

**TETRAHİDROKARVONUN
BİYOTRANSFORMASYONU VE BİYOLOJİK
ETKİLERİ**

Melda DUSAK
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Ekim-2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1104S081**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Melda Dusak'ın “Tetrahidrokarvonun Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.09.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ	
Üye	: Doç. Dr. M. Burçin MUTLU	
Üye	: Yard.Doç.Dr. Yusuf ÖZKAY	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TETRAHİDROKARVONUN BİYOTRANSFORMASYONU VE BİYOLOJİK ETKİLERİ

Melda DUSAK

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

II. Danışman: Yard. Doç. Dr. Gökalep İŞCAN

2012, 72 sayfa

Bu çalışmada gıda ve koku sanayilerinde farklı şekillerde kullanımı olan doğal *p*-mentan türevi tetrahidrokarvonun (karvomenton, C₁₀H₁₈O) 20 farklı bakteri, maya ve fungus kullanılarak mikrobiyal biyotransformasyonu araştırılmıştır. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda oluşan tetrahidrokarvonun hidroksillenmiş altı türevinin yapısı gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GK/KS) ile aydınlatılmıştır.

Tetrahidrokarvonun *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 ile biyotransformasyonu meydana gelen üç metabolit (*p*-mentan-1,2-diol ve *p*-mentan-2-ol'ün iki enantiyomeri) kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Metabolitlerin ve substratın *in vitro* antibakteriyal, antikandidal, antioksidan özellikleri ve pankreatik lipaz enzim inhibisyonu ilk defa incelenmiştir. Tanımlanan metabolitlerden (1*R*,2*R*,5*R*)-*p*-mentan-2-ol'ün *Candida glabrata*'ya karşı antikandidal aktiviteye sahip olduğu, (1*R*-2*R*)-*p*-mentan-2-ol'ün ise pankreatik lipaz inhibisyonunun standart madde ve substrata göre daha etkin olduğu rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tetrahidrokarvon, *p*-mentan-2-ol, *p*-mentan-1,2-diol mikrobiyal biyotransformasyon, biyootografi, pankreatik lipaz inhibisyonu, antikandidal aktivite, antibakteriyal aktivite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

BIOTRANSFORMATION OF TETRAHYDROCARVONE AND BIOLOGICAL EFFECTS

Melda DUSAK

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Department of Advanced Technologies Biotechnology Program

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Co-Supervisor: Gökalp İŞCAN

2012, 72 pages

In this present study, the monoterpene tetrahydrocarvone (carvomenthone, C₁₀H₁₈O) used as flavoring agent, was subjected to microbial biotransformation experiments, to the best of our knowledge for the first time, by using 20 different bacteria, yeast, and fungi, respectively. Six mono- and dihydroxylated derivatives of tetrahydrocarvone were identified by gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS) after the biotransformation studies. Scale up experiments using *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 resulted in the isolation and characterization of three metabolites *p*-menthane-1,2-diol and *p*-menthane-2-ol's two enantiomers. Furthermore, the purified metabolites were subjected to *in vitro* antibacterial, anticandidal, anti-oxidant evaluations and bioauthographic pancreatic lipase inhibition assays. The bioassay results indicated that (1*R*,2*R*,5*R*)-*p*-menthane-2-ol was effective for the inhibitors of anticandidal activity against *C.glabrata*. Additionally, pancreatic lipase activity was inhibited more stronger by 1*R*-2*R*-*p*-menthane-2-ol than other metabolites, tetrahydrocarvone and standard orlistat.

Keywords: Tetrahydrocarvone, *p*-menthane-2-ol, *p*-menhtane-1,2-diol, microbial biotransformation, pancreatic lipase inhibition, anticandidal activity antibacterial activity

TEŞEKKÜR

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalında gerçekleştirdiğim tez çalışmamın deneysel aşamalarını Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirmemde yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER ve Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Tez çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu sabır ve desteklerinden dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye ve manevi desteği ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye,

Bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yürütücüsü olduğu projeye dahil olduğum günden bu yana deneysel çalışmalarım ve diğer analizler sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, yardımcı danışmanım Yard. Doç. Dr. Gökalep İŞCAN'a

Enzim inhibisyon ve antioksidan aktivite deneylerinde büyük yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Araş. Görv. Uzm. Ecz. Hale Gamze DUYSMUŞ ve Araş. Gör. Dr. M. Dilek ALTINTOP'a, Uzm. Bio. Fatih GÖGER'e

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşlarım Araş. Görv. Uzm. Ecz. H. Tuba KIYAN, Bio. Betül BÜYÜKKILIÇ, Uzm. Kim. Burcu ERDEM, Uzm. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ'ye

İTAB, Fen Bilimleri Enstitüsü İdaresi ve personeline, maddi desteklerinden dolayı Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na (Proje No: 1104S081)

Hayatımın her aşamasında sonsuz desteğini esirgemeyen, sabır ve anlayış gösteren canım eşime, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Melda DUSAK

18.09.2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
------------------------	---

2. LİTERATÜR BİLGİSİ	6
----------------------------	---

2.1. Terpenler	6
----------------------	---

2.2. Monoterpenler, Biyolojik Aktiviteleri ve Aroma Özellikleri	8
---	---

2.3. Endüstriyel Öneme Sahip Bazı <i>p</i> -Mentan Yapısına Sahip Monoterpenler ve Kullanım Alanları	10
---	----

2.3.1. Limonen	11
----------------------	----

2.3.2. Mentol	13
---------------------	----

2.3.3. Karvon.....	13
--------------------	----

2.4. Tetrahidrokarvonun Mikrobiyal Transformasyonu.....	15
---	----

2.5. Tetrahidrokarvonun Biyotransformasyonu ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	18
---	----

3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
-----------------------------	----

3.1. Materyal	21
---------------------	----

Kullanılan kimyasal maddeler	21
------------------------------------	----

Kullanılan sarf malzemeleri	22
-----------------------------------	----

Kullanılan aletler ve cihazlar	22
--------------------------------------	----

Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	23
Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar.....	24
Test maddelerinin analiz Koşulları	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Biyotransformasyon çalışmaları	25
3.2.1.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması	25
3.2.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması	26
3.2.1.3. Ön tarama deneyleri.....	27
3.2.1.4. Preparatif ölçekli biyotransformasyon.....	28
3.2.1.5. Kolon kromatografisi ile metabolitlerin ayrımı.....	29
3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	30
3.2.2.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	30
3.2.2.2. Biyootografi yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	30
3.2.2.3. Mikrodilusyon yöntemi ile antikandida ve antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi	31
3.2.2.4. Pankreatik lipaz inhibisyonunun biyootografik yöntemle belirlenmesi	32
3.2.2.5. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	34
4. BULGULAR	37
4.1. Ön Tarama Çalışmaları Sonucunda Oluşan Metabolitler	37
4.2. Kolon Kromatografisi Ayrımı Gerçekleşen Metabolitler ve Yapı Tayinleri .	39
4.3. Biyolojik aktivite çalışmaları	40
4.3.1. Antikandida aktivite.....	40
4.3.2. Antibakteriyel aktivite	41
4.4. Pankreatik lipaz enzim inhibisyon sonuçları	41

4.5. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	42
4.5.1. 1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki sonuçları	42
4.5.2. ABTS radikal süpürücü etki sonuçları	43
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	48
Ek-1: Ön Tarama Deneyleri.....	57
Ek-2: Kütle Spektrumları.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Subtrat molekülü tetrahidrokarvon	4
2.1. İzopirenlerin ‘baş-kuyruk’ esasına göre bağlanması ve terpenlerin izopren birim sayılarına göre sınıflandırılması	7
2.2. Limonenin enantiyometrik yapıları	12
2.3. Karvonun enantiyomerik yapıları	14
2.4. Tetrahidrokarvonun siklohekzanon monooksijenaz ve <i>N. tabaccum</i> hücre kültürüyle gerçekleşen biyotransformasyonu	20
4.1. M1, M2, M3 metabolitlerinin pankreatik lipaz aktivite sonucu.....	42
4.2. Tetrahidrokarvon, M1, M2 ve M3’ün (DPPH [•]) radikalini süpürücü etki sonuçları	43
4. 3. ABTS Serbest Radikalinin % İnhibisyon Grafiği	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Doğal aroma maddelerinin yasal tanımları	2
2.1. Yapılarına göre monoterpenlerin sınıflandırılması	9
2.2. Monoterpenlerin sahip olduğu bazı biyolojik aktivite ve fizyolojik işlevleri ...	9
2.3. Mentan grubu monoterpenlerden <i>p</i> -mentan monoterpenlerinin bulunduğu bitki tür ve familyaları, bazı <i>p</i> -mentanların koku özellikleri	11
2.4. Tetrahidrokarvonun fizikokimyasal özellikleri	17
2.5. Biyotransformasyonla üretilen bazı doğal aroma bileşenleri	19
3.1. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar	23
3.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar	24
3.3. Gradient mobil faz bileşimleri	30
4.1. Ön tarama deneyleri sonucu oluşan metabolitler	37
4.2. Tanımlanan metabolitler, sinonimleri, tutunma zamanları ve <i>m/z</i> değerleri ..	40
4.3. Antikandidal etki sonuçları	41
4.4. Antibakteriyal etki sonuçları	41

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
lt	: Litre
g	: Gram
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
ppm	: Milyonda bir
vb.	: Ve benzeri
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
^{13}C NMR	: Karbon-nükleer manyetik rezonans
^1H NMR	: Proton-nükleer manyetik rezonans
THK	: Tetrahidrokarvon
CYP450	: Sitokrom P450
GST	: Glutasyon-S-transferaz
IC_{50}	: İnhibisyon konsantrasyonunun %50'si
ABTS $\bullet$ +	: 2,2-Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) radikali
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan tip kültür koleksiyonu)
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
TTC	: Trifenil tetrazolyum klorür
DPPH $\bullet$	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
ESOGÜ	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
GK	: Gaz Kromatografisi
KS	: Kütle Spektrometresi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
m/z	: Kütle/yük oranı
M+	: Moleküler iyon

MeOH	: Metanol
MHA	: Mueller Hinton Agar (katı besiyeri)
MHB	: Mueller Hinton Broth (sıvı besiyeri)
MHz	: Megahertz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
Rt	: Tutunma zamanı
TEAK	: Troloksa Eşit Antioksidan Kapasite
CFU	: Colony Forming Unit
U	: Unit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişte karmaşık yapılu bileşiklerden basit bileşiklere kadar aroma maddeleri bitkisel kaynaklarından ekstrakte edilmiş veya fermentasyon yoluyla üretilmiştir. 19. yüzyılda çeşitli meyve aromaları ve renk maddeleri sentetik aroma maddeleri olarak tüketime sunulmuştur. Aroma maddelerinin esasını teşkil eden bileşiklerin yapılarının ortaya konmasından sonra sentetik aroma bileşenleri üretilebilir hale gelmiştir (Armstrong ve Yamazaki, 1986). Bu gelişmeler paralelinde geçtiğimiz yirmi yılda aroma maddelerinin % 80'inden fazlasını oluşturan sentetik kökenli kimyasallardan sentezlenen yapay aroma maddeleri piyasadaki üstünlüğünü sürdürmüştür (Yılmaztekin ve ark., 2008). Son zamanlarda ise tüm dünyada sağlıklı yaşam kavramı ve tabiata geri dönme isteği doğrultusunda doğal ürünlere gösterilen talep artmıştır (Armstrong ve Yamazaki, 1986). Kimyasal ürünlerin insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmesi, uluslararası mevzuatlarda kimyasal yollarla elde edilen ürünlere getirilen kısıtlar nedeniyle tüketiciler sentetik eşdeğerlerine göre, daha sağlıklı ve güvenilir olduğundan doğal aroma bileşiklerini tercih etmektedir (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Berger, 1995; Yılmaztekin ve ark., 2008; Attokaran, 2011). Bu durum, doğal aroma maddelerinin bitkisel ve hayvansal kaynaklardan ekstraksiyon yoluyla üretimini gerekli kılmıştır (Armstrong ve Yamazaki, 1986). Ancak bitkiler ve uçucu yağları, meyve ve sebze ekstraktları, hayvansal orijinli ürünler gibi biyolojik materyallerden temin edilebilen aroma bileşenleri, doğal kaynaklarında çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Yılmaztekin ve ark., 2008). Dolayısıyla ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarıyla artan ürün maliyeti üreticinin yerel ve küresel pazarda rekabetini zorlaştırmaktadır (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Berger, 1995; Yılmaztekin ve ark., 2008; Attokaran, 2011). Ayrıca aroma bileşenlerinin hammadde kalitesine önemli ölçüde etki eden iklim ve mevsim değişimleri, geleneksel ekstraksiyon teknolojisine dayalı aroma bileşenleri sanayiinin standart verim ve kalitede aroma ajanı üretimini sınırlandıran en önemli faktörlerden biridir (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Berger, 1995; Attokaran, 2011). 1958'de yayımlanan Amerika Federal Düzenlemeler kodu, 1988'de yayımlanan Avrupa'daki ilgili yönetmelikler (CFR 101.22.a.3) ve Türk

Gıda Kodeksi Aroma Vericiler ve Aroma Verme Özelliği Taşıyan Gıda Bileşenleri Yönetmeliği'ne göre doğal aroma maddeleri tanımlanmış, bu bileşimlerin enzimatik ve fermentatif veya mikrobiyolojik süreçlerle kısacası biyoteknolojik yollarla eldesi yasallaşmıştır (Çizelge 1.1) (Cheetam, 1997; Longo ve Sanroman, 2006; Yılmaztekin ve ark., 2008).

