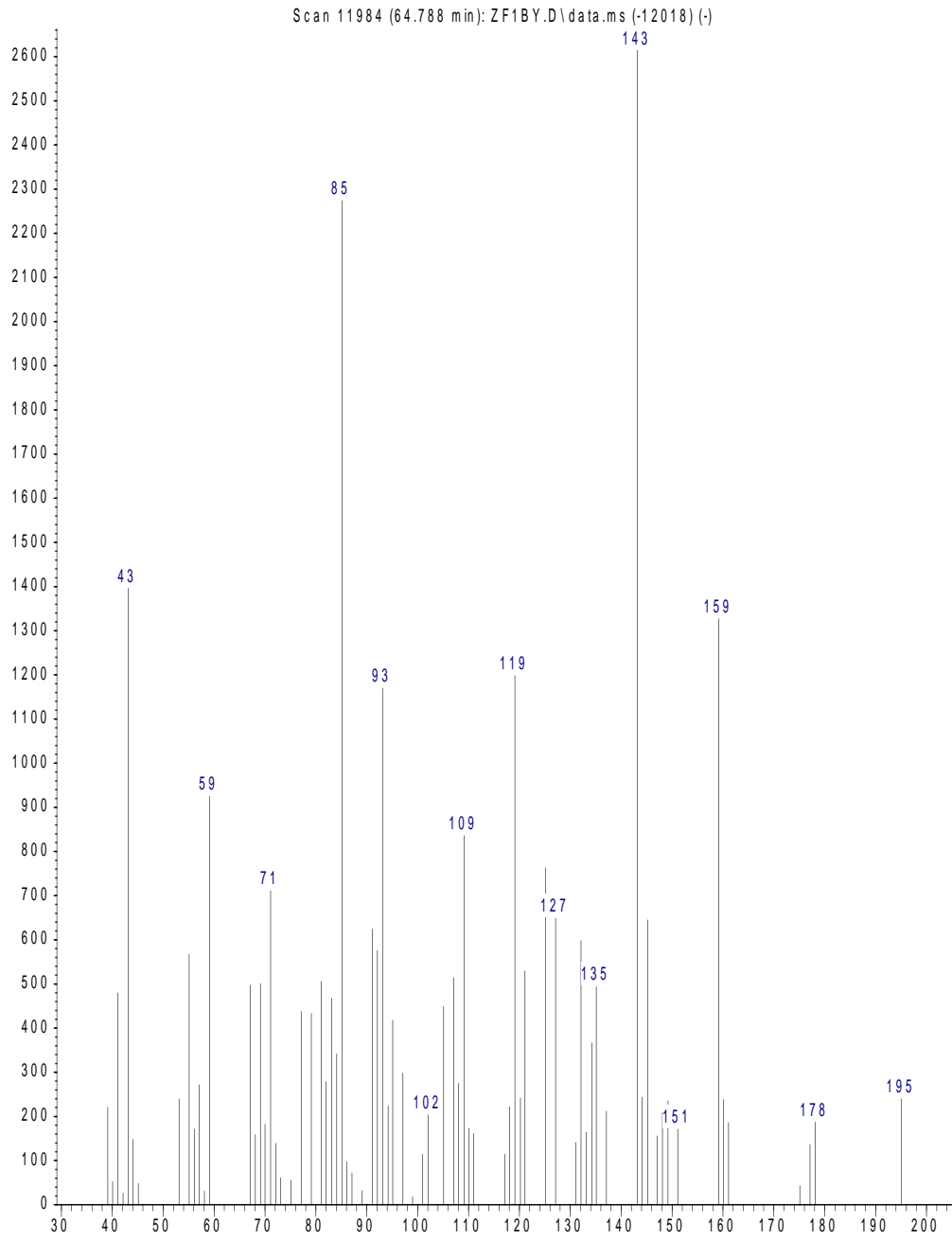
Abundance



m/z-->

EK-21. B5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

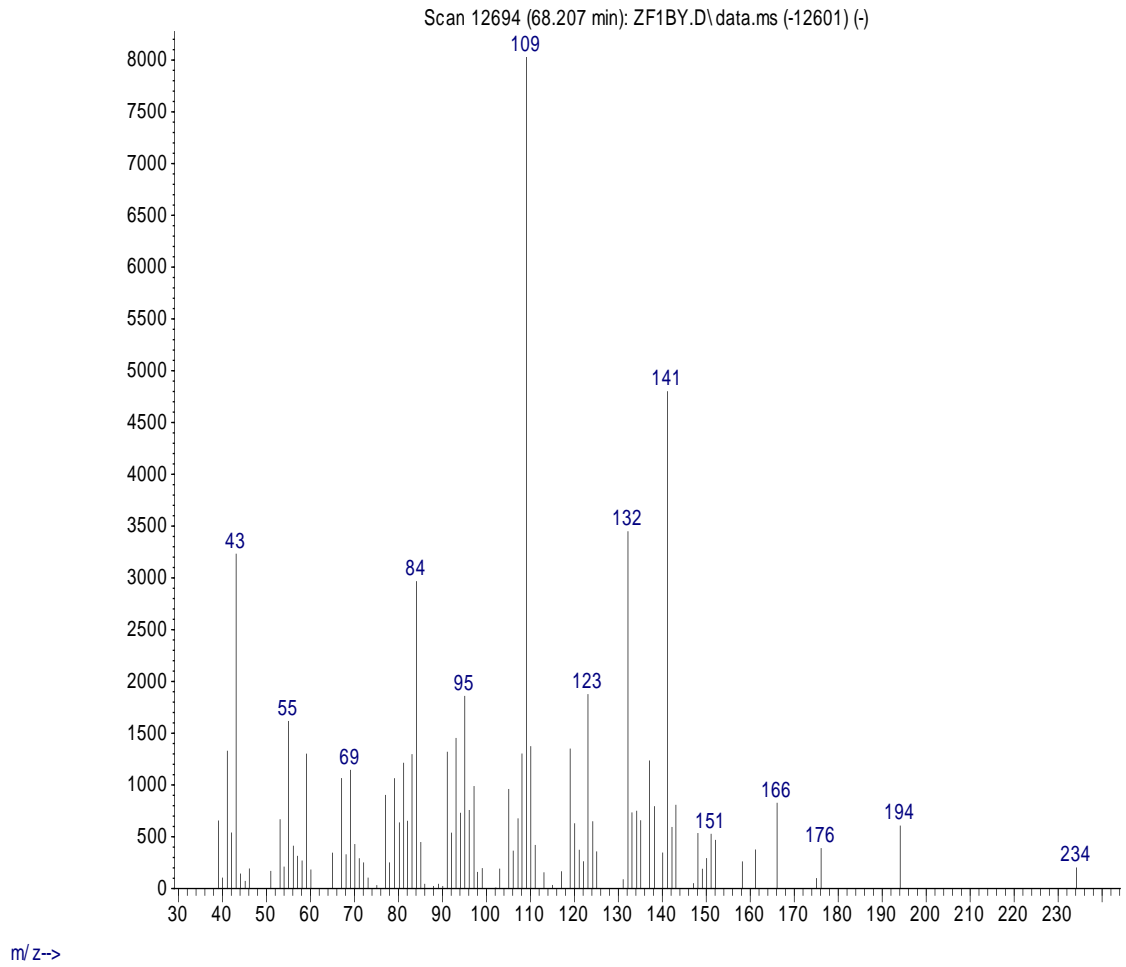
Abundance



m/z-->

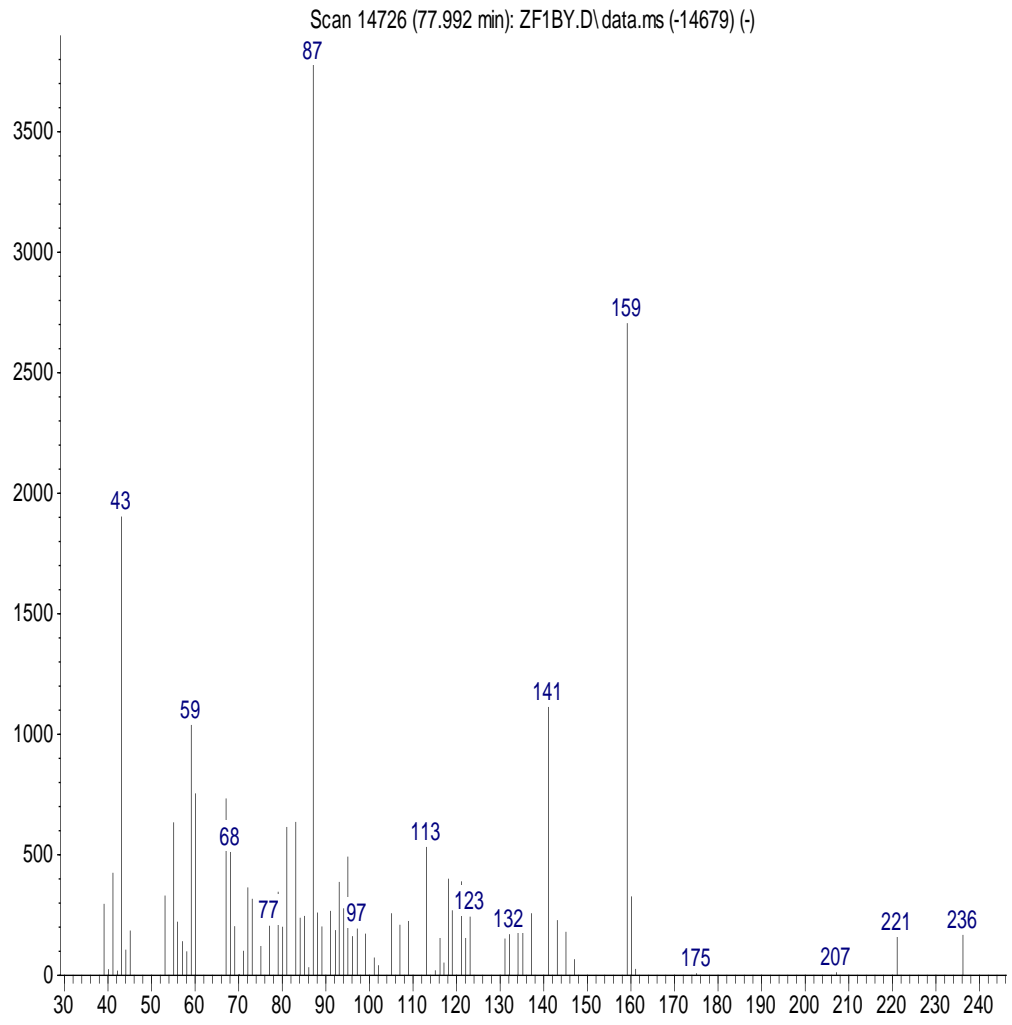
EK-22. B6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-23. B7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

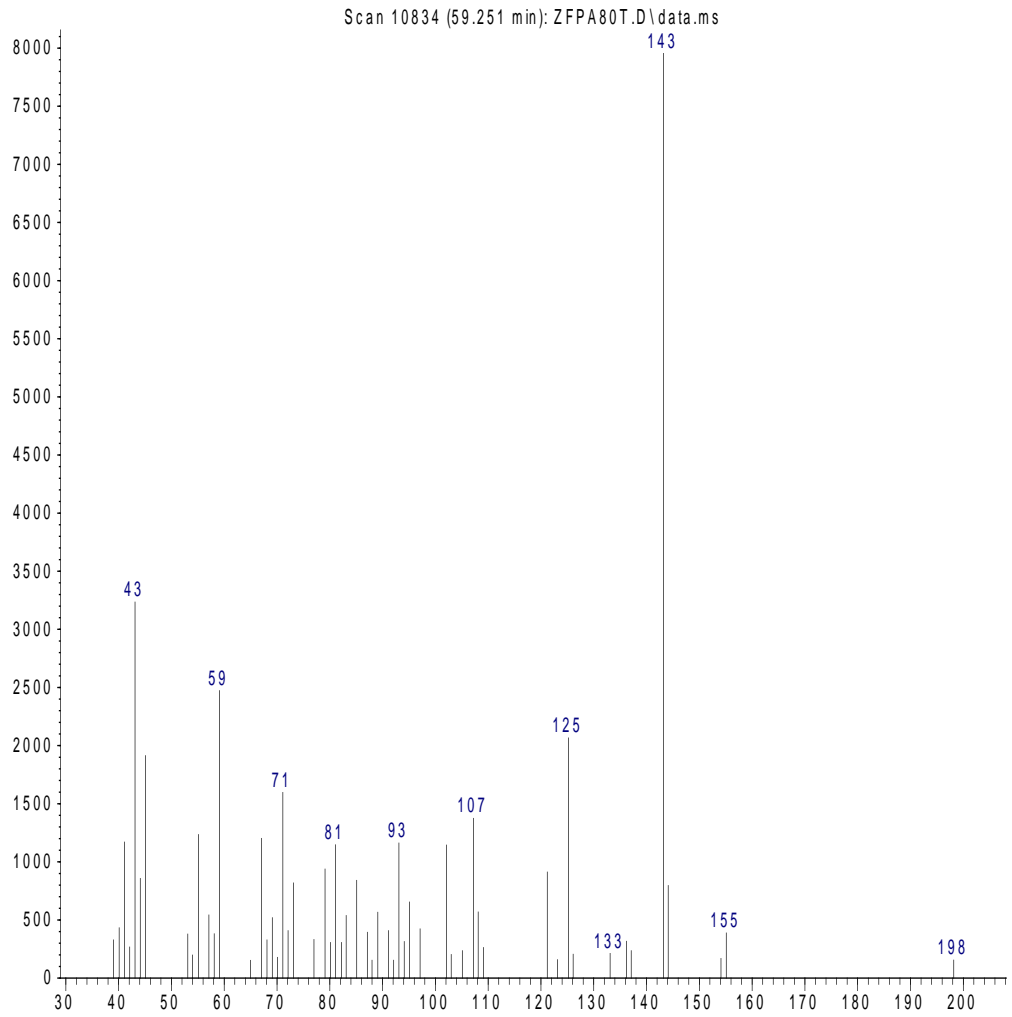
Abundance



m/z-->

EK-24. C1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

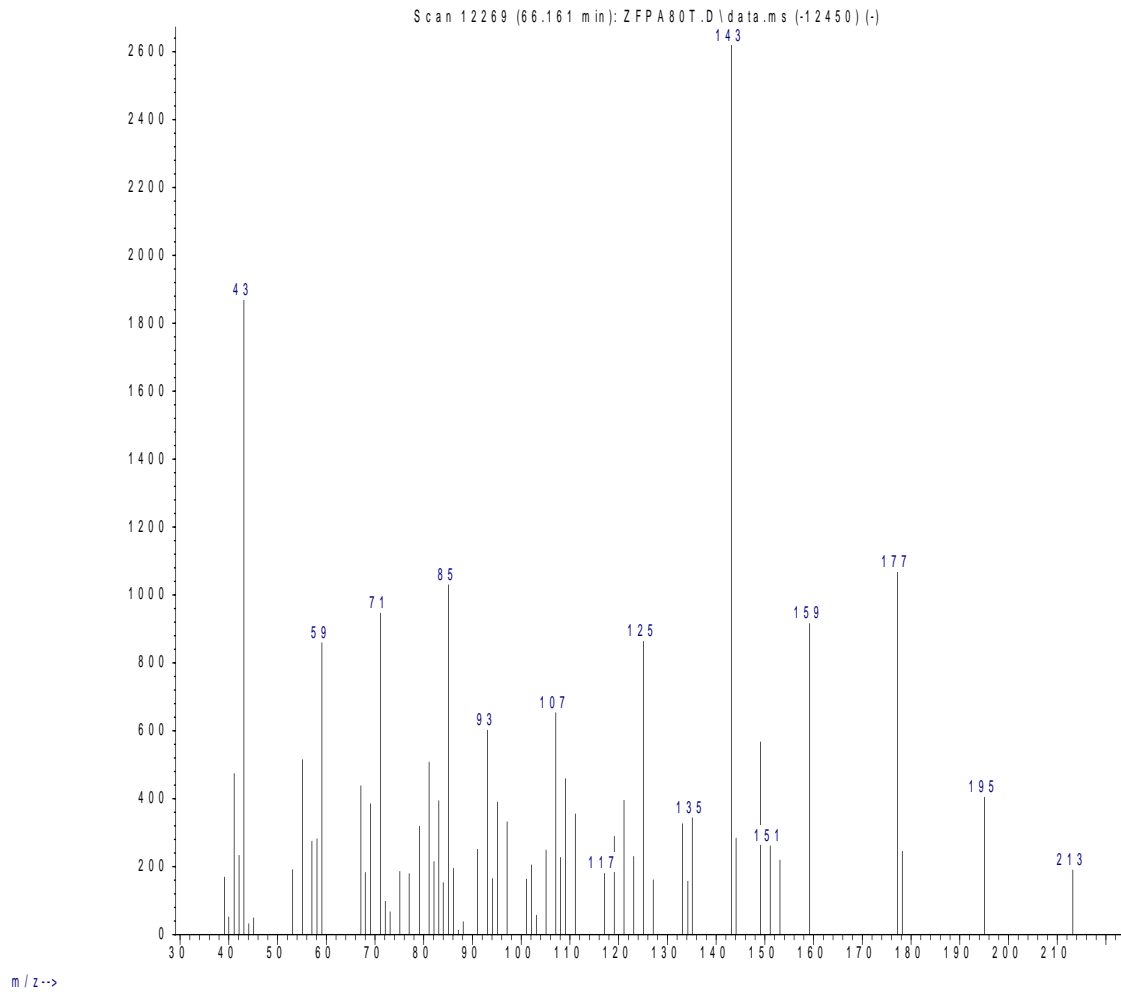
Abundance



m/z-->

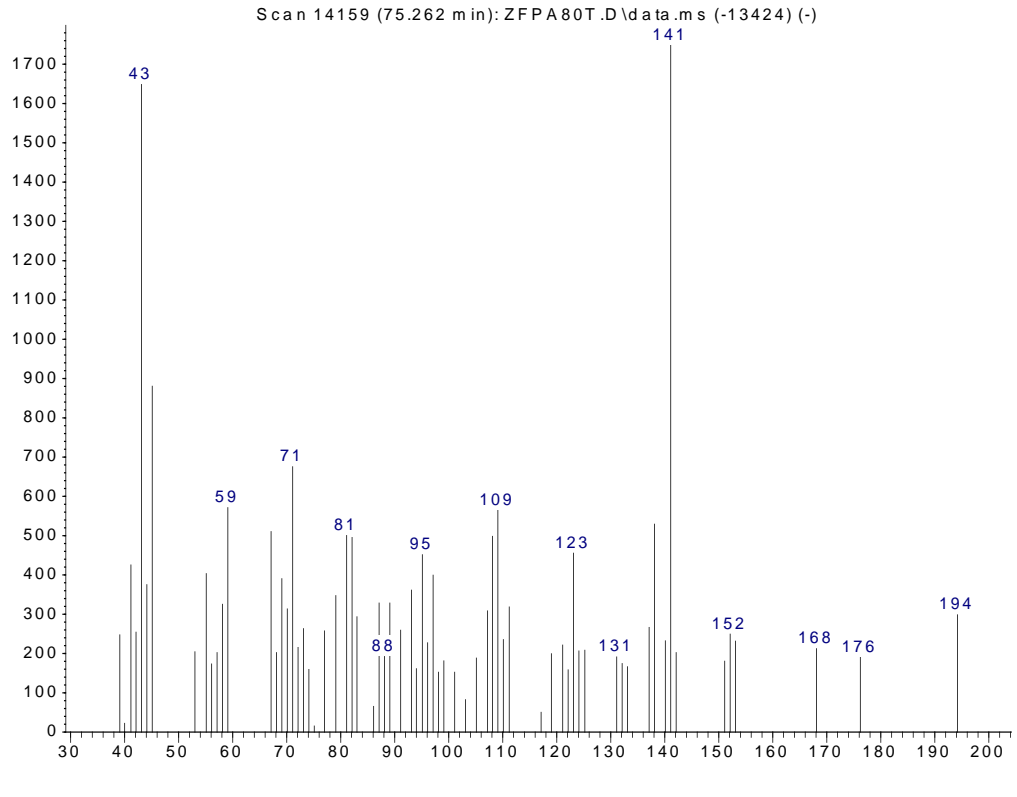
EK-25. C2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



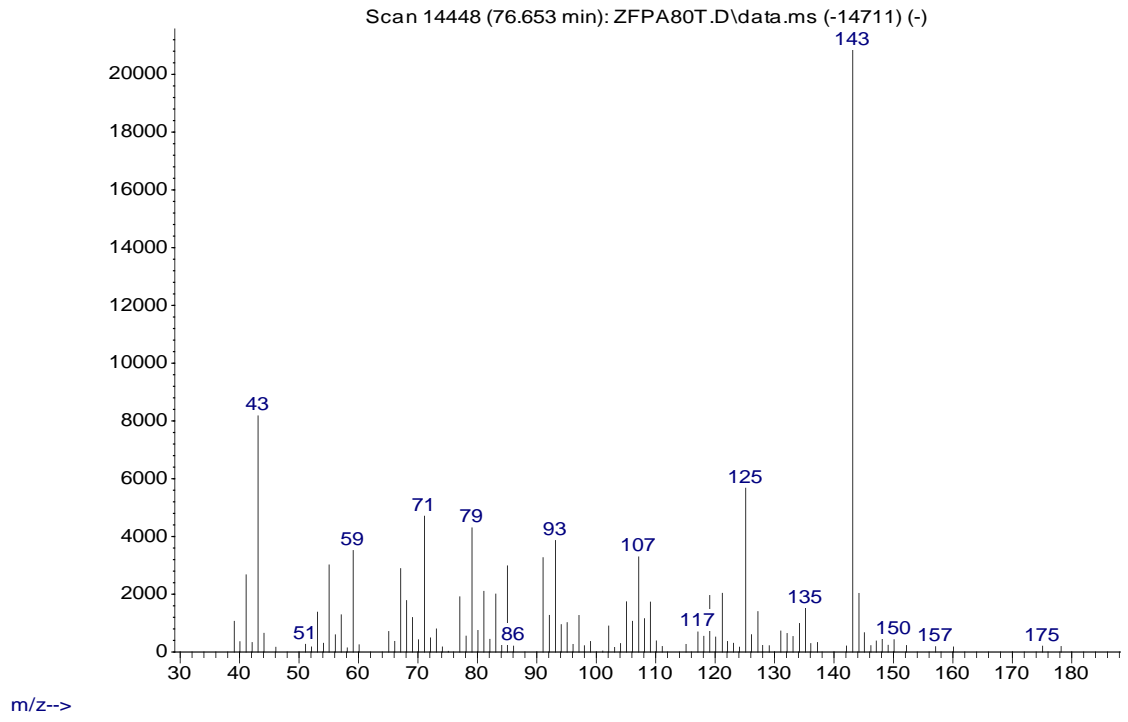
EK-26. C3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



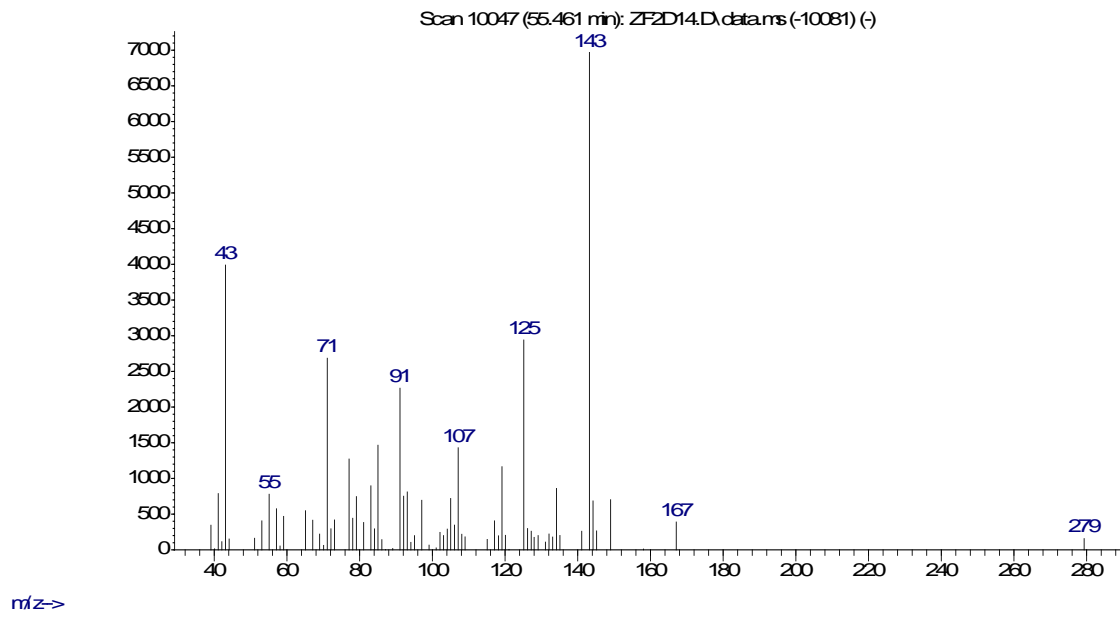
EK-27. C4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



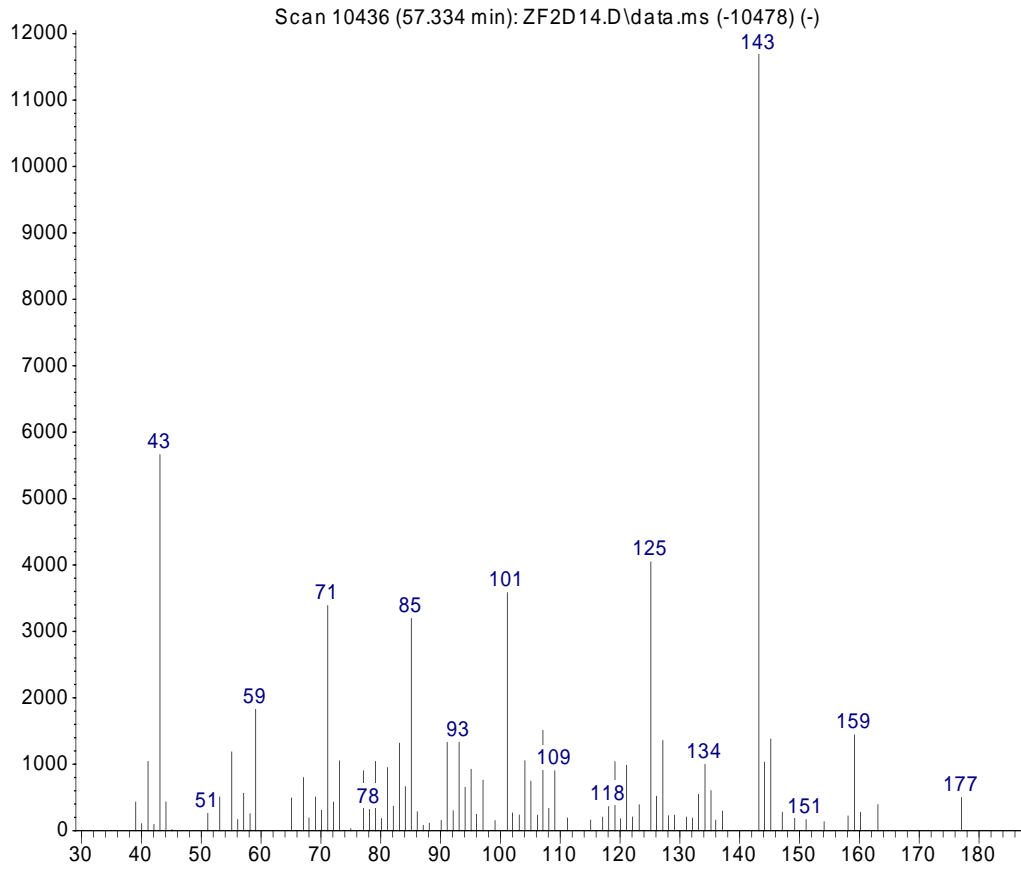
EK-28. D1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-29. D2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

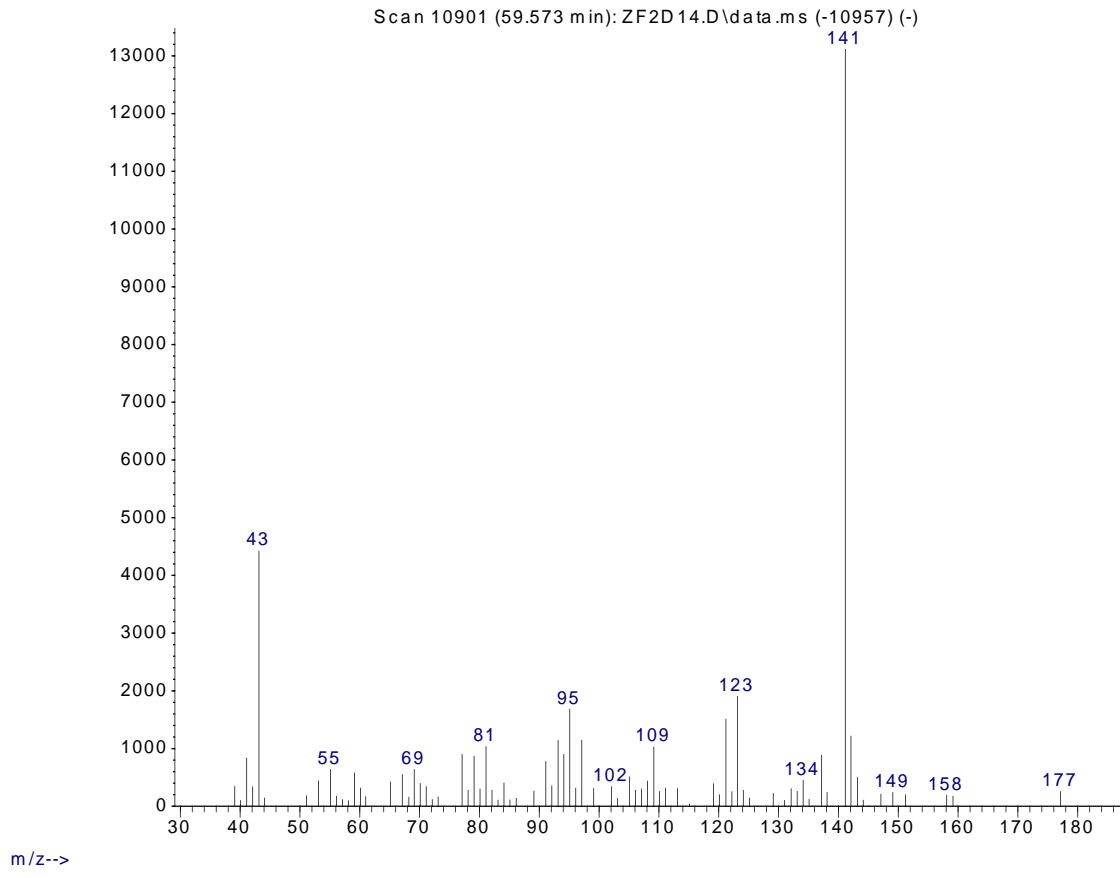
Abundance



m/z-->

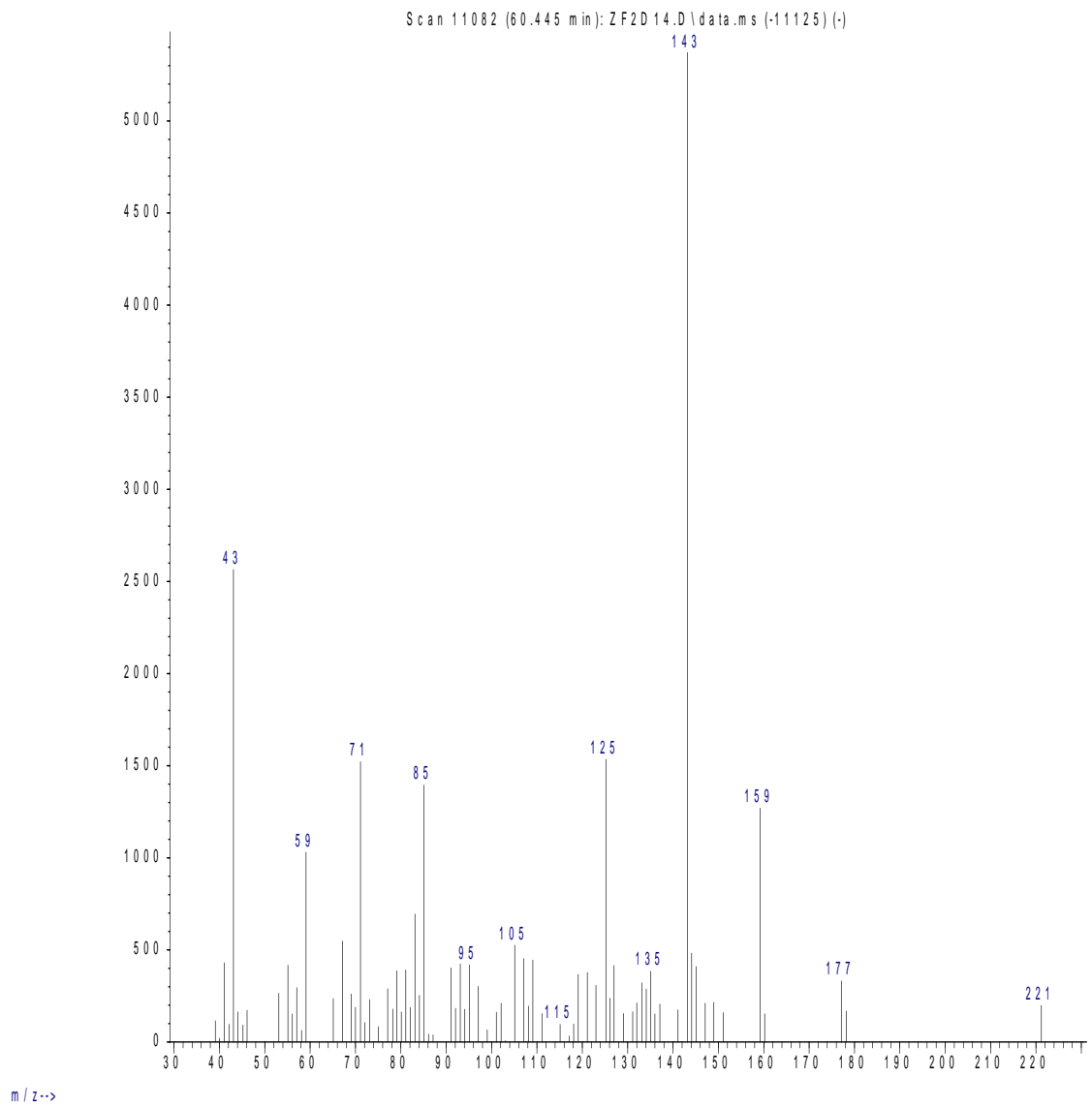
EK-30. D3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



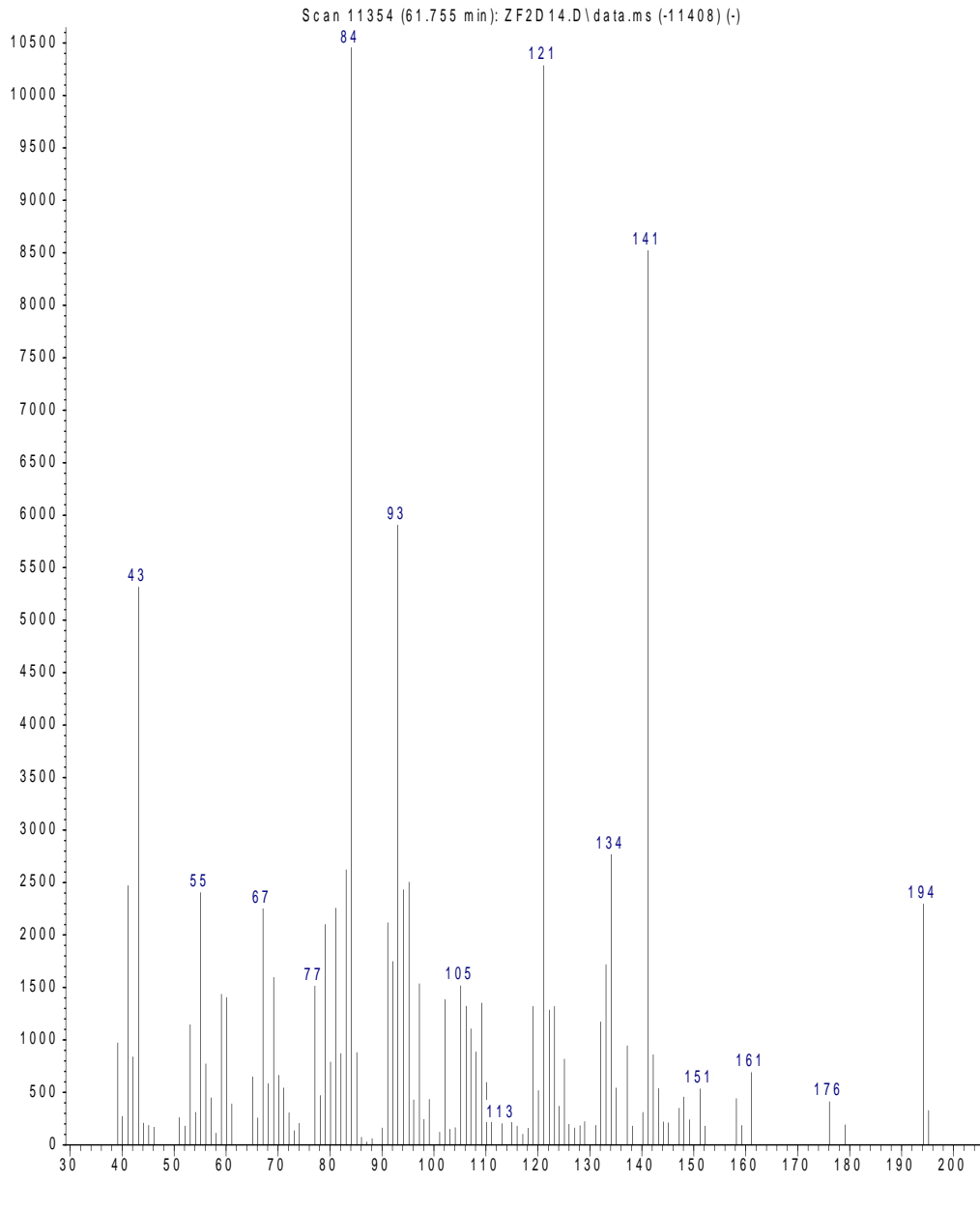
EK-31. D4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



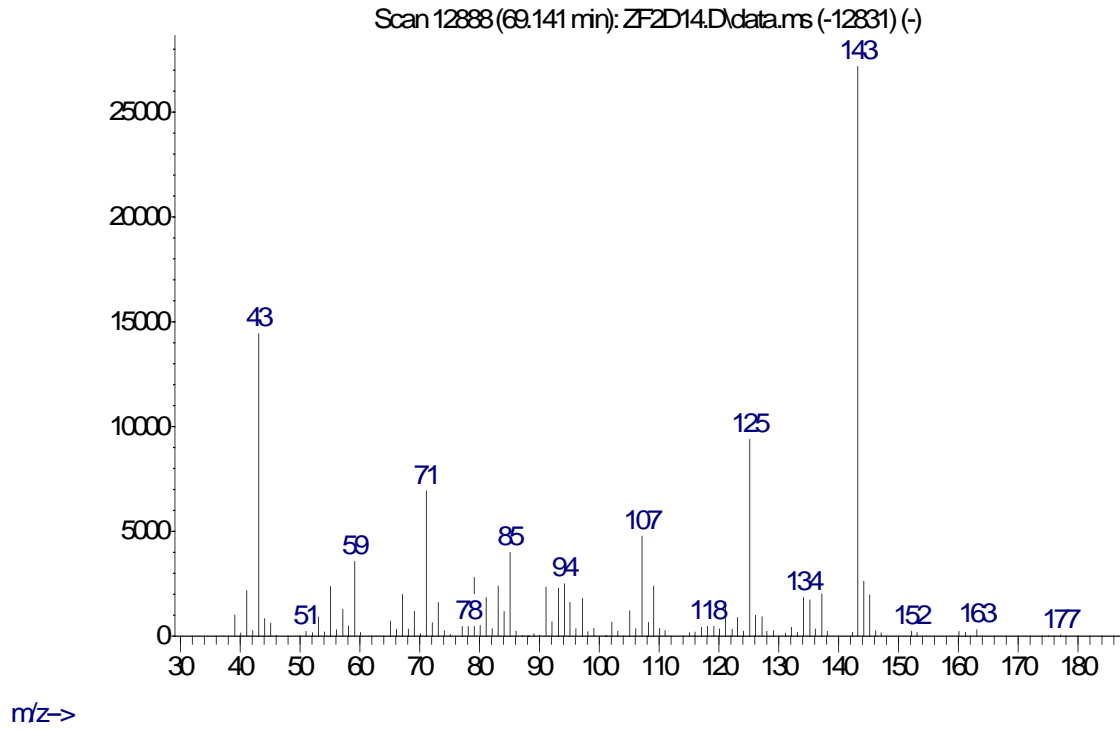
EK-32. D5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



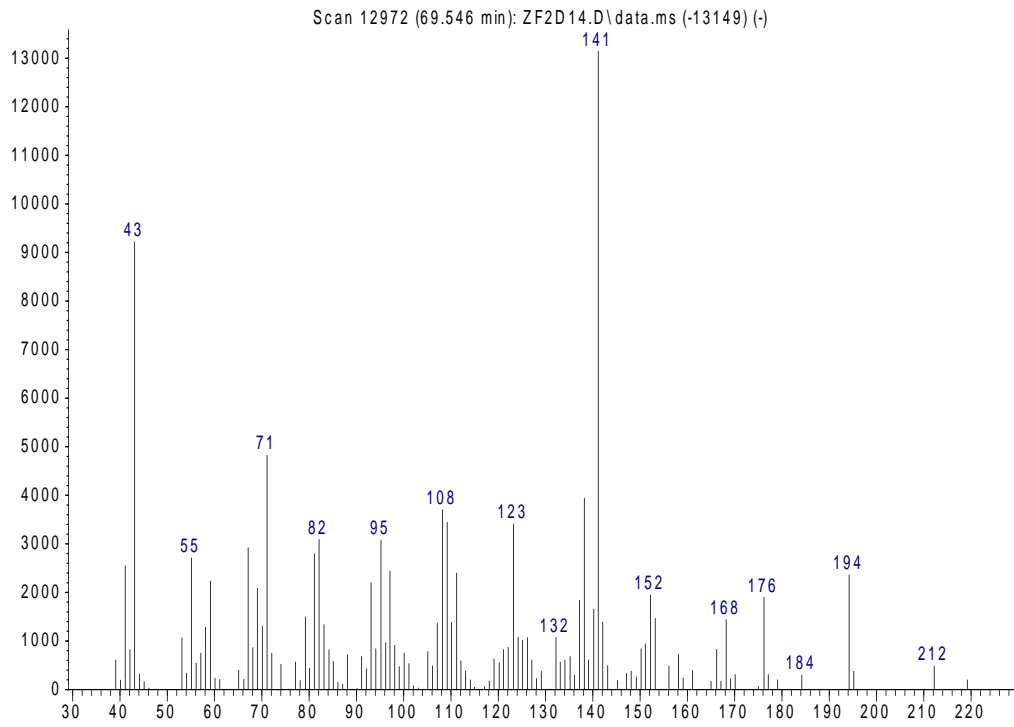
EK-33. D6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-34. D7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

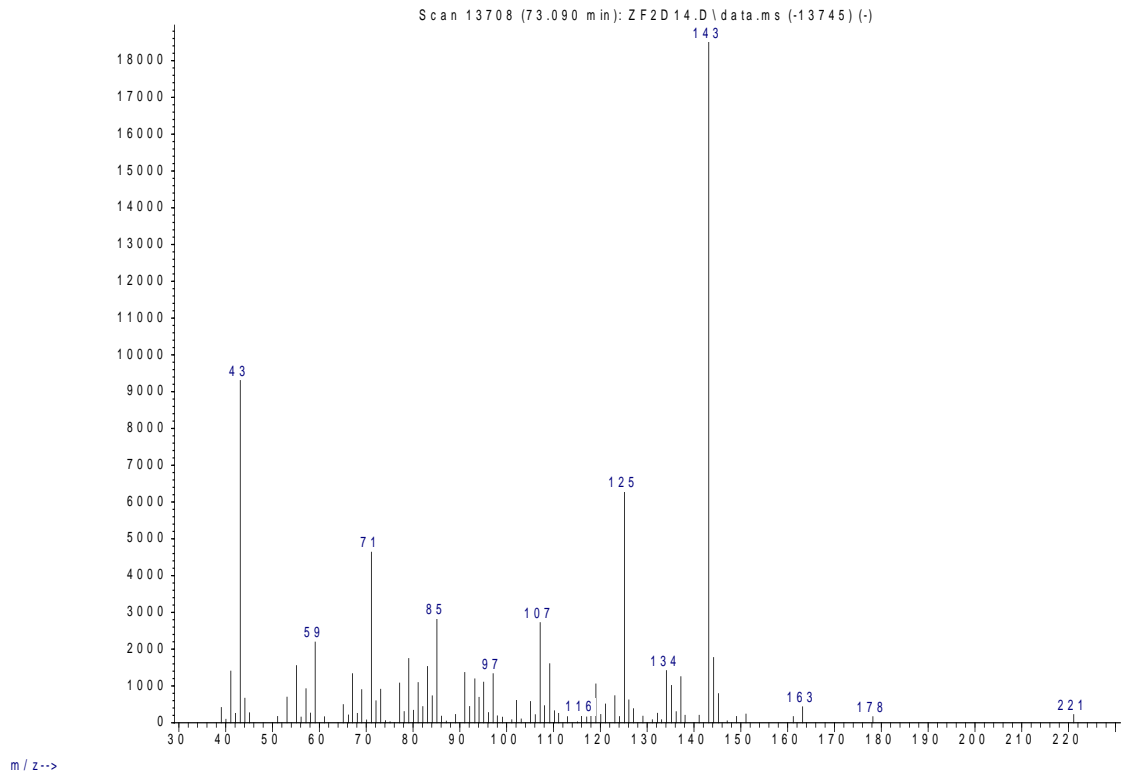
Abundance



m/z-->

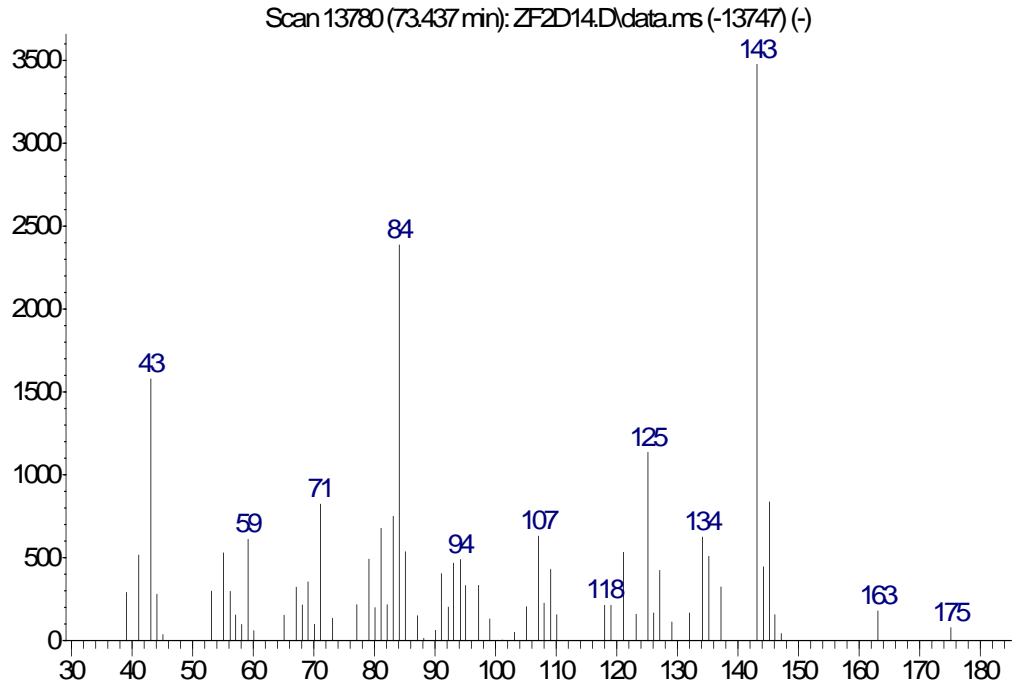
EK-35. D8 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-36. D9 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

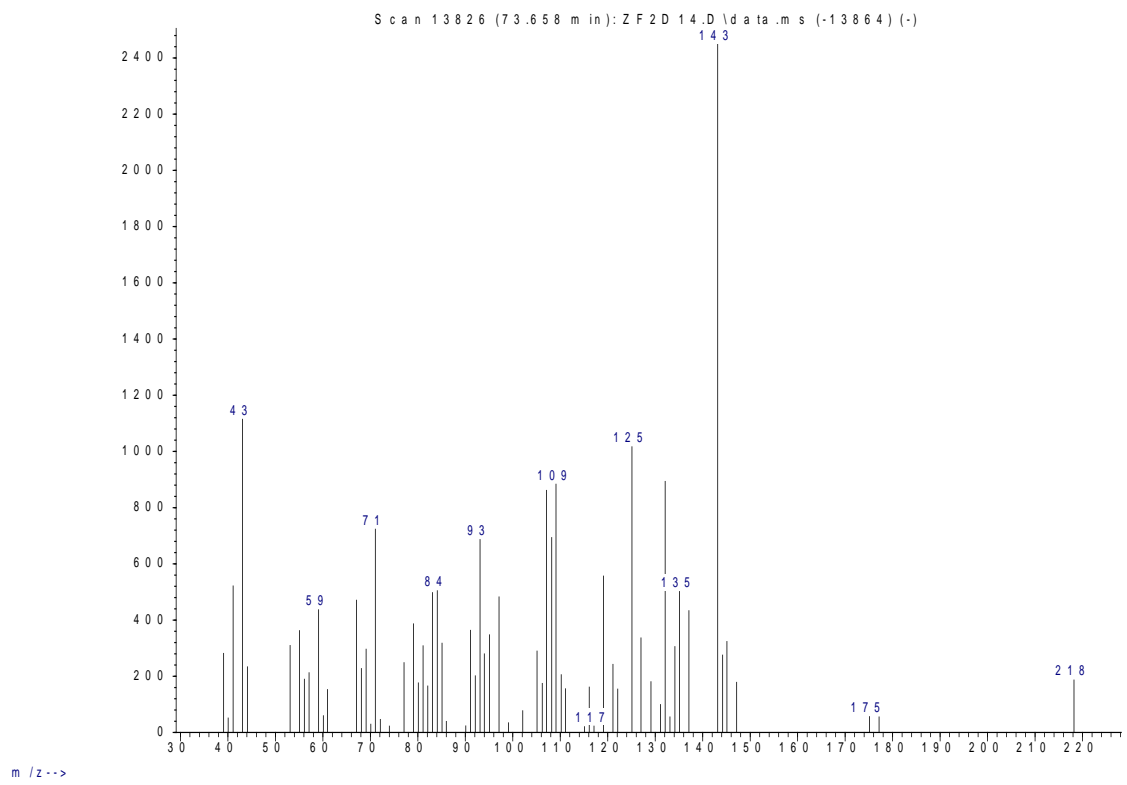
Abundance



m/z->

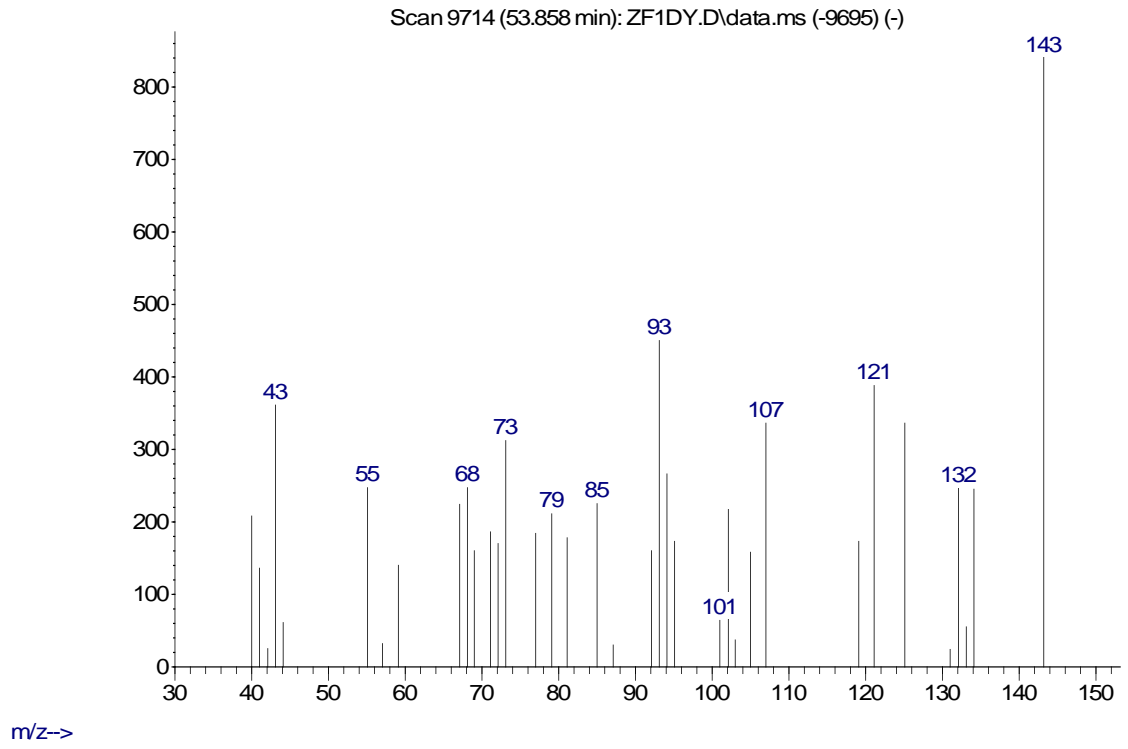
EK-37. D10 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



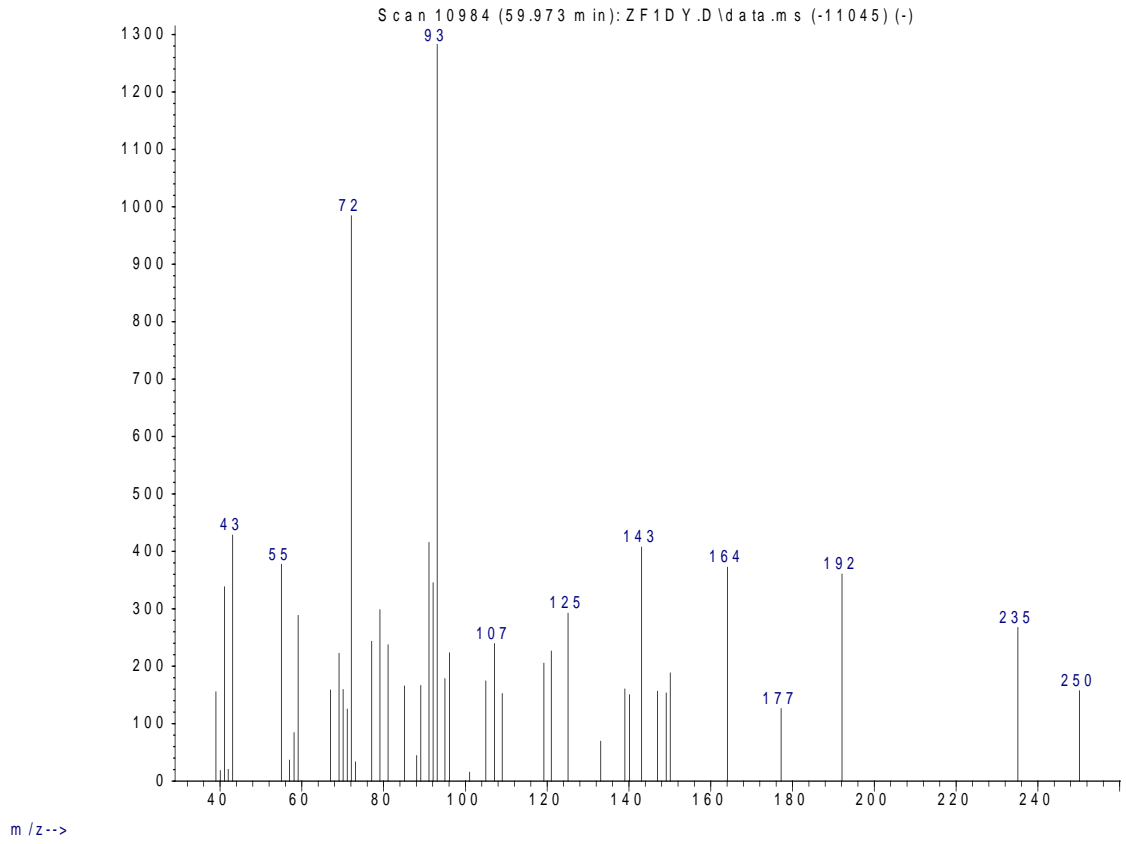
EK-38. E1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



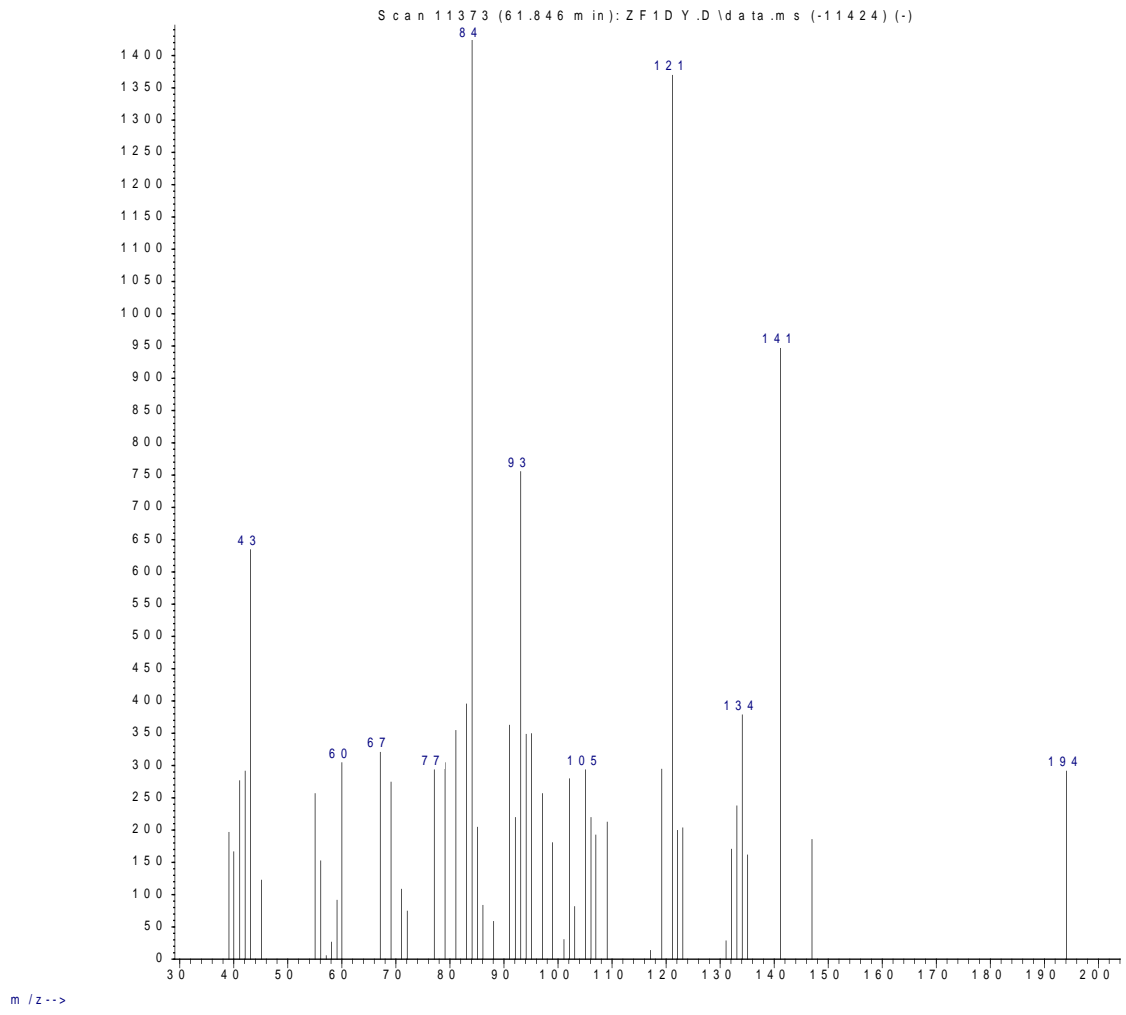
EK-39. E2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



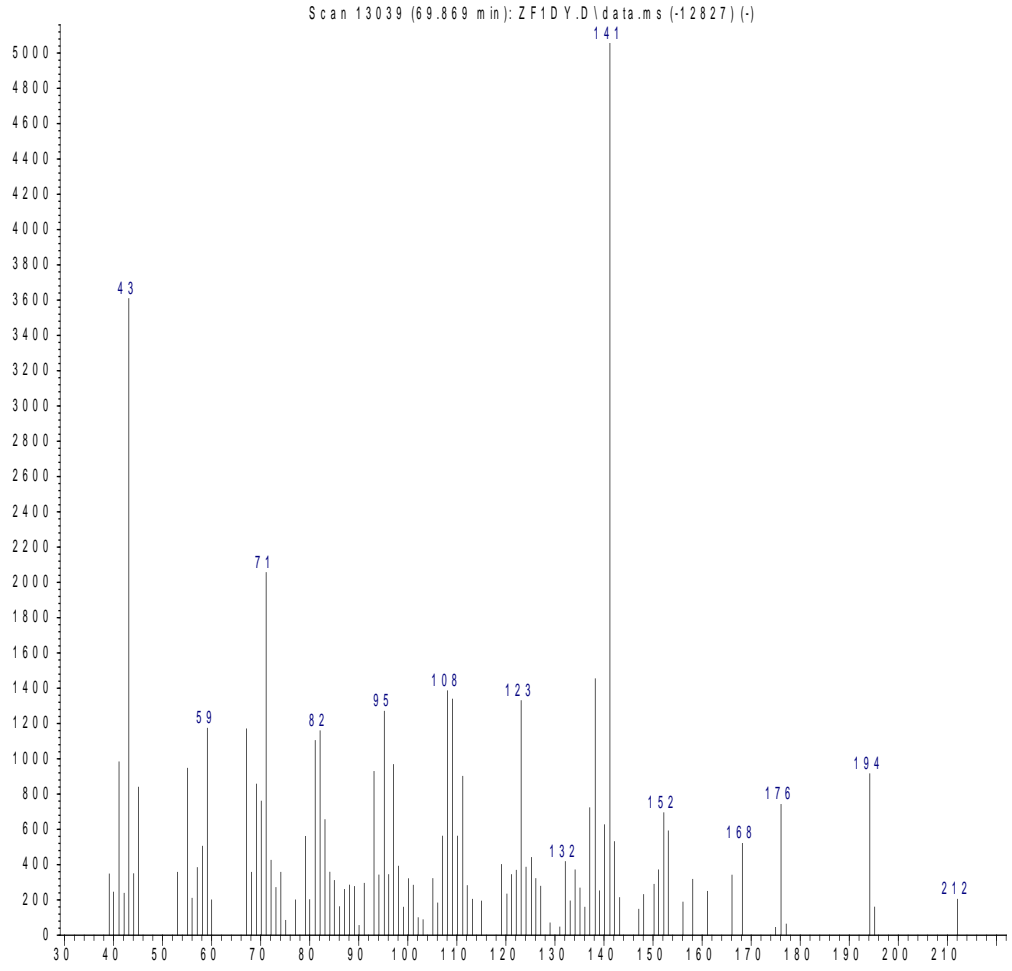
EK-40. E3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-41. E4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

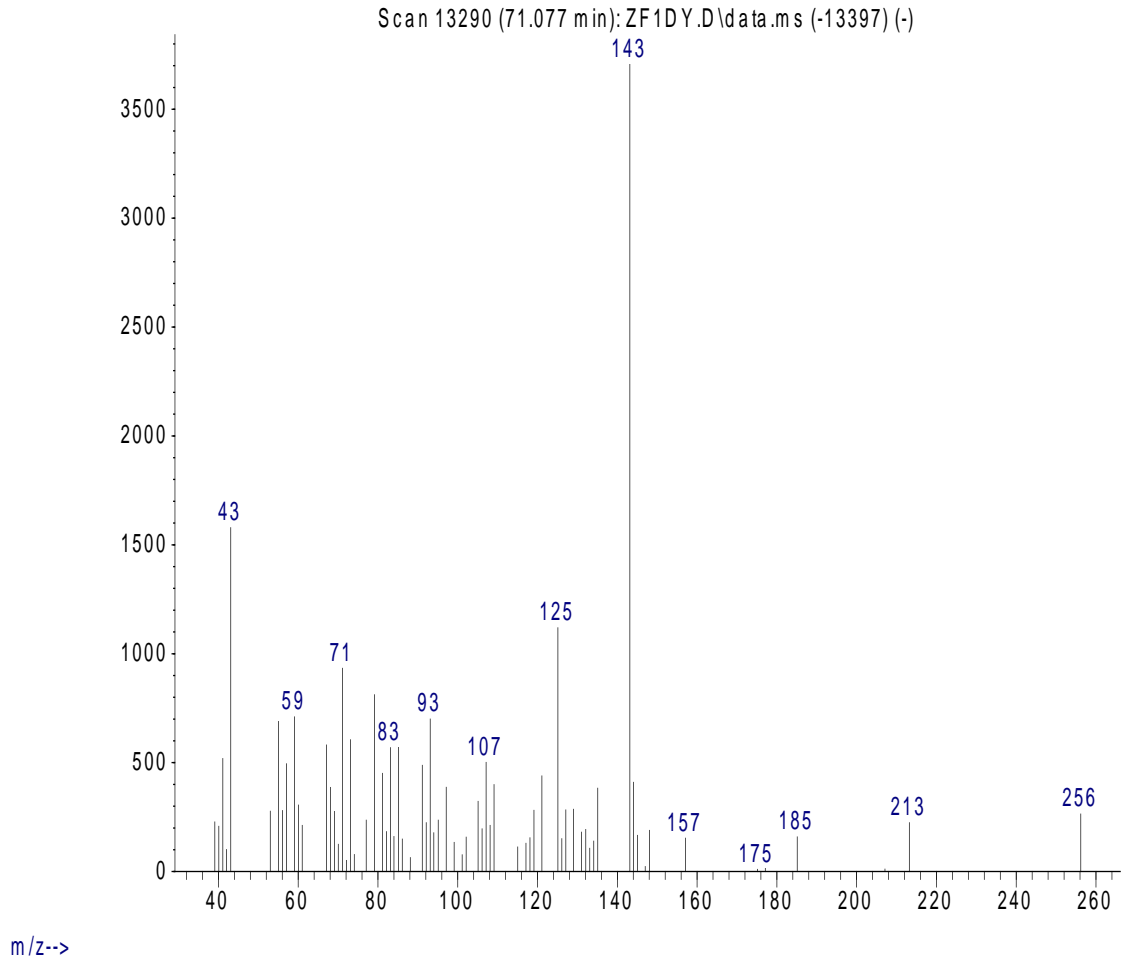
Abundance



m/z-->

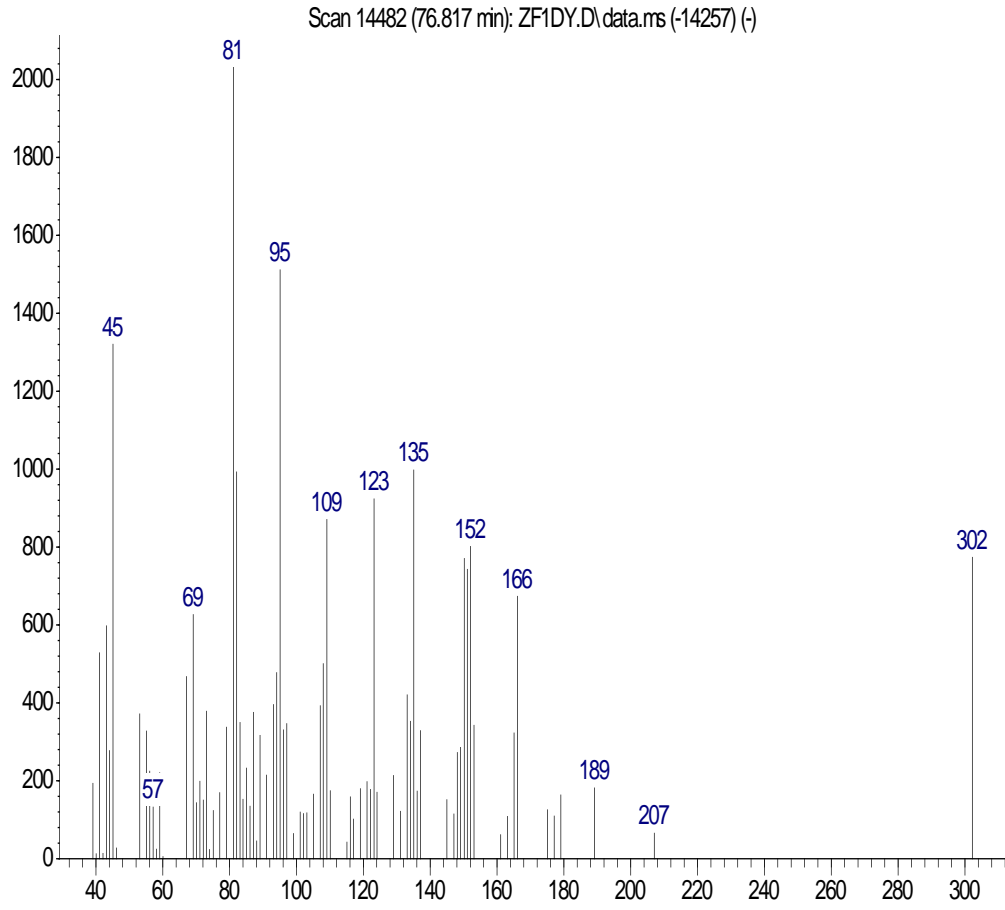
EK-42. E5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-43. E6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

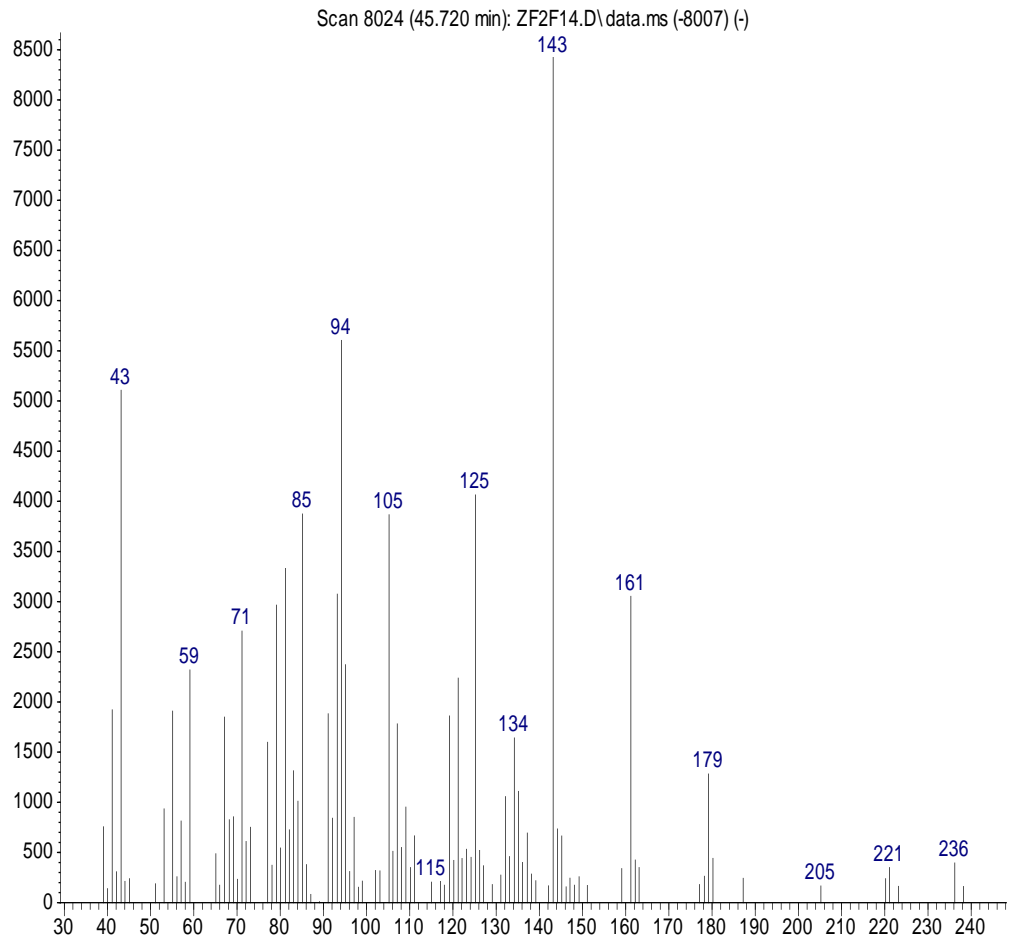
Abundance



m/z->

EK-44. F1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

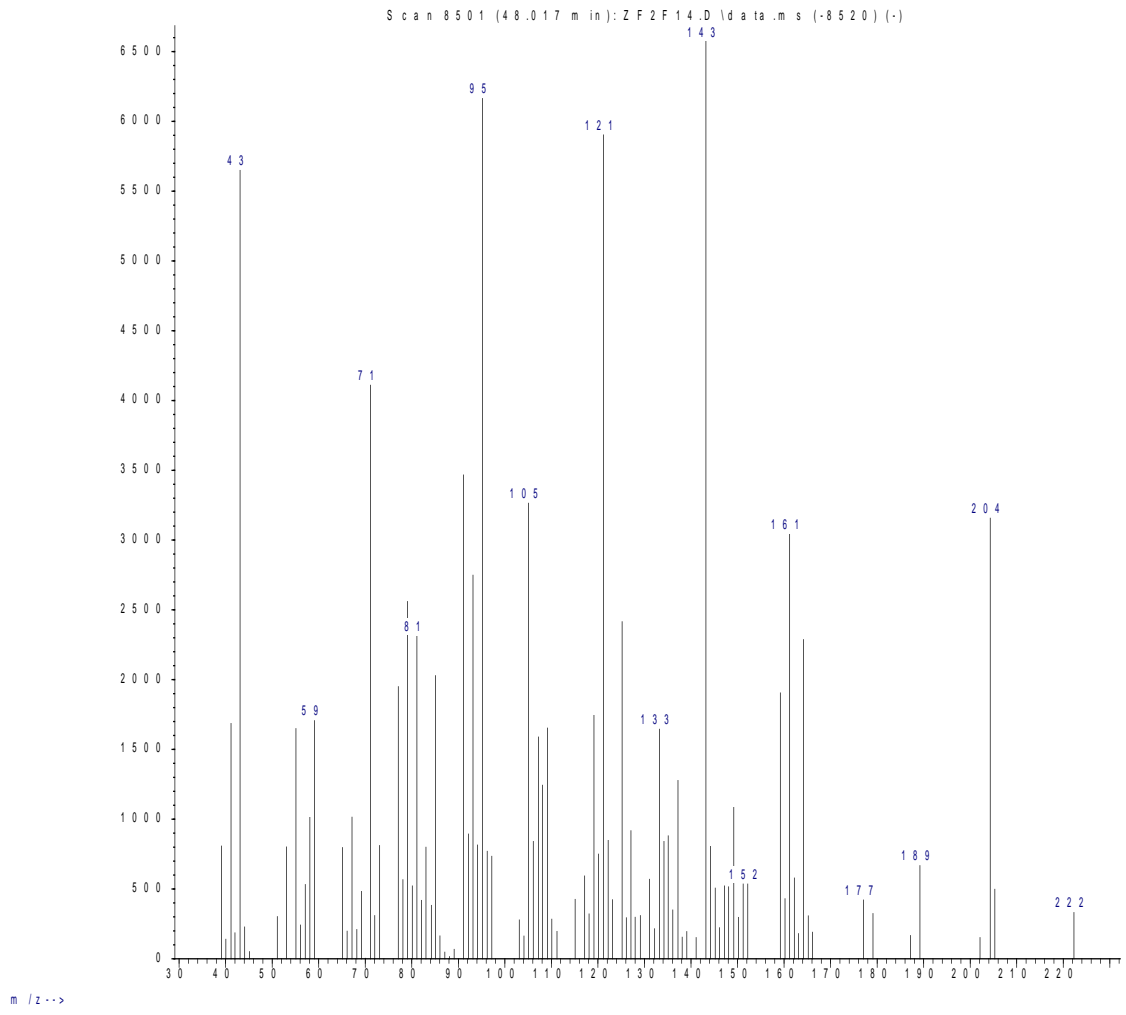
Abundance



m/z-->

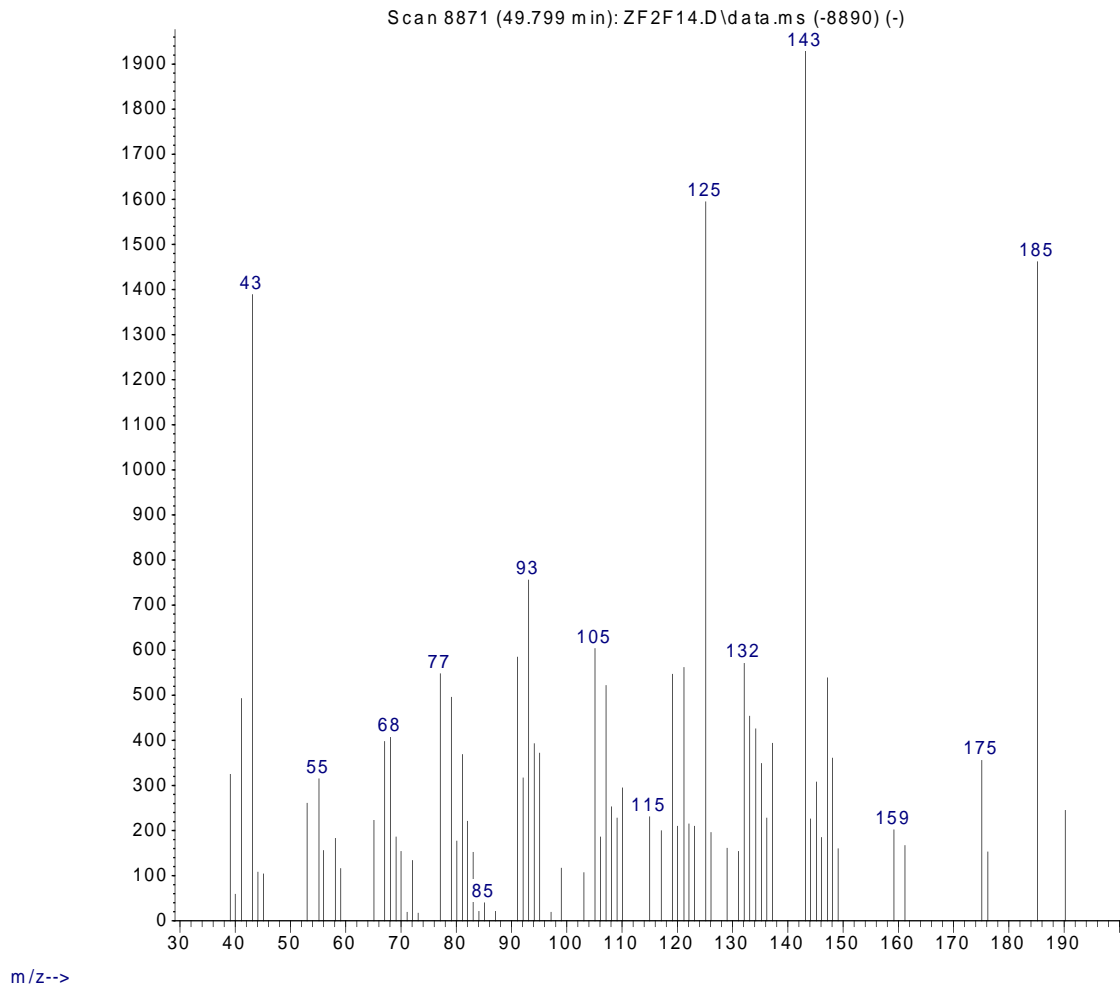
EK-45. F2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

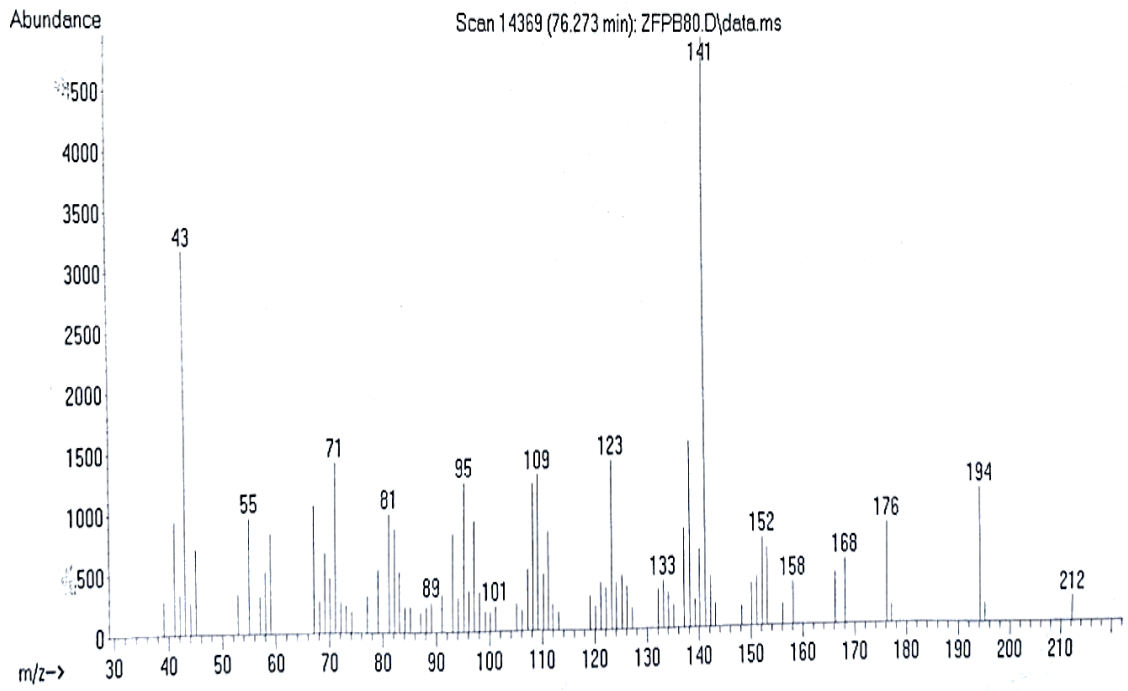


EK-46. F3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

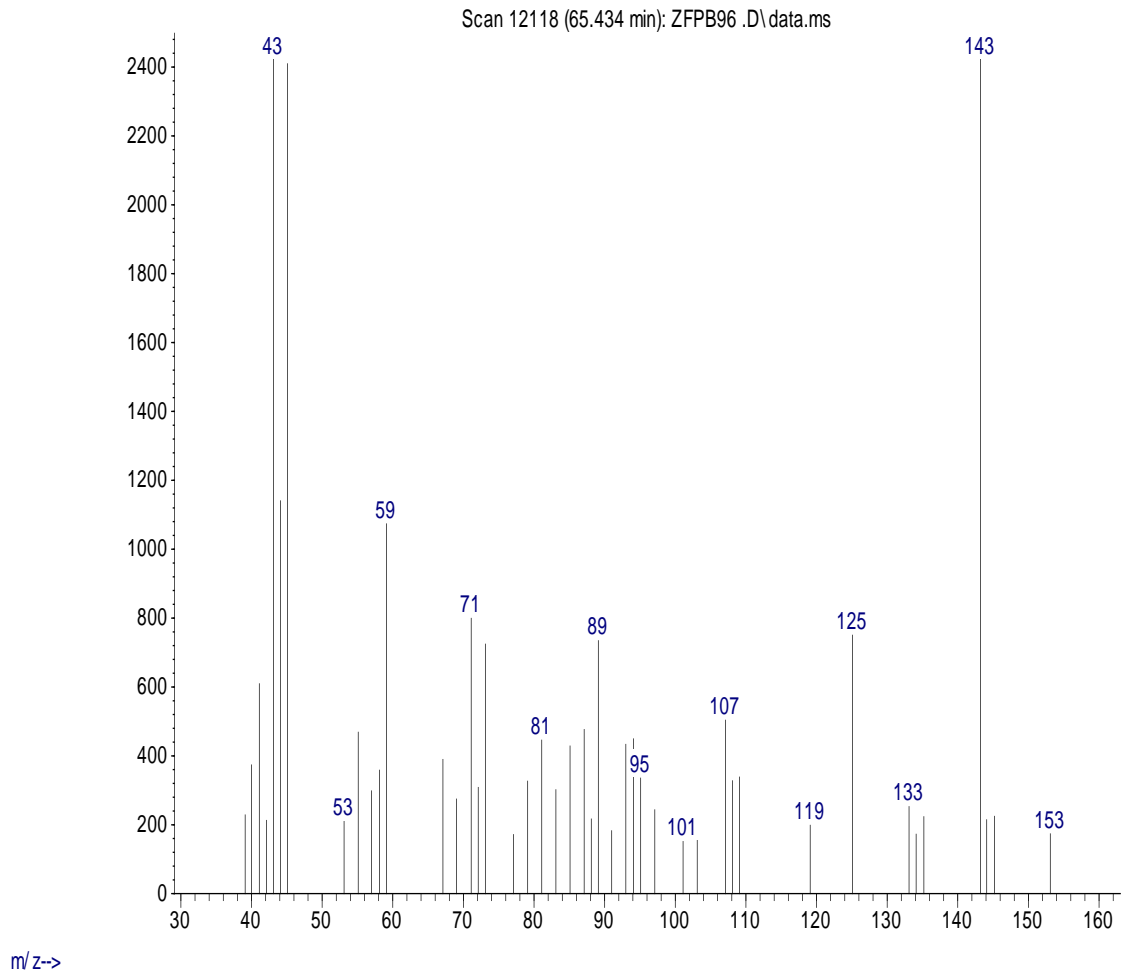


EK-47. G1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu



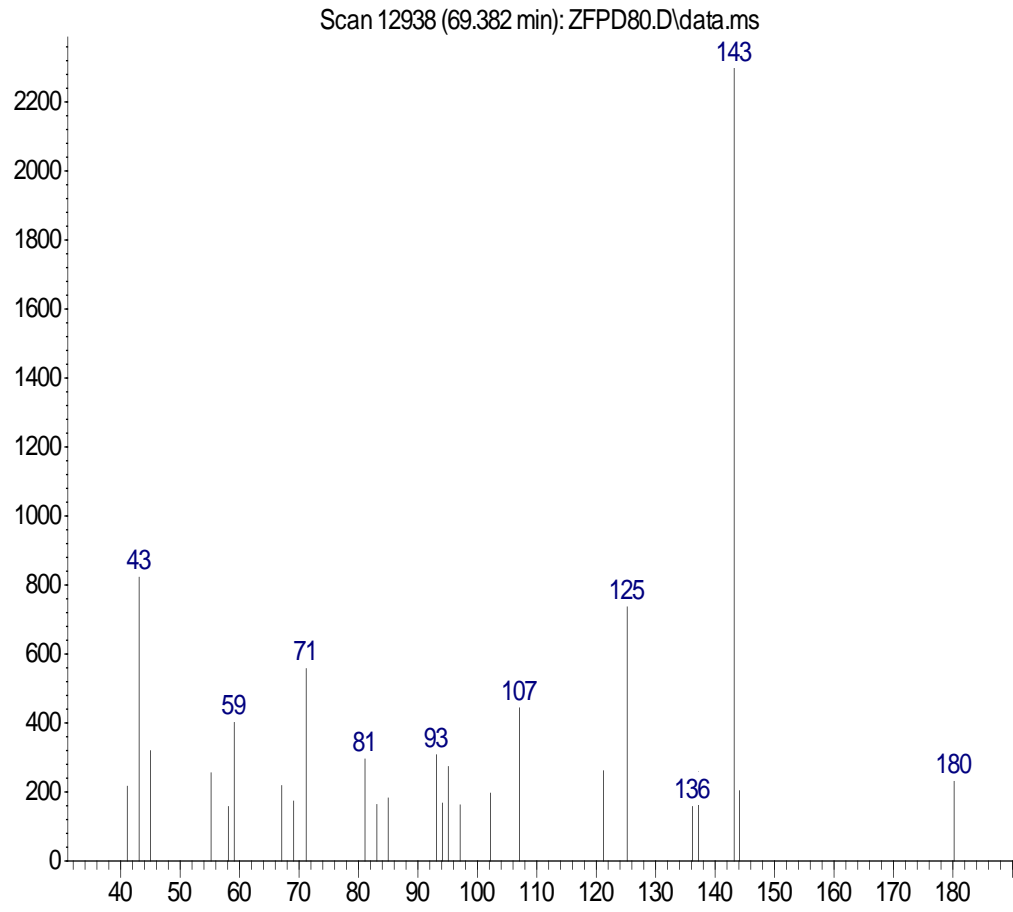
EK-48. H1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-49. I1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