Çizelge 1. 1. Doğal aroma maddelerinin yasal tanımları (Yılmaztekin ve ark., 2008)

DOĞAL AROMA MADDELERİNİN YASAL TANIMLARI	
Amerika Birleşik Devletleri federal düzenlemeler kodu	Uçucu yağlar, yağlı reçineler, esanslar, protein hidrolizatları, baharat, meyve suyu, sebze veya sebze suyu, yenilebilir maya (ekmek ve bira mayası), bitki tomurcuk, kabuk, kök ve yaprakları, et, deniz ürünleri, kümes hayvanları, yumurta ve süt ürünlerinin kızartılması, ısıtılması ve <i>enzimle muamele edilmesinden sonra elde edilen</i> destilatları veya esas işlevi aroma vermek olan <i>fermentasyon ürünleri</i>
Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği	Bitkisel veya hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, <i>enzimatif veya mikrobiyolojik yollarla elde edilen</i> aroma verici madde veya madde karışımları
Avrupa Birliği düzenlemeleri	Geleneksel gıda hazırlama işlemlerinden biri veya birden fazlası ile insan tüketimi için işlendikten sonra; bitkisel, hayvansal ve <i>mikrobiyal orijinli</i> materyalden uygun fiziksel, enzimatik veya <i>mikrobiyolojik işlemlerle</i> elde edilen doğada tanımlanmış ve doğal olarak bulunan aroma verici maddeler

Bu bağlamda biyoteknolojik uygulamalarla, kimyasal yollarla istenildiği gibi üretilmeyen yada doğal kaynaklardan izolasyonu ekonomik kısıtlar nedeniyle mümkün olmayan ilaç, aroma ve gıda katkı hammaddelerinin kolaylıkla sentezlenebilmesi ve üretilbilmesi sözkonusu olmuştur (Yılmaztekin ve ark., 2008). Biyoteknolojik yollarla aroma maddesi üretiminde mikroorganizmalar, enzimler ve bitki hücre ve doku kültürleri kullanılmaktadır (Yılmaztekin ve ark., 2008). Mikroorganizmaların kullanıldığı üretim tekniklerinde temel olarak iki yöntemden yararlanılmaktadır. Bunlar; ortamda bulunan şeker, alkol ve amino asit gibi basit besinlerden başlayarak fermentasyonla aroma maddelerinin üretimi (de novo sentezi) ve ortama ilave edilen ön bileşiklerin (substrat) biyotransformasyonu ile aroma maddelerinin üretimidir. Fermentasyonda karbon ve azot kaynaklarına ihtiyaç duyulurken, mikrobiyal biyodönüşümde uygun bir substrat yeterli olmaktadır (Yılmaztekin ve ark., 2008). Bu yolla mikrobiyal

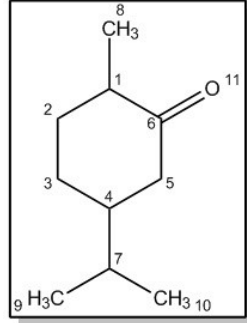
hücreler veya enzimler kullanılarak, pirazinler, bütirik asit, diasetil, asetaldehit gibi aroma bileşenlerinin üretimi mümkün olmaktadır. Mikrobiyal transformasyonlarda aktif anahtar molekülün çok aşamalı ve karmaşık dönüşümleri kolaylıkla ve “tek adımda” gerçekleşirken, fermentatif süreçlerle dahi elde edilemeyecek kadar çok sayıda uçucu doğal aroma bileşeni, stereokimyasal/enantiomerik saflıkta doğal aroma maddeleri meydana gelmektedir (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Berger, 1995; Liese ve Filho, 1999; Longo ve Sanroman, 2006; Kurt, 2011). Böylelikle farklı fonksiyonel yapıların katıldığı ya da varolan fonksiyonel yapıların değişime uğradığı biyotransformasyon reaksiyonlarıyla substrata göre biyoaktivitesi yüksek doğal aroma ajanları da meydana gelebilmektedir (Berger, 1995; Margetts, 2005; Longo ve Sanroman, 2006).

Uçucu yağların temel bileşenlerinden terpenler ve türevleri de biyokatalik işlemlerle birbirine dönüştürülebilen ya da farklı aroma maddeleri üretiminde kullanım potansiyeli yüksek, ekonomik öneme sahip doğal maddelerdendir. Doğada sıkça rastlanabilen kolay ulaşılabilir, ucuz bu doğal bileşenler aynı zamanda önemli biyoaktif etkileri sağlayan fonksiyonel gruplara da sahiptir. Bu nedenlerle terpenler, biyotransformasyon reaksiyonları için vazgeçilmez substrat maddeleridir ve limonen, timol, karvon, karvakrol gibi terpenlerin biyotransformasyonlarının araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Berger, 1995; Margetts, 2005; Longo ve Sanroman, 2006)

Bu bilgilerden hareketle tez çalışması kapsamında keto grubuna sahip *p*-mentan türevi monoterpen tetrahidrokarvonun (Şekil 1.1) Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı koleksiyonundan seçilen 20 adet mikroorganizma ile mikrobiyal biyotransformasyonu ile meydana gelen metabolitlerin yapılarının aydınlatılması, izolasyonu ve biyolojik aktivite testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Substrat molekülümüz tetrahidrokarvon, doğada başlıca iki nane türünde (*Mentha spicata* ve *M. arvensis*), greyfurt (*Citrus paradisi*) kabuğu yağında, tropik yıldız meyvesinde (*Averrhoa carambola*), solucan otunda (*Tanacetum vulgare*), sardunya bitkisi (*Pelargonium hybrida*) uçucu yağında bulunmaktadır. Sinek ve böcek kovucu olarak kullanılan tetrahidrokarvonun, glutatyon-S-

transferaz aktivitesini indükleyen etkiye de sahip olduğu rapor edilmiştir (Smith ve ark., 1963, Sidhu ve Swaleh, 1965; Zheng ve ark., 1992; Burdock, 2010).



Şekil 1. 1. Subtrat molekülü olarak seçilen tetrahidrokarvon



Şekil 1. 2. Tetrahidrokarvonun bitkisel kaynakları; tropik yıldız meyvesi (*Averrhoa carambola*), (b) solucan otu (*Tanacetum vulgare*) (Anonim, 2010; Anonim, 2012a, Anonim, 2012b)

Nanemsi tat ve aromaya sahip tetrahidrokarvon puding, yumuşak şekerlemeler, alkollü ve alkolsüz içecekler, sakızlarda aroma ajanı olarak kullanılmaktadır (Burdock, 2010).

İlk aşamada, tetrahidrokarvon fungus, bakteri ve mayalardan oluşan 20 adet mikroorganizmanın her biri ile ayrı ayrı etkileştirilerek ön tarama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 gün boyunca 28-37 °C ve 200 rpm şartlarında çalkalayıcılı inkübatörde biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun 1., 3., 5. ve 7. günlerinde örnekleme yapılarak oluşan metabolitlerin varlığı İTK (ince tabaka kromatografisi) ile gözlenmiş, ve GK/KS (gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi) sistemi ile yapısı aydınlatılmıştır.

İkinci aşamada, tetrahidrokarvonun mikrobiyal transformasyonunda diğer mikroorganizmalara göre daha verimli olduğu saptanan *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 ile preparatif ölçekli biyotransformasyon gerçekleştirilmiş ve metabolit biyolojik aktivite çalışmaları için kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan metabolitlerin ve substratın *in vitro* yöntemlerle antimikrobiyal, antioksidan (DPPH ve ABTS radikal süpürücü) etki, pankreatik lipaz enzim inhibisyonu biyolojik aktivite testleri yapılmıştır. UV-spektrofotometrik mikrodilüsyon ve biyootografi yöntemleri kullanılarak substrat ve metabolit, standart maddeler ile karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

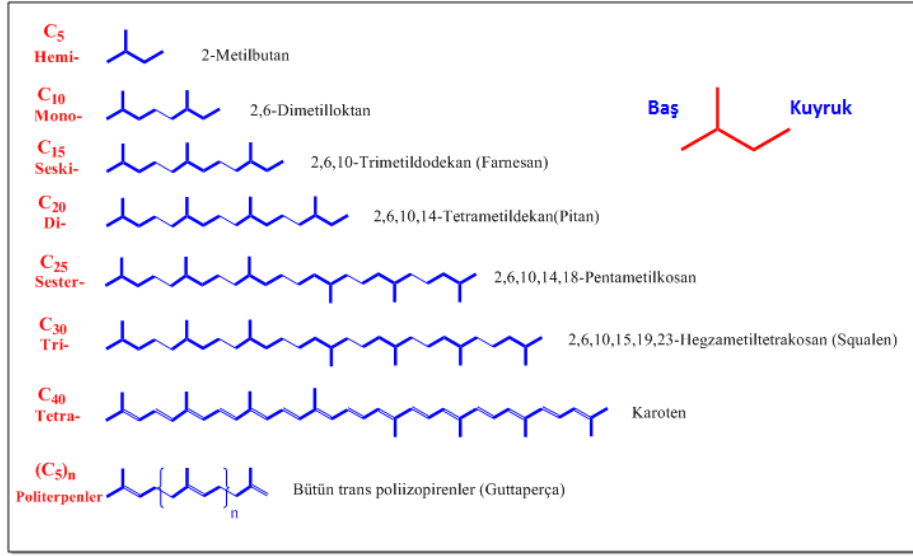
2.1 Terpenler

Terpenler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, gıda, kozmetik, zirai mücadele alanlarında kullanılan ve ekonomik fayda sağlayan doğal bileşenlerdendir (Rowe, 2005; Springob ve Kutchan, 2009; Silvestre ve Gandini, 2008, Carvalho ve Fonseca, 2006a). Doğada bulunan 40. 000’den fazla yapısıyla terpen ve terpen türevi bileşenler en önemli ve kalabalık sekonder metabolit gruplarındandır (Croteau ve ark., 2000; Sell, 2003; Zwenger ve Basu, 2008; Springob ve Kutchan, 2009; Osorio ve ark, 2010).

Uçucu yağların ana bileşenlerini oluşturan terpenlerin mantarlarda, denizde yaşayan mikroorganizmalarda ve böceklerde -örneğin *Papilionidae* cinsi kelebekler- bulunduğu rapor edilmiştir (Demyttenaere ve ark., 2001; Silvestre ve Gandini, 2008).

İlk önce bitki metabolizmasının atık bileşenleri olduğu ifade edilen terpenlerin aslında anabolik reaksiyonlar için *ara ürün* olduğu daha sonra belirlenmiştir. Giberellik asit gibi terpenlerin büyüme düzenleyicileri (fitohormonlar) olarak görev yaptığı ortaya çıkmış, memelilerde bulunan terpenlerin hücre membranlarının ve enzimatik reaksiyonların düzenlenmesinden, metabolik yolların stabilizasyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Sell, 2003; Kroschwitz, 2007; Carvalho ve Fonseca, 2006a; Silvestre ve Gandini, 2008).

Terpenler, yapısal olarak isoprenil difosfat (IPP) ve dimetilallildifosfat (DMAPP) mevalonat yolağında açığa çıkan izopren (C_5H_8 ; 2- metil-1,4,butadien) birimlerinin ‘baş-kuyruk’ şeklinde bağlanmasıyla meydana gelen doğal hidrokarbonlardır (Fessenden ve Fessenden, 2001; Demyttenaere, 2001; Silvestre ve Gandini, 2008, Krings ve Berger, 1998). Tek izopren birimi (5 karbon) hemiterpen yapısını, iki izopren birimi (10 karbon) monoterpenleri; üç izopren birimi (15 karbon), seskiterpenleri; dört izopren birimi (20 karbon) diterpenleri ve sekiz izopren birimi (40 karbon) tetraterpenleri oluşturur (Şekil 2.1) (Demirci, 2000; Fessenden ve Fessenden, 2001; Demyttenaere, 2001; Sell, 2003; Başer ve Demirci, 2007).



Şekil 2. 1. İzoprenlerin ‘baş-kuyruk’ esasına göre bağlanması ve terpenlerin izopren birim sayılarına göre sınıflandırılması (Breitmaier, 2006)

Terpenler, bitkilerin sitosollerinde asetil mevalonik asit (MVA) yolağında koenzim-A(asetil Co-A)’ dan, plastidlerinde ise deoksiksilozfosfat (DXP) yolağında pirüvat ve gliseralehit-3-fosfattan başlayarak meydana gelir. Hemiterpenler, tetraterpenler ve tetraterpenler DXP yolağından, triterpenler, steroidler ve bazı seskiterpenler MVA yolağından türevlenir. Her iki metabolik yolda da açığa çıkan ve baş-kuyruk esasına uygun birleşen izopren üniteleri çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarla terpenleri oluşturmuş ve onlara yeni işlevsel gruplar kazandırmışlardır. Bu nedenle, ilaç, parfümeri, aroma ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılan basit molekül yapıları terpenlerin çoğu antikanser, antimikrobiyal, antigermsidal vb. gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Bununla birlikte koku ve tat aktivitesi yüksek, düşük polariteye sahip terpenlerin farklı formlarının sahip olduğu değişik tat ve koku özellikleri bu bileşenlerin ekonomik önemini giderek artırmıştır (Krings ve Berger, 1998; Fessenden ve Fessenden, 2001; Başer ve Demirci, 2007; Springob ve Kutchan, 2009; Silvestre ve Gandini, 2008; Osorio ve ark, 2010). Limonen, karvon gibi terpenler ve oksijenlenmiş türevleri daha çok koku ve tat bileşeni olarak diş macunu, sabun, şampuan gibi gıda, kozmetik ve ilaç sanayi ürünlerinin formülasyonlarına ilave edilmekte, bunun yanı sıra

antikanser diyetlerinde '*fonksiyonel gıda bileşenleri*' olarak da kullanılabilmektedir (Sell, 2003; Humphrey ve Beale; 2006; Carvalho ve Fonseca, 2006b; Osorio ve ark, 2010; Adams ve ark., 2011).

Tez çalışmasında substrat molekülü olarak kullanılan karvon türevi tetrahidrokarvon, *p*-mentan grubu monoterpenlerden olduğundan, monoterpenler ve bazı önemli *p*-mentan grubu monoterpenler hakkında öz bilgilere değinilmiştir.

2.2. Monoterpenler, Biyolojik Aktiviteleri ve Aroma Özellikleri

Monoterpenler, lipofilik, uçucu karakterli, polimerleşme ve otooksidasyona yatkın, pek çok bitkinin kendine has aromasını kazandıran basit yapılı terpenlerdendir (Fessenden ve Fessenden, 2001; Carvalho ve Fonseca, 2006a; Mahmoud ve Croteau, 2002; Silvestre ve Gandini, 2008; Breitmaier, 2006; Springob ve Kutchan, 2009). Çoğunlukla yüksek yapılı bitkiler, uçucu yağ ve oleozinlerden, az miktarda da alg, fungus ve mayalardan elde edilen otuz farklı karbon iskelet yapısını içeren yaklaşık 22.000 monoterpen literatürde tanımlanmıştır (Swiegers ve ark., 2008; Carvalho and Fonseca, 2006a; Springob ve Kutchan, 2009; Sell, 2003).

Doğal kaynaklarından buhar veya su distilasyonu ve solvent ekstraksiyonuyla uçucu yağlarla karışık halde elde edilen monoterpenler, negatif basınçta fraksiyonel distilasyon ya da bir kristalin türevinin rejenasyonu (deterpenizasyonla) uçucu yağlardan ayrılmaktadır (Sell, 2003).

Monoterpenler, yapısal özelliklerine göre doğrusal, halkalı ve diğer yapılara sahip olmak üzere 4 gruba ayrılır. Doğrusal, halkalı (tek halkalı (monosiklik), çift halkalı (bisiklik), üç halkalı (trisiklik) ve diğer yapılara sahip monoterpenlere örnekler Çizelge 2.1' de verilmiştir (Zwenger ve Basu, 2008; Fessenden ve Fessenden, 2001; Krings ve Berger, 1998; Breitmeier, 2006). Bunun yanında istisnai bir durum olarak izopren ünitelerinin "baş-kuyruk" esasına göre bağlanmadığı düzensiz monoterpenler de mevcut olabileceği gibi sitronellol, geraniol ve mentol gibi alkol; sitral ve sinnamaldehit gibi aldehit; menton, karvon gibi keton; timol, öjenol gibi fenol; sineol gibi oksit ve ester yapılarında

monoterpenler de doğada bulunmaktadır (Breitmaier, 2006; Carvalho ve Fonseca, 2006a, Mahmoud ve Croteau, 2002; Silvestre ve Gandini, 2008; Attokaran, 2011).

Çizelge 2. 1. Yapılarına göre monoterpenlerin sınıflandırılması (Anonim, 2012a; Breitmaer, 2006)

MONOTERPENLER	DOĞRUSAL	HALKALI			DİĞER
		Monosiklik	Bisiklik	Trisiklik	
	Sitranelol	Karvon	δ -Karen	Trisiklen	<i>p</i> -simen
	Geraniol	Menton	Pinen		Karvakrol
	β -Mirsen	Mentol	Kafur		Timol
	Linalol	Karvomenton	Borneol		α -İyonon Piretrin

Daha önceleri monoterpenlerin bitkilerde atık bileşen ya da yedek karbon kaynağı olarak sentezlendikleri düşünülmüştür. Ancak sahip oldukları değişik türdeki yapılar ve işlevsel grupların kombinasyonu ile çeşitliliği artan monoterpenlerin birbirinden farklı biyolojik aktivite ve fizyolojik görevleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Çizelge 2.2’de bazıları listelenmiştir (Carvalho and Fonseca, 2006a).

Çizelge 2. 2. Monoterpenlerin sahip olduğu bazı biyolojik aktivite ve fizyolojik işlevler (Harrewijn ve ark., 2001; Carvalho ve Fonseca 2006a; Mahmoud ve Croteau , 2002)

BİYOLOJİK AKTİVİTE	
Antimikrobiyal	Timol ,karvakrol, D-Limonen
Antitümöral	(+)- <i>R</i> -limonen ve geraniol
Antiviral	Mentol, limonen, pinen
Fungisidal	L-Karvon
Larvisidal	1,8-sineol
FİZYOLOJİK İŞLEV	
Savunma	Limonen, pinen ve mirsen
Tozlaşma Ve Bitki-Bitki İletişimi	Linaol, kamfen ve sineol
Böcek ve sineksavar	α - ve β -Pinen, tetrahidrokarvon

Monoterpenler ve türevleri ilaç, tıp, tarım, kozmetik, metal, elektronik, uçak sanayi, gıda ve kimya sanayilerinde; ilaç ve hammaddesi, aromaterapi yağı bileşeni, dezenfektan, klorlanmış türevleriyle temizleyici, deterjan, sabun, biyoyakıt vb. olarak değerlendirilmektedir (Mahmoud ve Croteau, 2002; Carvalho ve Fonseca, 2006a; Osorio ve ark., 2010).

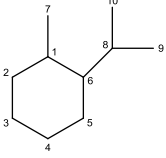
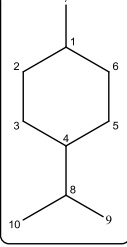
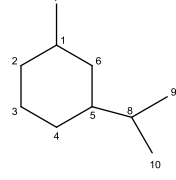
Aroma maddelerinin moleküllerinin sterokimyasal yapılarına bağlı olarak tat ve koku karakteristiklerinin değişmesi monoterpenlerin çok çeşitli duyuşal niteliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle doğada bol bulunan ve daha pek çok özelliği bünyesinde barındıran monoterpenler tat ve koku maddelerinin en önemli kaynaklarından (Cheetham, 1997; Brenna ve ark., 2003; Carvalho ve Fonseca, 2006a)

2.3. Endüstriyel Öneme Sahip Bazı *p*-Mentan Yapısına Sahip Monoterpenler ve Kullanım Alanları

Tek halka yapısına sahip monoterpenler genelde *p*-mentanın izomerlerinden türevlenmiştir. Mentan grubuna ait diğer izomerik tipler *o*- ve *m*-mentanlardır (Breitmaier, 2006). *p*-Mentanlar turpentin yağında bulunurken diğer izomerik tipler doğada bulunmaz (Breitmaier, 2006; Burdock, 2010). Özellikle *Lamiaceae* familyasının *Mentha* cinsine ait çeşitli nane türlerinin en önemli ana bileşeni olan monosiklik monoterpenler, *p*-mentan iskelet yapısından veya geometrik izomerlerinden türevlenmiştir (Sell, 2003).

Farklı bitki familyalarında bulunan bazı *p*-mentan türevleri ise Çizelge 2.3.' te listelenmiştir. 1900'lü yıllardan önce başlayan çalışmalarla limonen, *p*-simen, mentol, karvon gibi önemli *p*-mentan türevlerinin yapısı ortaya konmuştur (Whiting ve Harper, 1968).

Çizelge 2. 3. Mentan grubu monoterpenlerden *p*-mentan monoterpenlerinin bulunduğu bitki tür ve familyaları, bazı *p*-mentanların koku özellikleri (Sell, 2003; Breitmaier, 2006; İşcan, 2009; Burdock, 2010)

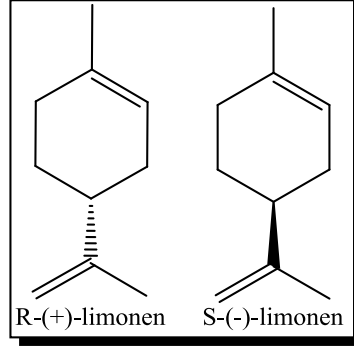
Mentan Grubu Monoterpenler		
<i>o</i> -mentan	<i>p</i> -mentan	<i>m</i> -mentan
		

<i>p</i> -Mentan Grubu Monoterpenler		
Familya	Tür	Monoterpen
Butaceae	<i>Citrus arantium</i>	(<i>R</i>)-(+)-limonen
		Portakal kokusu
Myrtaceae	<i>Eucalyptus phellandra</i>	(<i>R</i>)-(-)- α -fellendren
		Çamsı, terementi kokulu
Pinaceae	<i>Abies alba</i>	(<i>S</i>)-(+)- α -fellendren
		Çamsı, terementi kokulu
Umbelliferae	<i>Phellandrium aquaticum</i>	(<i>R</i>)-(-)- α -fellendren
		Limon, portakal kokusu

2.3.1. Limonen

D-Limonen ((*R*)-(+)-limonen; *p*-menta-1,8-dien) α -pinenden sonra doğada en sık rastlanan *p*-mentan türevidir (Noma ve Asakawa, 2010a). *D*-Limonen, daha çok biyolojik kaynaklarından izole edilebilirken, *L*-limonen ((*S*)-(-)-limonen) daha çok kimyasal yollarla elde edilmektedir (Şekil. 2.2). Her yıl 36 milyon kg tüketilen *D*-limonen, turunc meyvelerinin (*Citrus spp.*) kabuk yağlarında %90'ın üzerinde bulunurken (Adams ve ark., 2003, Demyttenaere ve ark., 2001), *S*-(-)-limonen *Mentha* türleri ve kozalaklı ağaçlardan elde edilen yağlarda düşük miktarlardadır (Demyttenaere ve ark., 2001; Adams ve ark., 2011). Limonen, oda

sıcaklığında sıvı ve renksizdir. Genellikle t rpent n yağının hidrasyonu ile elde edilir (Tan ve ark., 1998).