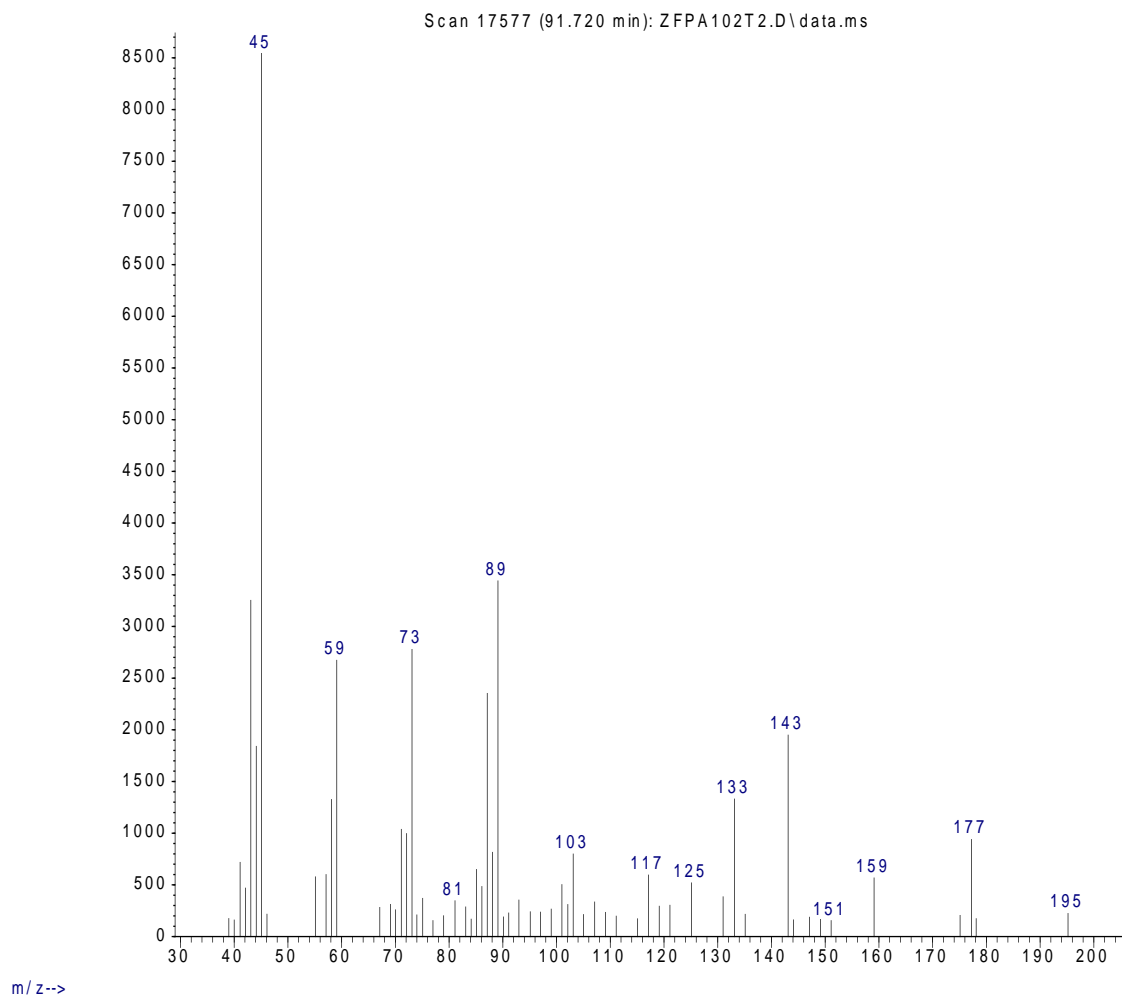
Abundance



m/z-->

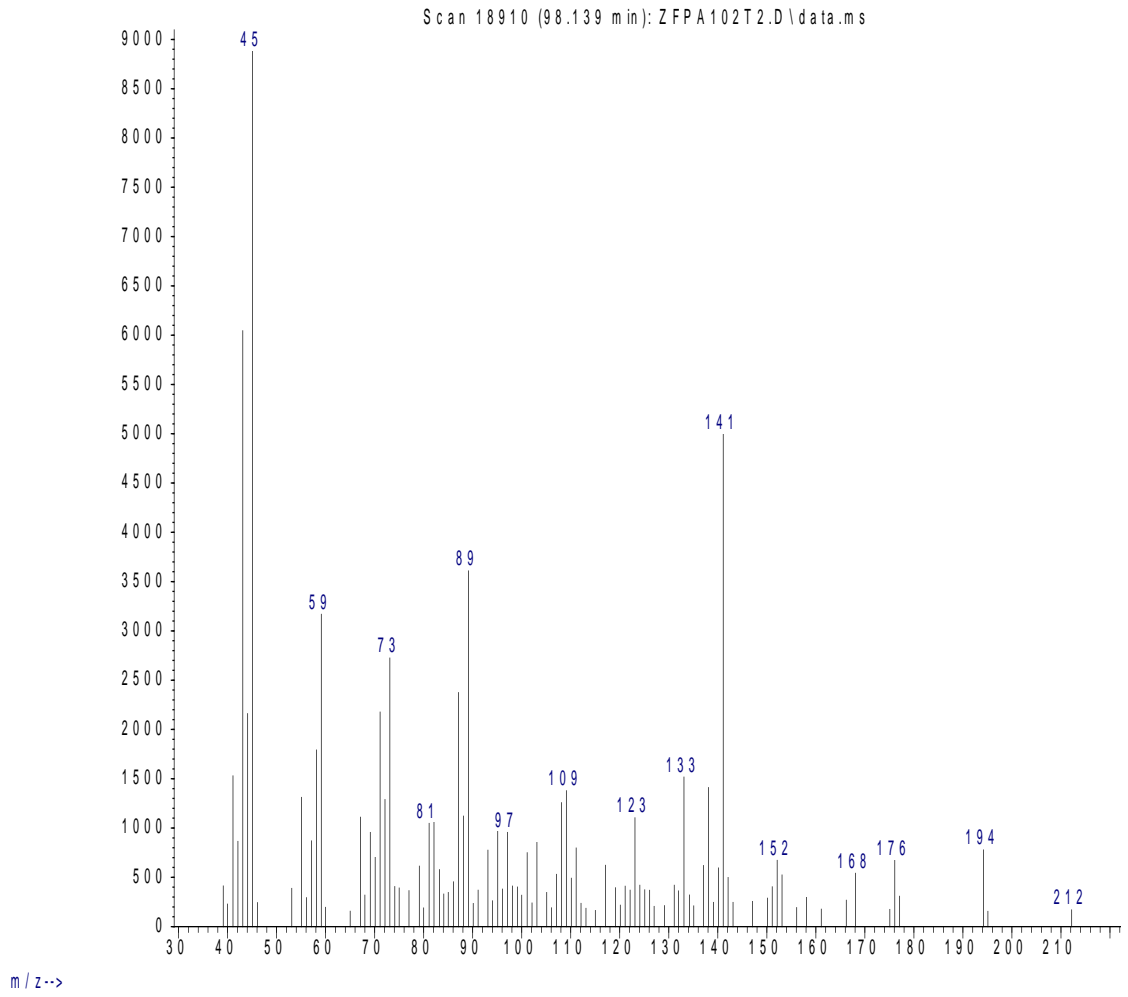
EK-50. J1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

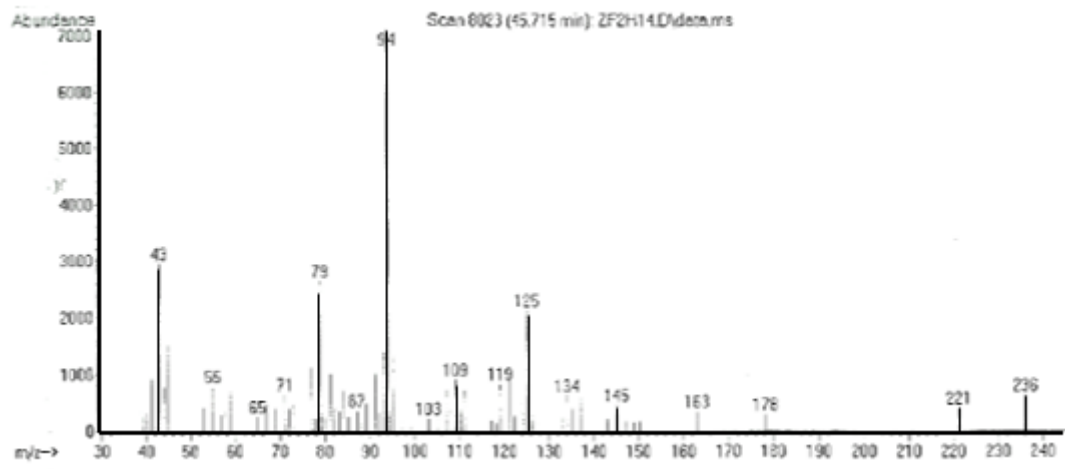


EK-51. J2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

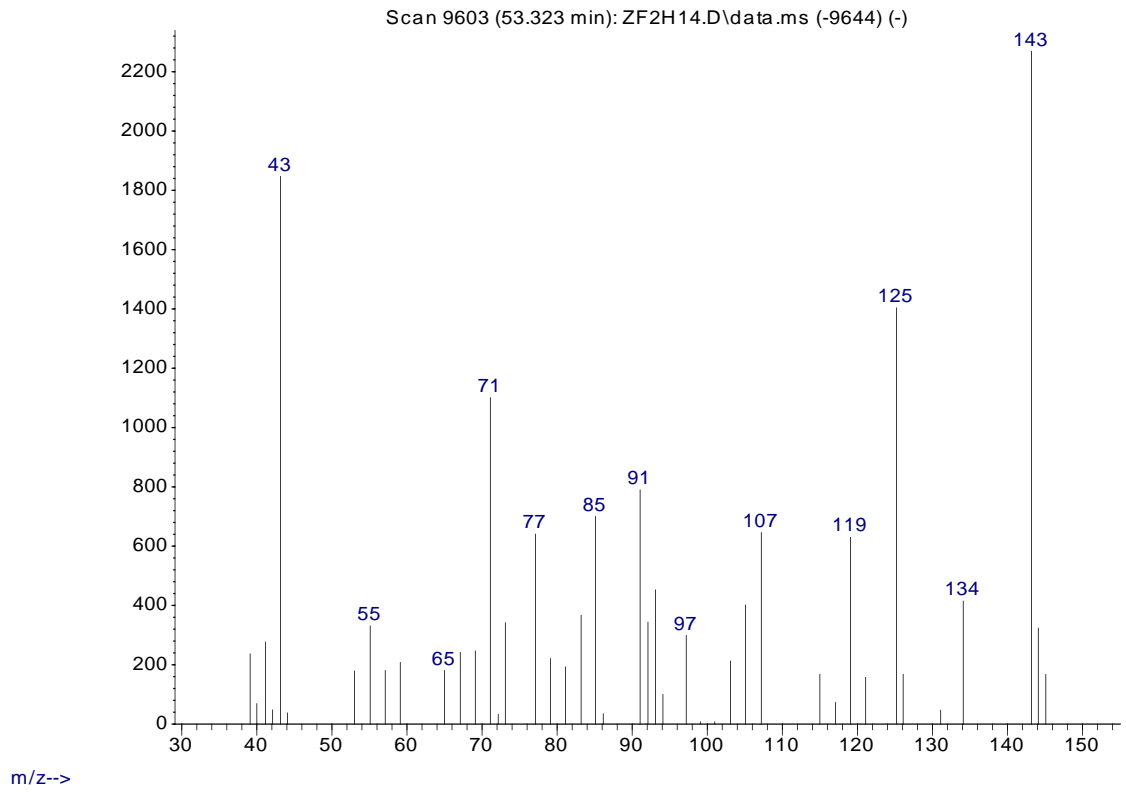


EK-52. K1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu



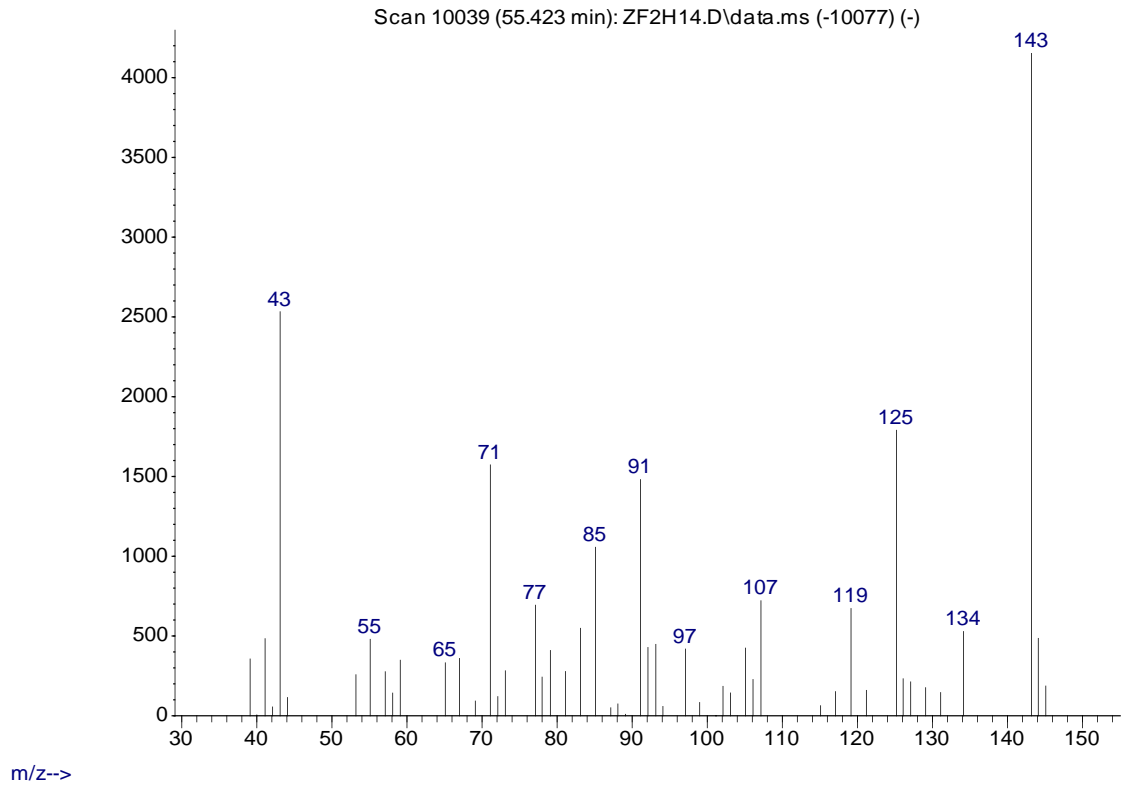
EK-53. K2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



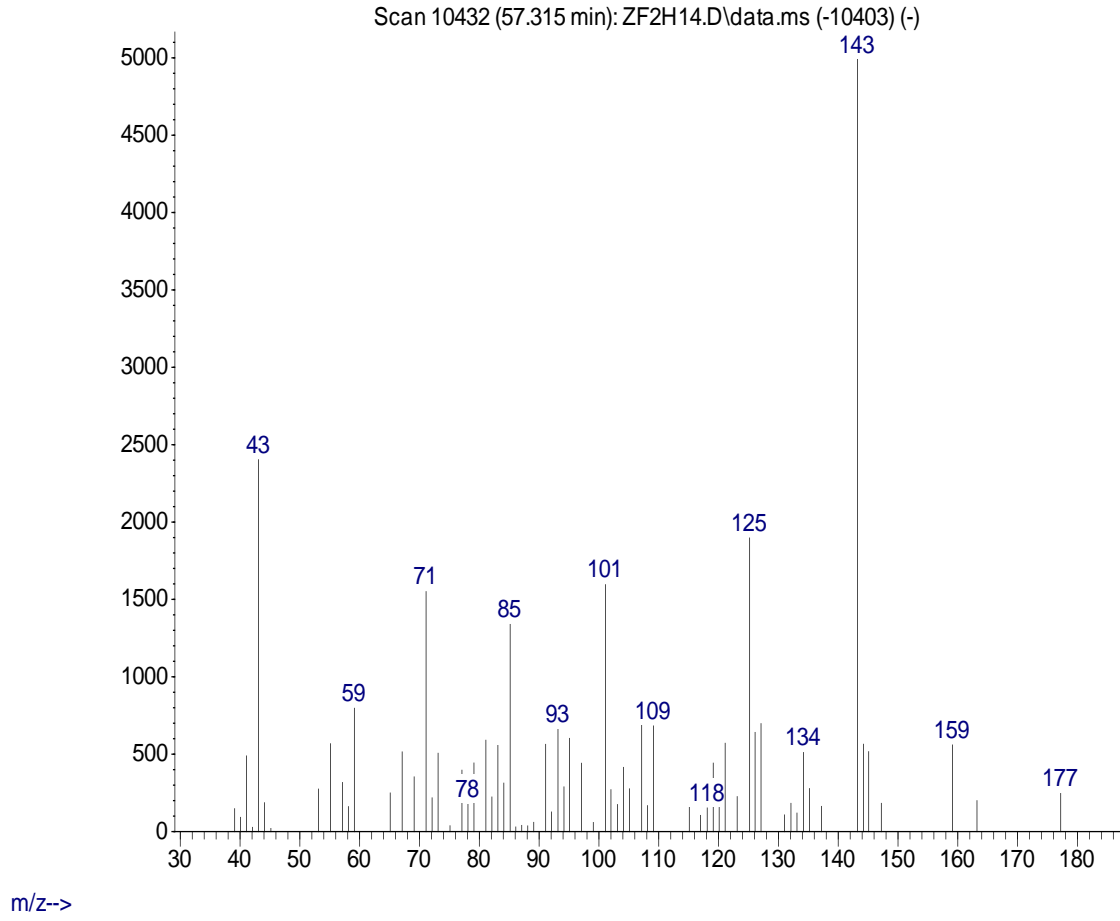
EK-54. K3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



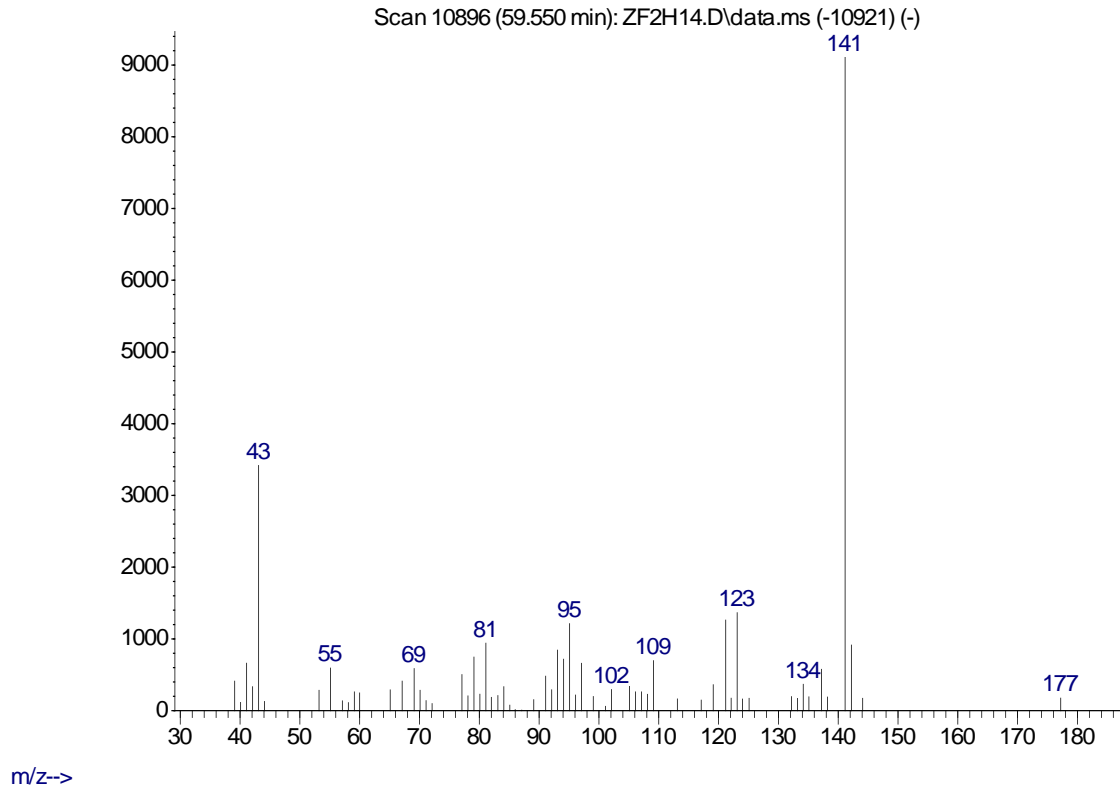
EK-55. K4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



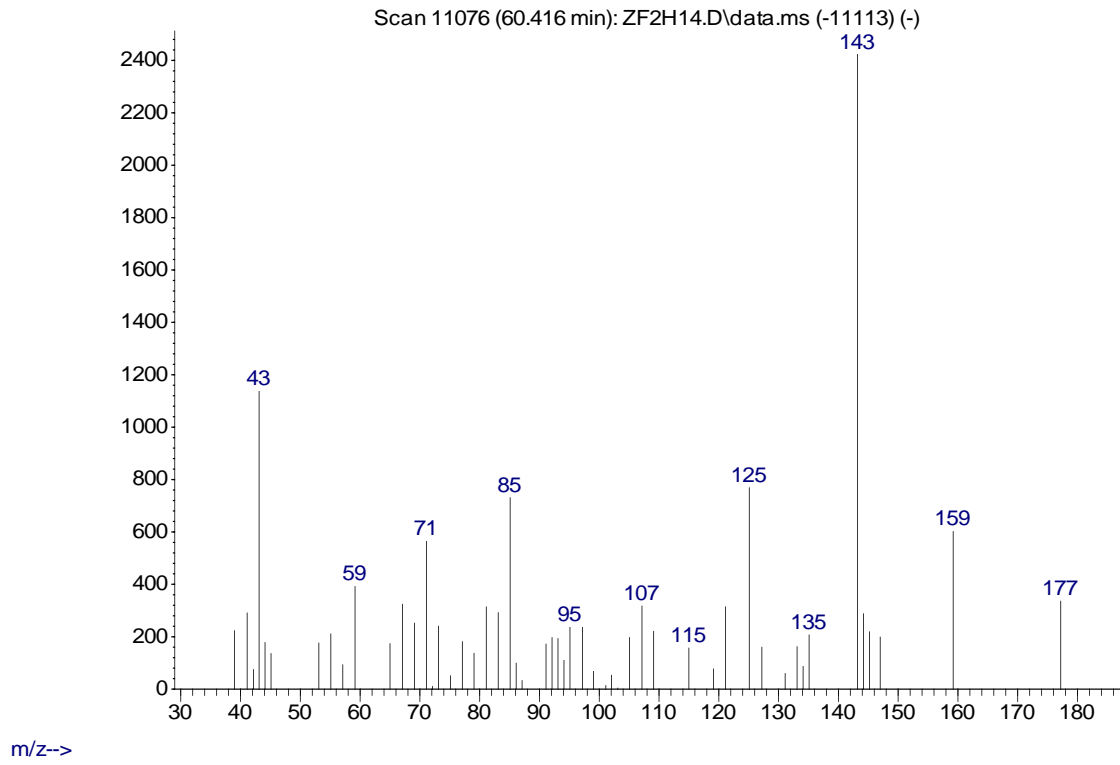
EK-56. K5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



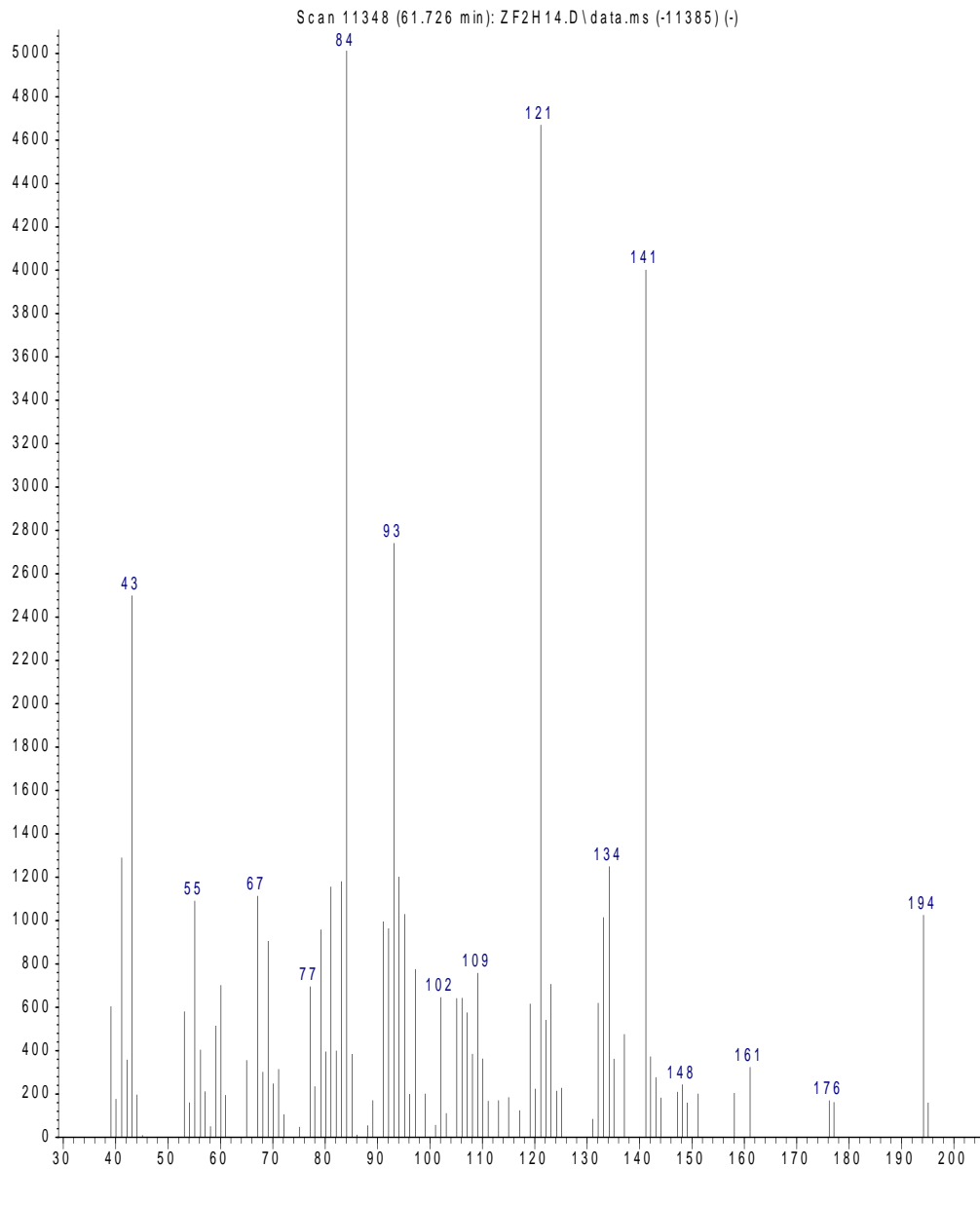
EK-57. K6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



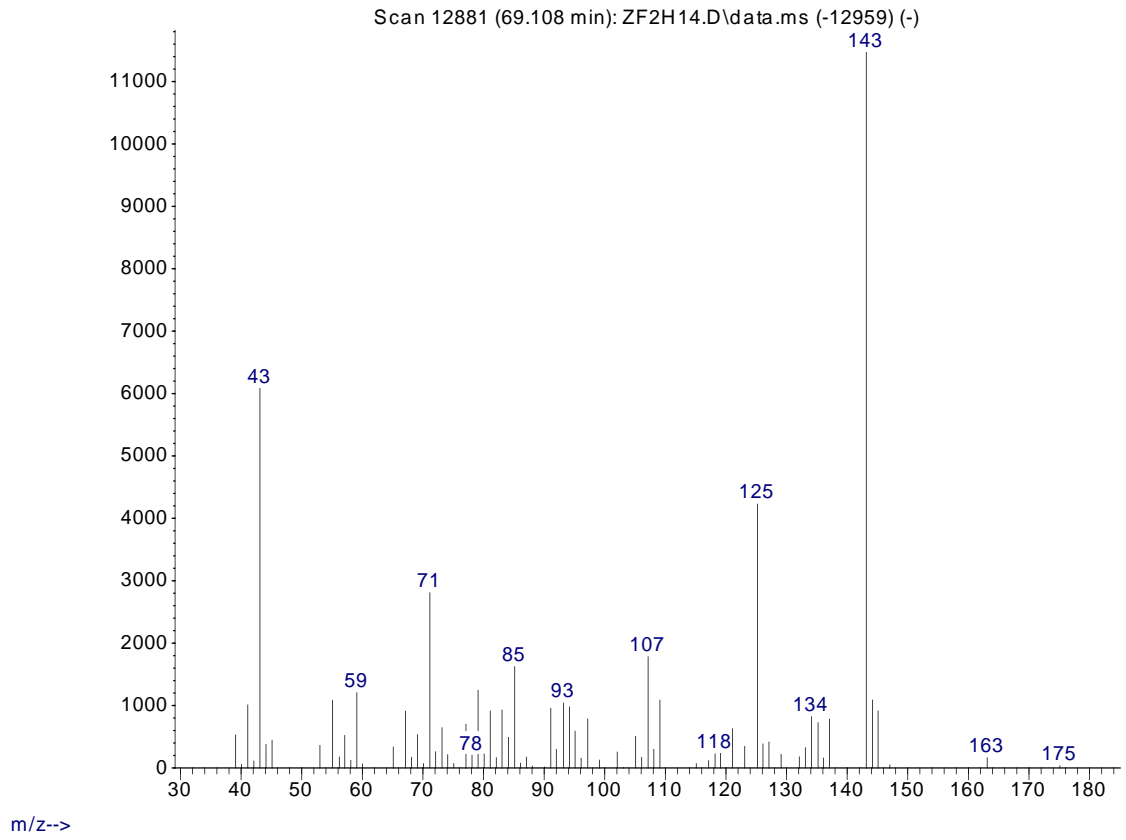
EK-58. K7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



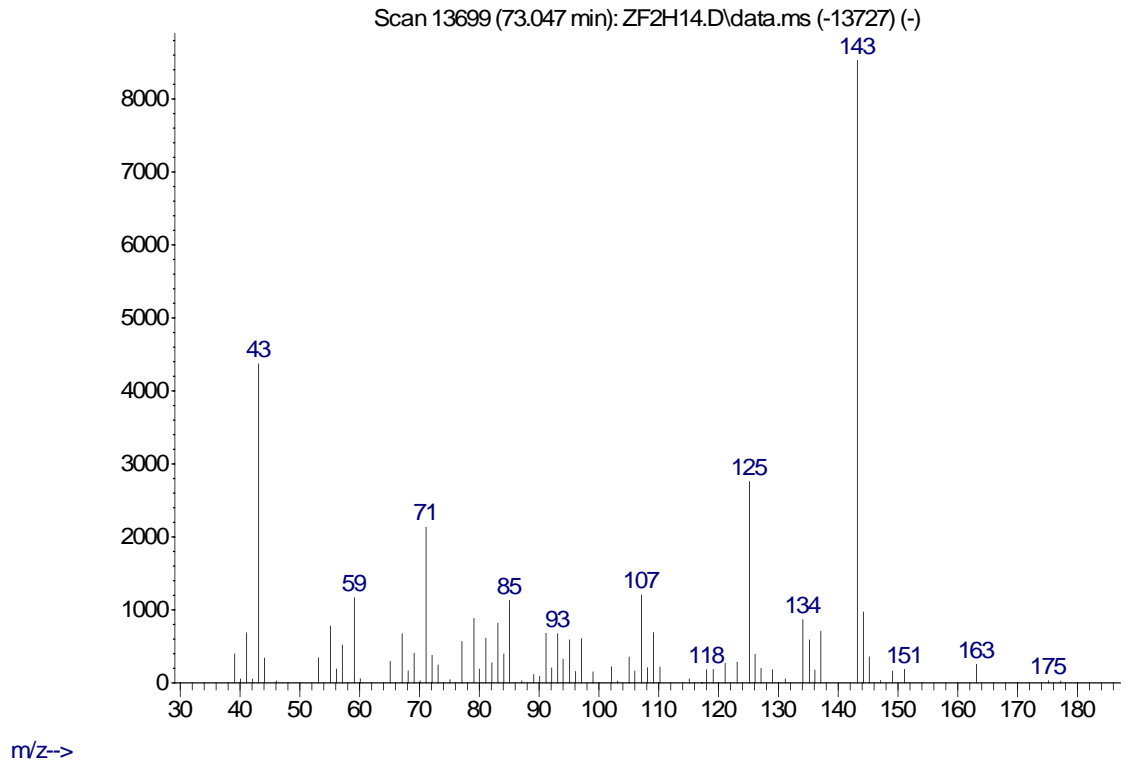
EK-59. K8 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



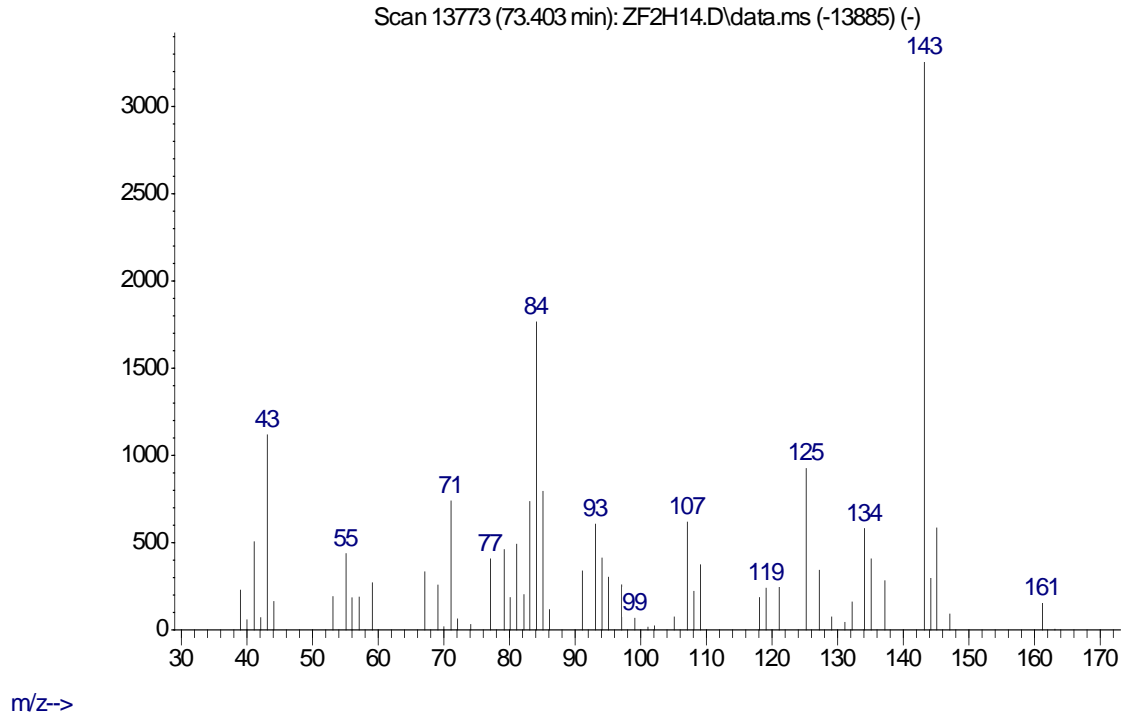
EK-60. K9 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



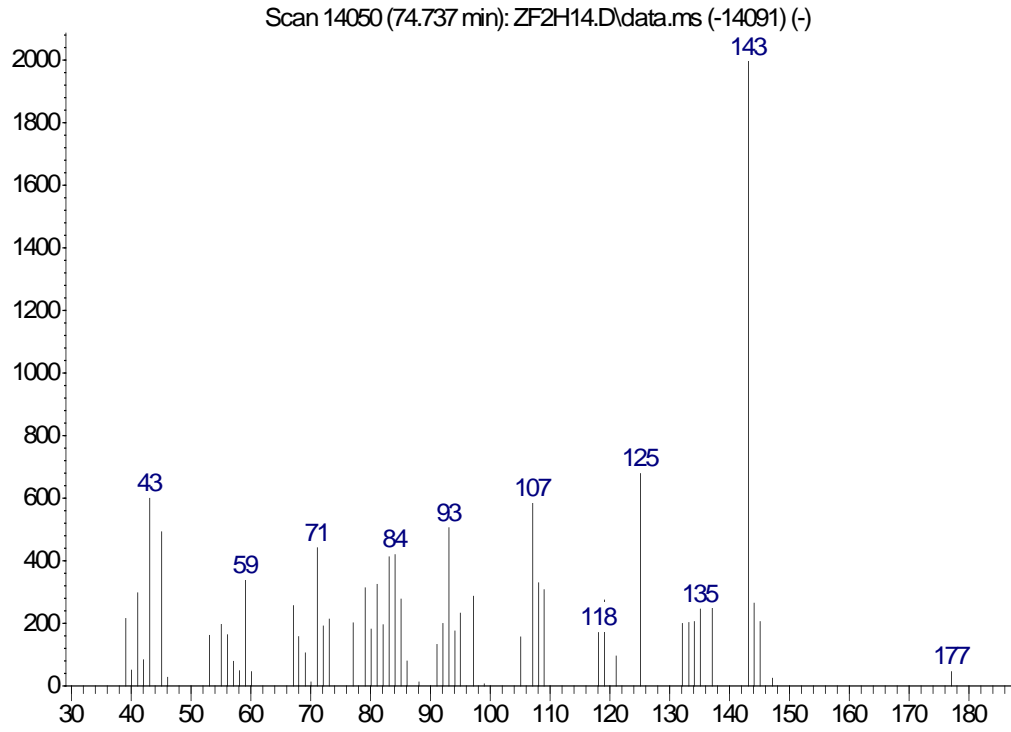
EK-61. K10 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-62. K11 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

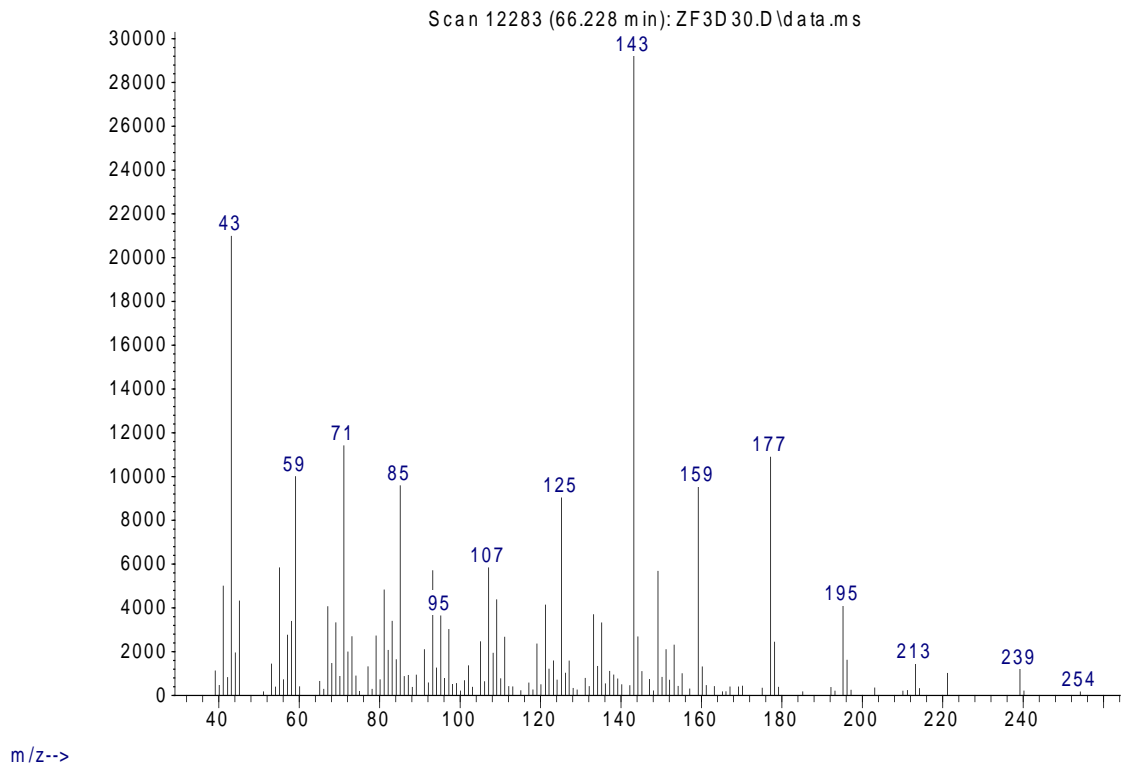
Abundance



m/z->

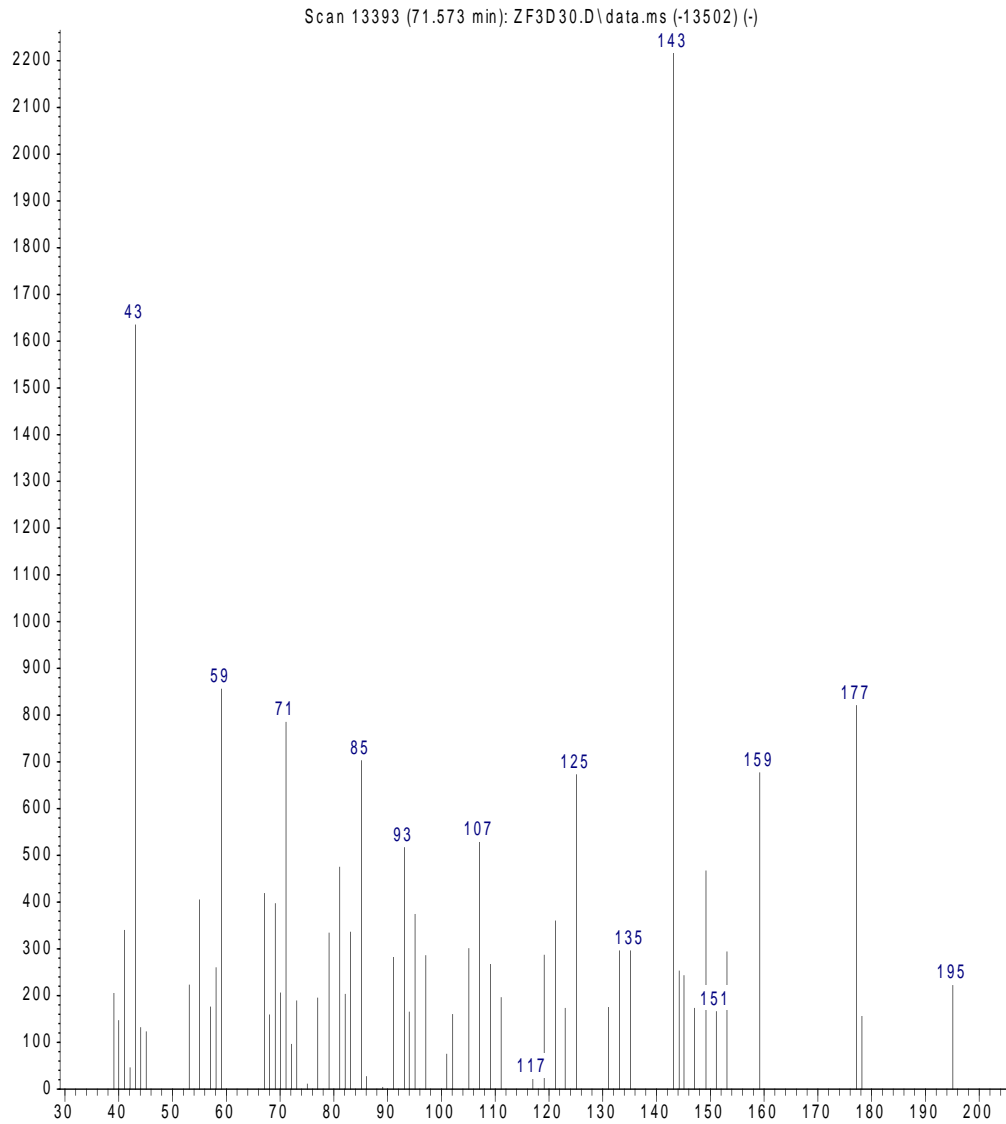
EK-63. L1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-64. L2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

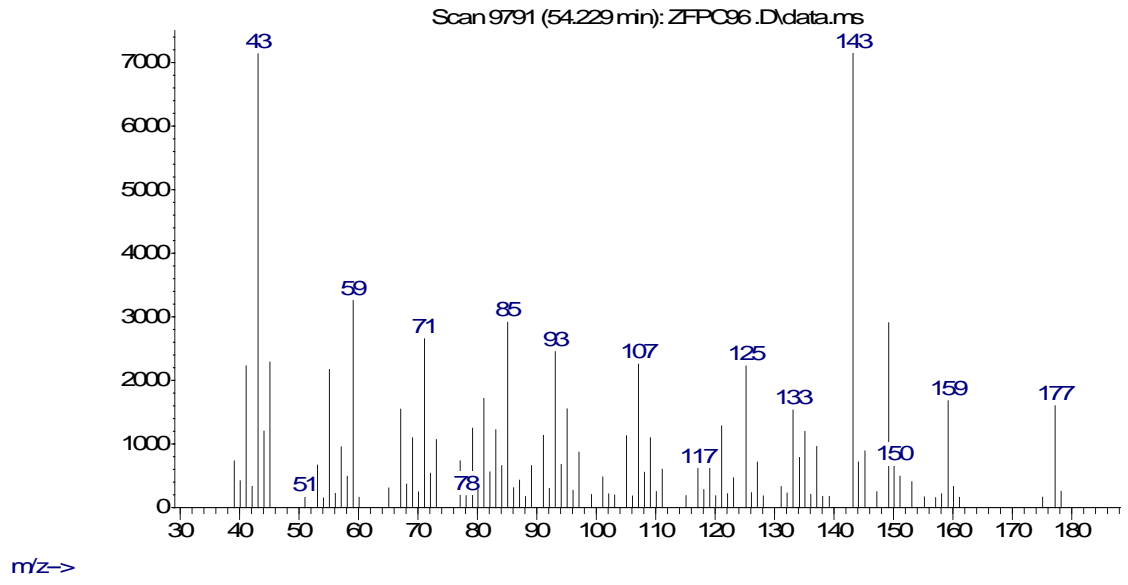
Abundance



m/z-->

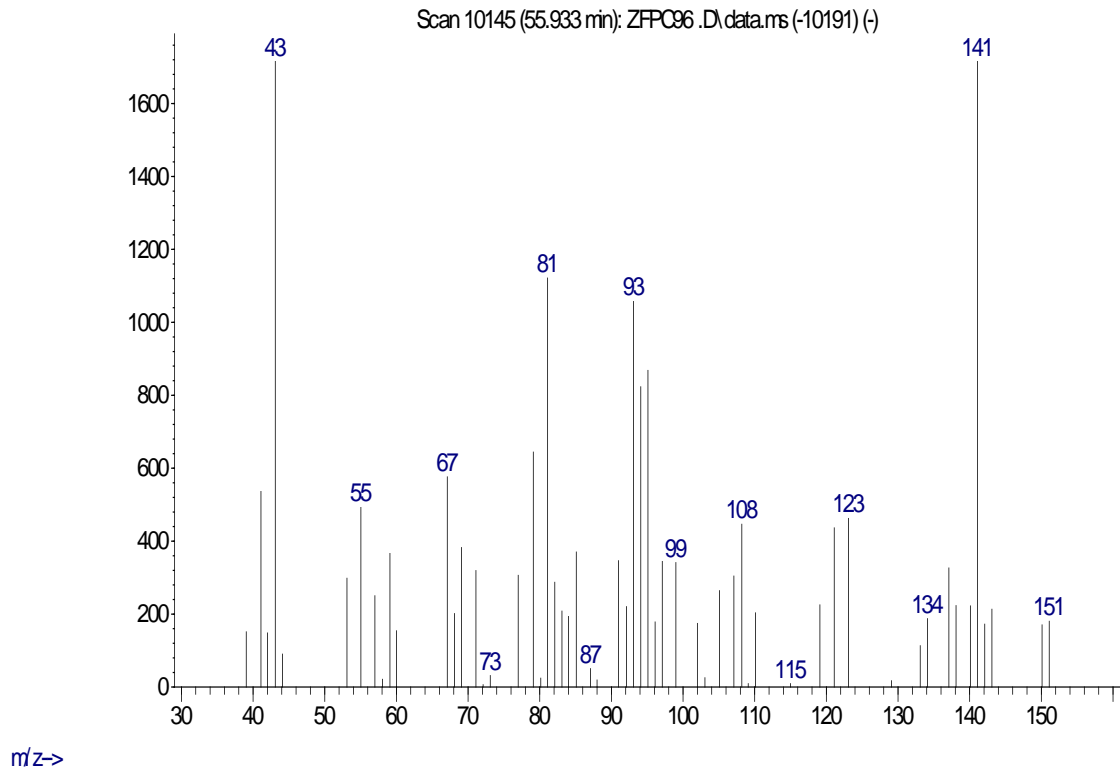
EK-65. M1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



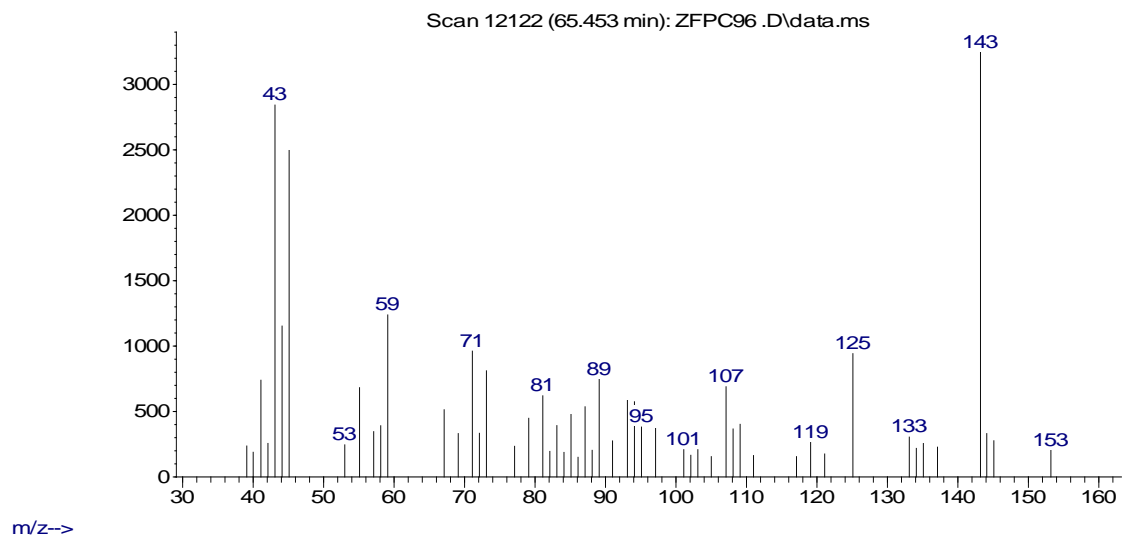
EK-66. M2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



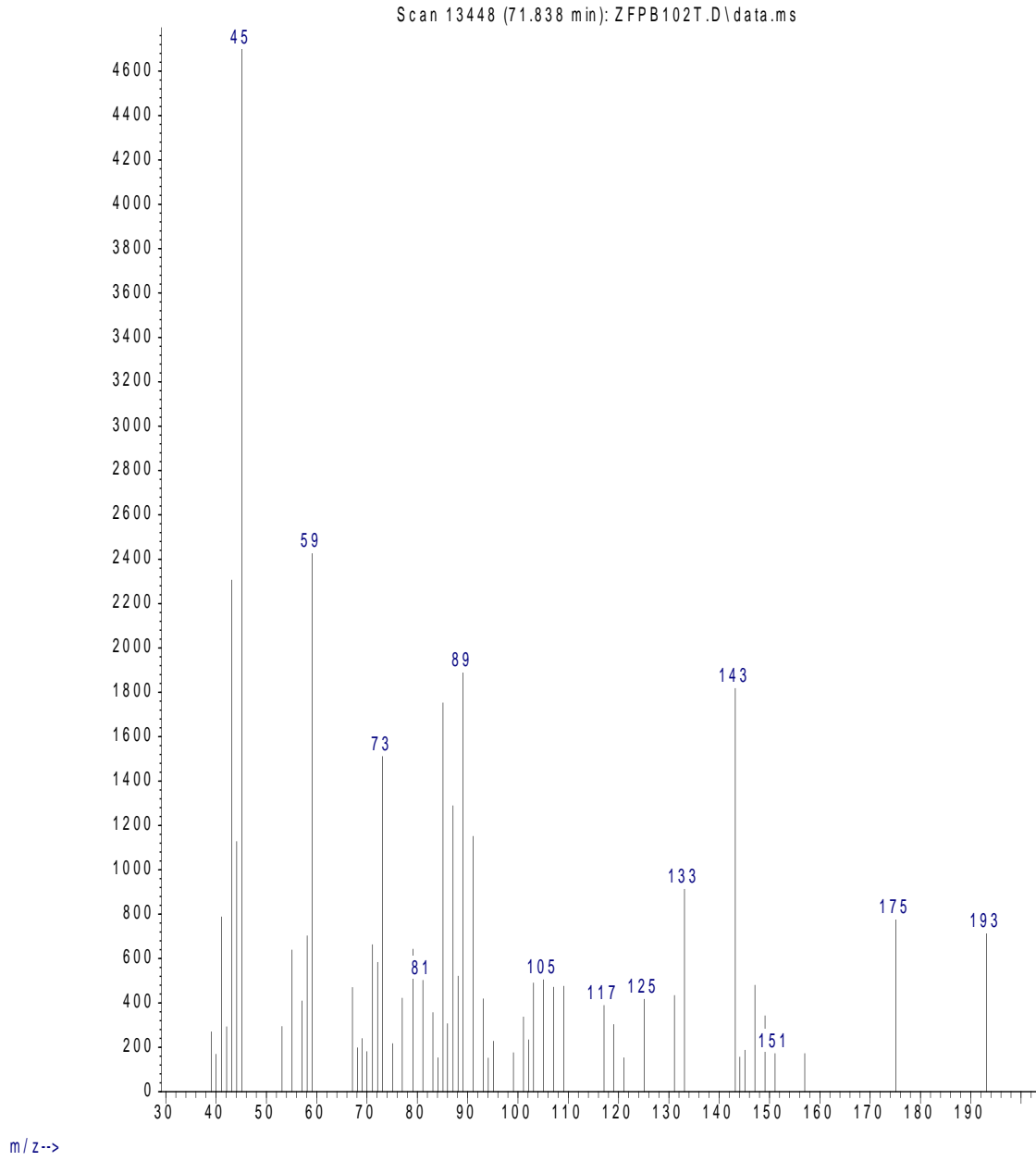
EK-67. M3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



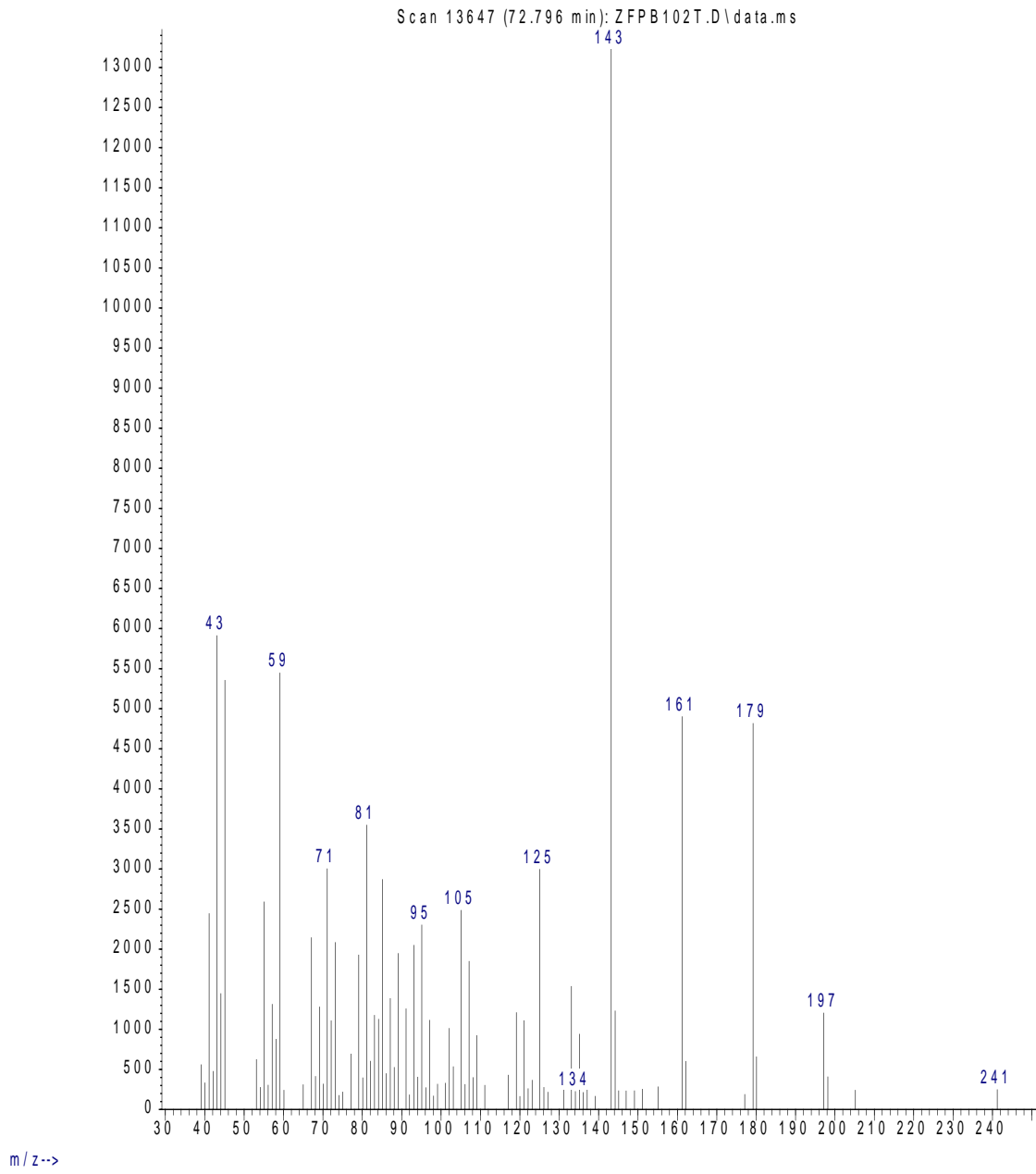
EK-68. N1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



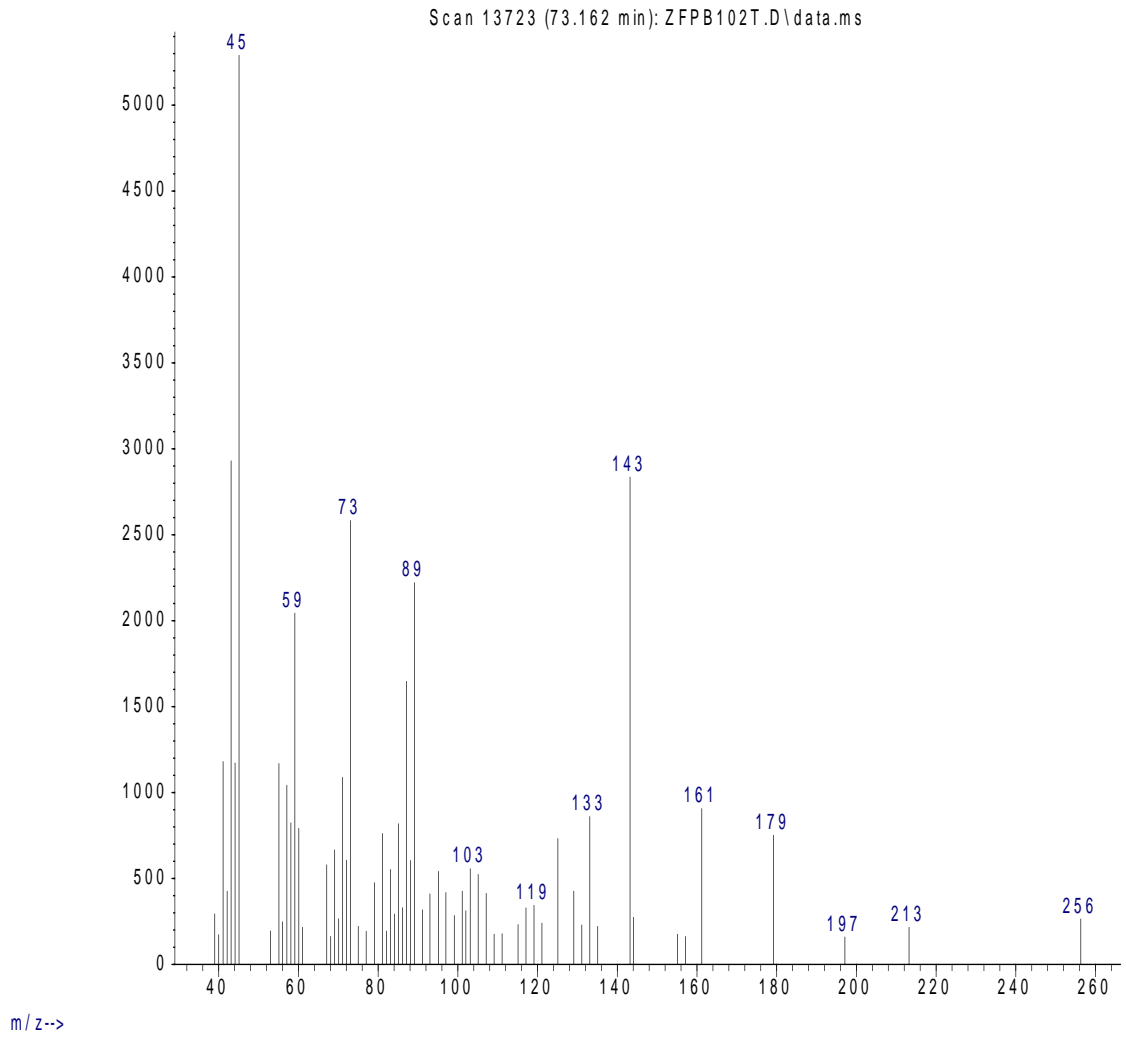
EK-69. N2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



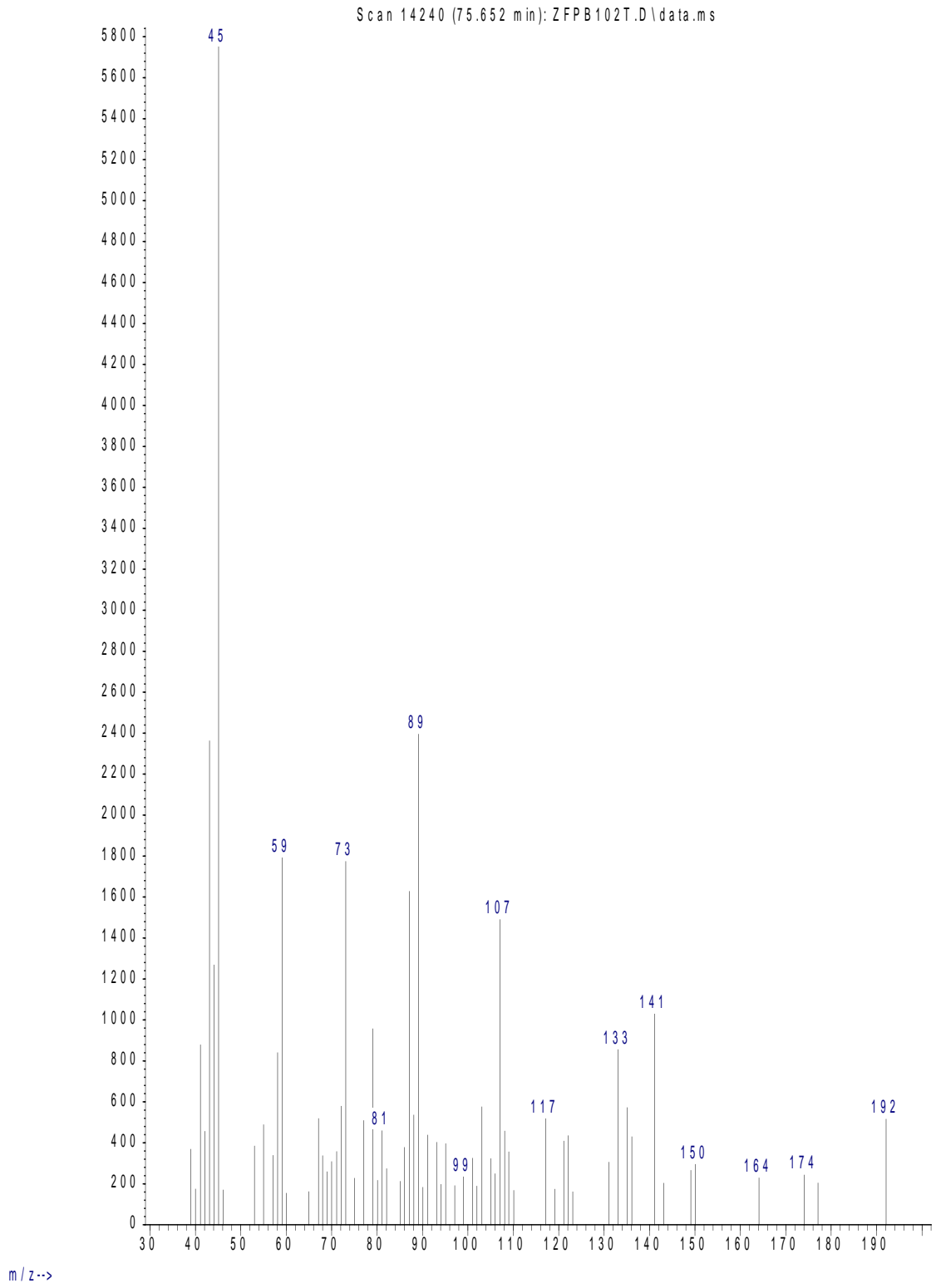
EK-70. N3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



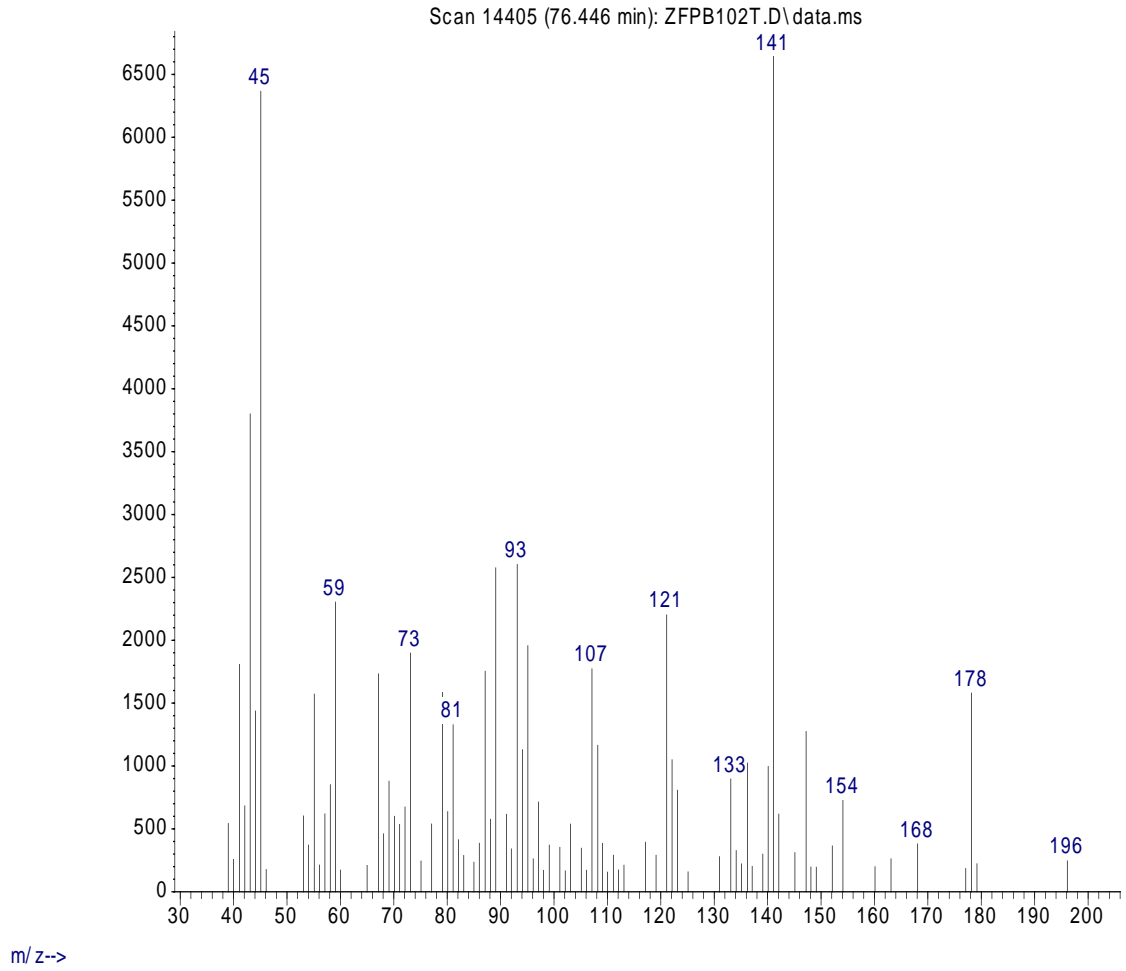
EK-71. N4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-72. N5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

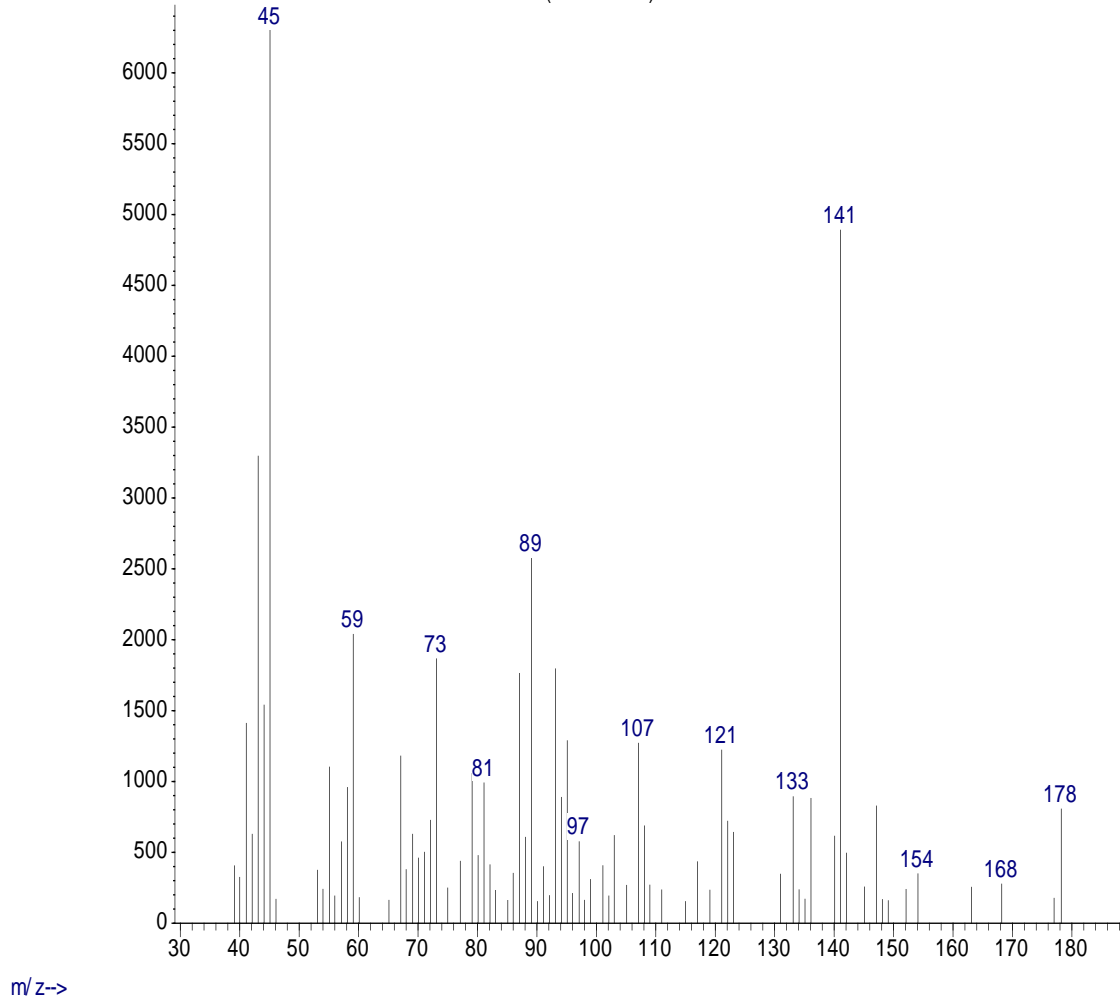
Abundance



EK-73. N6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

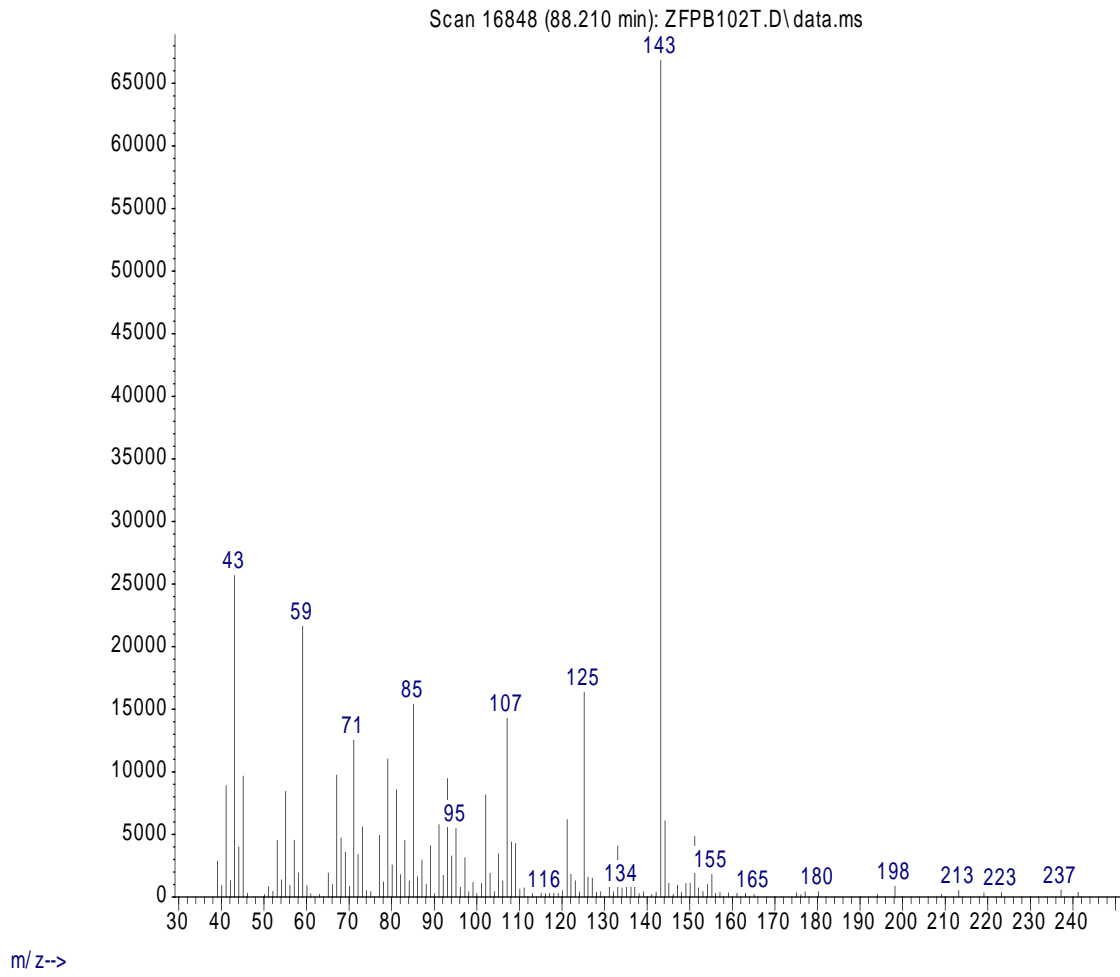
Abundance

Scan 14528 (77.039 min): ZFPB102T.D\data.ms



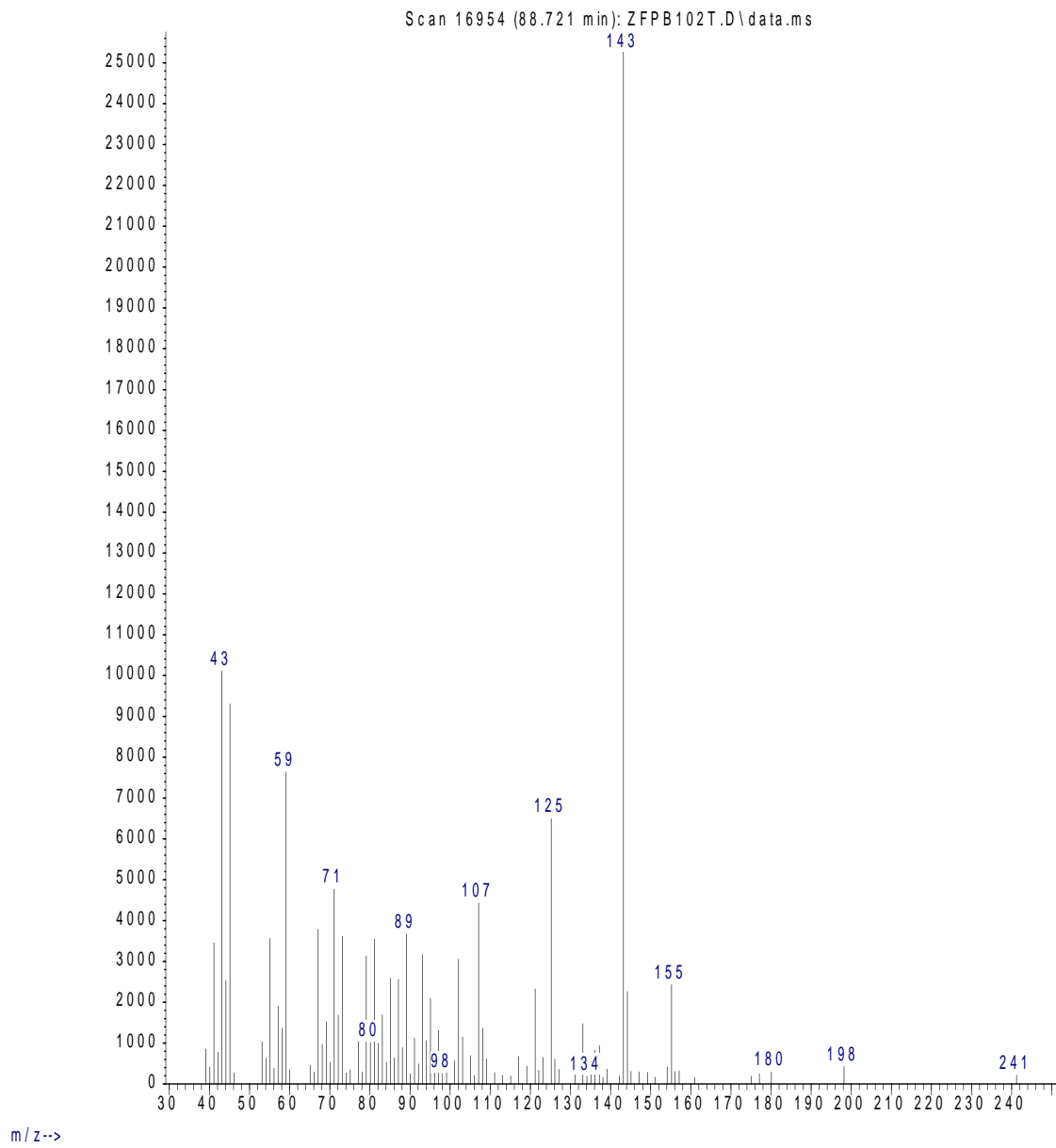
EK-74. N7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



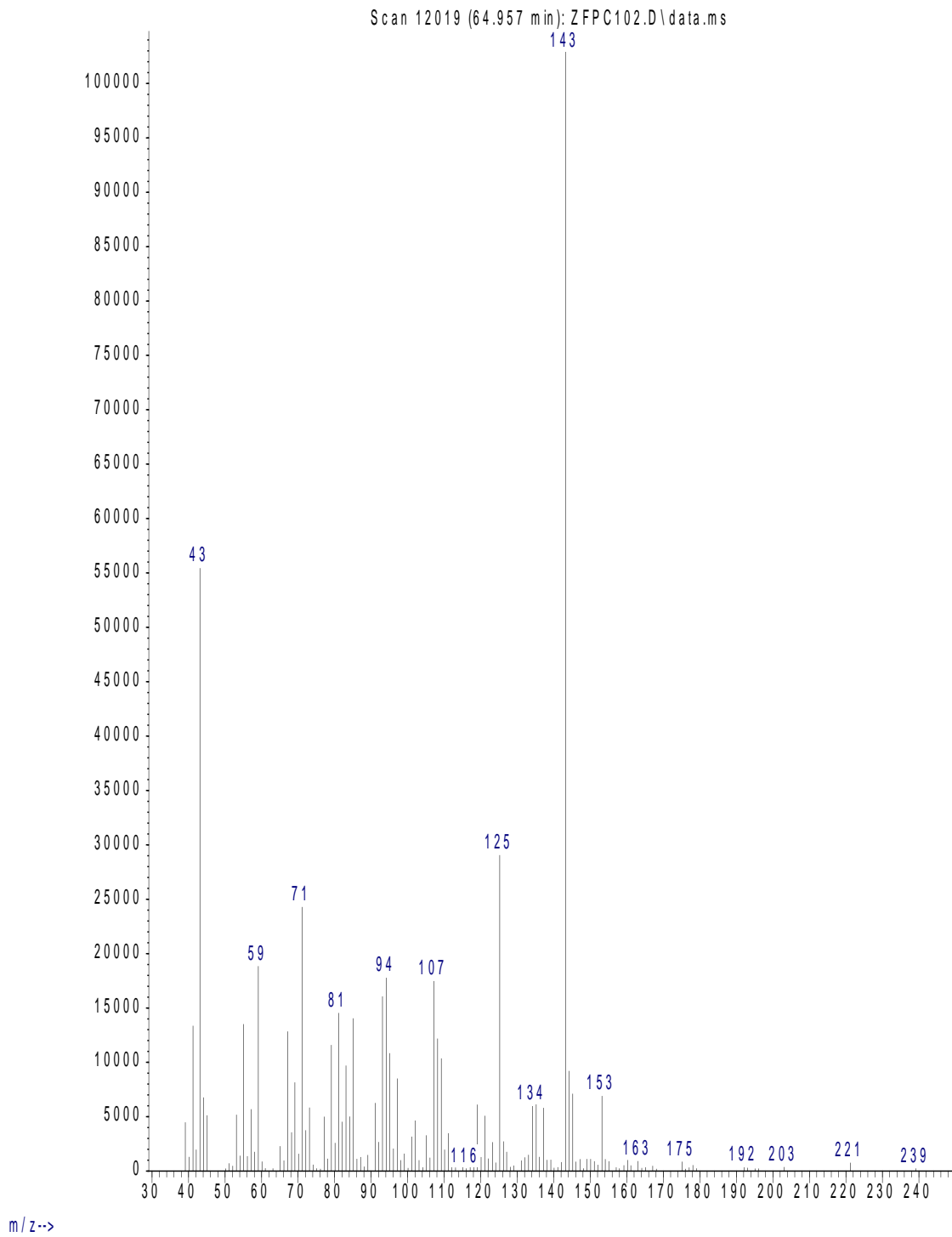
EK-75. N8 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