Şekil 2. 2. Limonenin enantiyometrik yapıları

D-Limonen, temizlik ürünlerinde yağ sökücü etkisinden dolayı, bazı ilaç ve gıda maddelerinde de limon veya portakal aroması kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda meme, kolon, akciğer ve prostat kanserini iyileştirici etkileri olduğu ve tümör oluşumunu gerilettiği de saptanmıştır (Crowell ve ark., 1994; Vigushin ve ark., 1998; Chen ve ark., 2006; Krings ve Berger, 1998, 2007; Springob ve Kutchan, 2009; Adams ve ark., 2011).

Dünya çapında yılda yaklaşık 50 milyon kg (günlük kişi başına tüketim miktarı: 27,905  g) tüketilen ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tat ve koku maddelerinin yıllık satışlarının % 92'sini kapsayan limonen, terpen alkoller ve ketonlarının üretiminde kullanılan önemli bir öncüdür (Tan ve ark., 1998; Demyttenaere ve ark., 2001; Adams ve ark., 2011). Bu bağlamda D-limonenin substrat olarak kullanıldığı bazı biyotransformasyon çalışmalarında, *Pseudomonas incognita* kullanılarak büyük oranda kristalik asit, perilik asit, dihidrokarvon, karvon ve karveol oluşurken, *P.gladioli* ile (+)- -terpineol ve (+)-perilik asit elde edilmiştir. Limonenin fungal transformasyonunda ise *Clodasporium spp.* (+)-limoneni trans-limonen-1,2-di le dönüştürürken, aynı cinsin farklı türü *Clodasporium spp.* ise limoneni  -terpineole çevirmiştir. *Penicillium digitatum* ve *P.italicum*, limonenden cis-trans carveol, (+)-karvon ve diğer minör bileşenleri üretmiştir. Limonenin *Aspergillus cellulosa* M77 ile biyotransformasyonu

sonucundaysa ilk defa isopiperiton, cis-carveol ve perilil alkolün elde edildiği duyurulmuştur (Demyttenaere ve ark., 2001).

2.3.2. Mentol

Yıllık tüketimi 7000 tondan fazla olan mentol((1*R*,2*S*,5*R*) *p*-mentan-3-ol) çeşitli nane türlerinden (*Mentha arvensis*, *M. piperita*) elde edilen yağların ana bileşenidir (Springob ve Kutchan, 2009, Srivastava ve ark., 2002). Kristal, açık veya beyaz renkte olup oda sıcaklığında katıdır. Üç stereo merkeze sahip olan mentolün muhtemel 8 stereoizomeri vardır. (-)-Mentol, tatlı nane aroması ve serinletici etkisiyle bilinirken, (+)-enantiyomeri tatsız ve yavan bir nane aromasına sahiptir (Springob ve Kutchan, 2009; Krings ve Berger, 1998; Brenna ve ark., 2003; Breitmaier, 2006). Japon nanesi (*Mentha arvensis*) yağındaki (+)-neomenthol, sardunya (*Pelargonium roseum*) yağında bulunan (-)-neoisomentol mentolün enantiyomerik yapılarına örnek gösterilebilir (Breitmaier, 2006).

Anestezik, antipruritik, antiseptik, karminatif, gastrik, sedatif, *E. Coli* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalara karşı antibakteriyel (Trombetta ve ark., 2005) etkilere de sahip olan (-)-mentol, ağız bakım ürünlerinde (%36), ilaçlarda (%22), sigara (%12) ve sakızlarda aroma ajanı (%7) ve gıda sanayinde aroma (%17) bileşeni olarak kullanılmaktadır (Springob ve Kutchan, 2009; Surburg ve Panten, 2006). Tüm bu bilgilere ek olarak mentol, şampuan, sabun, parfüm, diğer kozmetikler, temizlik malzemeleri ve deterjanlar gibi ürünlere hoş koku kazandırmak amacıyla yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Bhatia ve ark., 2009). Tüketilen mentolün 3/4'ü doğaldır (Springob ve Kutchan, 2009).

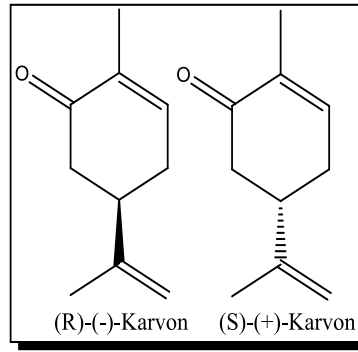
2.3.3. Karvon

Karvon 70 kadar bitki türü tarafından üretilen önemli monoterpenoidlerden biridir (Sell, 2003). Limonen ile keton bağlantılı olduğu 1894 yılında Wagner tarafından ortaya konan karvon, farklı olfaktor yapıları gösteren enantiomerik yapılara sahip olan iyi bir örnektir (Pelosi ve Viti, 1978; Demirci ve ark., 2004).

Doğada (*R*)-(-) ve (*S*)-(+)-karvon olmak üzere her iki enantiyomerik formda da bulunur (Şekil 2.3).

(*R*)-(-)-karvon, bahçe nanesinin (*Mentha spicata*) ve dereotunun (*Anethum graveolens*) ana bileşenidir. Dereotu bitkisi ve tohumundan elde edilen yağda sırasıyla % 30,5 ve % 20,9 oranlarında bulunur. Trans-karveolün *Rhodococcus erythropolis DCL14* tarafından biyotransformasyonu ile da (*R*)-(-)-karvon elde edilir (Anonim, 2009). Renksiz, berrak bir sıvıdır. Propilen glikolde çözünebilirken, gliserinde çözünmez (Bommarius ve Riebel, 2004; Carvalho ve Fonseca, 2006b).

(*S*)-(+)-karvon kaynağı olarak kullanılan Karaman kimyonu (*Carum carvi*) tohumlarının yorgunluk, gaz giderici, ağrı kesici, balgam söktürücü, uyarıcı, sindirime yardımcı özellikleri bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle tıbbi olarak hazımsızlık şikayetlerinde, bağırsak iltihabı tedavisinde kullanılırken, antitümör ajanı olarak kullanılan “*eleutherobin*” maddesinin stereoselektif sentezinde (4*S*)-(+)-karvondan yararlanılır (Cramarossa ve ark., 2005; Carvalho ve Fonseca, 2006b; Lehmann ve ark., 2008,).



Şekil 2. 3. Karvonun enantiyomerik yapıları

Demirci (2000), yaptığı çalışmada (+)-karvon ve (-)-karvonun *Absidia glauca*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium claviforme*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzerii* mikroorganizmalarıyla biyotransformasyonu sonucunda sırasıyla (+)-karvondan (-)-neohidrokarveol, (-)-izohidrokarveol, (-)-dihidrokarveol, (+)-*cis*-izohidrokarvon, (-)-neoizohidrokarveol, (-)-*trans*-karveol;

(-)-karvondan (+)-neohidrokarveol, (+)-izohidrokarveol, (+)-dihidrokarveol, (-)-cis-izohidrokarvon, (+)-neoizohidrokarveol, (+)-*trans*-karveol, 10-hidroksi-(+)-neodihidrokarveol elde edilmiştir. Ek olarak, karvonun enantiyomerik yapılarıyla yakından ilişkili, *trans*-karvomenton, *cis*-dihidrokarvon ve karvenon gibi nane koku ve tadından sorumlu olan pek çok enantiomeri de bulunmaktadır (Lehmann ve ark., 2008; Demirci ve ark., 2004). Karvon enantiyomerleri, antimikrobiyal/antifungal ajan (Karatzas ve ark., 2000), patates filizlenme inhibitörü olarak kullanılabildiği gibi; dondurma, fırıncılık ürünleri, et ürünleri, peynir çeşitleri, gazlı ve alkollü içecekler, yumuşak ve sert şekerlemeler ve dondurulmuş ürünlerde aroma maddeleri olarak kullanılmaktadır (Bommarius ve Riebel, 2004). Çavdar ekmeği, peynir, lahana turşusu, şeker, et ürünleri, sos ve likörlerde aroma maddesi olarak kullanılan ve kozmetik, diş macunu, sakız ve farmasötik preparatlarda bulunan (-)-karvon nane tadına sahipken, (+)-karvon karakteristik kimyon aromasına sahiptir (Jager ve ark., 2000; Cramarossa ve ark., 2005).

2.4. Tetrahidrokarvonun Mikrobiyal Transformasyonu

Çalışmamızda kullandığımız fonksiyonel grup olarak α karbonuna bağlı olan bir keto grubu içeren ve *p*-mentan grubu monoterpenlerden biri olan tetrahidrokarvon (karvomenton), doğada başlıca iki nane türünde (*Mentha spicata* ve *M. arvensis*), greyfurt (*Citrus paradisi*) kabuğu yağında, tropik yıldız meyvesinde (*Averrhoa carambola*), solucan otunda (*Tanacetum vulgare*) (Şekil 2.4), sardunya bitkisi yağında (*Pelargonium hybrida* L.) bulunmaktadır (Thomas, 1974; Deboukian ve Ashok, 2007; Anonim, 2001). Diğer enantiyomerik karvonlar ve bu yapıyla yakından ilişkili olan *trans*-karvomenton, ve karvenon benzeri moleküller gibi tipik olarak nane aromasıyla karakterize edilmektedir (Sidhu ve Swaleh, 1965; Burdock, 2010; Anonim, 2009). Aynı zamanda konyağın kendine has aromasının ana bileşenlerinden biri olan tetrahidrokarvon, gıda sanayinde aroma bileşeni (FEMA No:3176) olarak sakız ve benzeri ürünlerde kullanılmaktadır (Sidhu ve Swaleh, 1965; Burdock, 2010).

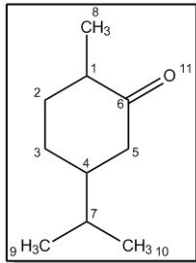
Tetrahidrokarvon, üç enantiyomer ve (1*R*,4*R*)- *trans* stereoisomeri olmak üzere dört formda bulunmaktadır. (-)-Karvomenton bu yapılardan doğada en çok bulunanıdır. Tetrahidrokarvonla ilgili çalışmalar, 1890'lı yıllarda başlamıştır. 1893 yılında Baeyer ve Wallach tarafından karvomentolün oksidasyonu ile elde edilen tetrahidrokarvon, 1922 yılında ilk defa doğadan izole edilmiştir. 1952 yılında ise (+)-karvonun katalitik hidrojenasyonu ile tetrahidrokarvonun çeşitli izomerleri elde edilmiştir. Thomas (1974), Whiting (1968) Gomez ve ark. (1991), Angel ve ark. (1993), Torres ve ark. (1999) karvonun; Fürstner ve Hannen (2006) (*R*)-karvotenasetonun hidrojenasyonu ile, Scheneier ve Murray (2002) ise (4*R*)-(+ ve (4*R*)-(-)-limonenin hidroborasyon, oksidasyon ve seçici indirgenmesiyle tetrahidrokarvon izomerlerini kimyasal yollarla elde etmişlerdir.

Karvomentol ve türevleri daha önceki çalışmalarda *D*-limonenin hidroborasyon, oksidasyonu ile; karvonun hidrojenasyonu ile ve karvomentonun metil-2-iodopropionat katalizörlüğünde hidrojenasyonu ile elde edilmiştir (Brown ve Pfaffenberger, 1974; Gomez ve ark., 1991; Torres ve ark., 1999; Pierce ve ark., 1971).