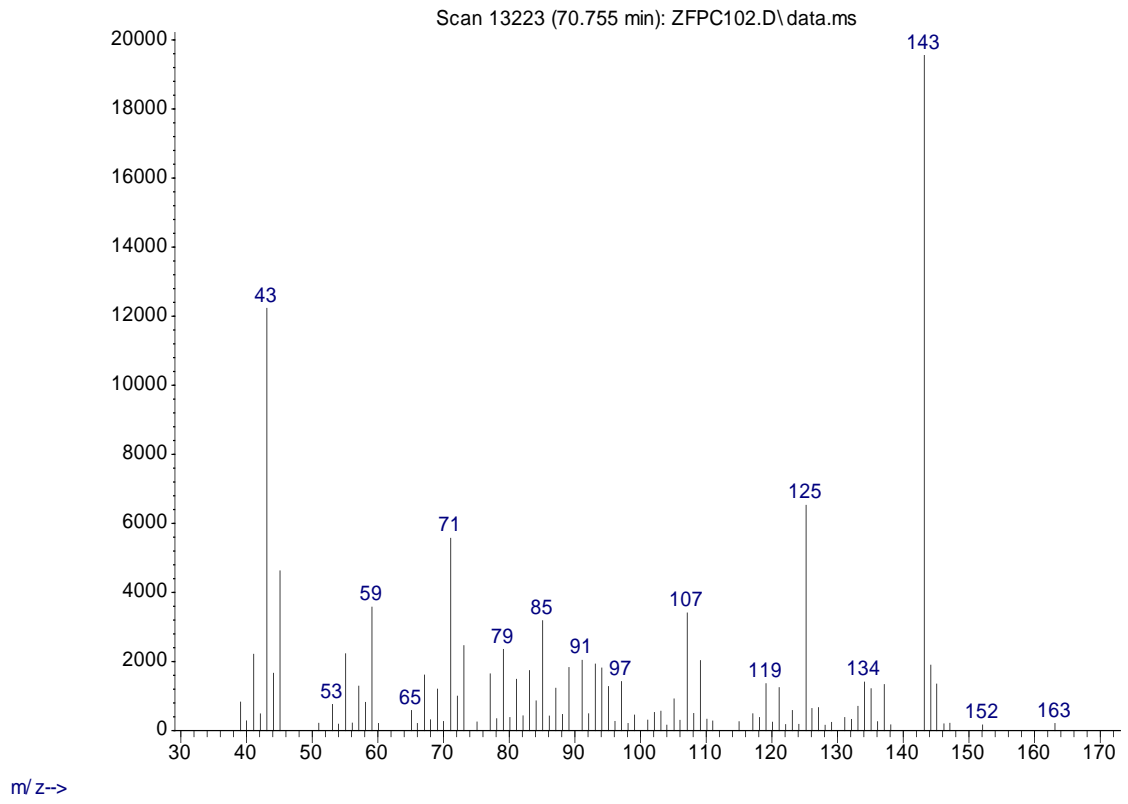
EK-76. O1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



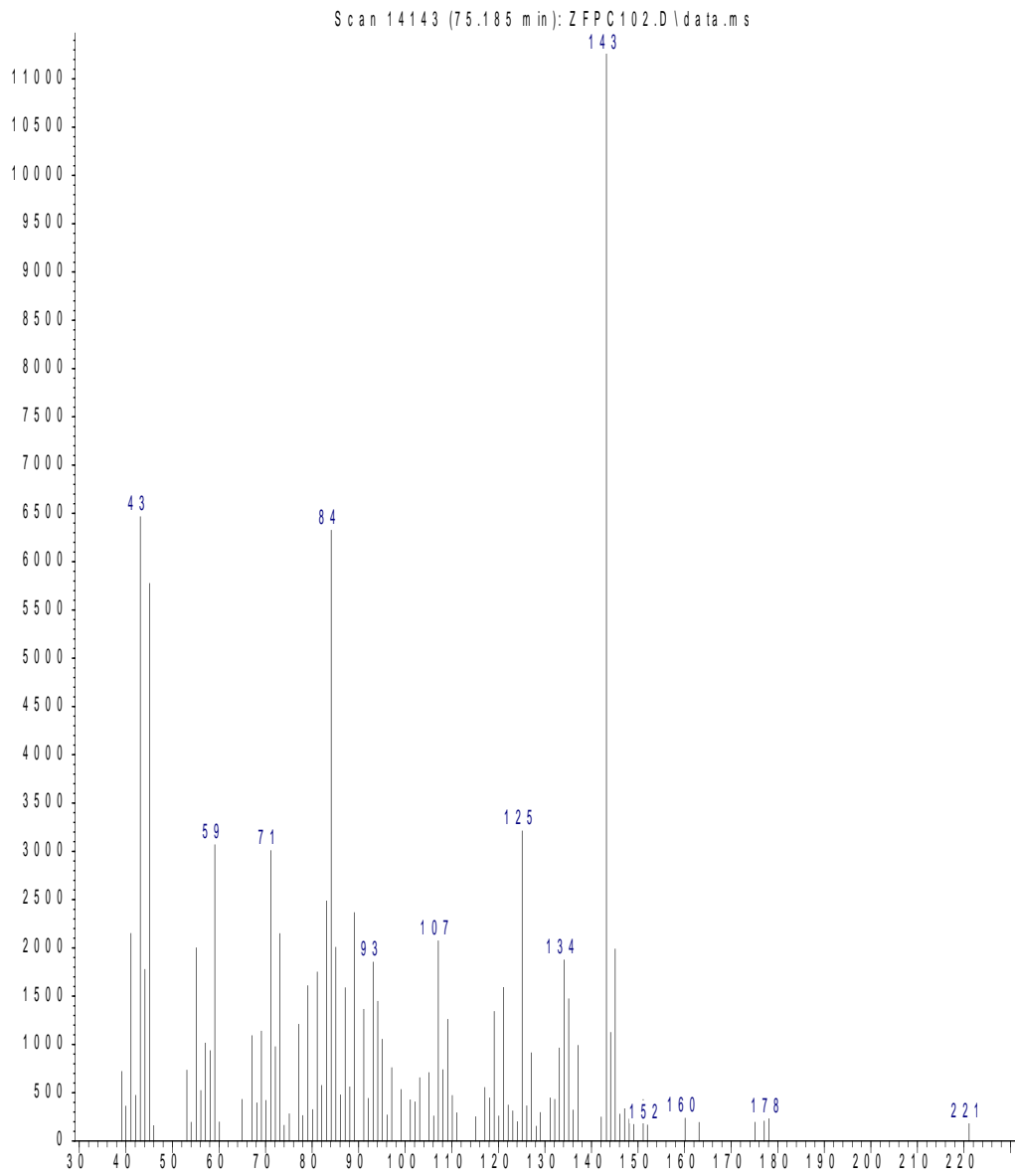
EK-77. O2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-78. O3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

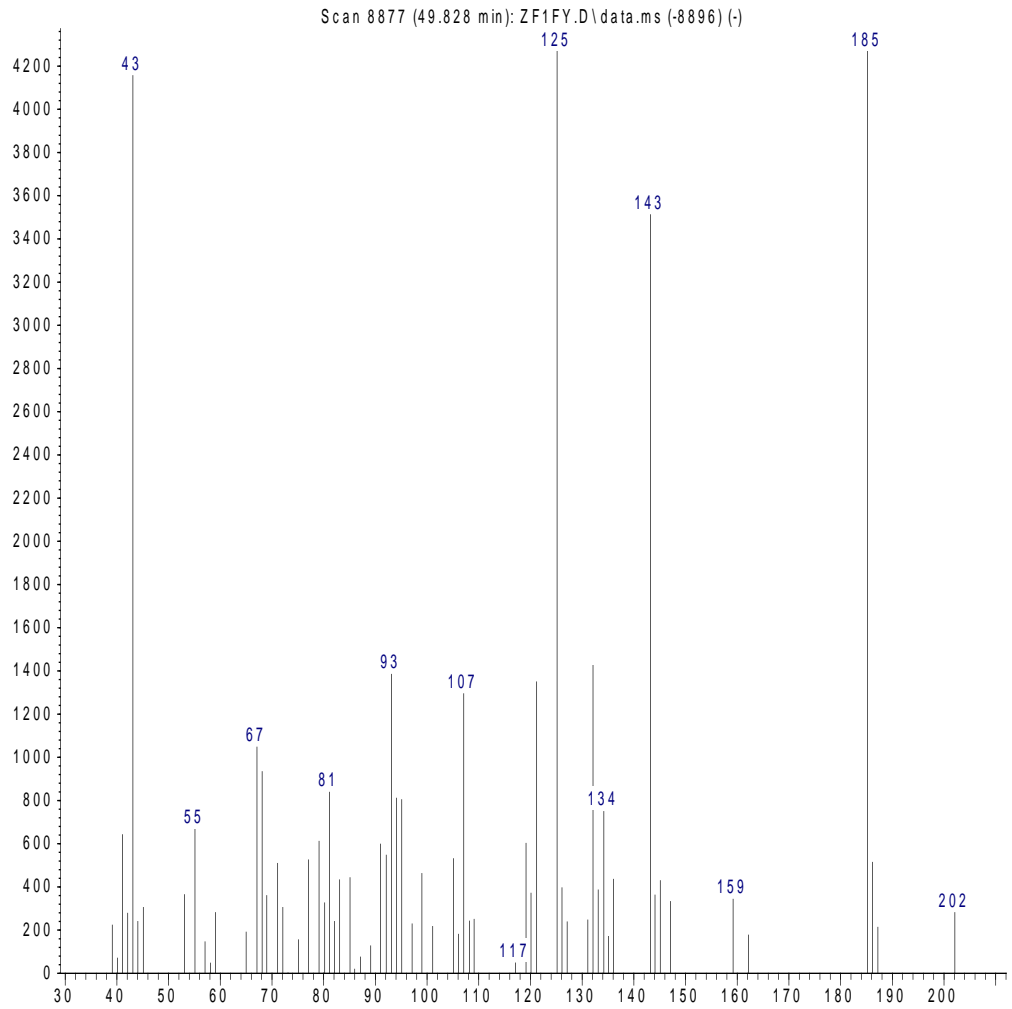
Abundance



m/z-->

EK-79. P1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

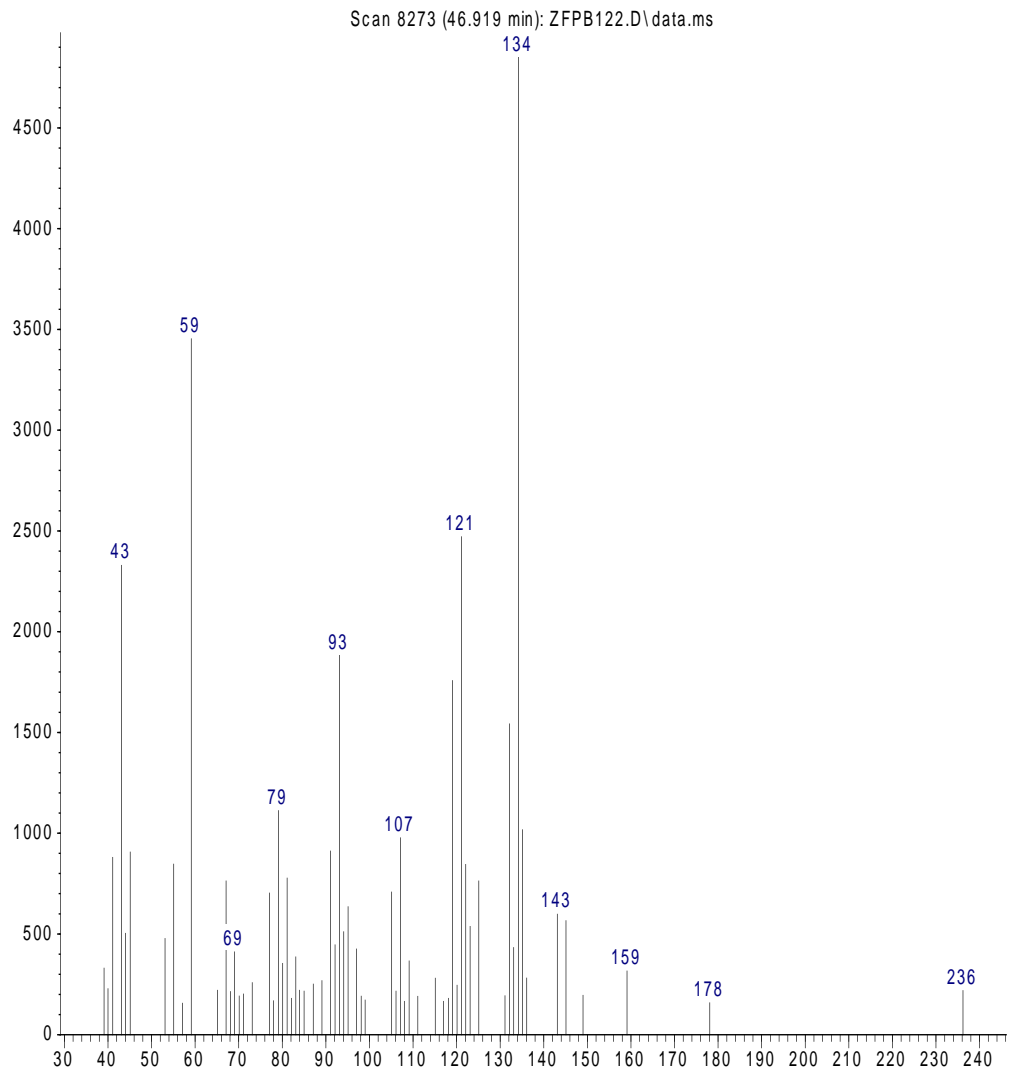
Abundance



m/z-->

EK-80. R1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

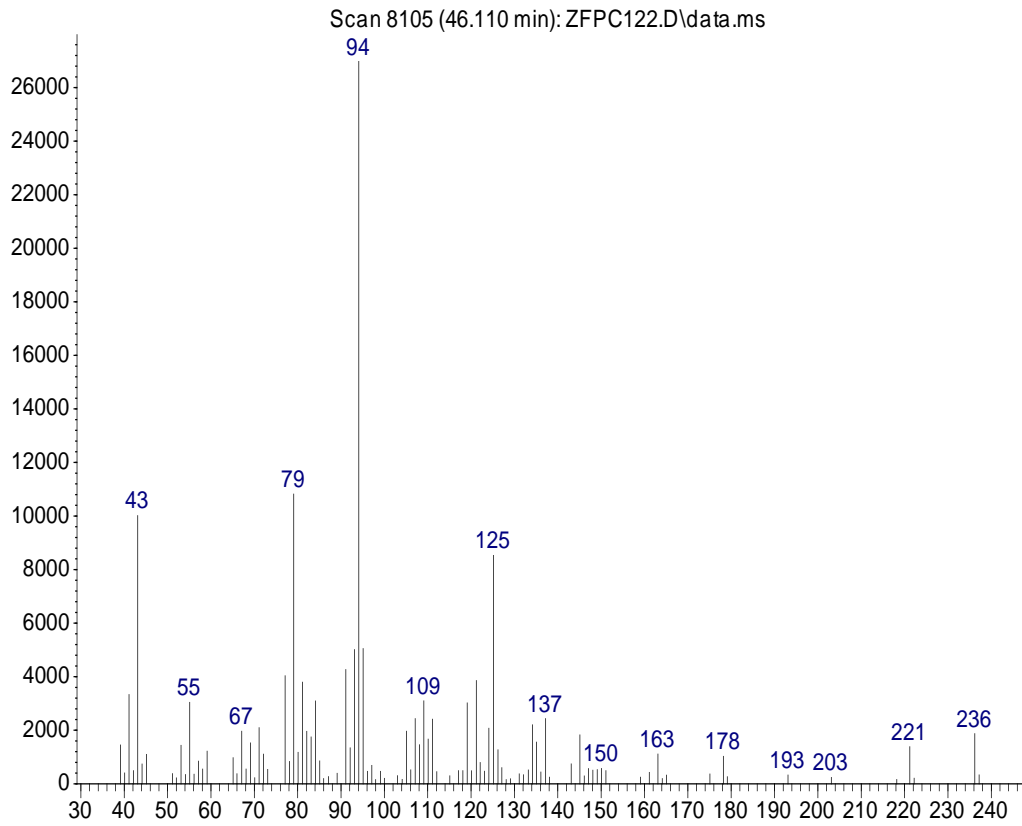
Abundance



m/z-->

EK-81. S1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

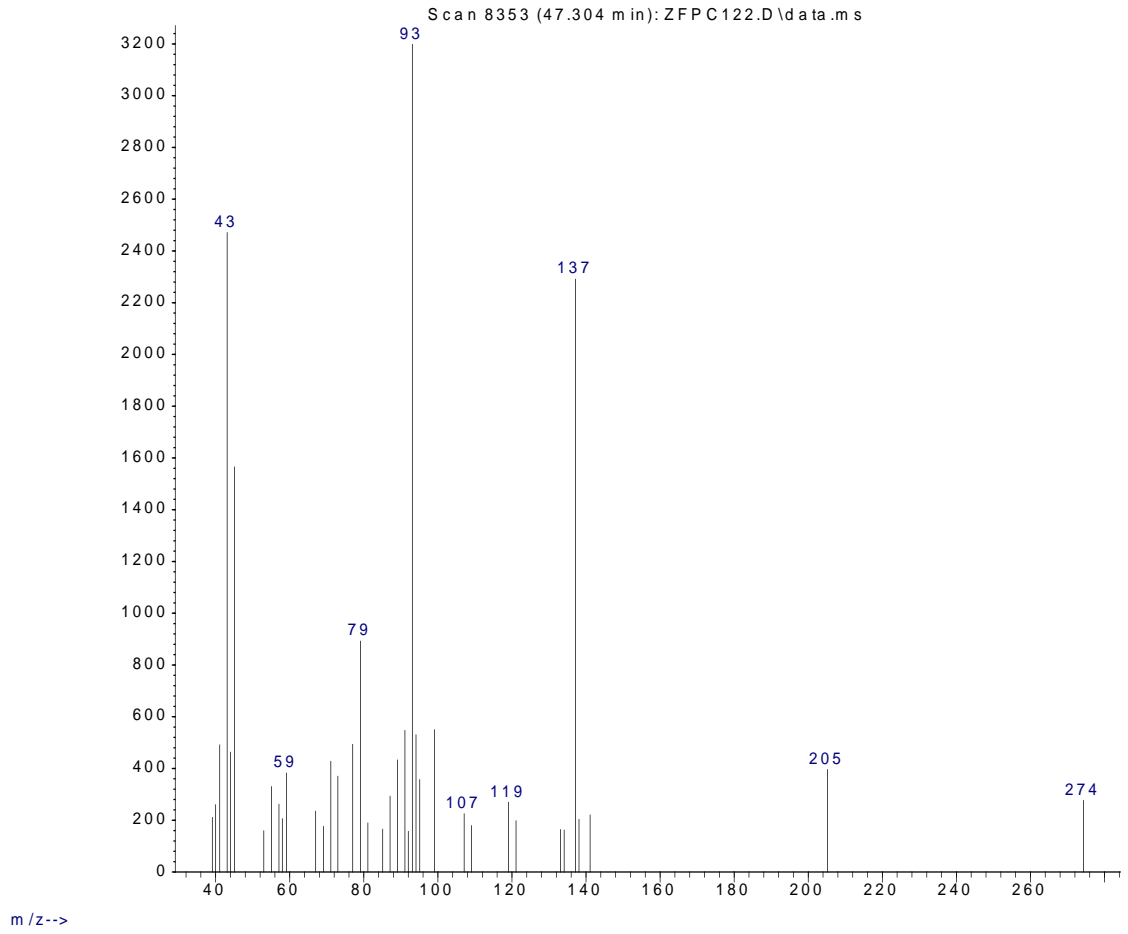
Abundance



m/z-->

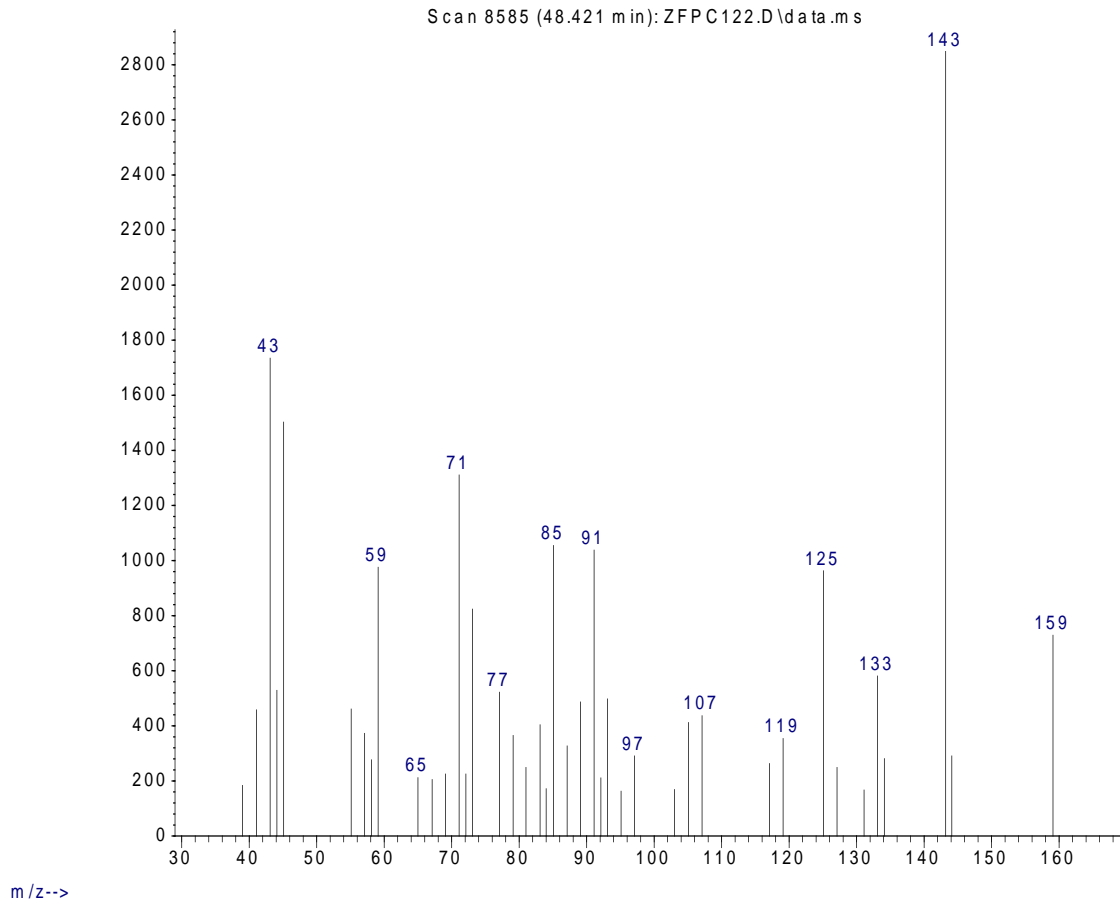
EK-82. S2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



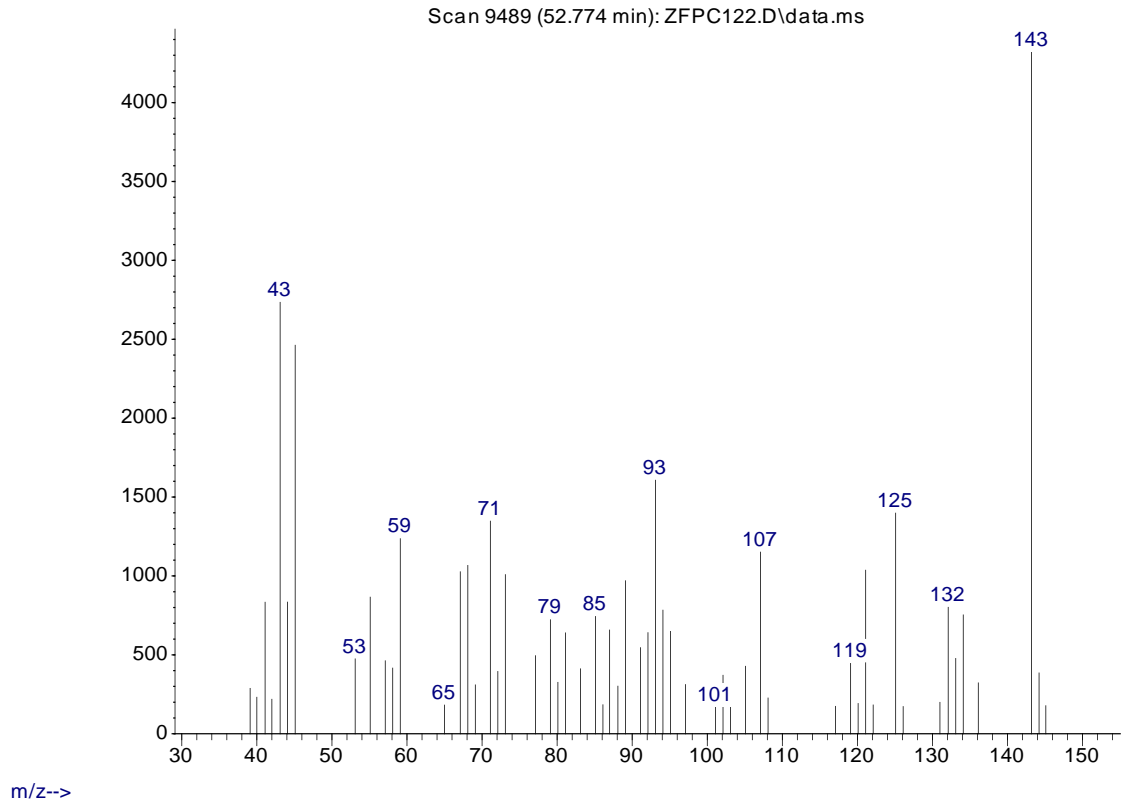
EK-83. S3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



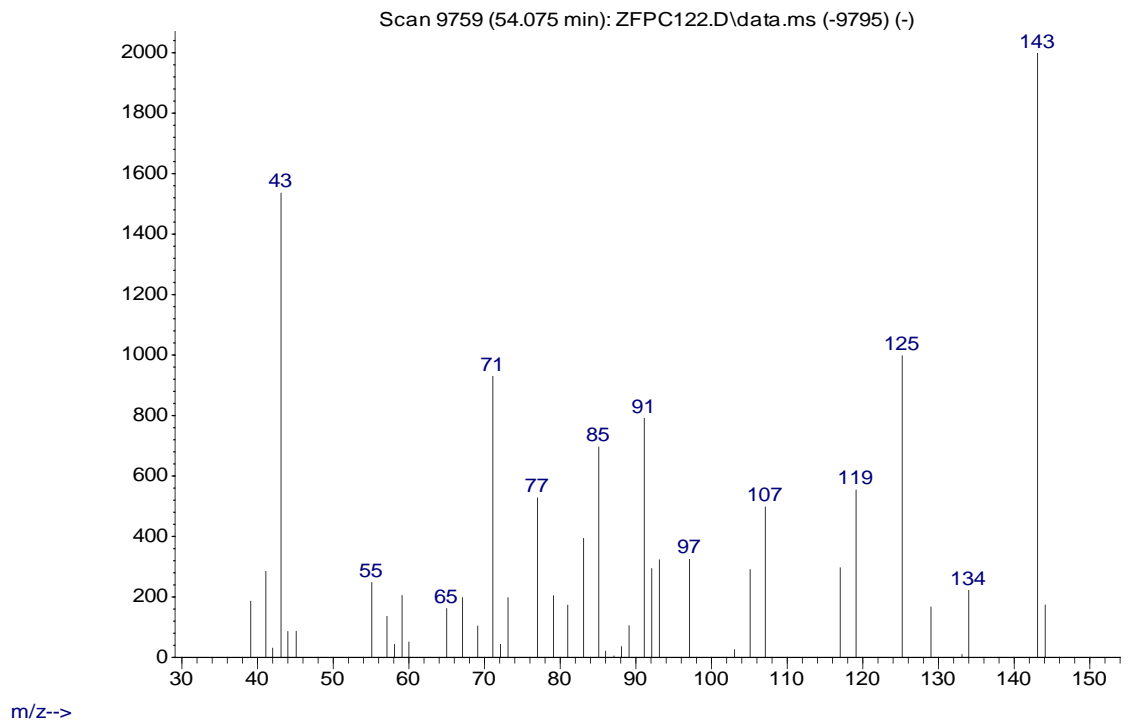
EK-84. S4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



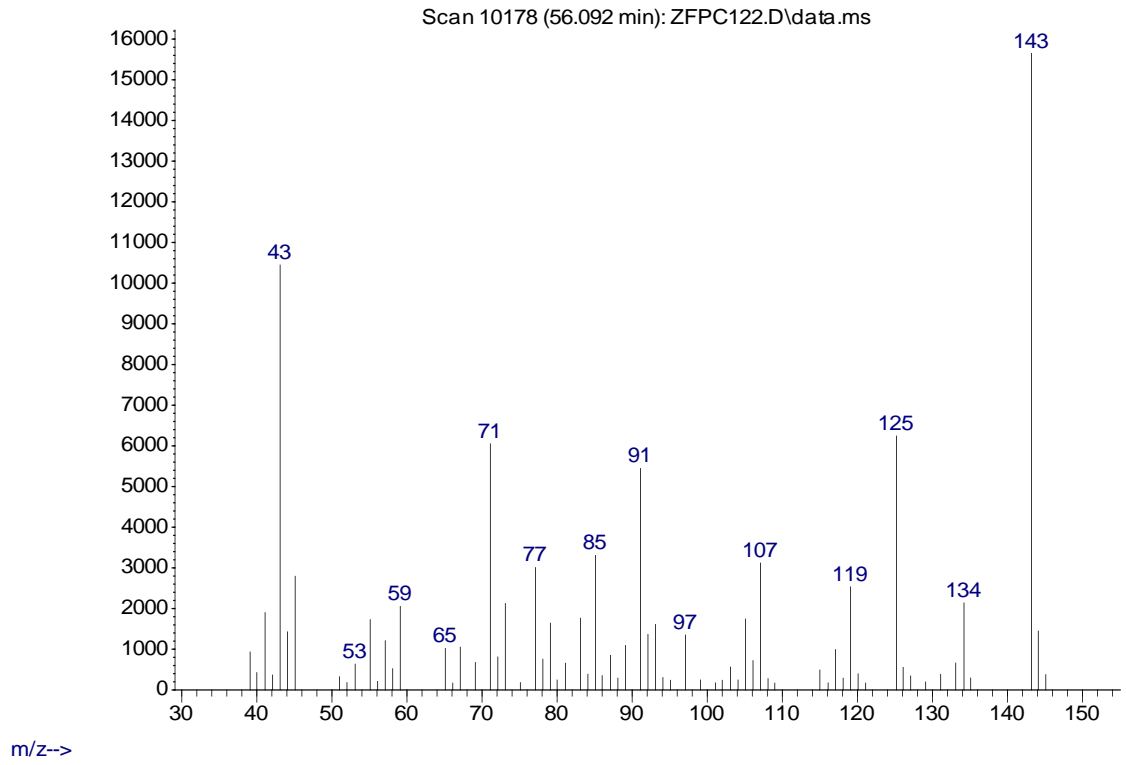
EK-85. S5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



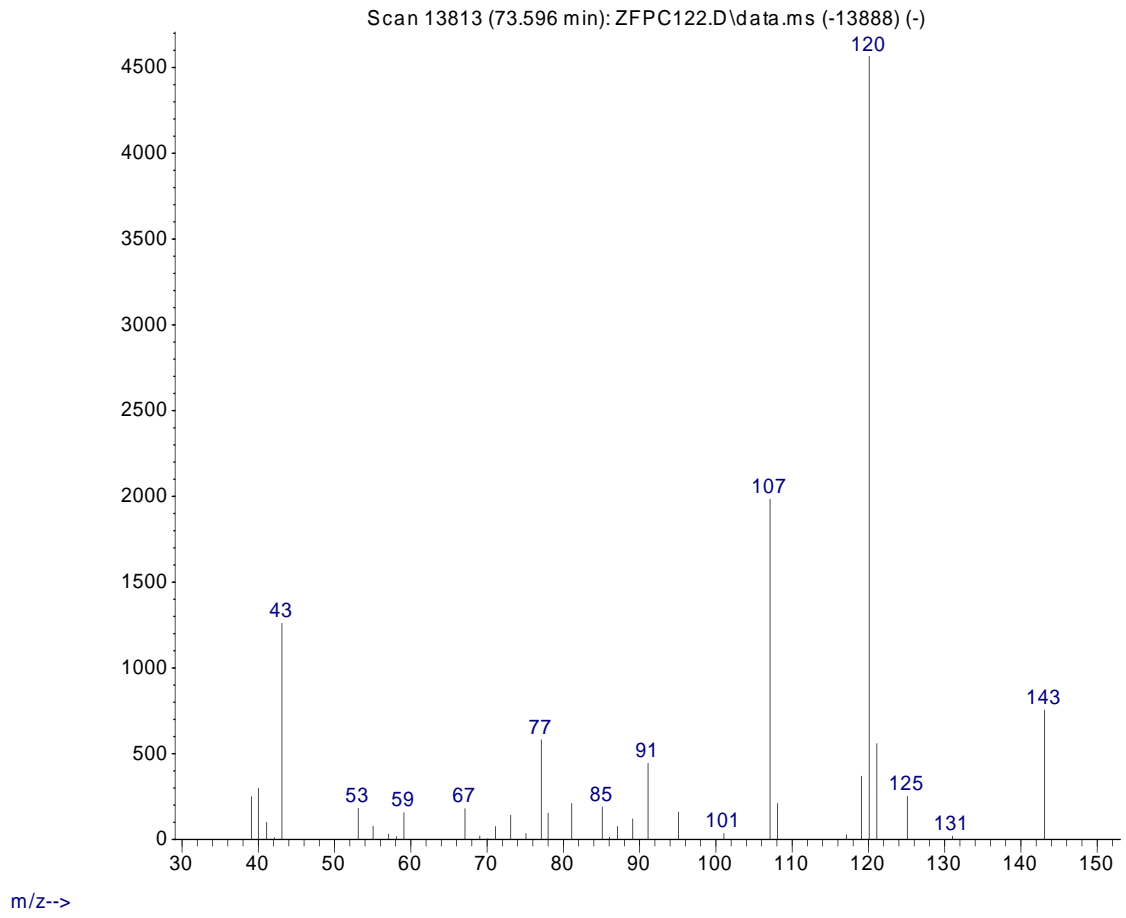
EK-86. S6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

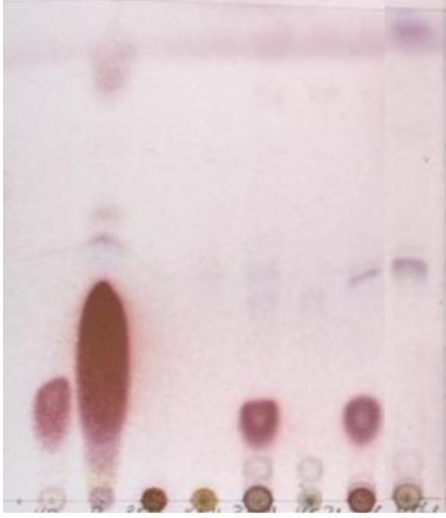


EK-87. S7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

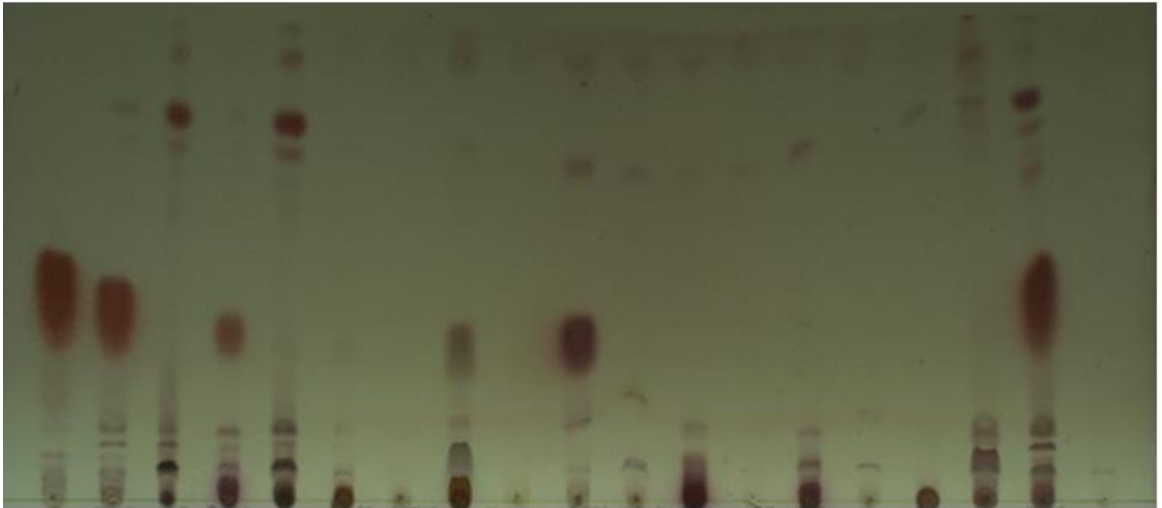


EK-88. α -Bisabolol ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



KB B BF11 KF11 BF21 KF21 BF66 KF66

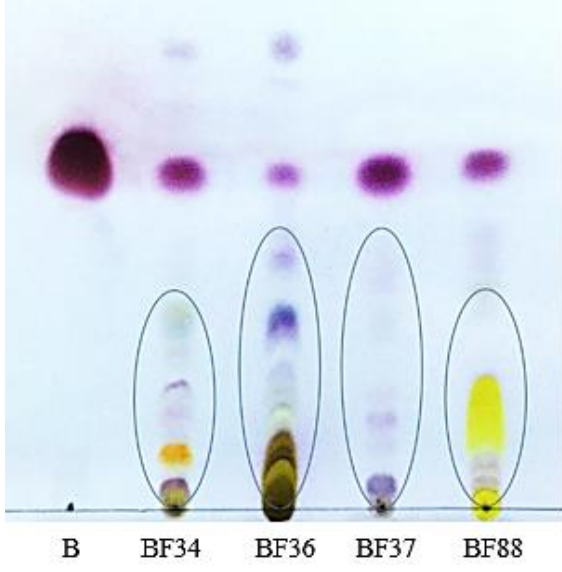
[α -Bisabolol kontrol grubu (**KB**), α -Bisabolol standart (**B**) ve onun *A. niger* ATCC 10549 (**BF11**), *P. chrysogenum* (**BF21**), *P. multicolor* (**BF66**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF11**, **KF21**, **KF66** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]



B BF9 KF9 BF10 KF10 BF12 KF12 BF15 KF15 BF29 KF29 BF27 KF27 BF39 BF54 KF54 BF74 BF75 KF75

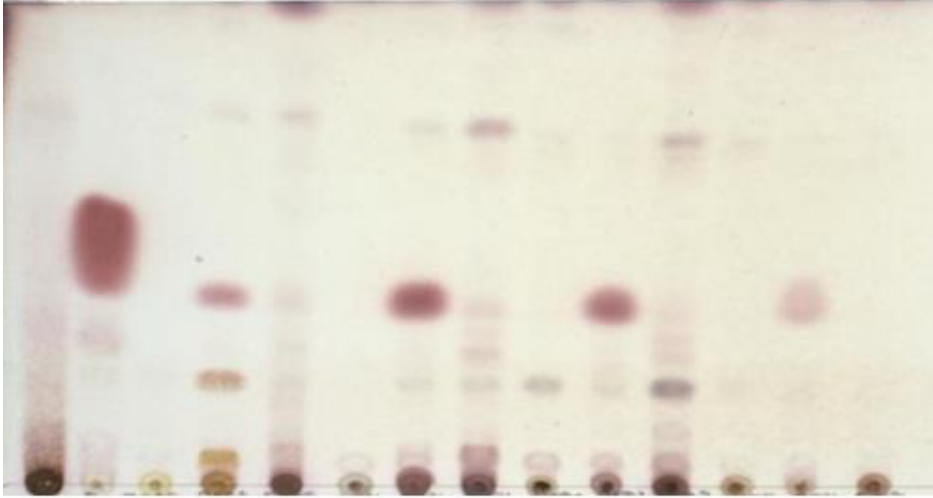
[α -Bisabolol (**B**) ve onun *A. parasiticus* (**BF9**), *A. niger* NRRL 326 (**BF10**), *A. alliaceus* (**BF12**), *A. flavus* (**BF15**), *B. velezensis* (**BF29**), *S. cerevisiae* (**BF27**), *R. stolonifer* (**BF39**), *B. cinerea* (**BF54**), *C. elegans* (**BF74**), *F. solani* (**BF75**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF9**, **KF10**, **KF12**, **KF15**, **KF29**, **KF27**, **KF54**, **KF75** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

EK-88. (Devam) α -Bisabolol ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



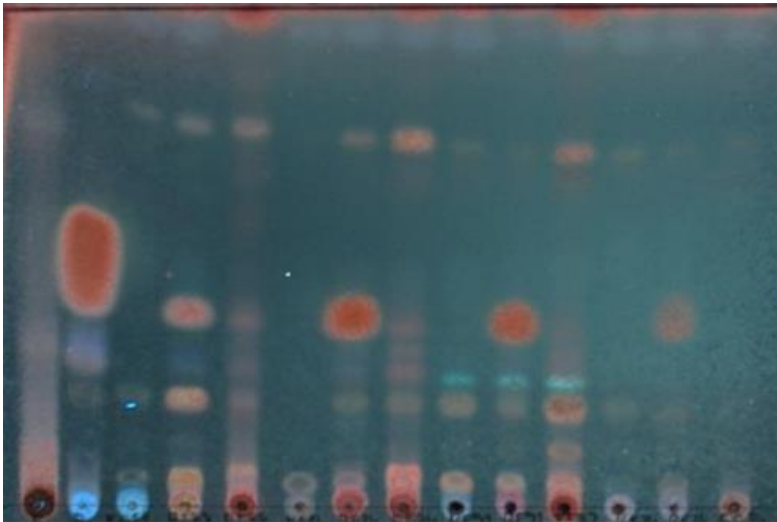
[α -Bisabolol (**B**) ve onun *T. elegans* (**BF34**), *M. ramannianus* (**BF36**), *T. harzianum* (**BF37**), *P. neocrassum* (**BF88**) biyotransformasyon ekstrelerinin metabolitleri, çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehyt-sülfürik asit]

EK-89. α -Bisabolol ve Farnesen İzomerleri Karışımının Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