Literatür araştırmaları sonucunda, tetrahidrokarvonun biyolojik etkilerinin araştırıldığı tek bir çalışmaya rastlanmıştır, karvon, karvon hidrat, dihidrokarvon, *trans*-sobrerol ve tetrahidrokarvonun glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesini indükleyen etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (Zheng ve ark., 1992). GST enzim kompleksi, karsinogen, mutajen ve zararlı kimyasal maddelerin, metabolize edilemeyen hidrofobik pek çok bileşiğin ve ksenobiyotiklerin hücre içi detoksifikasyonunda görev alır. GST, zararlı maddeleri glutatyonla bağlayıp konjuge bileşenleri hücre dışına taşıyarak organizmadan atılmasını veya ksenobiyotik biyotransformasyonu ile merkaptirik aside dönüştürülmesini sağlayan detoksifikasyon aşamaları için önemli bir biyokatalisttir (Aköz ve ark., 2000). Aynı zamanda tetrahidrokarvonun sinek ve böcek kovucu etkisiyle ilgili olarak çeşitli patentler alınmıştır (Deboukian ve Ashok, 2007). Alınan patentlerde termit, ateş ve marangoz karıncalarının ortamdan uzaklaştırılması için 25-300 ppm tetrahidrokarvonun etkili olduğu (Deboukian ve Ashok, 2010), 25-30 mg tetrahidrokarvonun ortamdaki *Cimex lectularius* böceklerinin %58'ini öldürdüğü ifade edilmiştir (Deboukian ve Raina, 2011a). Zehirli bir böcek olan *Solenopsis*

invicta için 25 mg tetrahidrokarvon, ortamdaki tüm böceklerin ölmesi için yeterli olduğu gösterilmiştir (Debouikan ve Raina, 2011b). Tetrahidrokarvon türevi dihidrokarvon, dihidrokarveol, dihidrokarvil asetat, karvil asetat, karvil propiyonat ve karveol gibi tetrahidrokarvonun çeşitli reaksiyonlarla birbirine dönüşebilen bazı türevleri gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Burdock, 2010) Tetrahidrokarvonla ilgili diğer özet bilgiler Çizelge 2.4 'te verilmiştir.

Çizelge 2. 4. Tetrahidrokarvonun fizikokimyasal özellikleri (Wouters ve ark., 1999; Furstner ve Hannen, 2005; Burdock, 2010, Adams ve ark., 2011)

TETRAHİDROKARVON					
Sinonimleri Karvomenton; 5-İzopropil-2-metilsikloheksanon; <i>p</i> -Mentan-2-one; Trans-5-izopropil-2 metilsikloheksan-1-one; 1-Metil-4-izopropilsikloheksan-2-one				Moleküler Formül C ₁₀ H ₁₈ O Yasal tanınırlık FEMA No:3176 Moleküler ağırlık g/mol 154. 25	
Spektral Veriler					
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃): d=2.39 (ddd, J=2.3, 3.4, 13.0 Hz, 1 H), 2.31 (dddd, J=1.2, 6.4, 13.1, 13.1 Hz, 1H), 2.06 (m, 2H), 1.85 (dddd, J=2.8, 2.8, 5.4, 12.4 Hz, 1 H), 1.55 (m, 2 H), 1.42 (m, 1 H), 1.29 (ddd, J=3.3, 12.8, 15.6 Hz, 1H), 1.01 (d, J=6.5 Hz, 3 H), 0.90 (d, J=4.2 Hz, 3H), 0.88 (d, J=4.2 Hz, 3H)			¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃): d=212.7, 45.7, 44.5, 44.1,34.3, 31.9, 28.1, 18.7, 18.5, 13.5; IR (KAP): n [~] =2960, 2931, 2871, 1710, 1455, 1428, 1387, 1368, 1315, 1240, 1220, 1197, 1127 cm ⁻¹		
Diğer Fiziksel Özellikler					
Enantiyomer	Yoğunluk (g/cm3)	Optik Çevirme	Kaynama Noktası(C ⁰)	CAS No	CRC No
(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-Tetrahidrokarvon	0.881±0.06	+13.4	220	5206-83-7	NYG48-U
(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-(+)- <i>trans</i> Tetrahidrokarvon	0.881±0.06	+11.1	218-219	59-471-80-6	JKF90-K
(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-Tetrahidrokarvon ((-)-İzokarvomenton)	0.881±0.06	-1.4	220-221	13163-74-1	JLF91-G
(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Tetrahidrokarvon	0.881±0.06	-27.95	220	13163-74-0	JFH48-E
AROMA AJANI OLARAK TETRAHİDROKARVONUN KULLANIMI					
Kullanım Alanları	Kullanım miktarları (mg/kg)				
	Optimum		Maksimum		
Alkollü içkiler	3.05		5.45		
Alkolsüz içecekler	4.98		9.82		
Dondurulmuş gıdalar	4.57		8.31		
Et ürünleri	10.00		20.00		
Yumuşak şekerlemeler	9.04		17.56		

2.5. Tetrahidrokarvonun Biyotransformasyonu İlgili Yapılmış Çalışmalar

Yaygın kullanım alanları ile sahip oldukları tat ve koku özelliklerinin yanı sıra ucuz ve kolay bulunabilir monoterpenlerin oksijenlenmiş ve çeşitli biyoaktif etkiler kazanmış türevlerinin doğal kaynaklarından saflaştırılması genellikle düşük verimle sonuçlanır. Ancak çoğu zaman oksijenlenmiş terpen türevlerinin doğal kaynaklarından eldesi ekonomik olarak imkânsızdır. Ancak geniş çeşitlilikteki monoterpen yapılarını kısa sürede dönüşüme uğratabilme yeteneğine sahip mikroorganizmalar veya enzimleri kullanılarak hedeflenen ve substratlarına göre arzu edilebilir yapılarda, daha değerli doğal aroma maddeleri sentezlenebilir. Örneğin; alifatik alkenoller, karboniller, bunların laktonları, vanilin, karboksilik ve benzoik asit esterleri gibi çeşitli doğal aroma maddeleri mikrobiyal biyotransformasyonlarla hızlı, çabuk ve kolayca elde edilebilir (Menzel ve Schreier, 2007; Schrader ve ark., 2004). Bunlardan bazıları Çizelge 2.5’ te listelenmiştir.

Biyotransformasyon, farmakolojik olarak *in vivo* şartlarda vücuda giren yabancı maddelerin karaciğerde bulunan enzimler tarafından zararsız hale getirilmesini sağlayan biyokimyasal reaksiyonları ifade ederken, mikrobiyal transformasyon ise canlılığı ve gelişimi sağlanan mikroorganizmaların bulunduğu besi ortamlarına, substrat ilavesi ile gerçekleşen bir seri oksidasyon, redüksiyon, dekarboksilasyon veya hidroliz vb. reaksiyonlarını kapsayarak yeni metabolitlerin sentezlenmesine denir (Leuenberger, 1990; İşcan, 2009).

Biyotransformasyon reaksiyonlarında mikroorganizmalar dışında bütün hücre sistemleri (canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri, canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri ve insan) ile hücresiz preperatlar (saflaştırılmamış ve saflaştırılmış enzimler) da katalizör olarak kullanılabilir (Demirci, 2000; Houjin ve ark., 2006; Grogan, 2009; Schewe ve ark., 2011; Kurt, 2011). Ancak mikrobiyal hücrelerin katalizlediği biyotransformasyon reaksiyonlarının kısa sürede gerçekleşmesi, mikrobiyal hücrelerin metabolize edebildikleri substrat çeşitliliğinin fazlalığı ile mikrobiyal biyotransformasyon diğer bütün hücre sistemleriyle gerçekleştirilen biyotransformasyonlara göre üstünlüklere sahiptir (Demirci, 2000; Kurt, 2011). Mikrobiyal transformasyonlarda en sık gerçekleşen

reaksiyonlar, oksidoredüktaz ve hidrolaz enzimlerinin katalizlemiş olduğu yükseltgenme ile C-N, glikozit, peptit, ester ve amit gruplarının hidroliz reaksiyonlarıdır (Loughlin, 2000; Demirci, 2000).

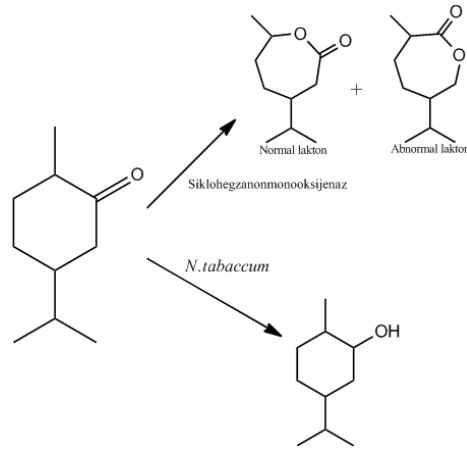
Bu reaksiyonlarda rol oynayan enzimler: Oksidoredüktazlar (EC-1), transferazlar (EC-2), hidrolazlar (EC-3), liyazlar (EC-4), izomerazlar (EC-5), ligazlardır (EC-6) (Demirci, 2000; Kurt, 2011). Özellikle oksidoredüktazlardan sitokrom P450 (CYP450) enzim grubu yükseltgenme reaksiyonlarını ve yukarıdaki reaksiyonların çoğunu katalizleyen önemli bir monooksijenazdır (Schewe ve ark., 2011).

Çizelge 2. 5. Biyotransformasyonla üretilen bazı doğal aroma bileşenleri (Vandamme, 2003; Schrader ve ark., 2004; Dubal ve ark., 2008)

<i>Mikroorganizma</i>	<i>Ürettiği Aroma Bileşenleri</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> <i>ocystis spp</i>	Terpenler, laktonlar meyve ve çiçek aromaları, meyve ester aromaları
<i>Geotrichum klebahnii</i>	Karboksilik asitlerin etil esterleri, hoş kokulu meyve aromaları
<i>Penicillium sp.</i> <i>Botryodiplodia sp.</i>	Mantar aroması, meyve laktonları, metil keton(peynir aroması)
<i>Aspergillus niger</i> <i>Pycnopus cinnabarinus,</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ferulik asitten vanilik asit ve vanilin
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Glukozdan soya sosu aroması (DMF-furanon)
<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida tropicalis</i>	Hindistancevizi aroması
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Rikinoleik asitten , gamma-dekalakton (şeftali aroması)
<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Bütirik asit (tereyağı aroması)

Yapılan kaynak araştırmasında doğal sinek-böceksavar ve gıda aroma bileşeni olarak kullanılan “**tetrahidrokarvon**” ile yapılmış fungus veya bakterilerin bütün hücre sistemleri olarak kullanılmasıyla gerçekleşen bir biyotransformasyon çalışmasına rastlanmazken, Suga ve ark. (1988), tütün (*Nicotiana tabaccum*) bitki hücre kültürü kullanılarak tetrahidrokarvonun karvomentole dönüştüğü bildirmiştir (Ishikawa ve ark., 2002). Ayrıca

Acinetobacter spp., *Arthrobacter spp.*, *Brachymonas spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Comamonas spp.* türlerinin sikloheksanon monooksijenaz genlerinin *E.coli*' de ifade edilmesi, enzimin saflaştırılması ve karvomentonun biyotransformasyonunda kullanılmasıyla normal ve abnormal laktonlar elde edilmiştir. *Brevibacterium spp.* sikloheksanon monooksijenazı ile tetrahidrokarvonun %71 verimle 7-metil-4-izopropil-2-okzo-okzoepanona dönüştüğü rapor edilmiştir (Şekil 2.4) (Cernuchova ve Mihovilovic, 2007).



Şekil 2.4. Tetrahidrokarvonun sikloheksanonmonooksijenaz ve *N. tabaccum* hücre kültürüyle gerçekleşen biyotransformasyonu (Ishikawa ve ark., 2002; Cernuchova ve Mihovilovic, 2007)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler

- 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil: DPPH (Sigma)
- 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit): ABTS^{•+} (Sigma)
- Glasiyel asetik Asit (Carlo Erba)
- Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) (Sigma)
- Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (Sigma)
- Etil asetat (Carlo Erba, Riedel de Haen)
- Dimetil sülfoksit (Riedel de Haen)
- Ketokonazol (Merck)
- Kloramfenikol (Sigma)
- Trifenil tetrazolyum klorür (Sigma)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Aseton (Merck)
- n-hekzan (Merck)
- Anisaldehit (Fluka)
- Sülfürik asit (Riedel de Haen)
- Malt ekstresi (Fluka)
- Pepton (Fluka)
- Glikoz (Fluka)
- Maya ekstraktı (Fluka)
- Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sodyum klorür($NaCl$) (Fluka)
- Susuz sodyum sülfat (Fluka)
- Askorbik asit (Sigma)
- Trisma-Base (Sigma)
- Troloks (Sigma)

- Sodyum persülfat (Sigma)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Potasyum hidroksit (KOH) (Merck)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck)
- Tetrahidrokarvon (Frutarom)
- 3-[N-morpholino] propansulfonik asid (MOPS) (Sigma)
- Bovin serum albumin (Sigma)
- Orlistat (Sigma)
- Fast blue B (Sigma)
- Alfa naftil asetat (Sigma)
- Potato Dekstroza Agar (Merck)
- Sabouroud Glukoz Agar (Fluka)
- Gallik Asit

Kullanılan sarf malzemeleri

Hazır İTK plakları (TLC-Silicagel 60 GF₂₅₄, mesh 15 µm Merck), cam pastör pipetleri, tek kullanımlık plastik kapaklı petri (90 mm x 25, ISOLAB), cam kapaklı petri (150 mm), tek kullanımlık plastik pipetler (1000, 100 µL), 96 kuyucuklu mikrotipler, vakumlu filtrasyon sistemi, (Sartorius), Drummond kılcal borular.

Kullanılan aletler ve cihazlar

- Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GK/KS) (Shimadzu GC 2010)
- UV–VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV1700 PharmaSpec)
- Vakumlu sentrifügal yoğunlaştırıcı (Labconco)
- Otoklav (Hirayama, HV-50)
- Steril Kabin (Heal force HF SAFE 900)
- Vorteks karıştırıcı (Ika Genius 3)
- Ultrasonik banyo (Bandalin-Sonorex)

- pH metre (WTW Inolab)
- Santrifüj (Sigma)
- Bakteriyolojik Etüv (MMM Incucell)
- Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific)
- Mikroplate spektrofotometre (BioTek, Powerwave XS)
- Ultra derin dondurucu (-85 °C) (New Brunswick Scientific)
- Rotavapor (Heidolph ve Buchi)
- Otomatik multikanal pipetör, (Brand)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV1700 PharmaSpec)

Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3. 1. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma /Kaynak	
<i>Absidia ramosa</i> /NRRL 1332	<i>Devosia riboflavina</i> /NRRL B-784
<i>Alternaria brassicola</i> / DA izolat	<i>Fusarium culmorum</i> /Ana.Ü.Fen Fak. Biy. Böl.
<i>Aspergillus amstelodami</i> /NRRL 4716	<i>Glomeralla cingulata</i> /Ana.Ü.Fen.Fak.Biy. Böl.
<i>Aspergillus nidulans</i> /A. Ü.Fen.Fak.Biy. Böl.	<i>Penicillium claviforme</i> /MR 376
<i>Aspergillus niger</i> /ATCC 10549	<i>Penicillium odoratum</i> / DA 37
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>Africanus</i> / Ana.Ü.Fen.Fak.Biy. Böl..	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /ATCC 9763
<i>Bacillus velezensis</i> /NRRL B-14580	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> /D.Azaz
<i>Botrytis cinerea</i> /AHU 9424	<i>Streptomyces griseus</i> /ATTC 23137
<i>Candida guilliermondii</i> /Ana.Ü.Fen.Fak.Biy. Böl.	<i>Trichothecium roseum</i> /Ana.Ü.Fen.Fak.Biy. Böl.
<i>Corynespora cassicola</i> / DSM 62474	<i>Yarrowia lipolytica</i> / ATCC 8661

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilen mikroorganizmalar Çizelge 3.2’ de görülmektedir.

Çizelge 3. 2.Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma /Kaynak
<i>Escherichia coli</i> /NRRL B-3008
<i>Staphylococcus aureus</i> /ATCC 6538
<i>Salmonella typhimurium</i> /ATCC 13311
<i>Bacillus cereus</i> /NRRL B-3711
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA /Klinik izolat
<i>Erwinia caratovara subs. caratorava</i> /NRRL B-4072
<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i> /TPPB-42050
<i>Cornynobacter spp.</i> 13A
<i>Candida albicans</i> /Klinik izolat
<i>Candida albicans</i> /ATCC 90028
<i>Candida glabrata</i> /ATCC 60625
<i>Candida utilis</i> /NRRL Y-900
<i>Candida krusei</i> /NRRL Y-7179
<i>Candida parapsilosis</i> / NRRL-Y-12696
<i>Candida glabrata</i> /Klinik izolat
<i>Cornynobacter spp.</i> 14A

Test Maddelerinin Analiz Koşulları

Tetrahidrokarvon ve biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolitleri için Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GK/KS) sistemi kullanılmıştır.

Sistem: Shimadzu GC 2010

Dedektör: Kütle Spektrometresi

Kolon: TRB5MS polar kolon (25 m x 0.25 mm çap, 0.25 µm film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz: Helyum (1 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır.

Enjeksiyon portu sıcaklığı: 250 °C

Dedeksiyon aralığı: 70 eV elektron enerjisiyle, 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri (**Split:** 50/1) gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık Programı: 60 °C’de 10 dk, 4 C/dk artışla 260 °C’ye çıkan, 260 °C’de 5 dk bekleyen toplam 65 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” nin yanı sıra Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 3.1 kütüphane tarama yazılımlarından yararlanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyotransformasyon Çalışmaları

Biyotransformasyon çalışmaları ön tarama deneyleri ve preparatif biyotransformasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada 20 mikroorganizma içinden substrat molekülü tetrahidrokarvonla etkin ve verimli dönüşümler gerçekleştiren mikroorganizma ön tarama deneyleriyle belirlenmiş ve ikinci aşamada büyük ölçekli biyotransformasyonla elde edilen metabolitler biyolojik aktivite testleri için kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır.

3.2.1.1. Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması

Mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiş (Bkz. Çizelge 3.2.) ve Sabouraud Glikoz Agar (SGA), Patates Dekstroz Agar (PDA), Müller Hinton Agar (MHA) katı besiyerlerinde; eğik tüp, petri ya da liyofilize halde ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Bununla birlikte stok mikroorganizmalar, 1 mL %50 (mayalar için) ve %15 (fungus ve bakteriler için) gliserol içeren kapaklı eppendorf tüplerde -85 °C’de saklanmıştır. İhtiyaç duyulduğunda mikroorganizma saklandığı yerden alınarak oda sıcaklığında steril şartlarda uygun katı besiyerlerine ekilmiştir. Böylelikle mikroorganizmalar canlandırılmış ve saflığının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda funguslar için Sabouraud Glikoz Agar (SGA), bakteriler için MHA katı besiyerleri kullanılmıştır. Daha

sonra gelişimi yeterince sağlanmış mikroorganizmalar biyotransformasyonda kullanılmak üzere zenginleştirilmiş sıvı besiyeri (alfa-medyum)'a inoküle edilerek ön-inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

Alfa medyum besiyeri: 20 g glikoz, 5 g pepton, 5 g maya ekstraktı, 5 g NaCl ve 5 g Na₂HPO₄ distile suyla 1000 mL'ye tamamlanıp pH 7.0 olacak şekilde 0.1 N HCl veya NaOH ilave edilmiştir. 100 mL'lik erlenlerin her birine 50 mL besiyeri ilave edilmiştir. Erlenlerin ağızları pamukla kapatıldıktan sonra pamuğun üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak 121°C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak besiyeri steril hale getirilmiştir.

Yumuşak agar: Hazır karışım halinde temin edilmiş MHB besiyerine 0.075 (a/h) oranında bakteriyolojik agar ilave edilmiş, ısıtılıp homojenizasyon sağlandıktan sonra gerekli miktarda tüplere dağıtılarak otoklavda steril edilmiştir. Biyootografi deneylerinde kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmıştır.

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) besiyeri: Orjinal ambalajındaki tarife göre steril distile su ile hazırlanan RPMI 1640 besiyeri 3-[N-morpholino] propansulfonik asid (MOPS) ile tamponlanıp 0.1 M NaOH ile pH 7.0'ye ayarlanmış ve steril tek kullanımlık 0.2 µm por filtreden geçirilerek antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmıştır (Pfaller ve ark.;1997).

Hazır besi ortamları: Çalışmamızda kullanılan, Mueller-Hinton Broth (Fluka), Mueller Hinton Agar (Fluka), Sabouraud Glukoz Agar (Fluka), Patates Dekstroz Agar (Merck), Malt Ekstrakt Agar (Fluka), Malt Ekstrakt Broth (Merck), Nutrient Agar (Fluka) gibi hazır olarak temin edilen besi ortamları orijinal ambalajındaki tarife uygun olarak hazırlanmıştır. Katı besiyerleri 121 °C'de ve 1.1 atmosfer basınç altında, 20 dakika steril hale getirilerek, laminar akışlı kabin altında steril petrilere yaklaşık 15 mL dökülmüş ve soğuması sağlandıktan sonra kullanılabilecek +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sıvı besiyerleri ise mikroorganizmalar ile aşılardan önce, erlenlerde pamukla kapatılmış şekilde sterilize edilmiştir. Besiyerleri en fazla 2 hafta süreyle saklanmış, kullanılacağı güne kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.3. Ön tarama deneyleri

Ön tarama deneyleri, Çizelge 3.1’de listelenmiş olan her bir mikroorganizma için tek tek gerçekleştirilmiştir.

Kontrol Grupları: Tüm biyotransformasyon çalışmalarında metabolitlerin mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığını anlamak amacıyla, aynı koşullarda hazırlanmış ve besiyeri; besiyeri + substrat ve besiyeri + mikroorganizma bulunduran üç erlen kontrol amaçlı kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların aşılınması ve adaptasyonu: Bir öze dolusu mikroorganizma aseptik koşullarda uygun katı besiyeri içeren petrilere inoküle edilmiş, fungus ve mayalar için 26-28 °C, 24-72 saat; bakteri ve mayalar için 37 °C, 24 saat olan inkübasyon şartlarında petrilere gelişime bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen mikroorganizmalar, 100 mL erlenler içinde bulunan 50 mL steril zenginleştirilmiş sıvı besiyerine (alfa-medyum) aktarılmıştır. Aşılanan erlenler uygun sıcaklıklarda 200 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca ön inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda ortam şartlarına adapte olmuş mikroorganizmayı içeren erlenden, yarısına kadar taze besiyeri doldurulmuş 2 adet 100 mL’lik erlene steril şartlar altında 1 mL mikroorganizma aşılanmıştır. Erlenlerden biri mikroorganizma kontrolü olarak kullanılırken, diğerine 40 µL substrat ilave edilmiştir. Bu iki erlen kontrol amaçlı kullanılacak diğer erlenlerle birlikte çalkalamalı inkübatörde 10 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

Metabolitlerin Ekstraksiyonu: Biyotransformasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde metabolit oluşumunu kontrol etmek amacıyla ekstraksiyon yapılmıştır. Bu amaçla steril şartlarda steril uçlu pipetlerle erlenlerden 3 mL besiyeri içeriği alınarak deney tüplerine aktarılmıştır. Deney tüplerine 3 mL etil asetat ilave edilmiş ve deney tüpleri 1 dakika kadar vortekslenmiştir. Ardından santrifüjlenerek üstteki berrak faz pipetle diğer bir deney tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem her erlen için 3 defa tekrarlanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Etil asetat vakumlu hızlı yoğunlaştırıcı kullanılarak ekstreden uzaklaştırılmıştır. Ekstrede metabolit oluşumu İTK sistemiyle kontrol edilmiştir. Bu amaçla 0.25 mm kalınlığında hazır silika jel tabakalarına numuneler spotlandıktan sonra, tabaka diklorometan-aseton (9:1) ve hekzan-etil asetat (3:1) çözücü sistemi

kullanılarak yürütülmüştür. Silika jel tabaka kuruduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda oluşan metabolitler işaretlenmiş, UV altında ışıması olmayan metabolitleri tespit etmek amacıyla ise anisaldehit-sülfürik asit reaktifi uygulanarak sıcaklık (110°C- 3 dk) ile muamale edilmiştir. Hem UV lambası altında işaretlenen, hem de ısı ve anisaldehit-sülfürik asit reaktifiyle renklendirilen spotlara bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Buna göre, ekstrenin ve kontrol gruplarının oluşturduğu spotlar karşılaştırılmış, kontrol gruplarından farklı olan spotlar metabolit olarak düşünülmüştür. Metabolit varlığı belirlendiğinde GK/KS sistemi ile doğrulama ve yapı tayini analizleri yapılmıştır.