F B KF88 BF88 FF88 KF24 BF24 FF24 KF92 BF92 FF92 KF34 BF34 FF34

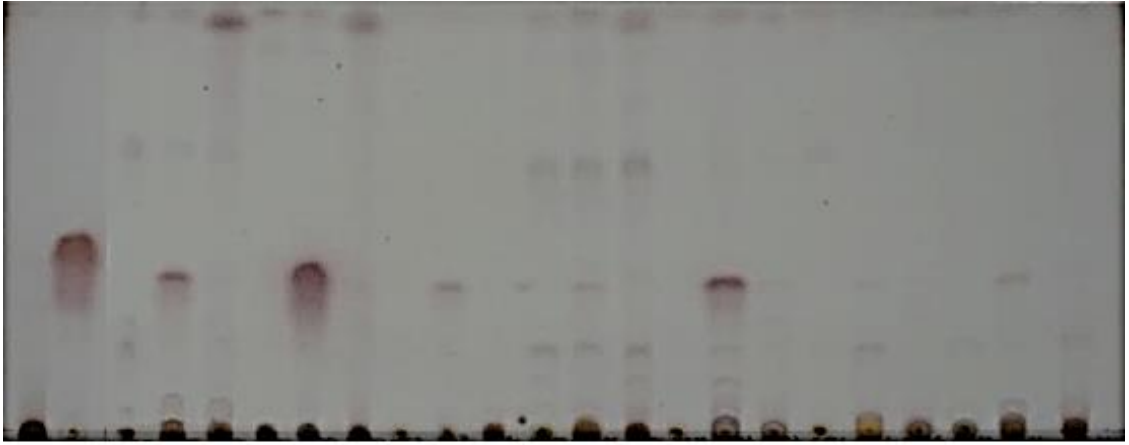
Farnesen izomerleri karışımı (F), α -Bisabolol (B) ve onların P. neocrassum (BF88, FF88), F. culmorum (BF24, FF24), P. valentinum (BF92, FF92), T. elegans (BF34, FF34) biyotransformasyon ekstreleri; KF88, KF24, KF92, KF34 kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]



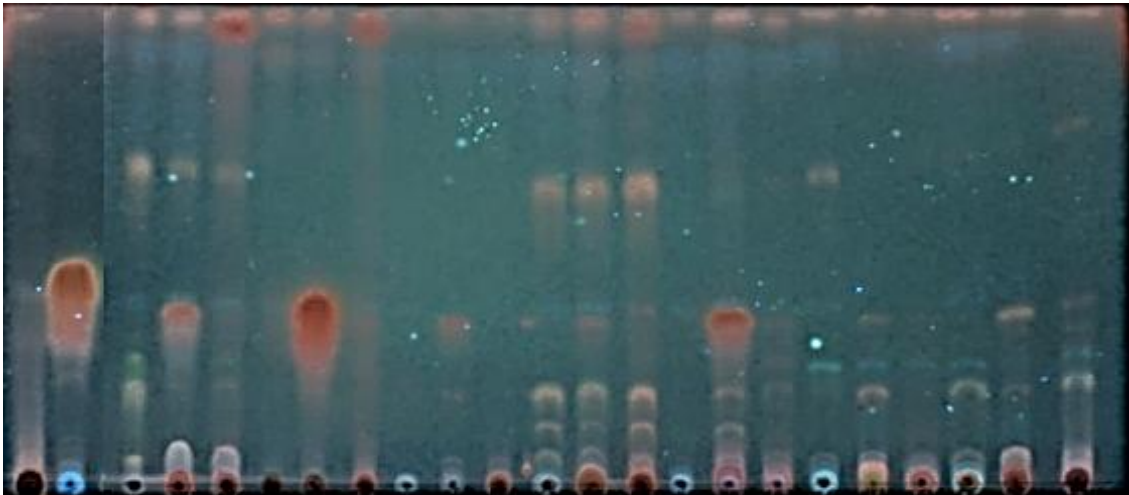
F B KF88 BF88 FF88 KF24 BF24 FF24 KF92 BF92 FF92 KF34 BF34 FF34

Farnesen izomerleri karışımı (F), α -Bisabolol (B) ve onların P. neocrassum (BF88, FF88), F. culmorum (BF24, FF24), P. valentinum (BF92, FF92), T. elegans (BF34, FF34) biyotransformasyon ekstreleri; KF88, KF24, KF92, KF34 kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit sonrası 366 nm'de]

EK-89. (Devam) α -Bisabolol ve Farnesen İzomerleri Karışımının Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



Farnesen izomerleri karışımı (**F**), α -Bisabolol (**B**) ve onların *A. flavus* (**BF15**, **FF15**), *P. adametzii* (**BF20**, **FF20**), *T. elegans* (**BF34**, **FF34**), *M. ramannianus* (**BF36**, **FF36**), *T. harzianum* (**BB37**, **FF37**), *C. cassiicola* (**BB46**, **FF46**), *C. elegans* (**BF74**, **FF74**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF15**, **KF20**, **KF34**, **KF36**, **KF37**, **KF46**, **KF74** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]



[Farnesen izomerleri karışımı (**F**), α -Bisabolol (**B**) ve onların *A. flavus* (**BF15**, **FF15**), *P. adametzii* (**BF20**, **FF20**), *T. elegans* (**BF34**, **FF34**), *M. ramannianus* (**BF36**, **FF36**), *T. harzianum* (**BB37**, **FF37**), *C. cassiicola* (**BB46**, **FF46**), *C. elegans* (**BF74**, **FF74**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF15**, **KF20**, **KF34**, **KF36**, **KF37**, **KF46**, **KF74** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit sonrası 366 nm'de]

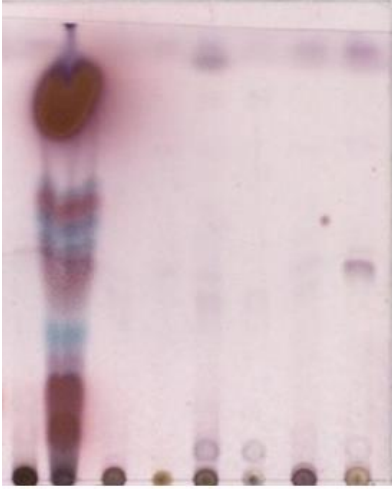
EK-89. (Devam) α -Bisabolol ve Farnesen İzomerleri Karışımının Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



F FB29 KB29 KF74 FF74 FF75 KF75

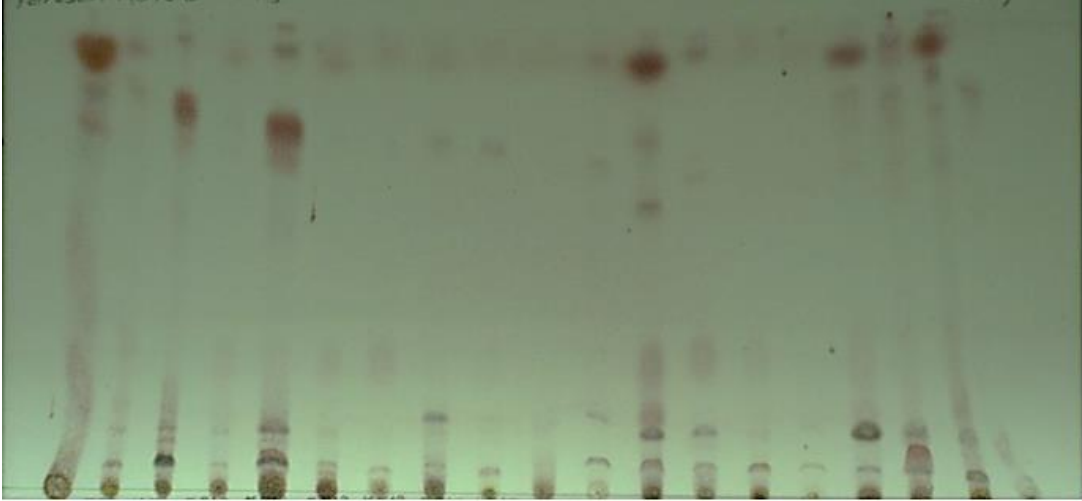
[Farnesen izomerleri karışımı (**F**) ve onun *B. velezensis* (**FB29**), *C. elegans* (**FF74**), *F. solani* (**FF75**) biyotransformasyon ekstreleri; **KB29**, **KF74**, **KF75** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

EK-90. Farnesen İzomerleri Karışımı ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



KF F FF11 KF11 FF21 KF15 FF66 KF66

[Farnesen izomerleri karışımı kontrol grubu (**KF**), Farnesen izomerleri karışımı standart (**F**) ve onun *A. niger* ATCC 10549 (**FF11**), *P. chrysogenum* (**FF21**), *P. multicolor* (**FF66**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF11**, **KF21**, **KF66** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

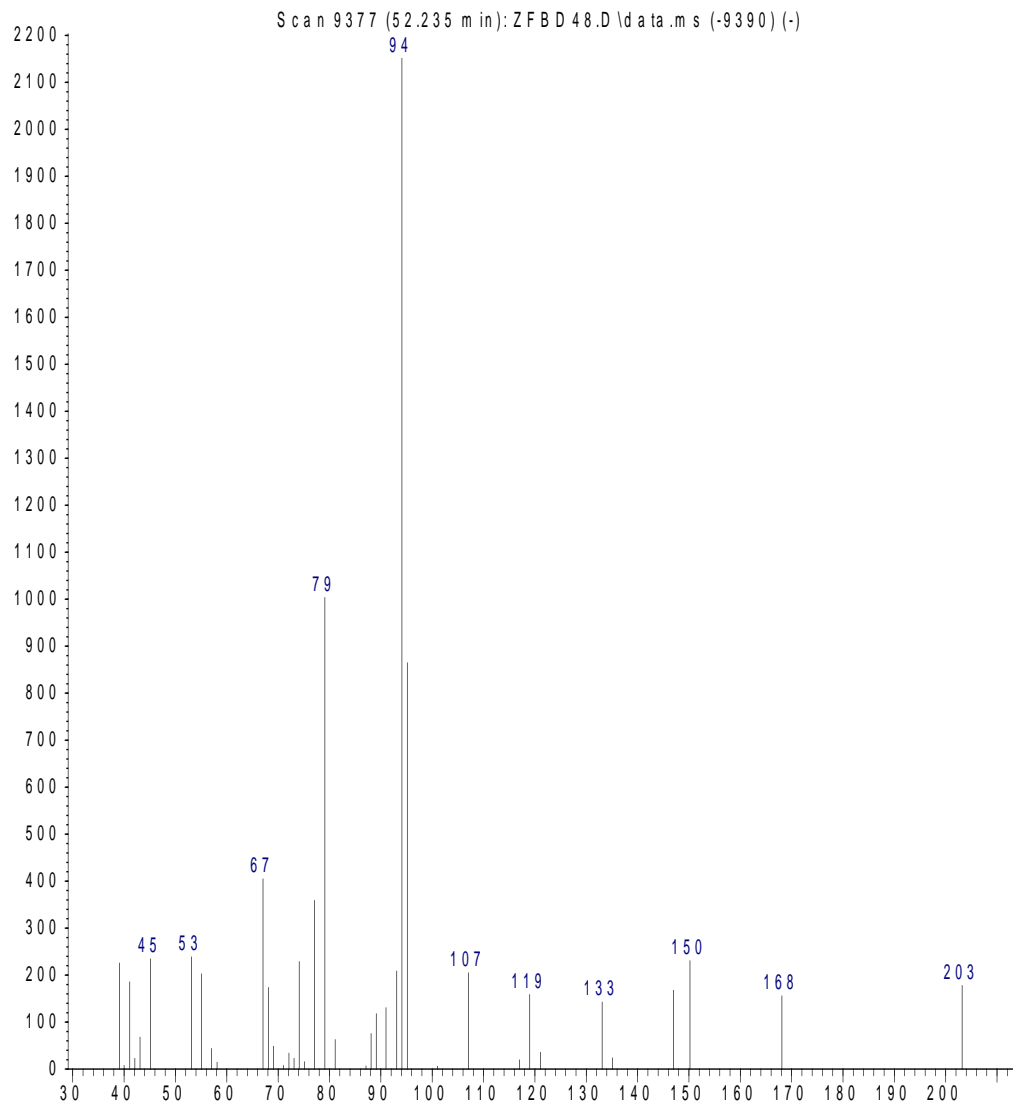


F FF9 KF9 KF10 FF10 FF12 KF12 FF15 KF15 FF27 KF27 FF39 KF39 FF54 KF54 KF74 FF74 FF75 KF75

[Farnesen izomerleri karışımı (**F**) ve onun *A. parasiticus* (**FF9**), *A. niger* NRRL 326 (**FF10**), *A. alliaceus* (**FF12**), *A. flavus* (**FF15**), *S. cerevisiae* (**FF27**), *R. stolonifer* (**FF39**), *B. cinerea* (**FF54**), *C. elegans* (**FF74**), *F. solani* (**BF75**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF10**, **KF12**, **KF15**, **KF27**, **KF39**, **KF54**, **KF74**, **KF75** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

EK-91. BA1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

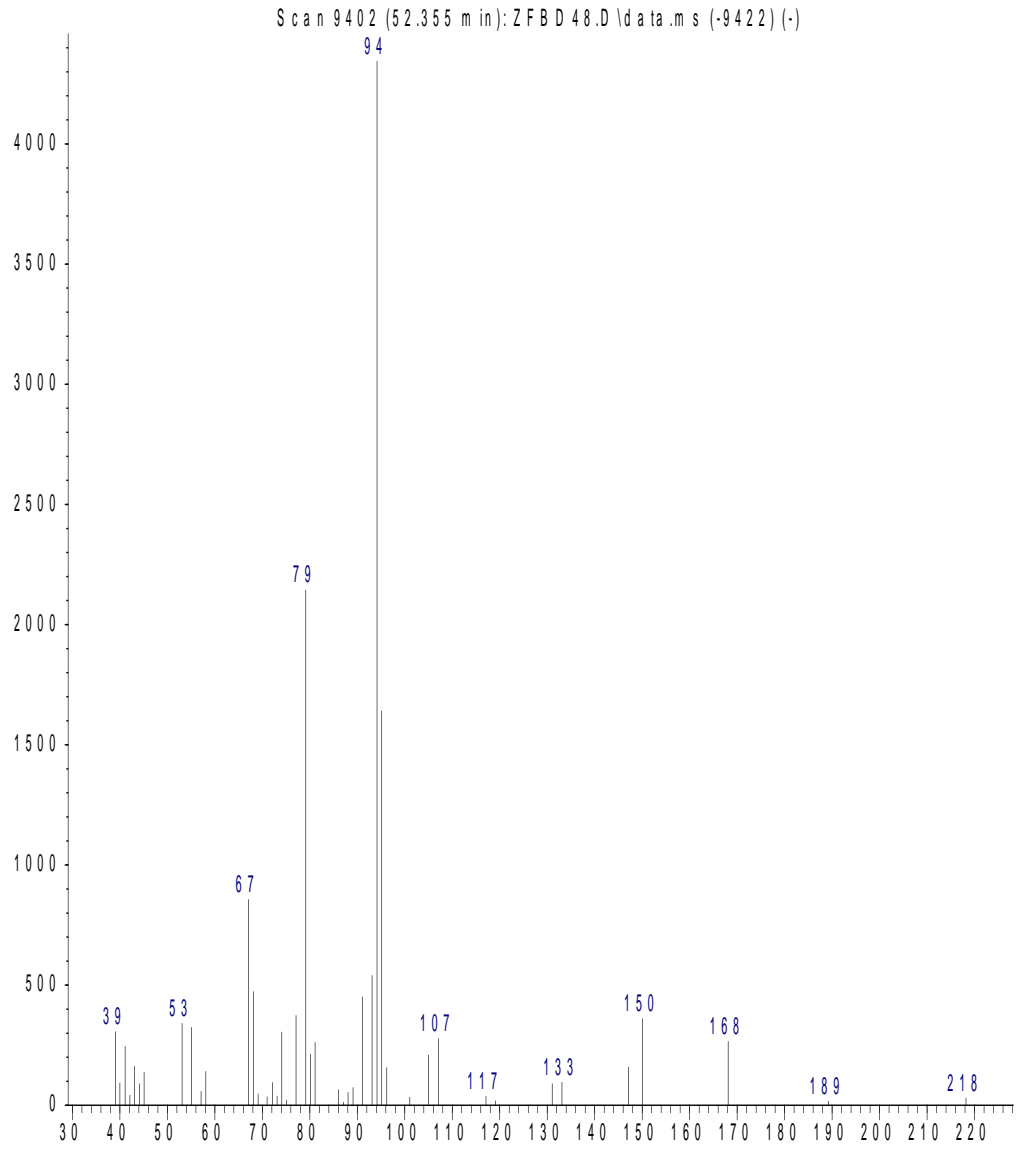
Abundance



m/z-->

EK-92. BA2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

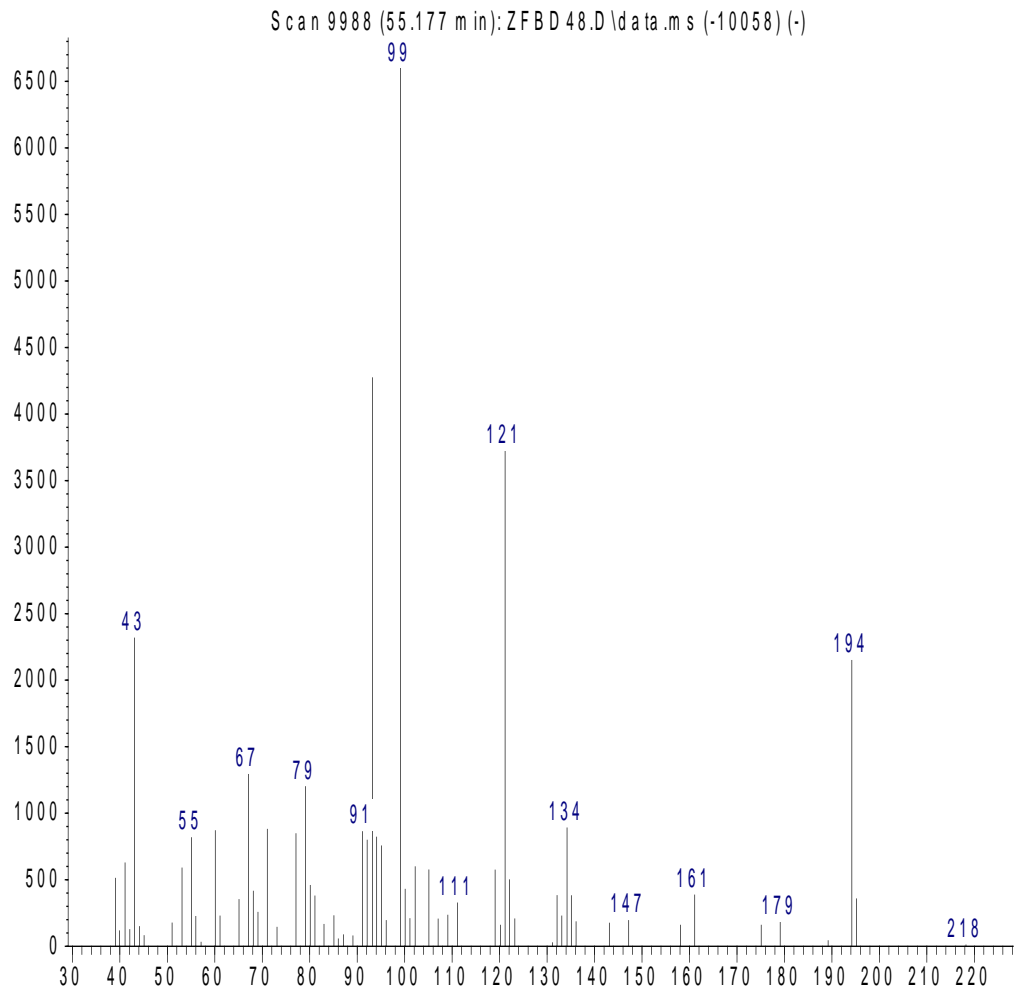
Abundance



m/z-->

EK-93. BA3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

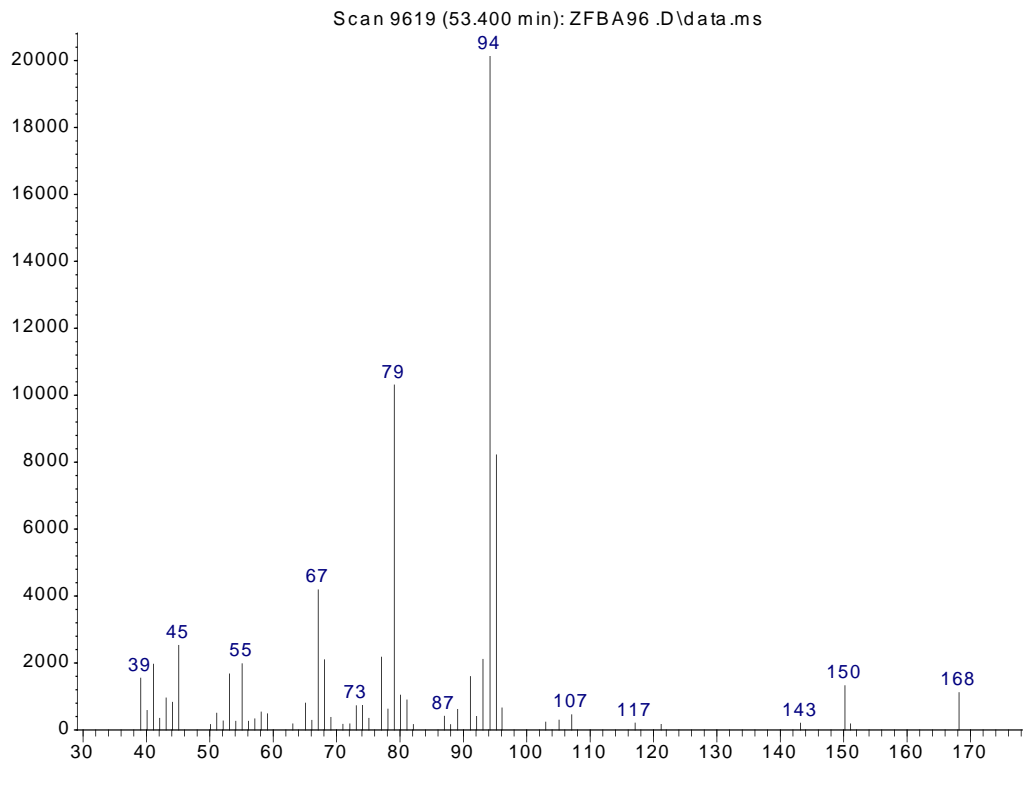
Abundance



m/z-->

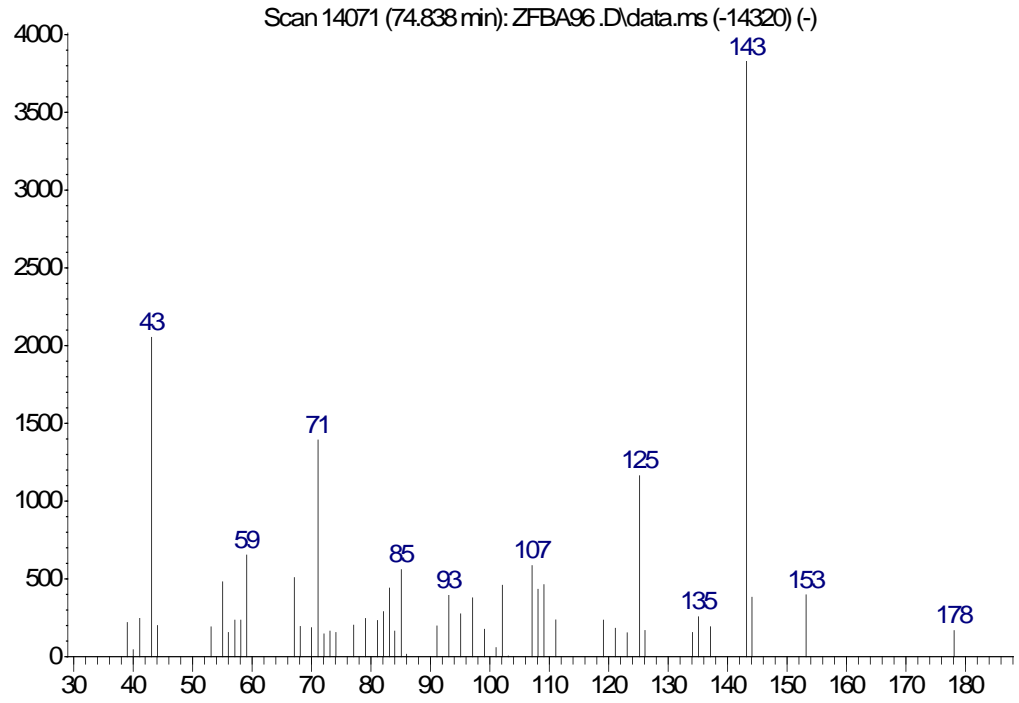
EK-94. BB3 Metabolitinin GC/MS Spektrum

Abundance



EK-95. BB4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

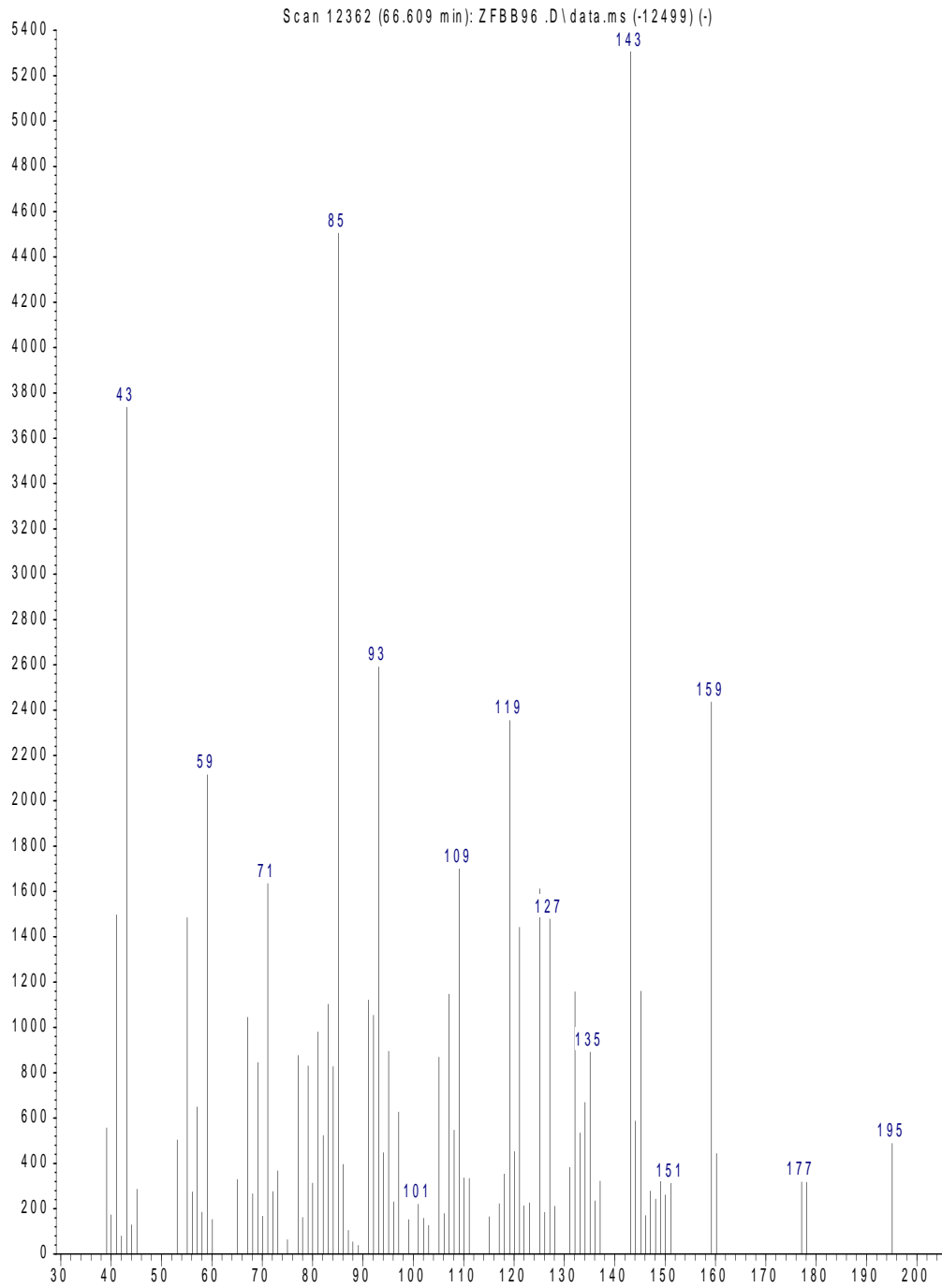
Abundance



m/z->

EK-96. BC1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

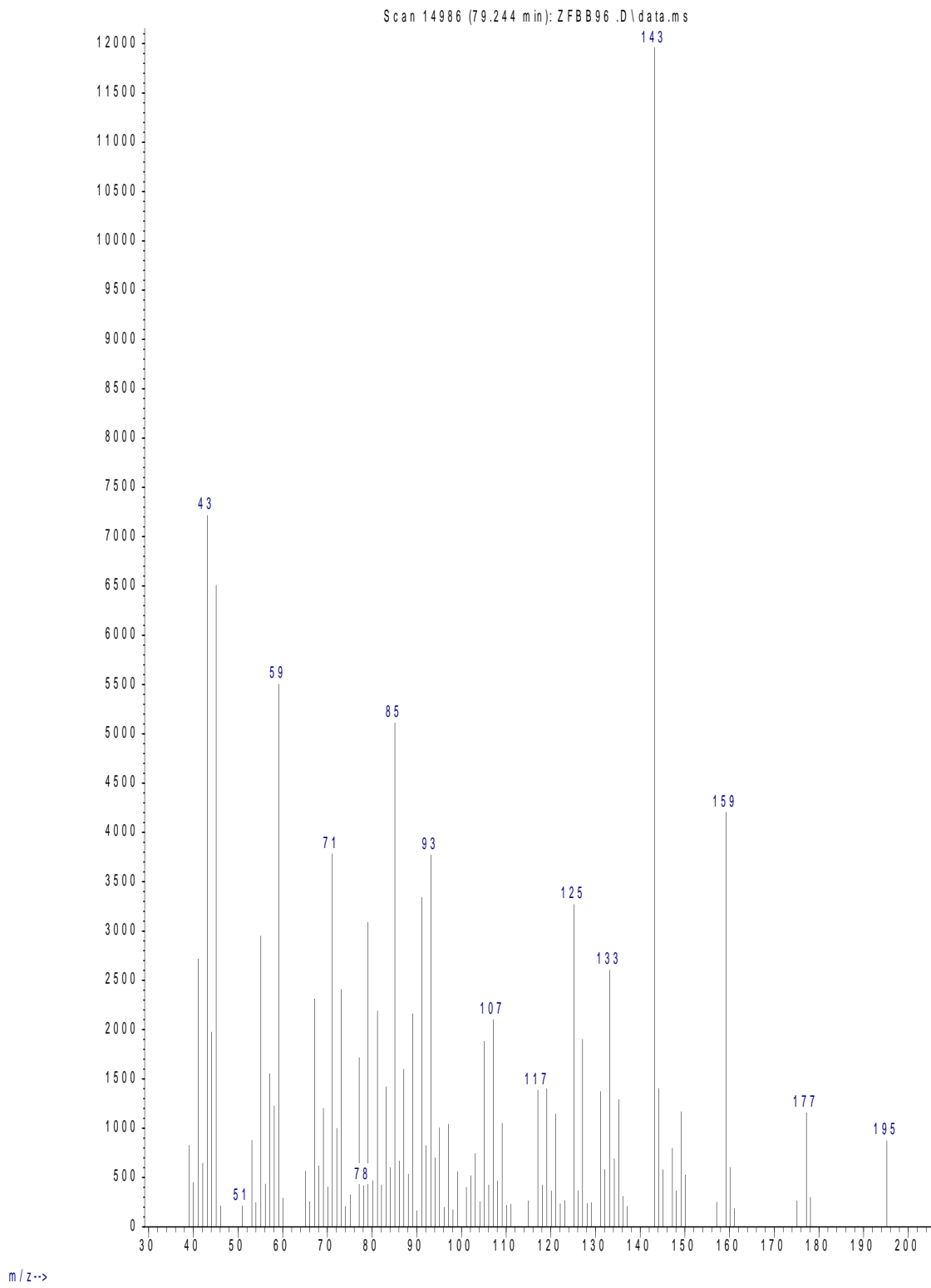
Abundance



m/z-->

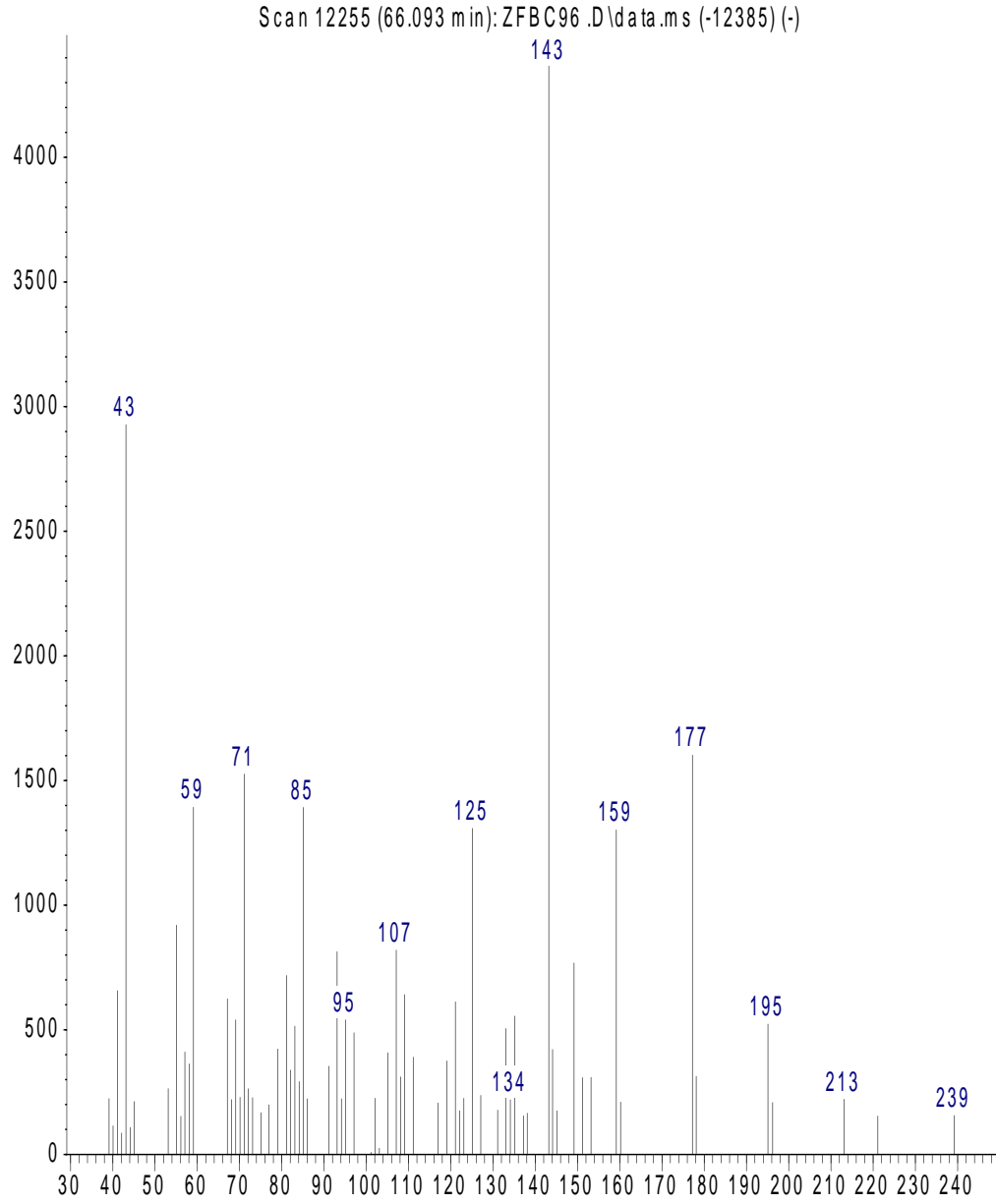
EK-97. BC2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-98. BD1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

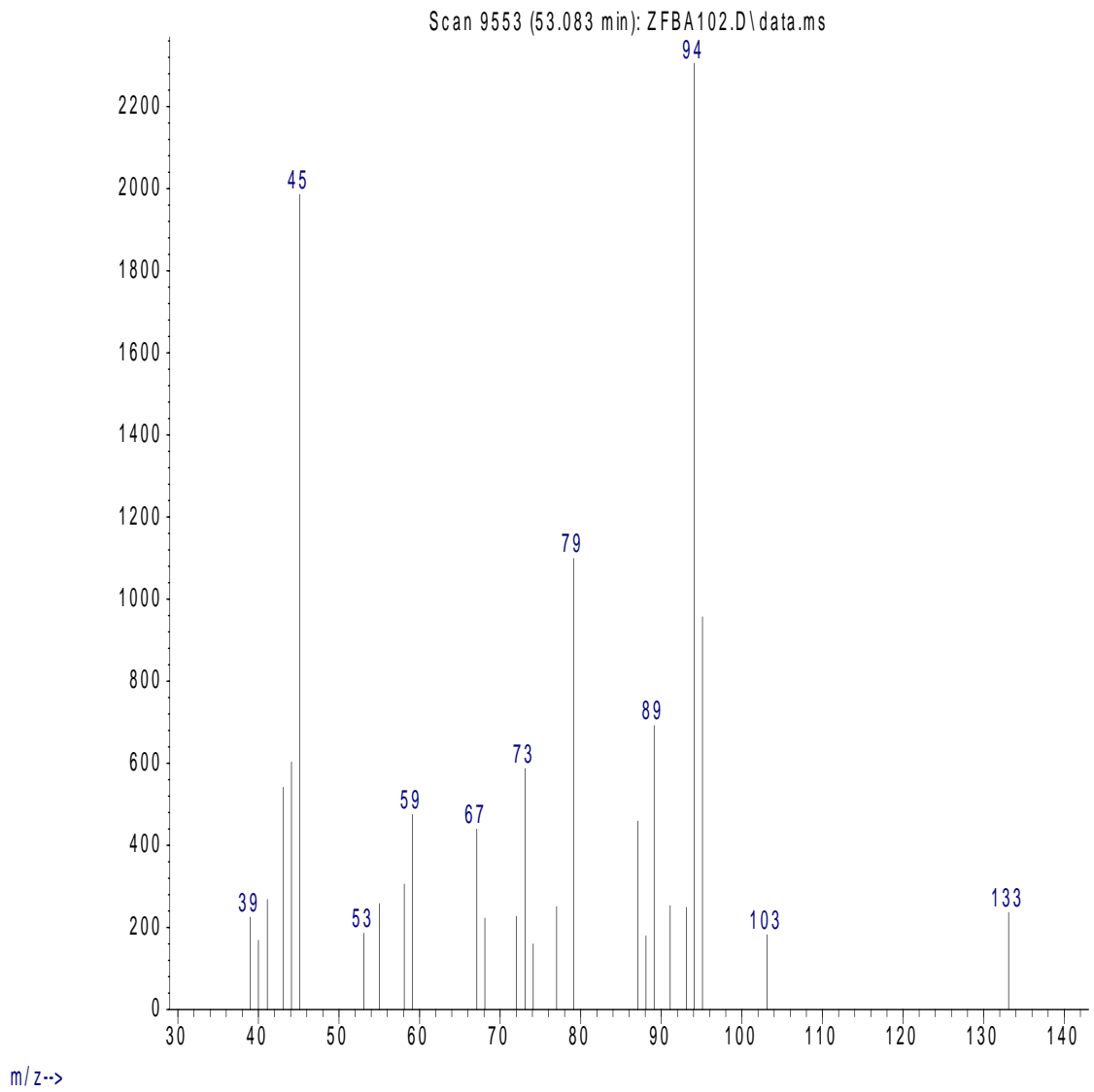
Abundance



m/z-->

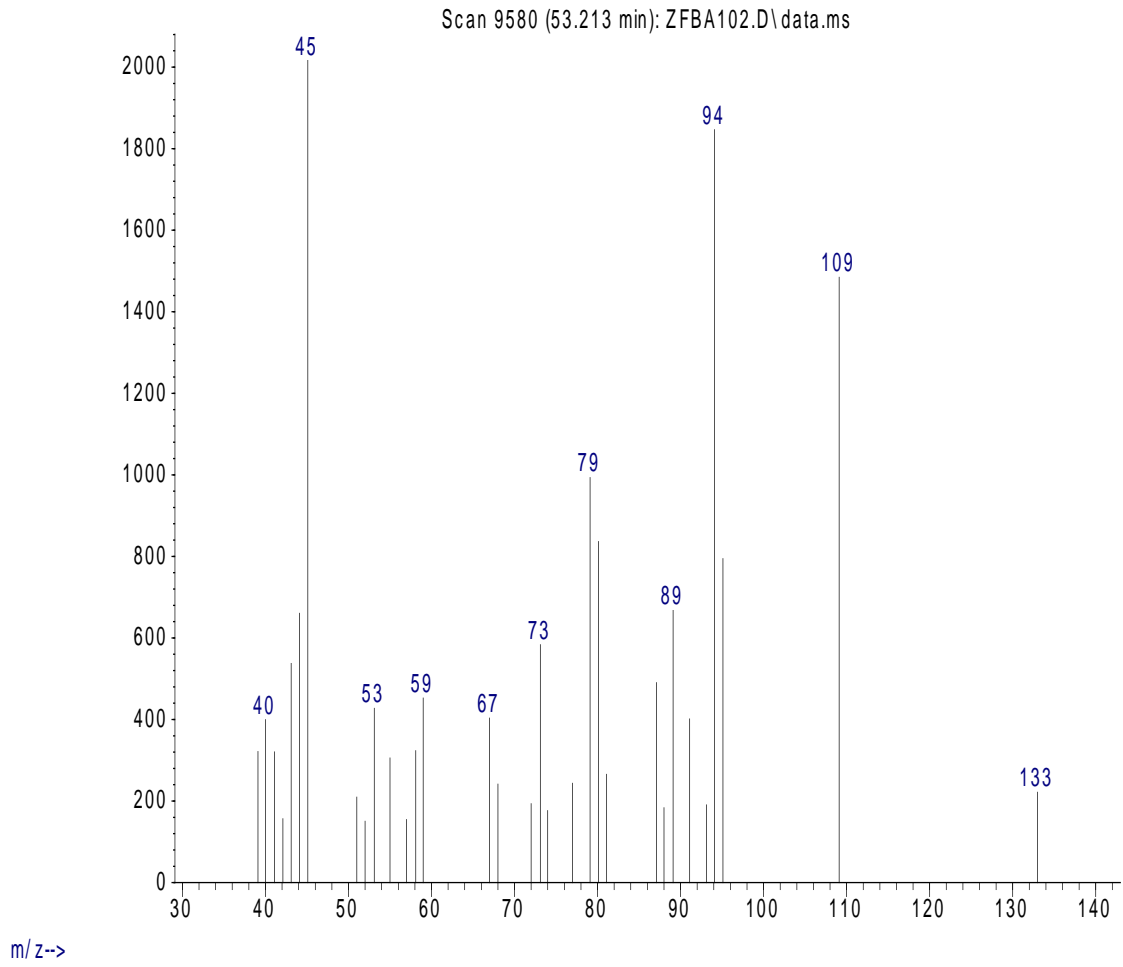
EK-99. BF2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



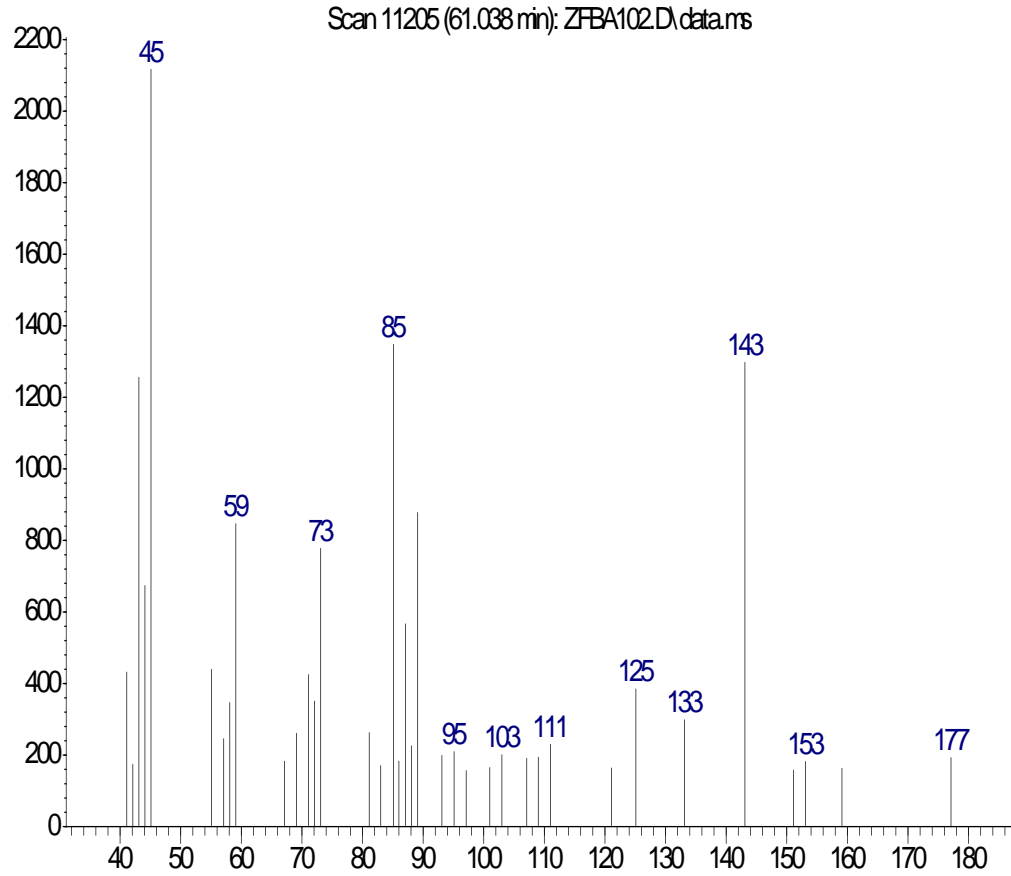
EK-100. BF3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-101. BF4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

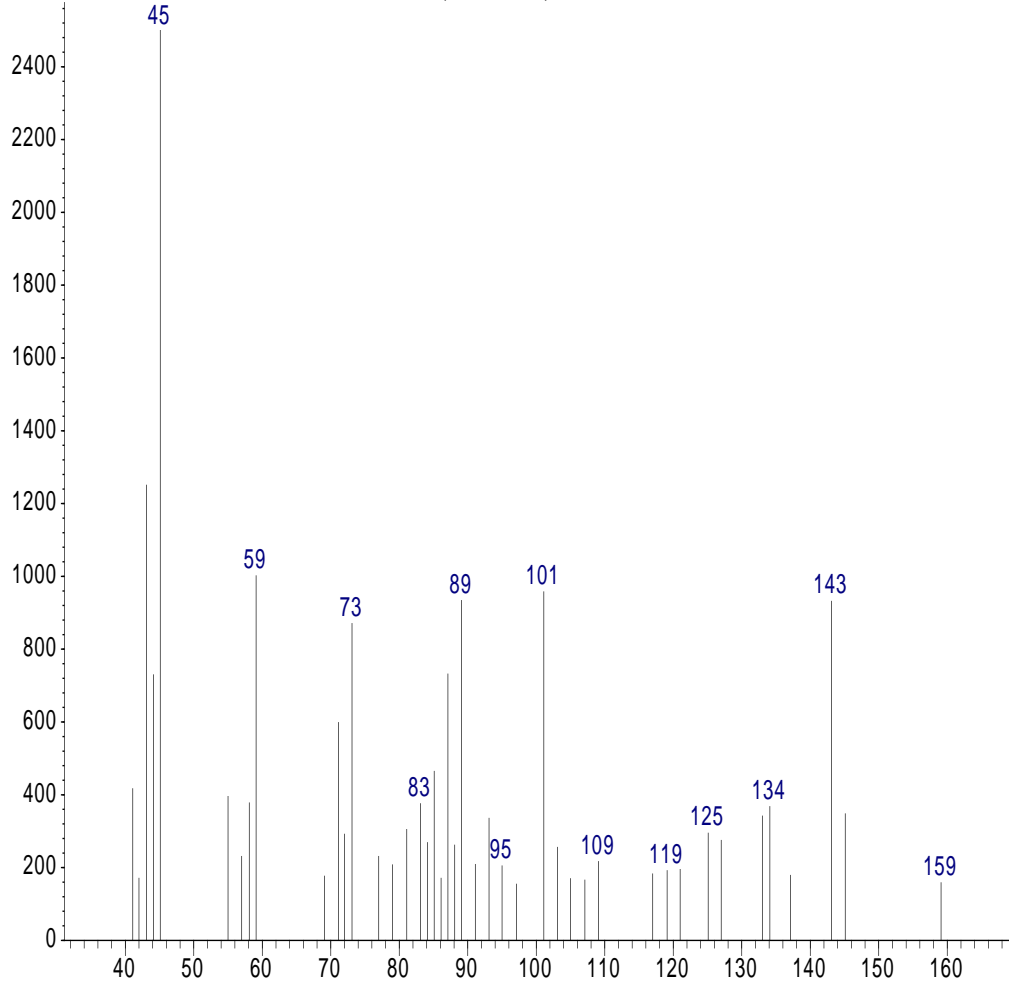


m/z->

EK-102. BF5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance

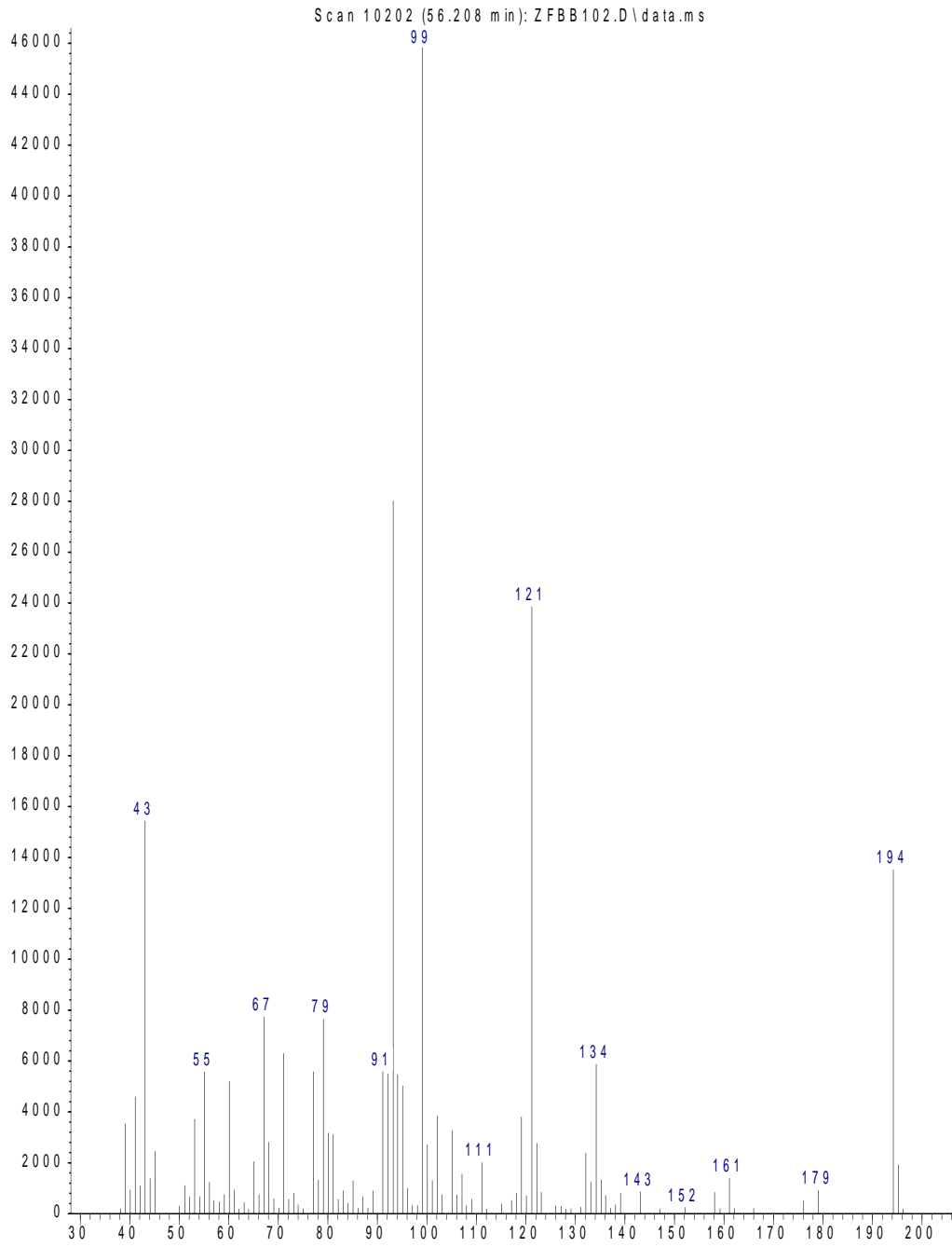
Scan 11798 (63.893 min): ZFBA102.D\data.ms



m/z-->

EK-103. BG1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

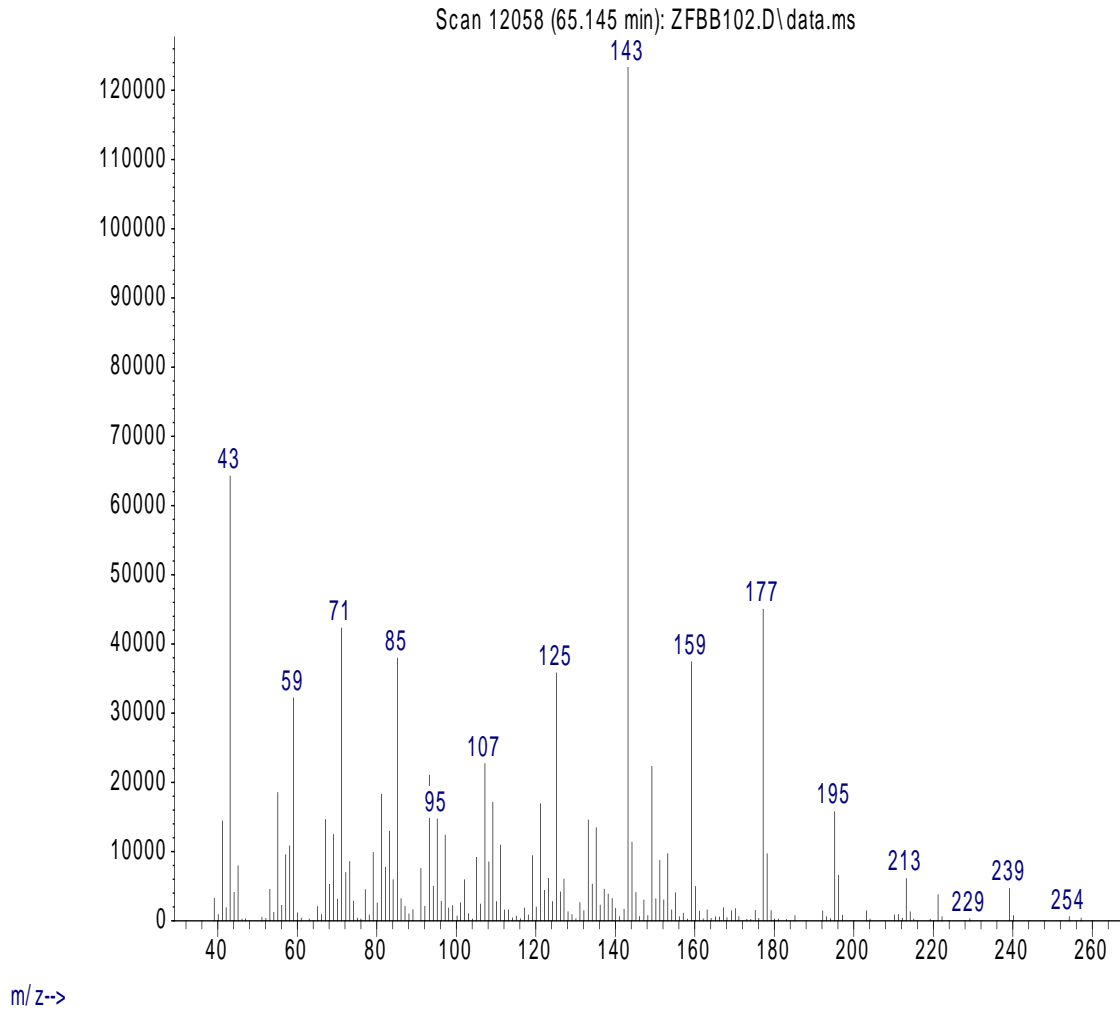
Abundance



m/z-->

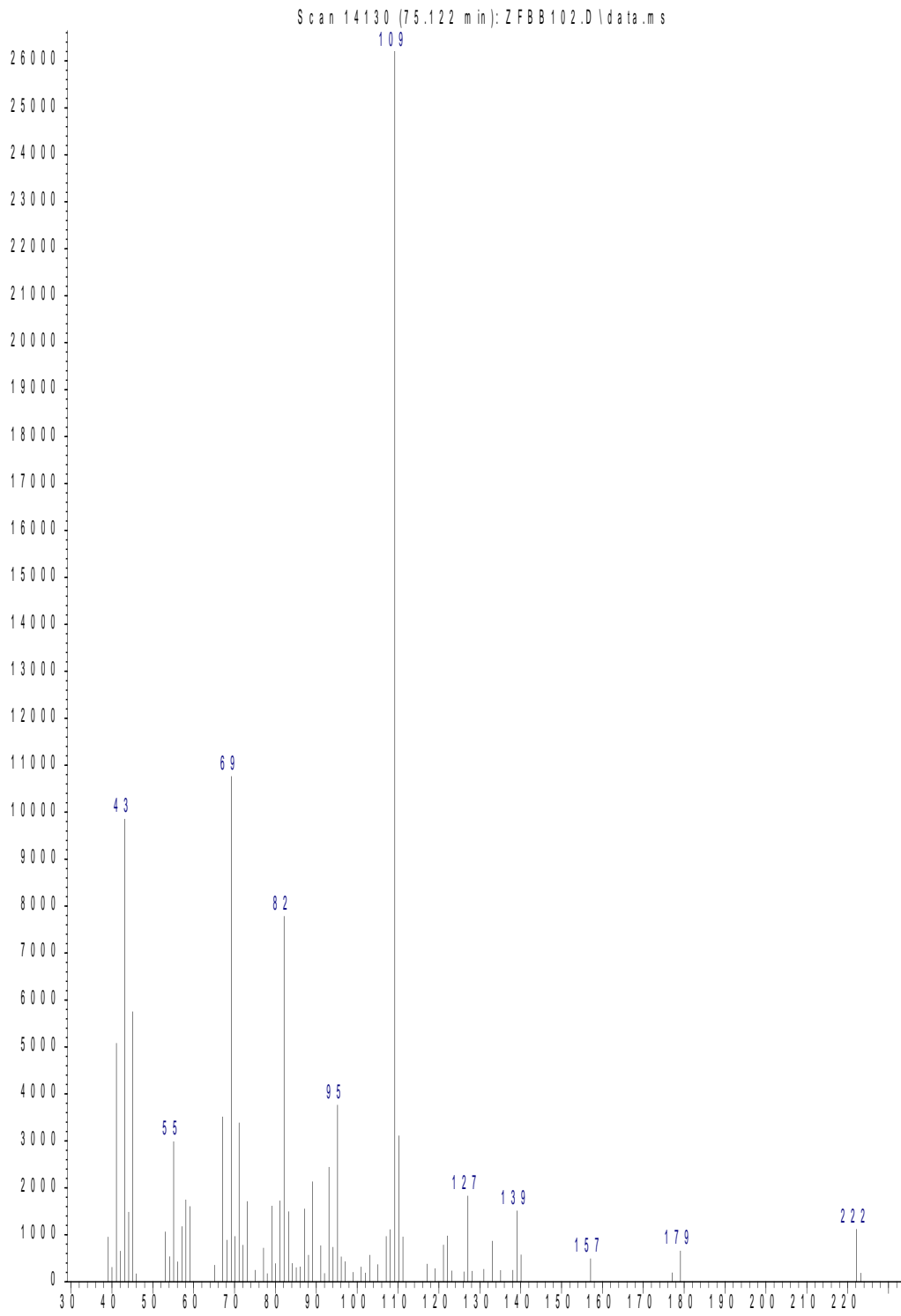
EK-104. BG2 metabolitinin MS spektrumu

Abundance



EK-105. BG3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

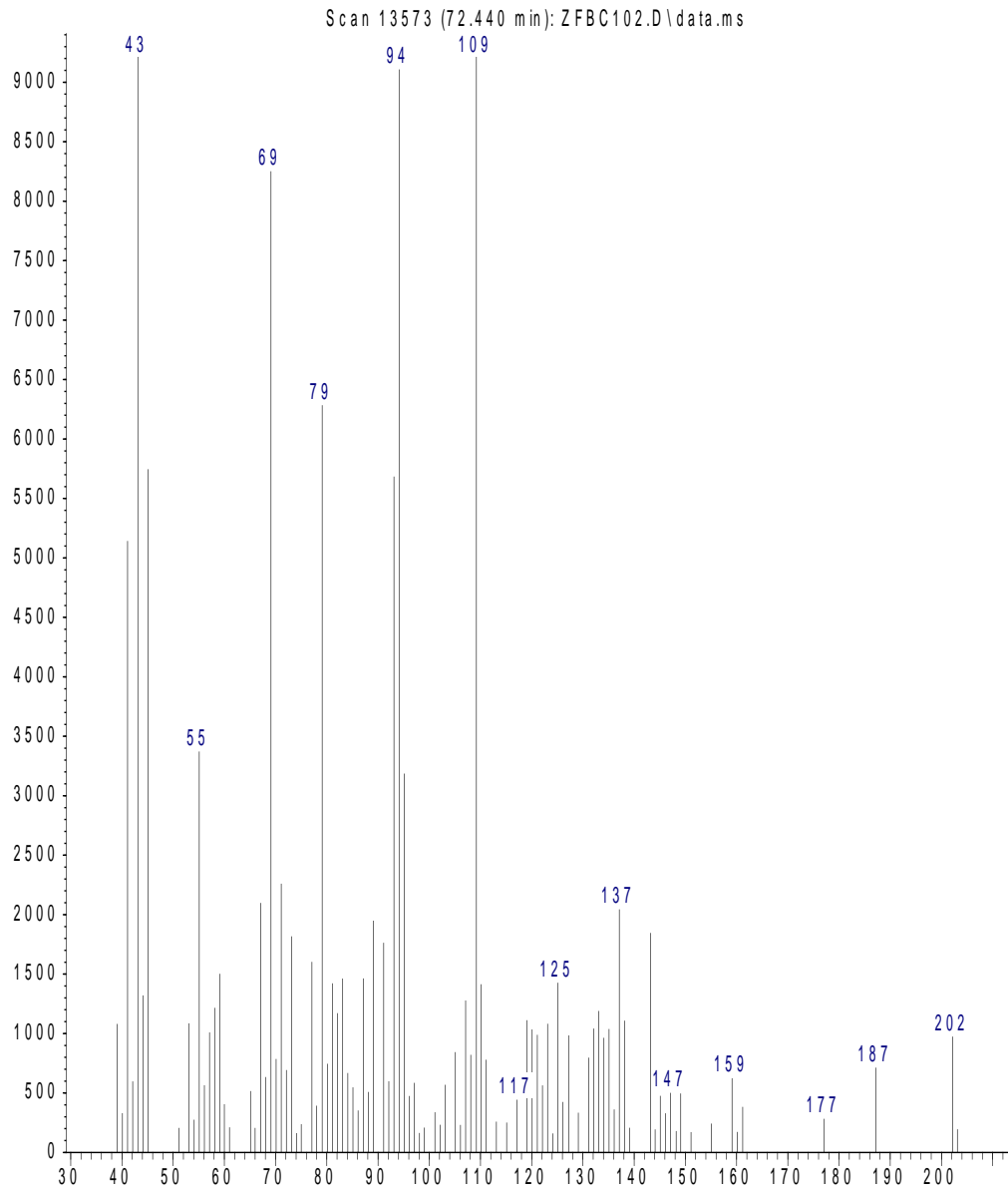
Abundance



m/z-->

EK-106. BH2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

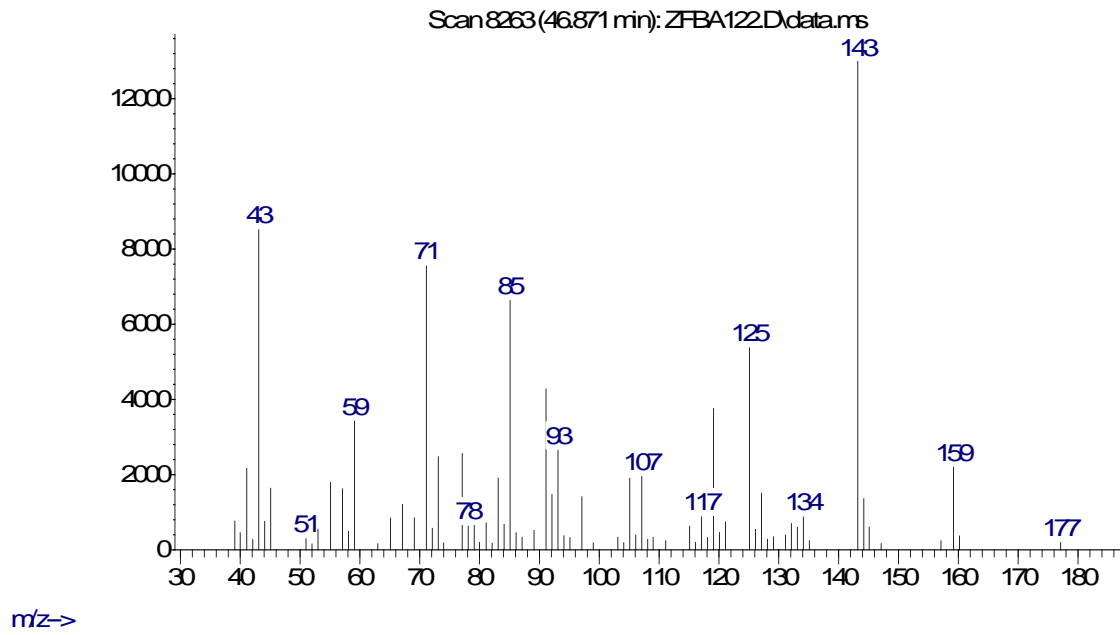
Abundance



m/z-->

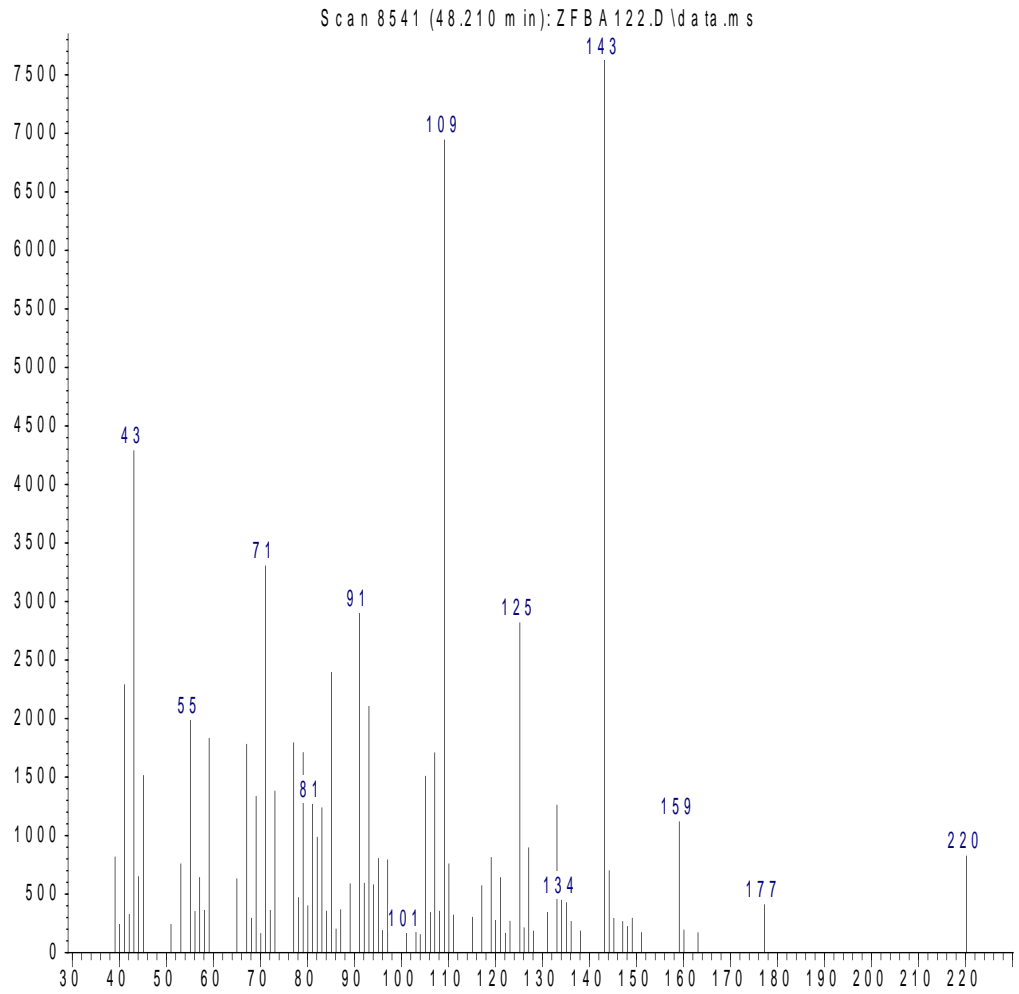
EK-107. B11 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-108. BI2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

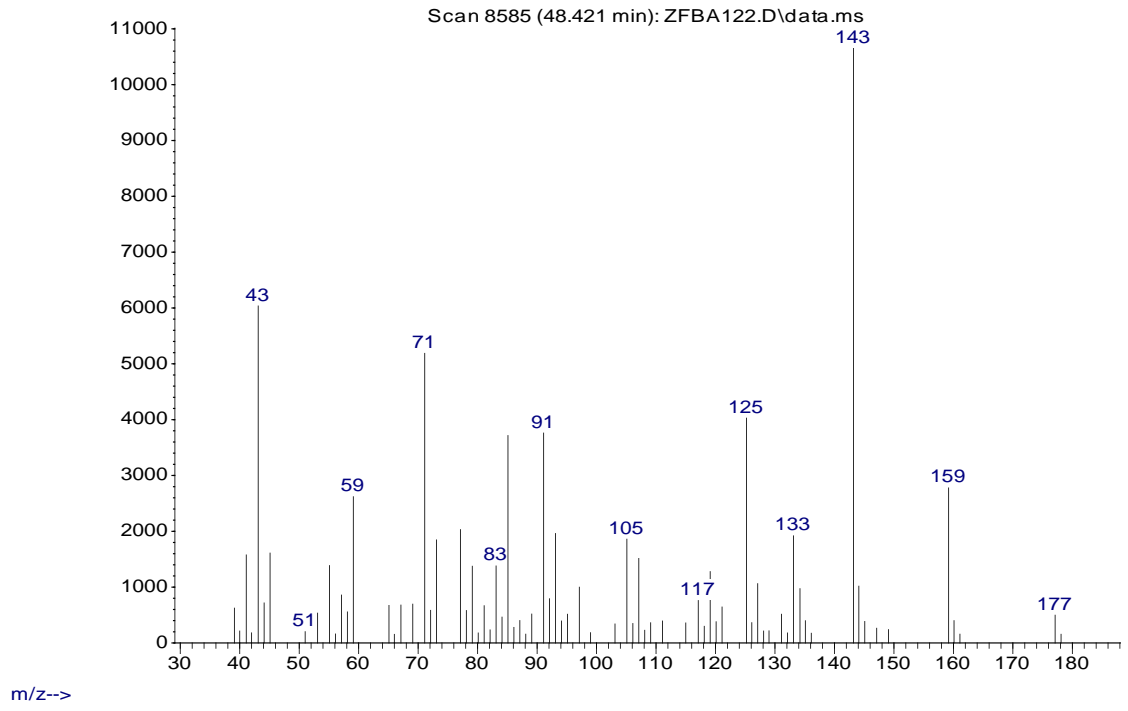
Abundance



m/z-->

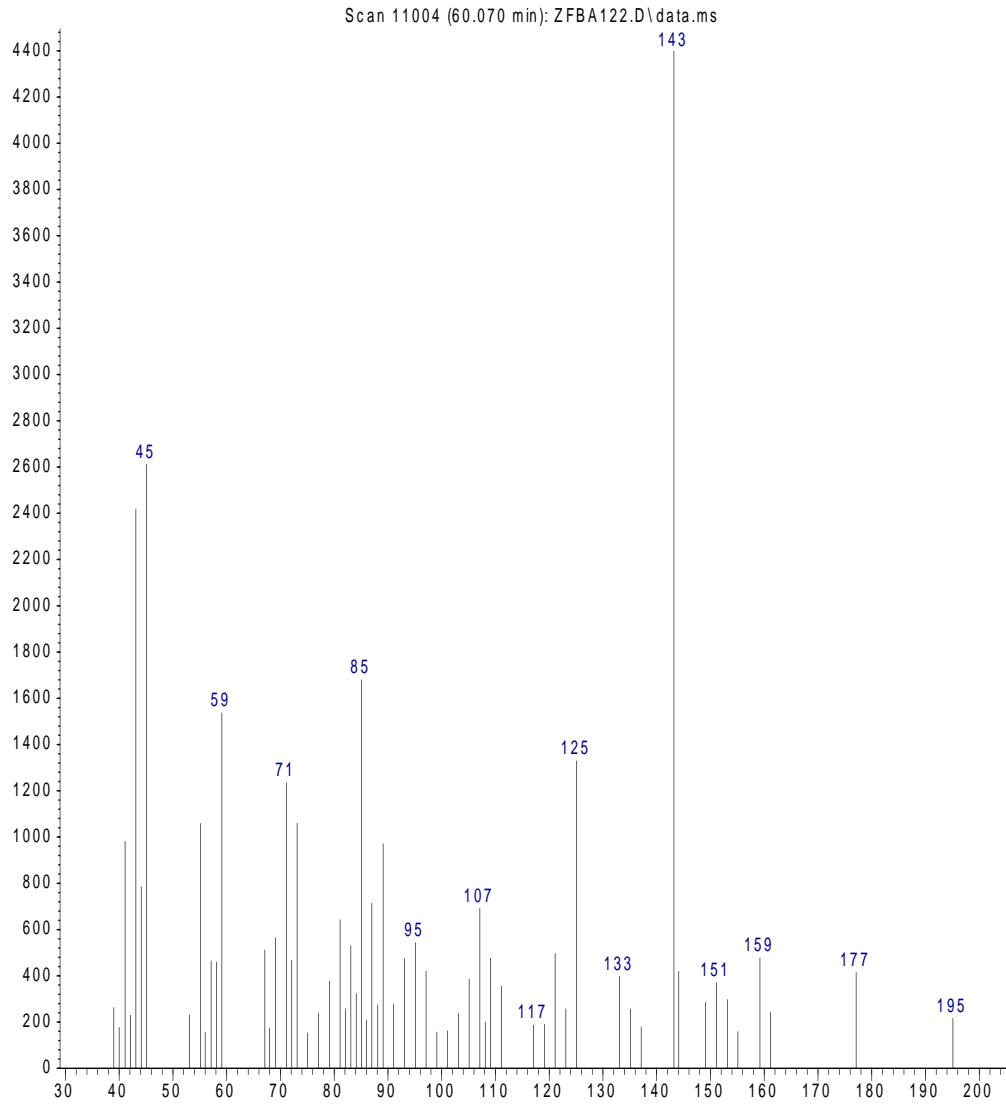
EK-109. BI3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-110. B15 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

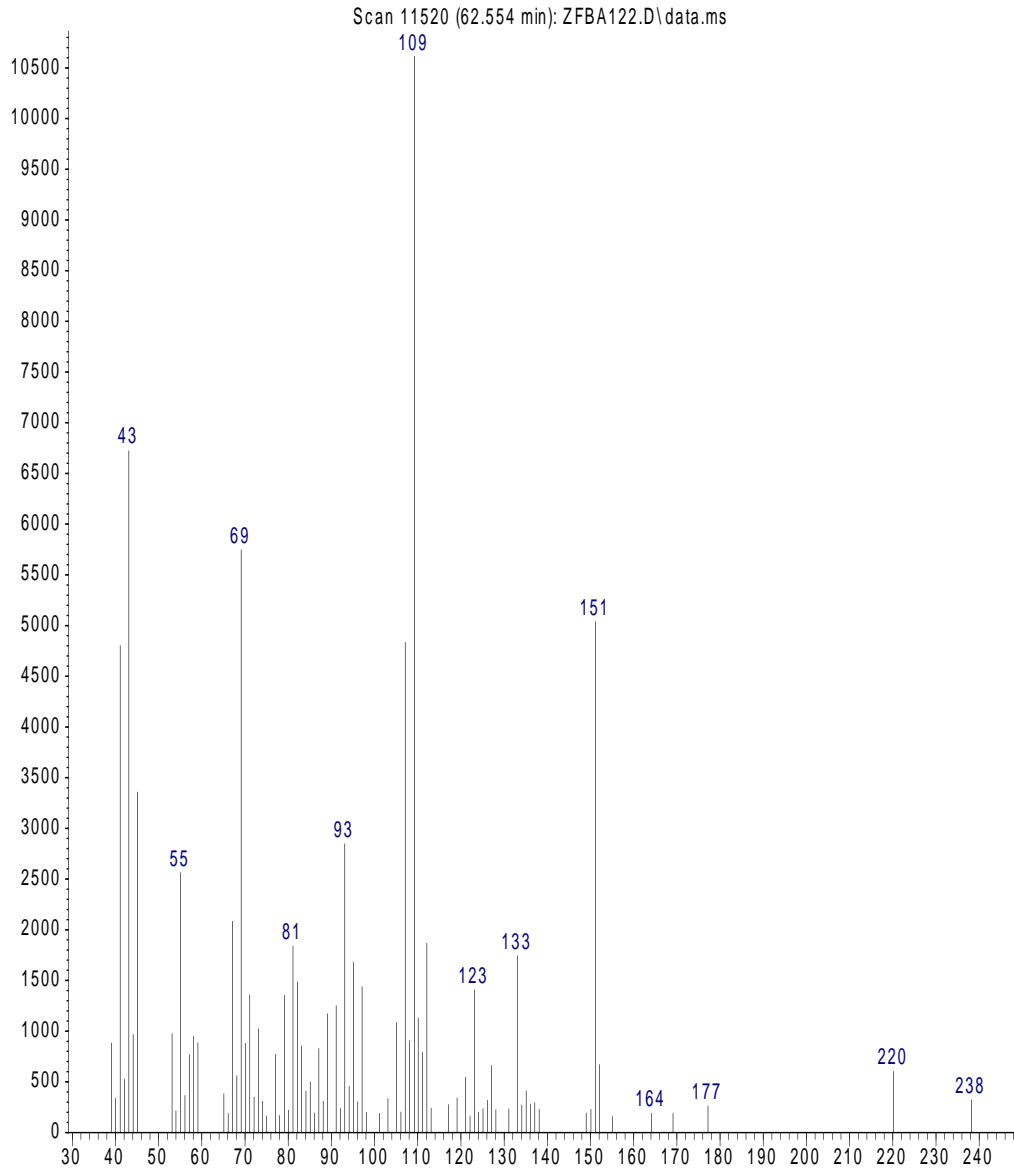
Abundance



m/z-->

EK-111. BI6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

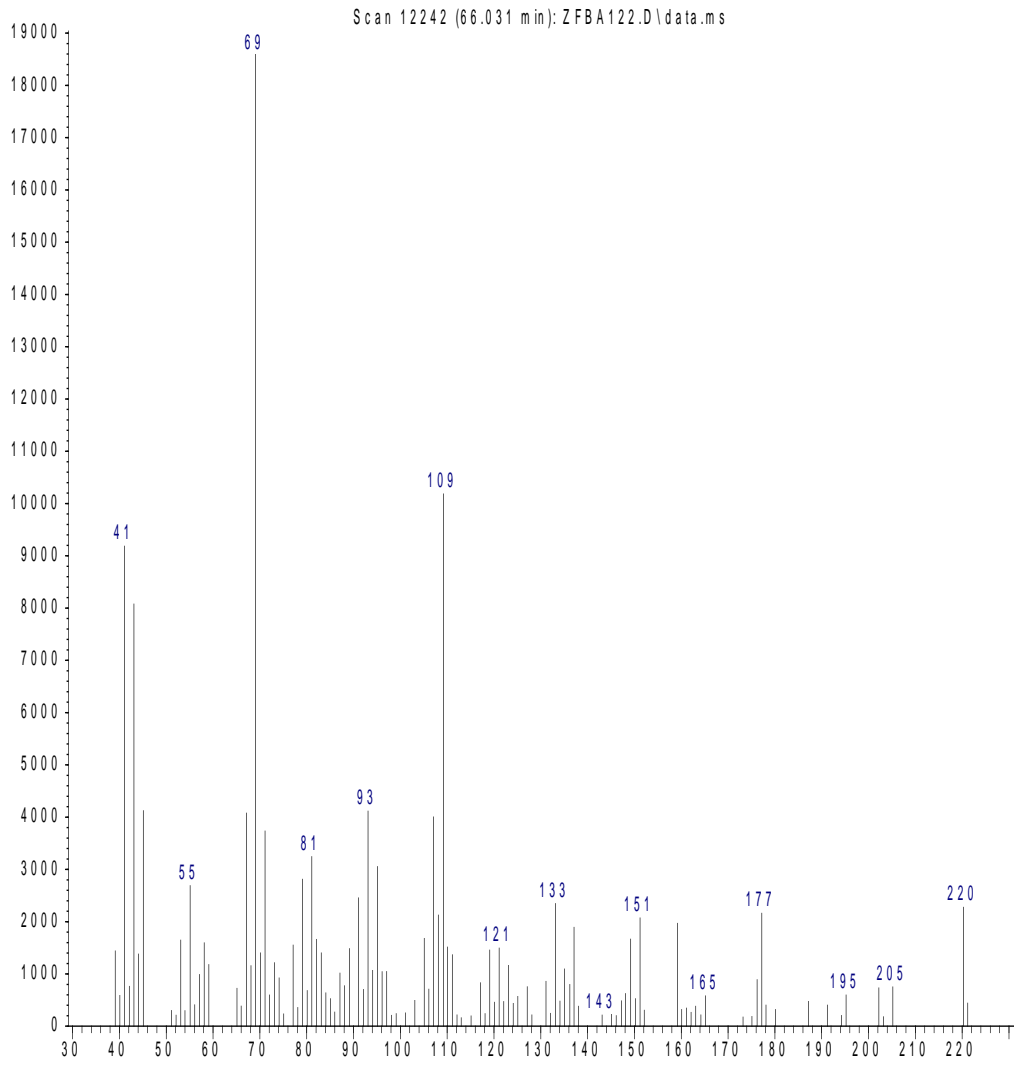
Abundance



m/z-->

EK-112. BI7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

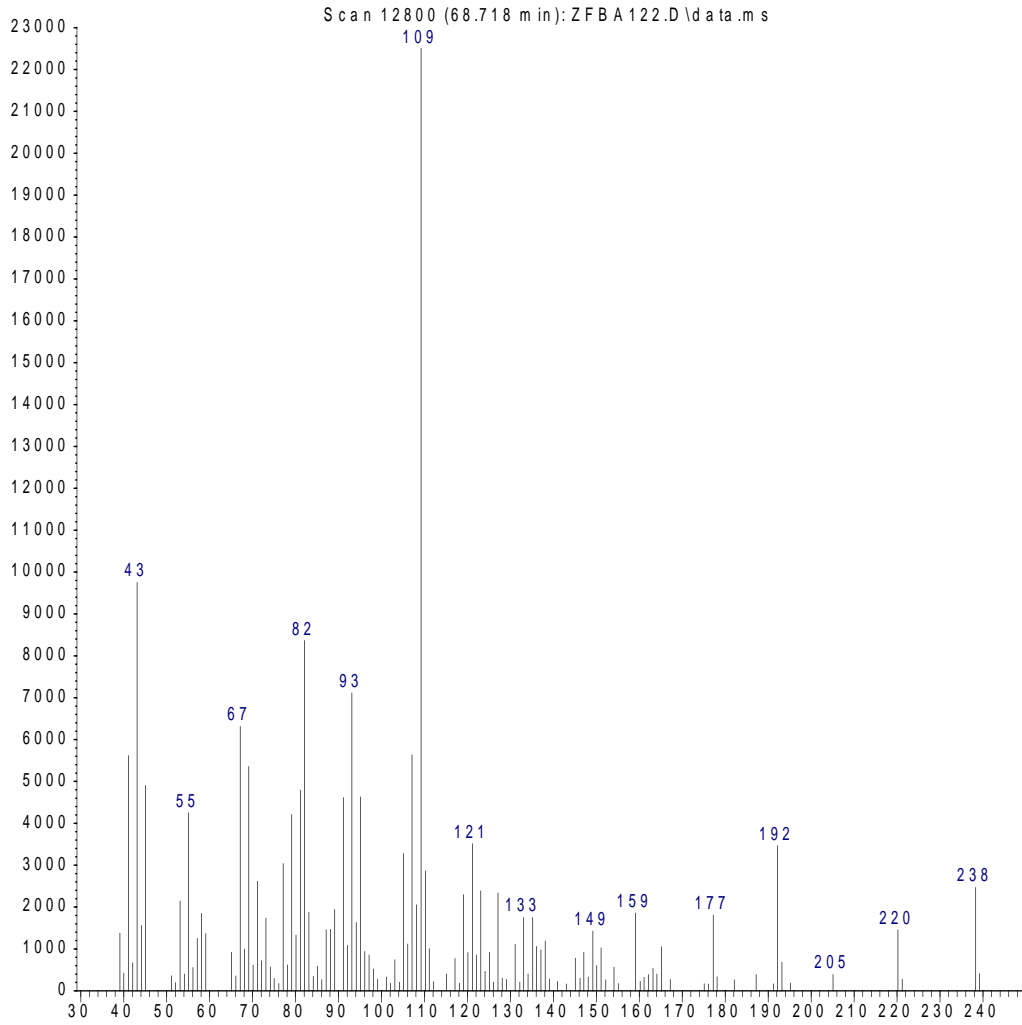
Abundance



m/z-->

EK-113. BI8 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

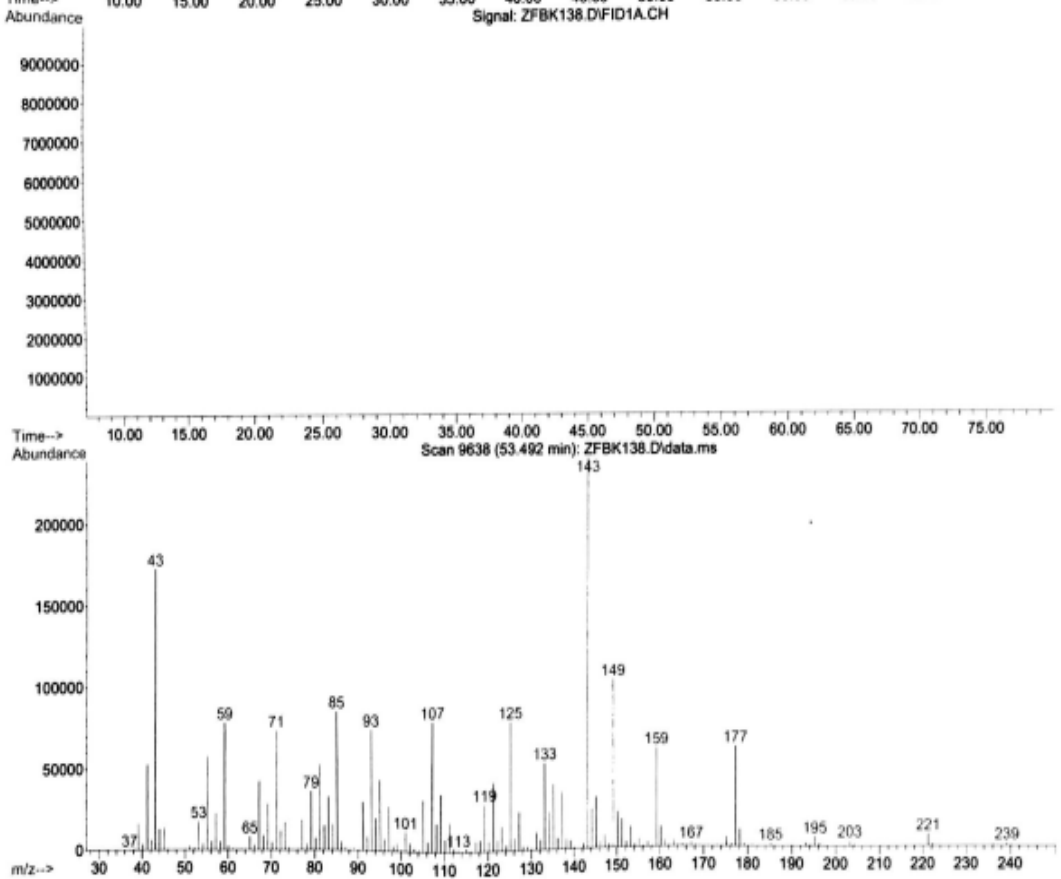
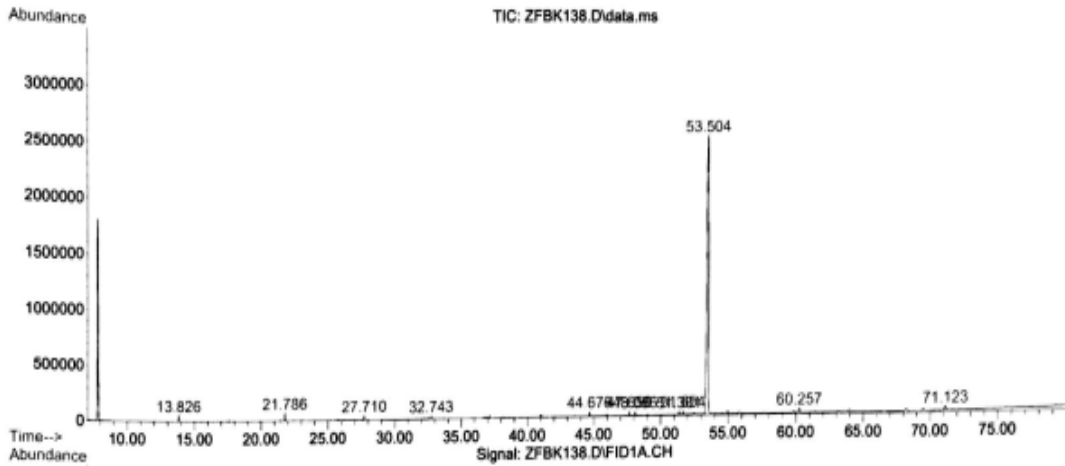
Abundance