Sonlandırma ve Ektraksiyon: Transformasyonun 10. gününde süreç sonlandırılmıştır. Bu amaçla, 50 mL etil asetat mikrobiyal transformasyonun gerçekleştiği erlene ve kontrol grubu erlenlerine ilave edilmiş ve 1 dakika kadar karıştırılmıştır. Faz ayrışımının tamamen görüldüğü anda üstte kalan faz, içine bir miktar susuz sodyum sülfat konulmuş Whatman filtre kağıdından geçirilerek rotavapor balonuna aktarılmıştır. Bu işlem en az 3 defa tekrarlanmış ve süzülen ekstre balonda biriktirilmiştir. Daha sonra rotavapor 40 °C ve 120 rpm'e ayarlanarak, etil asetat ile alçak basınç altında yoğunlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan ekstre, pastör pipeti, cam yünü ve silika yardımıyla oluşturulan küçük kolondan geçirilerek mikroorganizma artığı olan safsızlıklardan arındırılmıştır. Ardından yine metabolit varlığını belirlemek ve doğrulamak amacıyla İTK ve GK/KS sistemleriyle analiz yapılmıştır.

3.2.1.4. Preparatif ölçekli biyotransformasyon

Ön tarama deneylerinde İTK ve GK/KS sistemleri ile metabolit oluştuğu belirlenen kültür ortamları, oluşturdukları metabolitlerin biyolojik etkilerinin araştırılması amacıyla preparatif ölçekli biyotransformasyon için büyük hacimlerde hazırlanmıştır. Bunun için 2 litrelik erlenlerde 1 litre besiyeri hazırlanmış, madde ilavesinden 48-72 saat önce *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 ile aşılansak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, aseptik şartlar altında 400 µL başlangıç maddesi, 200 rpm ve 37 °C'de çalkalayıcı inkübatöre bırakılmıştır

Sonlandırma ve Ektraksiyon: Ön tarama deneylerine göre, metabolit oluşumunun en yüksek seviyede olduğu gün transformasyon işlemine son verilerek, besiyeri etil asetat ile ekstre edilmiştir. Öncelikle vakumlu Buchner hunisi kullanılarak besiyeri misellerden kurtarılmıştır. Süzülen besiyeri hacmi kadar etil asetat ile ayırma hunisinde en az 3 defa ekstre edilmiştir. Ayrılan fazlar birleştirilerek öncelikle susuz Na₂SO₄'tan geçirilmiş ardından alçak basınç altında 40 °C'de yoğunlaştırılmıştır. Küçük bir silikajel taşıyan kolondan süzildükten sonra metabolit varlığı GK/KS kullanılarak doğrulanmıştır. Elde edilen ekstre kolon kromatografisi yöntemi ile fraksiyonlandıktan sonra hedef metabolitin ayrımı ve izolasyonu yapılmıştır.

3.2.1.5. Kolon kromatografisi ile metabolitlerin ayrımı

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstreden metabolitlerin ayrılması amacıyla kolon, *n*-hekzanla ıslatılmış silikajel ile yağ usulde doldurulmuştur. Bunun için ekstre ve kullanılacak silikajel miktarına göre 5x40 ve 10x70 cm ebatlarında kolonlar tercih edilmiştir. Ekstre temiz bir flakona alınıp biraz çözücü ile çözülmüş ve homojen bir şekilde karıştırılarak silikajele emdirilmiştir. Bir gece bekletilen flakondaki silikajele emdirilmiş ekstre ertesi gün *n*-hekzan'dan başlanarak etil asetat ile gradient elüsyon yapılarak (Çizelge 3.3) 100-10 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmış (toplam 360 fraksiyon) ve son olarak da kolon sırasıyla etil asetat, metanol ve aseton ile yıkanmıştır. Toplanan fraksiyonlardaki metabolit varlığı İTK ile kontrol edilmiş, aynı spotların görüldüğü fraksiyonlar birleştirilerek çözücü düşük vakum altında yoğunlaştırılarak uzaklaştırılmıştır (İşcan, 2009).

Çizelge 3. 3. Gradient mobil faz bileşimleri

<i>n</i> -Hekzan	Etil asetat
100	0
95	5
90	10
80	20
70	30
60	40
50	50
40	60

3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.2.2.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Biyotransformasyonda kullanılan substrat ve elde edilen metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla biyootografi yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemlerinde daha önce çizelgede belirtilen mikroorganizmalar kullanılmıştır.

3.2.2.2. Biyootografi yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Biyootografi yöntemi biyoaktif bir ekstre veya madde karışımı içindeki aktiviteden sorumlu madde ve/veya maddeleri belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem ile başlangıç maddeleri, transformasyon sonucu elde edilen ham ekstreler ve saflaştırılmış metabolitler önceden seçilen bir grup insan, gıda ve bitki patojeni mikroorganizmaya karşı test edilmiştir. Yöntem birkaç aşamadan oluşmaktadır (İşcan, 2009).

İTK plaklarının hazırlanması: 8x7 cm ebatlarında kesilen silikajel GF₂₅₄ plaklar metanolla yıkanmış ve 60 °C’lik etüvde 30 dk bekletilerek aktif hale getirilmiştir. Kirlilik unsurlarından arınan plaklar her test mikroorganizması ayrı ayrı hazırlanmış, bir adet de referans plak eklenmiştir. 2 mg/mL konsantrasyonunda ve metanolde çözünmüş örnekler, hazırlanan plaklara

Drummond kılcal borularıyla 2'şer µL spotlanmıştır. Önceden hekzan:etilasetat (3:1) çözücü sistemi ile doyurulan İTK tankına plaklar yerleştirilerek yürütülmüştür. Yürütülen plaklar 40 °C'lik etüvde 30 dk bekletilerek tamamen çözücünden arınması sağlanmıştır. Referans plak, önce UV 254 ve 366 nm de incelenmiş, ardından anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile spotların yerleri belirlenmiştir. Diğer plaklar başka bir işlem uygulanmadan mikroorganizma kültürü ile kaplanmıştır (İşcan, 2009).

Mikroorganizma kültürünün hazırlanması: Bir gün önce Muller Hinton Broth (MHB) besi ortamı içeren tüplerde geliştirilen kültürler, önceden hazırlanmış ve deney süresince 42 °C'deki su banyosunda bekletilerek katılaşması engellenen yumuşak agar tüplerine (0,075 (a/h)) McFarland No.5 bulanıklık standardı referans alınarak aşılanmıştır. Bu sıcaklıkta canlılıklarını yitirmeyen kültürler bir sonraki aşamaya kadar bekletilmiştir (İşcan, 2009).

Aktivitenin belirlenmesi: Nutrient agar (NA) besiyeri 13 cm'lik steril petri kaplarına bir taban oluşturacak şekilde 15 mL kadar dökülmüştür. Yürütülmüş plaklar her bir mikroorganizma için farklı bir agar plağına aseptik şartlar altında yerleştirilmiştir. 42 °C' deki su banyosunda bekletilen mikroorganizma ile henüz aşılanan kültürler İTK plağı üzerinde çok ince bir katman oluşturacak şekilde yavaşça petriye dökülmüştür. Donması beklendikten sonra plaklar uygun sıcaklıklarda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklara trifenil tetrazolyum klorür (TTC) tuzu çözeltisi (etil alkolde %5) püskürtülerek 3-4 saat daha etüvde bırakılmıştır. Üremenin olmadığı alanlar, reaktif ile renklendirilmiş canlı bakteri halısı üzerinde şeffaf zonlar olarak belirlemiştir. Daha önceden anisaldehit-sülfürik asit reaktifi püskürtülerek hazırlanan referans plakla karşılaştırılarak aktiviteden sorumlu lekeler belirlenmiş ve petrilerdeki plaklarla karşılaştırılmıştır (İşcan, 2009).

3.2.2.3. Mikrodilasyon yöntemi ile antikandidal ve antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Bakteriler için Beşe (1989)'nin yöntemi kullanılmış ve Müller Hinton Broth (MHB) hazırlanmış, *Candida* türleri için Pfaller ve ark. (1997)'na göre

hazırlanan Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) kullanılmıştır. M1 (3 mg), M2 (3 mg) , M3 (2,5 mg), tetrahidrokarvon (2 mg) ve standart madde olarak mayalarda ketokonazol (2 mg), bakteriler için kloramfenikol (2 mg) bileşikleri steril %50'lik DMSO (1 mL) ile çözülerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Antikandidal ve antibakteriyal aktivite için, bir gün önce Müller Hinton Agar (MHA) besiyeri içeren petrilere ekimi yapılan kültürlerden, mayalar ve bakteriler 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, gelişen *Candida* türleri RPMI 1640 içeren steril deney tüplerine, gelişen bakteriler ise MHB içeren steril deney tüplerine 1 öze dolusu inoküle edilmiştir. Deney tüplerine aktarılan kültürler yine 24 saat boyunca 37 ve 28 °C'lerde inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların gelişimi sağlandıktan sonra, kullanılan her test mikroorganizması için ayrı ayrı seçilen 96 kuyucuklu "U" tipi mikrotitrasyon plaklarının tüm kuyucuklarına 100 µL steril besiyeri konmuştur. İlk kuyucuklara stok çözeltilerden 100'er µL ilave edilmiştir. Daha sonra ilk kuyucuktan başlayarak tüm kuyucuklara log₂'ye göre seyreltme uygulanmıştır. Ardından 24 saat boyunca RPMI 1640 besiyerinde 37 °C'de çoğaltılmış mikroorganizmalar McFarland 0.5 standardına göre seyreltilmiştir. Devamında kontrol olarak bırakılan kuyucuklar haricindeki kuyucuklara 100 µL mikroorganizma kültüründen ilave edilip 24 saat ilgili sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda üremenin olduğu alanların daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa trifenil tetrazolyum klorür (TTC) çözeltisinden (etil alkolde %5) 20'şer µL ilave edilerek, 2 saat daha etüvde bekletilmiştir. Çözelti rengi berrak olan, yani bakteri büyümesinin olmadığı kuyucuktaki derişim minimum inhibe edici konsantrasyon (MIK) değeri olarak belirlenerek, µg/mL birimiyle ifade edilmiştir (İşcan, 2009).

3.2.2.4. Pankreatik lipaz inhibisyonunun biyootografik yöntemle belirlenmesi

Son yıllarda dünya genelinde ve ülkemizde ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkan obezite, şeker hastalığı (tip II -*diabetes mellitus*) , hipertansiyon, safra kesesi taşları, solunum fonksiyon bozuklukları ve kanser gibi çok sayıda hastalığın oluşumuna öncülük etmektedir. Obezite, beslenme şekli ve egzersize

bağlı klasik yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılmakta, ancak kaybedilen kilolar bir süre sonra tekrar geri alınmaktadır. Bu nedenle diyet, hayat tarzı değişiklikleri ile verilen kiloların uzun vadede korunmasına yönelik farmakolojik tedaviler önerilmektedir (Tanakol, 2003). Bu amaçla kullanılan orlistat, gastrointestinal lipazları inhibe ederek yağ asitlerinin incebağırsaktaki emilimi azaltıp, kalınbağırsak yoluyla vücuttan atılmasını sağlamaktadır (Tanakol, 2003; Won ve ark., 2007; Yamada ve Ark, 2010). Bu mekanizmayla birlikte pankreatik lipaz inhibitörleri vücutta yağların depolanmasını engelleyerek kilo kaybına neden olmaktadır. En önemli lipaz inhibitörleri orlistat ve onun hidrojenlenmiş türevi olan lipstatindir. Yapılan bazı çalışmalarda flavonoid, stilben, kateşin ve terpenoid türevleri gibi doğal kaynaklı bileşenlerin de lipaz inhibitörü olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte, doğal kaynaklı lipaz inhibitörlerinin hızlıca taranması amacıyla kromatografik tekniklerle birleştirilmiş biyootografik yöntemler, çok sayıda bileşenden oluşmuş doğal kaynaklı ekstrelerin her bir bileşeni için pankreatik lipaz aktivitesini kalitatif olarak gösterebilmektedir (Won ve ark., 2007; Yamada ve ark., 2010).

Pankreatik lipaz aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin biyootografik yöntemde, standart madde olarak orlistat kullanılmaktadır. Yöntemin esası İTK plağında pankreatik lipaz aktivitesinin görüldüğü bölgelerde pankreatik lipazın α -naftil asetatı, α -naftol ve asetik aside parçalaması, sonrasında plağa fast blue B püskürtülmesi, böylelikle fast blue B ve α -naftolün birleşerek mor-pembe rengini vermesine dayanmaktadır. Enzim inhibisyonunun gerçekleştiği bölgeler beyaz olarak görülmektedir. Yöntem birkaç aşamadan oluşmaktadır (Hassan, 2011).