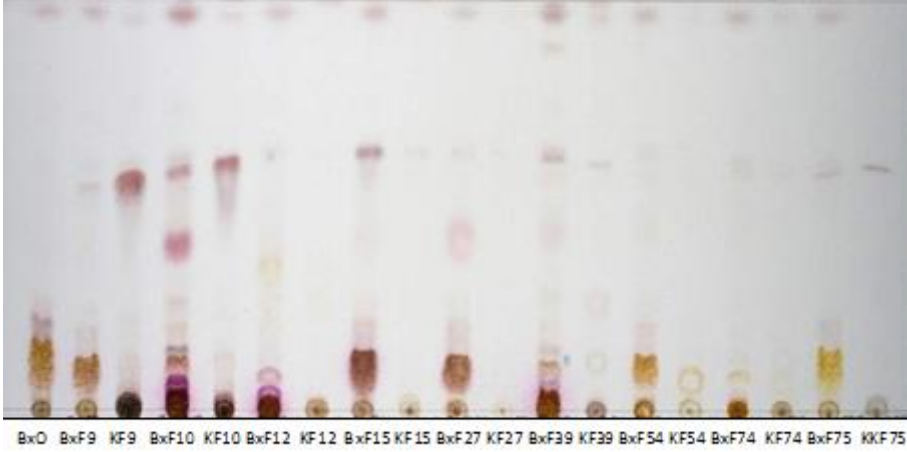
m/z-->

EK-114. BE1 Metabolitinin GC/MS Verileri

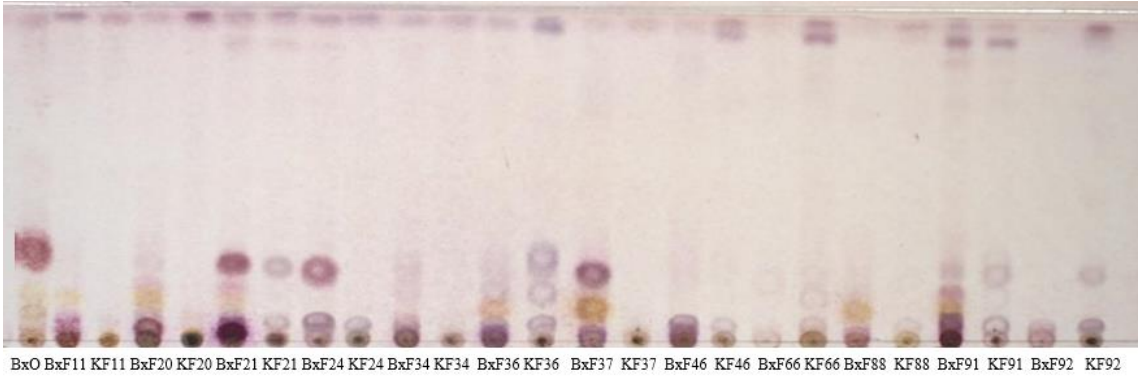
File :D:\MSD-DATA\ZFBK138.D
Operator : Betul
Acquired : 22 Aug 2017 15:47 using AcqMethod MIWAX-2MS.M
Instrument : GCMS 1
Sample Name: ZFBK138
Misc Info :
Vial Number: 8



EK-115. α -Bisabolol oksitler ve Biyotransformasyon Ürünlerinin İTK Profili



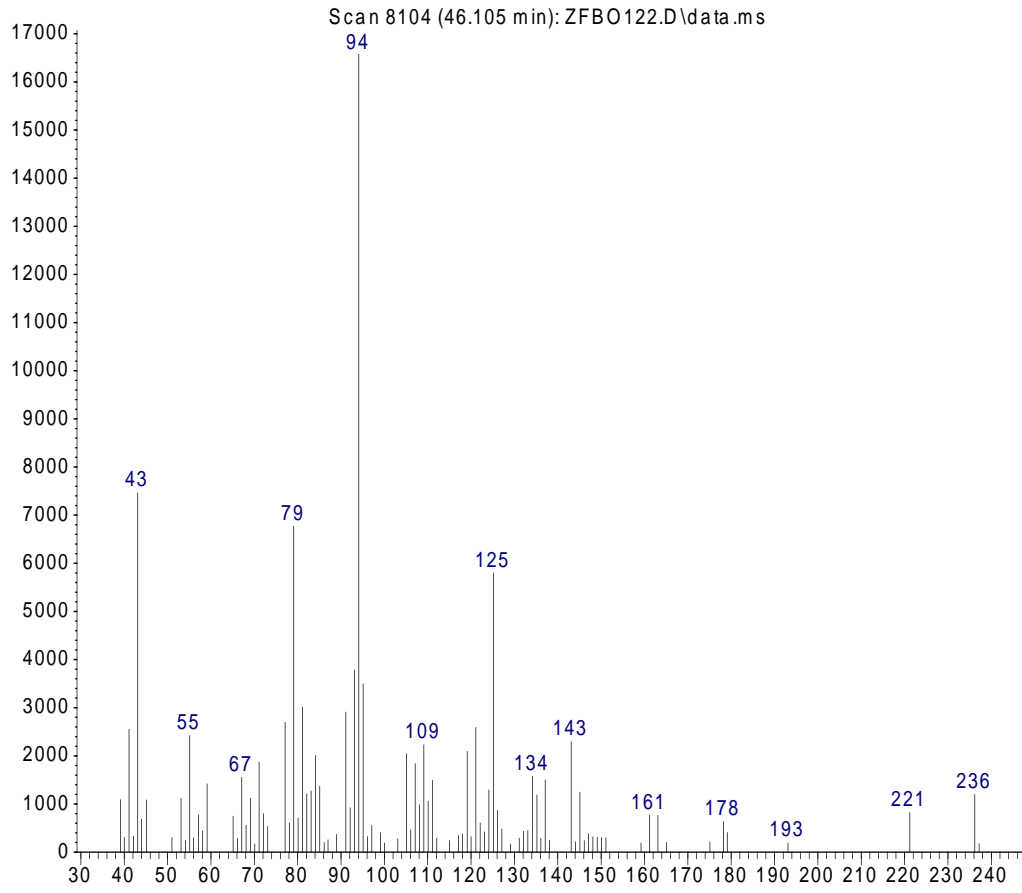
[İzole edilen bisabolol oksitler (**BxO**) ve onun *A. parasiticus* (**BxF9**), *A. niger* NRRL 326 (**BxF10**), *A. alliaceus* (**BxF12**), *A. flavus* (**BxF15**), *S. cerevisiae* (**BxF27**), *R. stolonifer* (**BxF39**), *B. cinerea* (**BxF54**), *C. elegans* (**BxF74**), *F. solani* (**BxF75**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF9**, **KF10**, **KF12**, **KF15**, **KF27**, **KF39**, **KF54**, **KF74**, **KF75** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: vanilin-sülfürik asit]



[İzole edilen bisabolol oksitler (**BxO**) ve onun *A. niger* ATCC 10549 (**BxF11**), *P. adametzii* (**BxF20**), *P. chrysogenum* (**BxF21**), *F. culmorum* (**BxF24**), *T. elegans* (**BxF34**), *M. ramannianus* (**BxF36**), *T. harzianum* (**BxF37**), *C. cassiicola* (**BxF46**), *P. multicolor* (**BxF66**), *P. neocrassum* (**BxF88**), *P. primulinum* (**BxF91**), *P. valentinum* (**BxF92**) biyotransformasyon ekstreleri; **KF11**, **KF20**, **KF21**, **KF24**, **KF34**, **KF36**, **KF37**, **KF46**, **KF66**, **KF88**, **KF91** kontrol grupları; çözücü sistemi: kloroform/toluen 75:25; reaktif: anisaldehit-sülfürik asit]

EK-116. BoA1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

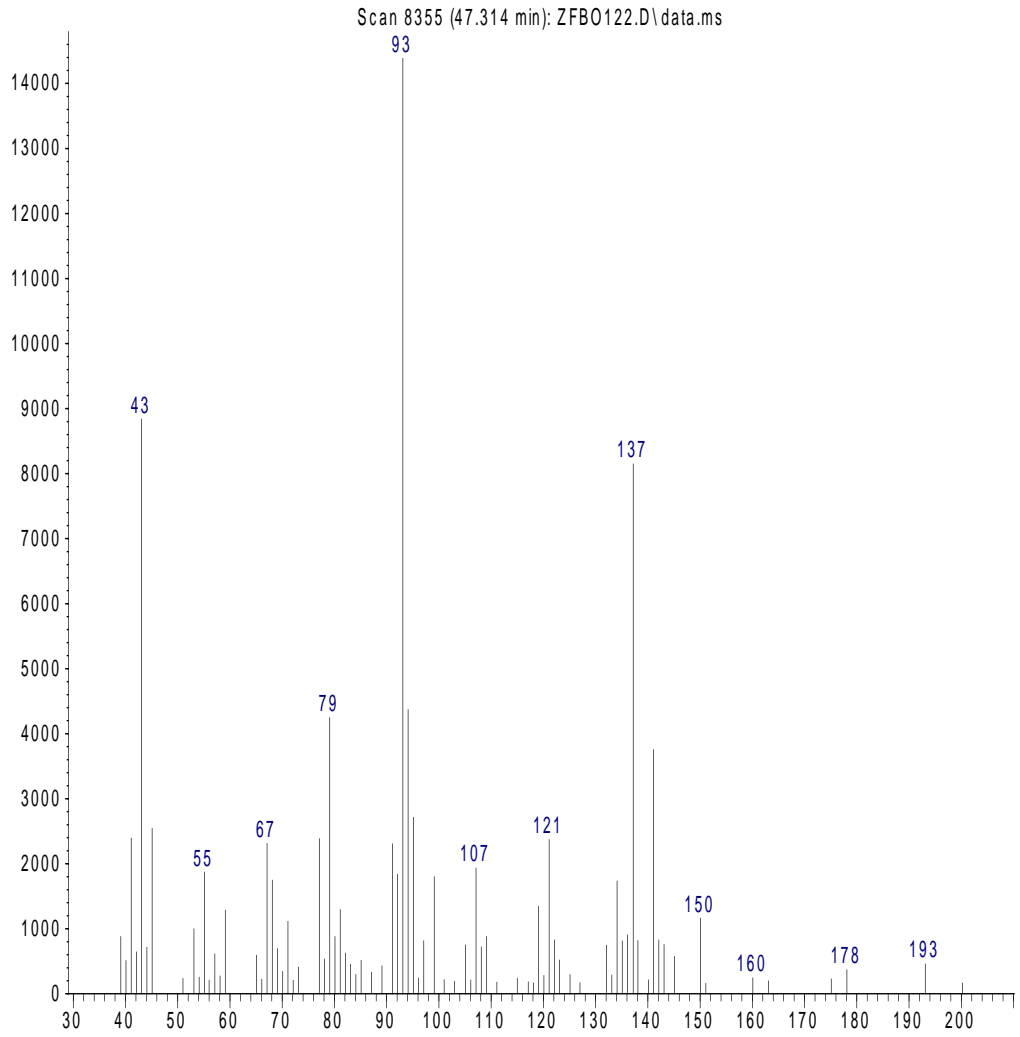
Abundance



m/z-->

EK-117. BoA2 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

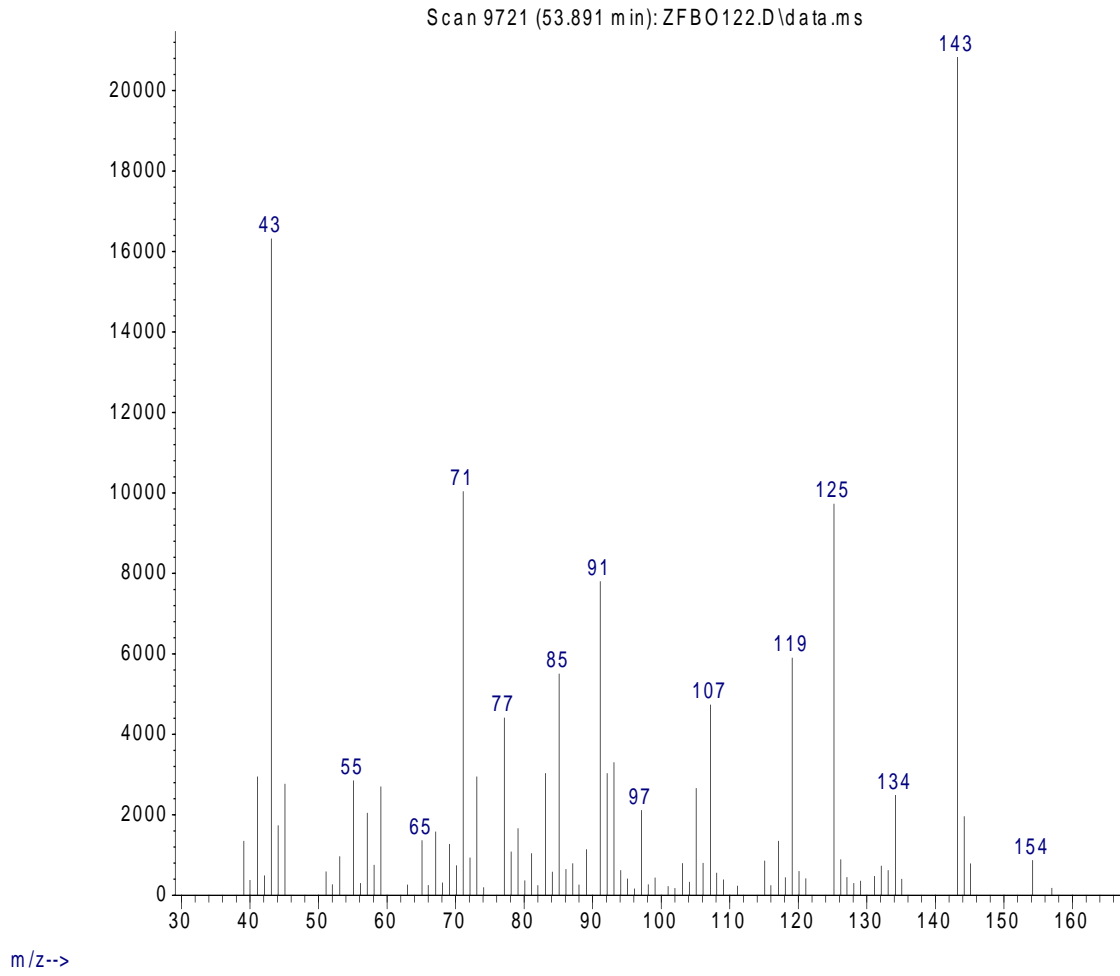
Abundance



m/z-->

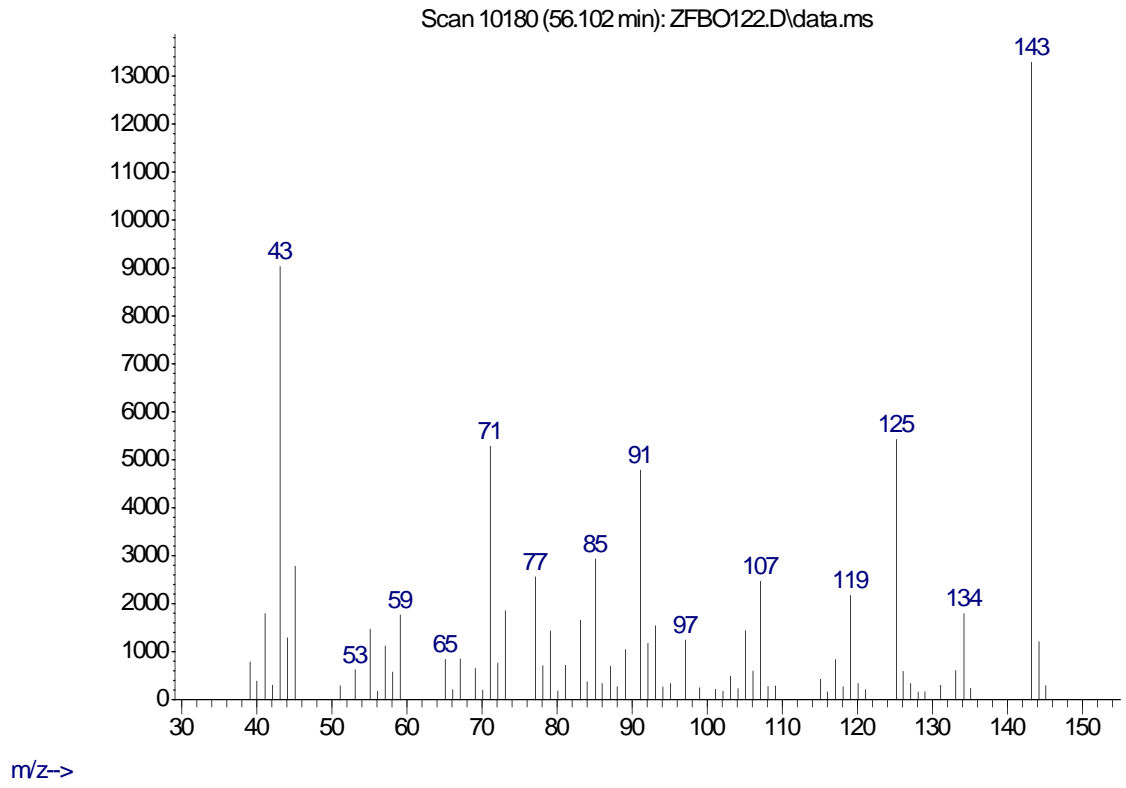
EK-118. BoA3 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



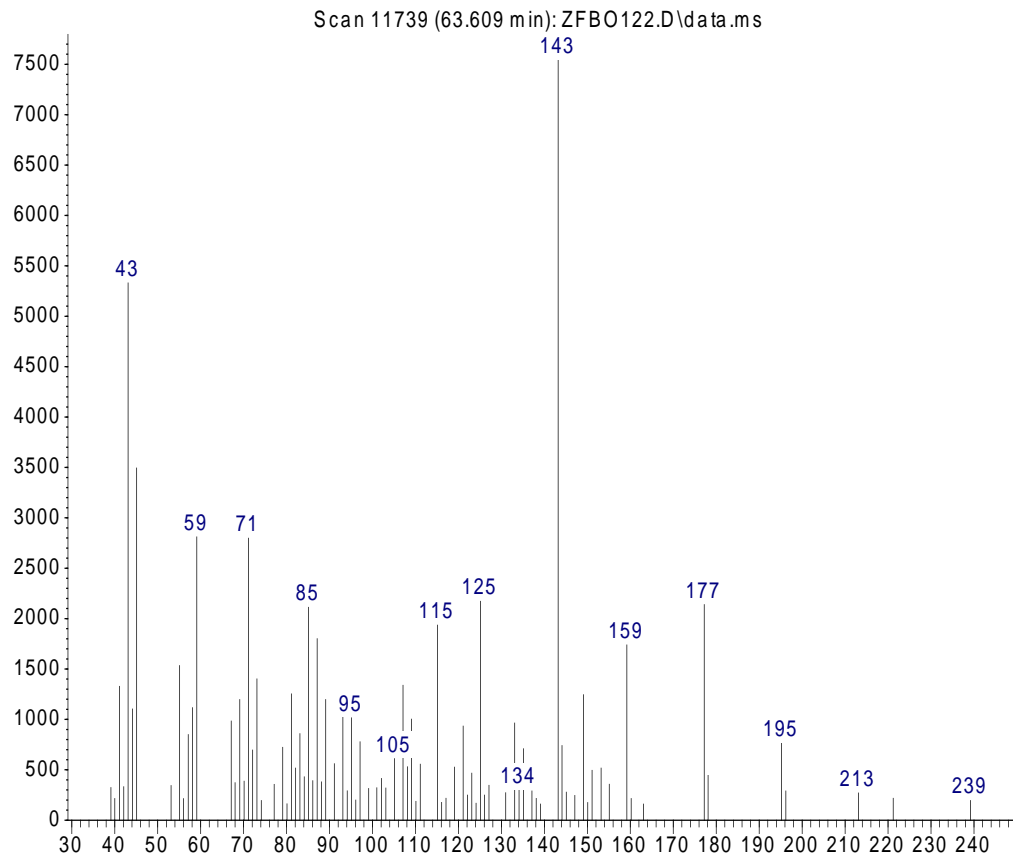
EK-119. BoA4 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-120. BoA5 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

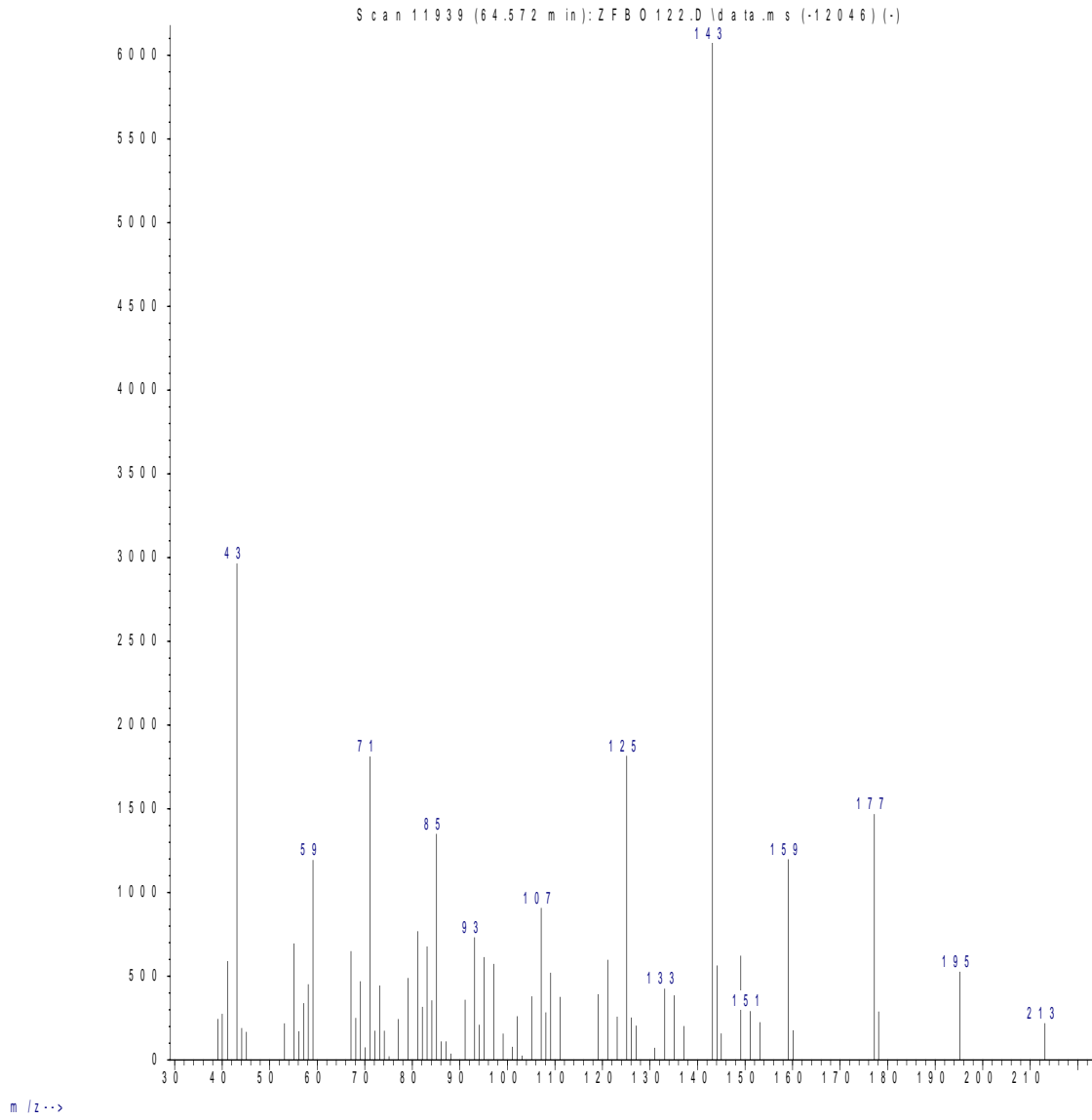
Abundance



m/z-->

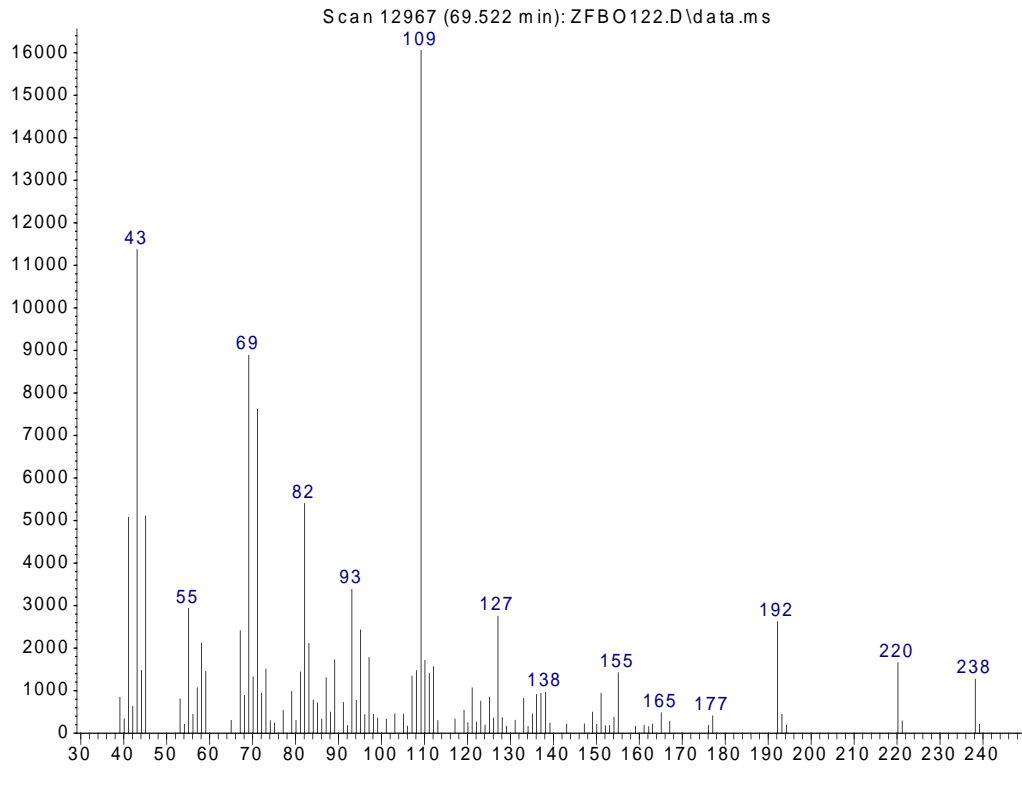
EK-121. BoA6 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



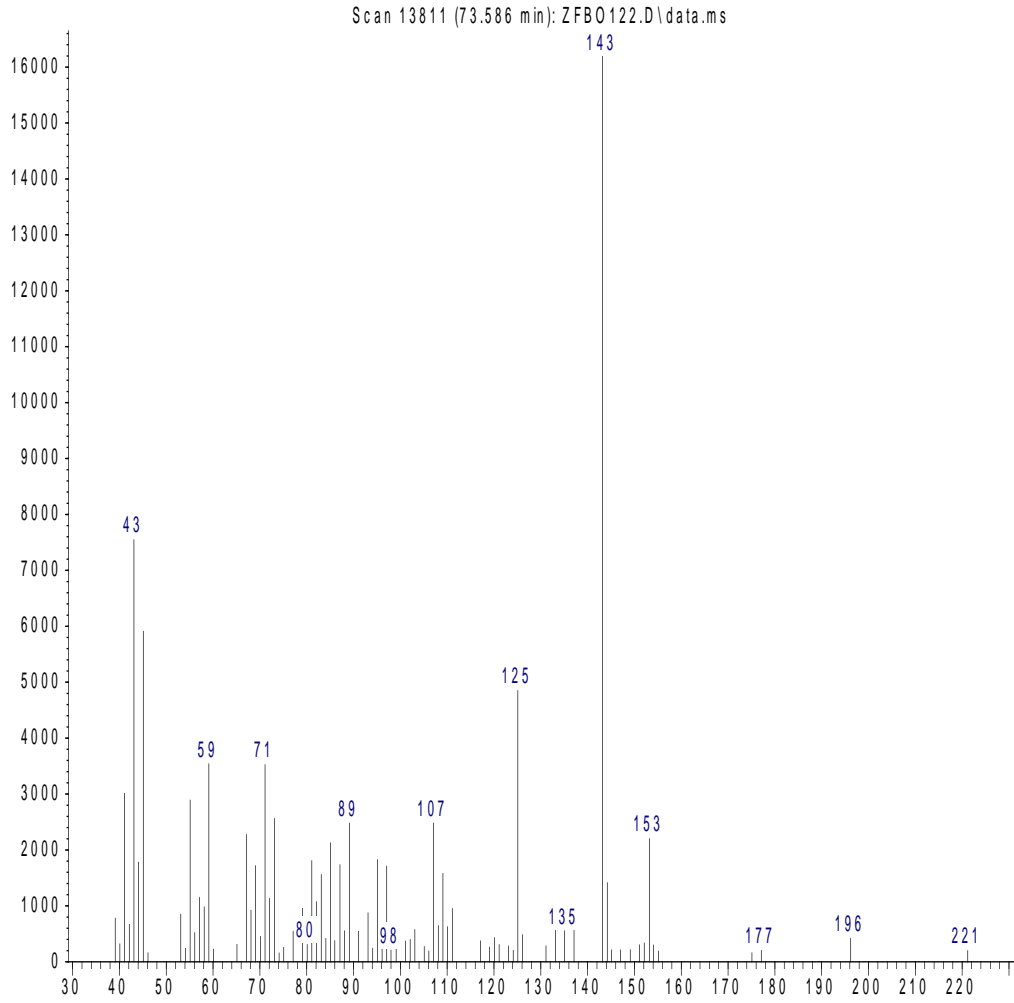
EK-122. BoA7 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



EK-123. BoA8 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

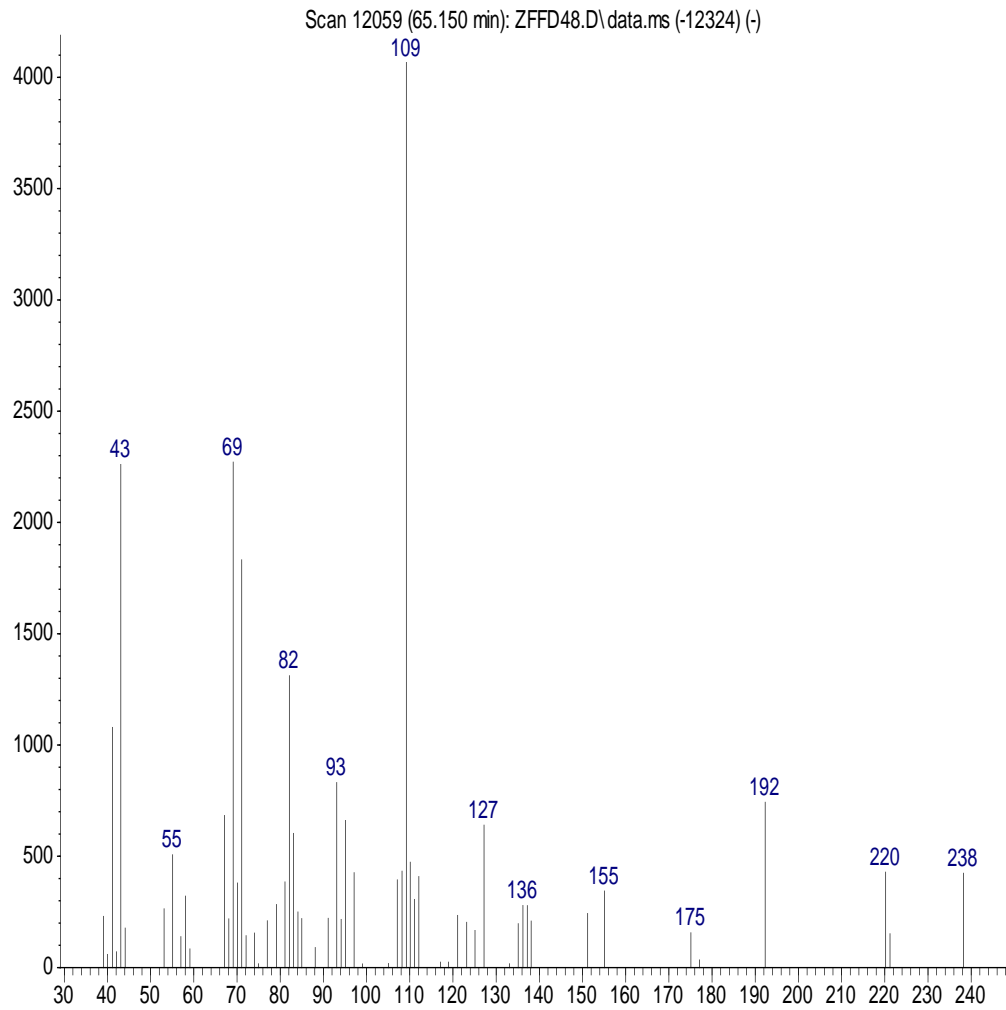
Abundance



m/z-->

EK-124. FB1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

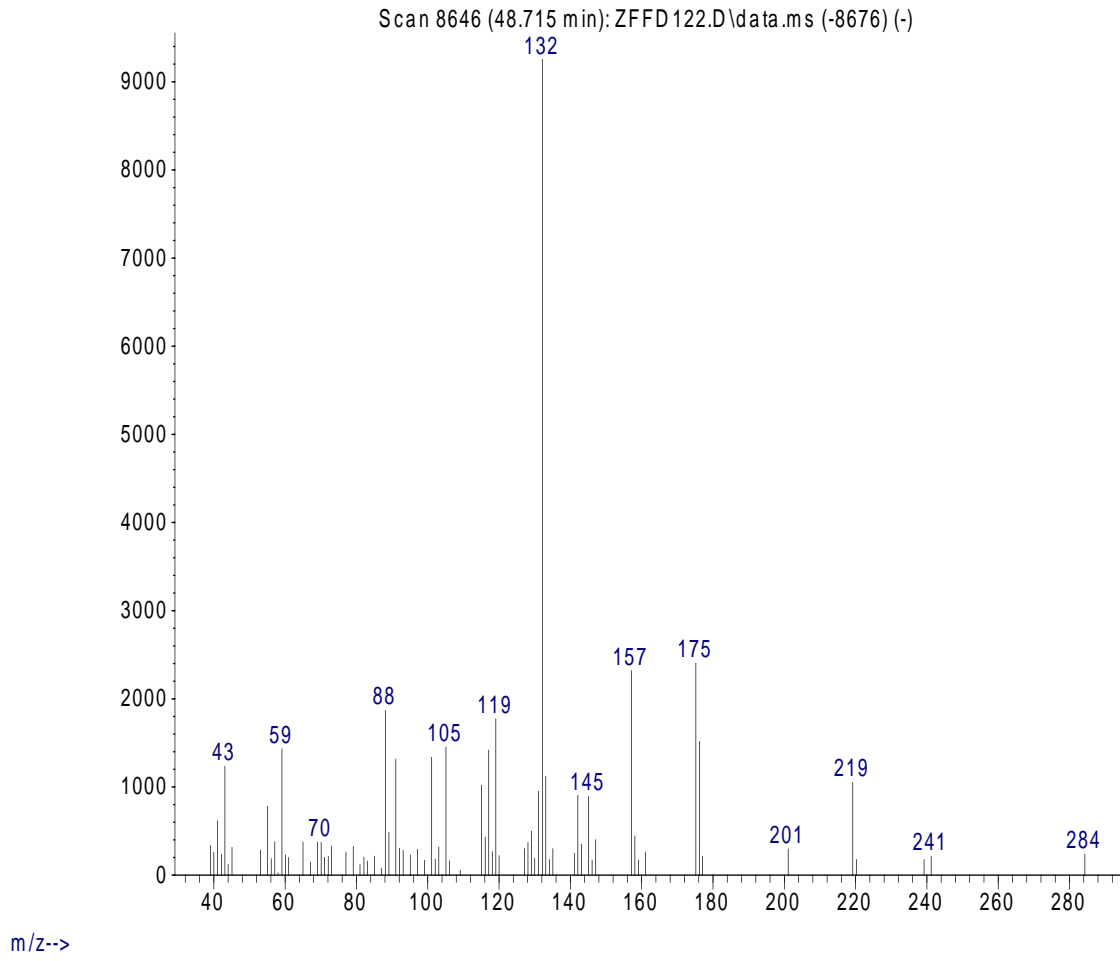
Abundance








m/z->

EK-125. FD1 Metabolitinin GC/MS Spektrumu

Abundance



Microbial Transformation of (–)- α -Bisabolol Towards Bioactive Metabolites

Zeynep Firat ^{1,2*}, Fatih Demirci ^{3,4}, Betül Demirci ³
Hasan Kırmızıbekmez ⁵ and K. Hüsni Can Başer ⁶

¹Graduate School of Health Sciences, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Türkiye

²Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Türkiye

³Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Türkiye

⁴Faculty of Pharmacy, Eastern Mediterranean University, 99628 Famagusta, Turkish Republic of Northern Cyprus

⁵Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Yeditepe University, Kayisdagi, Istanbul, Türkiye

⁶Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Near East University, 99138 Turkish Republic of Northern Cyprus

(Received April 15, 2020; Revised April 06, 2021; Accepted April 10, 2021)

Abstract: Bisabolol is one of the bioactive constituents of chamomile. It was aimed to biotransform (–)- α -bisabolol by different fungi for the production of new bioactive metabolites, which was converted to α -bisabolol oxide A and B by *Thamnidium elegans*. Additionally, the biotransformation by *Penicillium neocrassum* yielded a new metabolite, which was characterized as 2-(5-methyl-5-(6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-yl)tetrahydrofuran-2-yl)propan-2-ol = bisafuranol. The substrate and its metabolite mixtures were tested using antioxidant DPPH[•] scavenging assay. Antimicrobial activity was evaluated by an *in vitro* microdilution assay against a panel of human pathogenic bacteria and yeasts resulting in the lowest MIC and MFC values of 150 μ g/mL. (–)- α -Bisabolol was effective against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* (75, 37.5 μ g/mL, respectively). The antioxidant activity of the metabolites was found to be more effective in scavenging free radicals.

Keywords: *Matricaria recutita* L.; microbial transformation; bisabolol; antimicrobial activity; antioxidant activity; *Penicillium neocrassum*. © 2021 ACG Publications. All rights reserved.

1. Introduction

Terpenes constitute one of the largest chemical classes of secondary metabolites. Terpenes and terpenoids with low molecular weights such as mono- and sesquiterpenes are also characteristic volatile constituents of essential oils [1]. Terpenes withdraw attention due to their broad biological activities in many sectors [2]. Biotechnological applications such as biotransformations of terpenes and terpenoids have an important impact for food, chemicals and pharmaceuticals [3–5].

* Corresponding author: E-Mail: zeynepf@anadolu.edu.tr; Phone:+90-222-3350580 Fax:+90-222-3350570

The article was published by ACG Publications
<http://www.acgpubs.org/journal/records-of-natural-products> November-December 2021 EISSN:1307-6167
DOI: <http://doi.org/10.25135/mp.252.2004.1615>