İTK plaklarının hazırlanması ve Ekstrelerin Yürütülmesi: 8x7 cm ebatlarındaki iki İTK plağına M1, M2, M3 metabolitlerini içeren saf ekstrelerden ve substrattan 10 μ L ve etanol içinde 5 mg/mL konsantrasyonunda bulunan orlisttan 5 μ L spotlanmıştır. Plaklar önceden hekzan:etil asetat (3:1) çözücü sistemi ile doyurulan İTK tankına yerleştirilerek yürütülmüştür. Referans plak, önce UV 254 ve 366 nm’ de incelenmiş, ardından anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile spotların yerleri belirlenmiştir. Yürütülmüş olan diğer İTK plağından mobil faz iyice uzaklaştırılarak enzim aktivitesi deneyi için ayrılmıştır (Hassan, 2011).

Stok Enzim Çözeltisinin Hazırlanması: Deneylerde 0.05 M Tris-HCl (pH= 7.4) tamponu, 32 U/mg'lık lipaz enzimi ve bovin serum albumininden hazırlanan stok enzim çözeltisi, substrat olarak orlistat, alfa naftil asetat ve renk reaktifi olarak fast blue B kullanılmıştır. 0.05 M Tris-HCl tamponu için 0.05 M Tris Base tartılarak 1000 mL ultra saf suda çözündürülmüş, derişik HCl ile pH 7.4'e ayarlanmıştır. Lipaz enziminden 930 U içeren miktar (29 g) tartılarak tampona ilave edilmiş ve 100 mg bovine serum albumin eklenmiştir. 75 mg α -naftil asetat 50 mL etanolde çözündürülerek deneye hazırlanmıştır. Renk reaktifi olarak kullanılan fast blue B ise, 25 mg tartılmış ve 50 mL distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok çözelti, renk reaktifi, alfa naftil asetat buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edilmiştir (Hassan, 2011).

Aktivitenin belirlenmesi: Enzim aktivitesi deneyi için ayrılan diğer plağa önce alfa naftil asetat püskürtülür ve azot gazıyla plaka üzerinde kalan kısım iyice uzaklaştırılmıştır. Ardından enzim stok çözeltisi püskürtülmüş ve üzerinde kalan kısım azot gazıyla uzaklaştırılmıştır. 37 °C'de neme doymuş bir ortamda 30 dk. için inkübasyona bırakılmıştır. Otuz dakikanın sonunda ise plağa fast blue B reaktifi püskürtülüp, pembe-mor zeminde beyaz olarak beliren spotlarla referans plağın spotları karşılaştırılarak enzim inhibisyonunun neden olduğu beyaz lekeler belirlenmiştir (Hassan, 2011).

3.2.2.5. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

1-1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Standart madde ve metabolitlerin DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemek amacıyla 3 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler öncelikle İTK plaklarına 5 μ L spotlanmış ve üzerine hemen DPPH çözeltisi püskürtülerek, kalitatif olarak ön tarama testleri yapılmıştır.

Aktif olduğu görülen bileşiklerin, UV-spektroskopik ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak, kantitatif olarak inhibisyon konsantrasyon BHT ve GA standart maddeleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Sarker ve ark, 2006).

Kantitatif yöntem: Numunlerin MeOH'deki stok çözeltisi 2 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözelti, 96-kuyucuklu mikrotitrasyon

plaklarının ilk sütununa sırasıyla 100'er µL aktarılmıştır. Son sütunun sondaki 2 kuyucuğu dışında kalan kuyucuklara çok-kanallı pipet aracılığıyla 100'er µL MeOH ilave edilir. Daha sonra ilk sütundaki numuneler MeOH içinde seyreltme yapılarak, 5 dakika boyunca vortekste karıştırılmıştır. DPPH stok çözeltisi 2 mg DPPH'ın 25 mL MeOH'de çözünmesiyle son konsantrasyonu 80 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL DPPH çözeltisinden eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bırakılmıştır. Kontrol olarak numune içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve galik asit (GA) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbans değerleri UV spektrofotometre kullanılarak 517 nm' de okunmuştur.

Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) aynı konsantrasyonda pozitif kontrol, DPPH+MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı plakta uygulanmıştır. UV absorbans 517 nm'de mikroparka spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında okunmuştur. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (n=8) olarak ifade edilmiş, istatistiksel değerlendirme ve hesaplamalarda Gen 5 Data Analysis programı (BioTek) kullanılmıştır. % 50 inhibisyon konsantrasyonu değeri (IC₅₀) (3.1) ile hesaplanmıştır.

$$IC_{50} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.1)$$

A₀ : kontrol absorbans

A₁ : numune absorbans

ABTS Radikal Süpürücü Etki: Standart TEAK (Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi Papandreou ve ark. (2006) kullanılarak gerçekleştirilen deney, ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalinin süpürülmesi ve E vitamininin suda çözünen analogu olan troloks ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. 7 mM ABTS ^{•+} ve 2,5 mM sodyum persülfat (Na₂S₂O₈) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesi sonucu mavi yeşil renkli radikal oluşumu sağlanmış, bu çözeltinin 734 nm' deki absorbansı 0,8-0,7 olacak şekilde absölü etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL örnek ve 990 µL hazırlanan ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılarak, 1 dk 'lık aralıklarla 734 nm' de absorbansı 30 dk süre ile

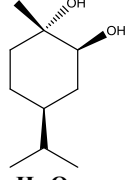
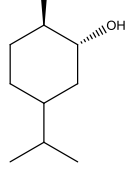
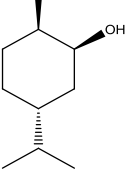
ölçülmüştür. Troloks’a eşdeğer antioksidan kapasitesi troloksun kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

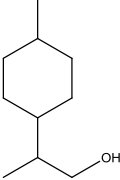
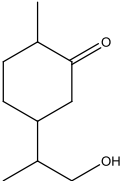
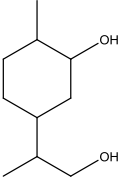
4.1. Ön Tarama Çalışmaları Sonucunda Oluşan Metabolitler

Tetrahidrokarvonun seçili mikroorganizmalarla biyotransformasyonu sonucu oluşan ve GK/KS’nde yapısı tanımlanan metabolitler Çizelge 4.1’ de görülmektedir. Ön tarama deneyleri boyunca metabolit oluşumunu izlemek amacıyla gerçekleştirilen İTK (ince tabaka kromatografisi) deneylerine ait bazı plaklar Ek-1 Ön Tarama Deneyleri bölümünde verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Ön tarama deneyleri sonucu oluşan metabolitler

TANIMLANAN METABOLİTLER		
Kod	Metabolit	Kullanılan Mikroorganizma
MI	 $C_{10}H_{20}O_2$ 172,26 g/mol	<i>Bacillus velezensis</i> <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Glomeralla cingulata</i> ,
M2	 $C_{10}H_{20}O$ 156,27 g/mol	<i>Absidia ramosa</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> var. africanus <i>Bacillus velezensis</i> <i>Corynespora cassicola</i> <i>Devosia riboflavina</i> , <i>Penicillium claviforme</i> <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Trichothecium roseum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
M3	 $C_{10}H_{20}O$ 156,27 g/mol	<i>Absidia ramosa</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus terreus</i> var. africanus <i>Bacillus velezensis</i> <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Corynespora cassicola</i> <i>Devosia riboflavina</i> , <i>Penicillium claviforme</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Trichothecium roseum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> ,

Çizelge 4.1. Ön tarama deneyleri sonucu oluşan metabolitler (Devamı)

TANIMLANAN METABOLİTLER		
Kod	Metabolit	Kullanılan Mikroorganizma
M4	 $C_{10}H_{20}O$ 156,27 g/mol	<i>Aspergillus amstelodami</i>
M5	 $C_{10}H_{18}O_2$ 170, 25 g/mol	<i>Absidia ramosa</i> <i>Aspergillus amstelodami</i> <i>Aspergillus terreus</i> var. africanus, <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,
M6	 $C_{10}H_{20}O_2$ 172, 25 g/mol	<i>Alternaria brassicola</i> <i>Aspergillus amstelodami</i> , <i>Penicillium odoratum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>

4.2.Kolon Kromatografisi Ayırımı Gerçekleşen Metabolitler ve Yapı Tayinleri

Tetrahidrokarvonun mikrobiyal transformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin yapı tayini GK/KS sistemi ile gerçekleştirilmiş, bunlardan büyük ölçekli biyotransformasyon ürünü olan M1, M2, M3 metabolitleri izole edilebilmiştir. Çizelge 4.2’de spektroskopik verileri ve tutunma zamanları verilen metabolitlerin kütle spektrumları Ek-2 Kütle Spektrumları bölümündedir.

Çizelge 4. 2. Tanımlanan metabolitler, sinonimleri, tutunma zamanları ve *m/z* değerleri

Metabolitler	Sinonimleri	Rt	<i>m/z</i>
M1 <i>p</i> -menta-1,2-diol	<i>p</i> -menta-1 α -2 β -diol; <i>1S,2S,4S</i> - <i>p</i> -menta-1,2-diol	24,153	172(M ⁺ ,3), 154(5), 129(13), 112(10), 111(48), 84(8), 71(100), 69(26), 43(57), 41(24)
M2 (+)-Neoizokarvomentol	<i>1R,2R</i> - <i>p</i> .mentan-2- ol; <i>1R,2R</i> 5-izopropil-2- metilsikloheksanol 1	20,598	156(M,1 ⁺), 154(1), 138(22), 113(28), 109(13), 95(100), 81(27), 57(39), 55(42), 41(29)
M3 (+)-Neokarvomentol	<i>p</i> -mentan-2 α -ol; <i>1R,2R,5R</i> - <i>p</i> -mentan-2- ol; (<i>1S,2R,5R</i>)-5- izopropil-2- metilsikloheksanol	19,286	156(M,1 ⁺), 154(1), 138(22), 113(28), 109(13), 95(100), 81(27), 57(39), 55(42), 41(29)
M4 2-(metilsikloheksil)propan- 1-ol	2-(metilsikloheksil)-1- propanol	29, 117	156(M,15 ⁺), 136(8), 113(100), 111(20), 95(80), 81(55), 57(45), 55(53), 41(40)
M5 9-hidroksi-(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-(-)- <i>p</i> - Mentan-2-one	5-(1-hidroksipropan-2- il)-2-metilsikloheksan- 1-one; 5-(2-Hydroxy-1- methylethyl)-2- metilsikloheksanon	29,658	172(M,15 ⁺), 141(10), 129(30), 125(15), 111(100), 95(23), 83(21), 69(25), 55(80), 41(40)
M6 <i>p</i> -mentan-2,9-diol	5-(1-hidroksipropanol- 2-yl)-2- metilsikloheksanol	29,075	172(M,1 ⁺), 154(8), 136(8), 113(100), 111(2), 95(66), 81(44), 57(40), 55(40), 41(32)

4.3 Biyolojik aktivite çalışmaları

4.3.1. Antikandidal aktivite

Standart suş ve klinik izolatlardan seçilmiş 8 adet *Candida* türüne karşı numuneler ve elde edilen metabolitin antikandidal etkisi mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonları $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3’ te verilmiştir.

Çizelge 4. 3. Antikandidal Etki Sonuçları (MİK, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)(*THK=Tetrahidrokarvon)

Mikroorganizma	*THK	M1	M2	M3	Kontrol
<i>Candida albicans</i> (klinik izolat)	31,25	93,75	46,875	39,062	1,953
<i>Candida albicans</i>	31,25	93,75	46,875	78,125	15,625
<i>Candida glabrata</i>	31,25	93,75	46,875	19,531	31,248
<i>Candida utilis</i>	31,25	93,75	46,875	39,062	7,812
<i>Candida krusei</i>	31,25	93,75	93,75	78,125	0,488
<i>Candida parapsilosis</i>	62,5	187,5	93,75	39,062	1,953
<i>Candida albicans</i> ATTC 90028	62,5	187,5	93,75	39,062	31,248
<i>Candida glabrata</i> (klinik izolat)	15,625	187,5	93,75	78,125	0,976

4.3.2.Antibakteriyal aktivite

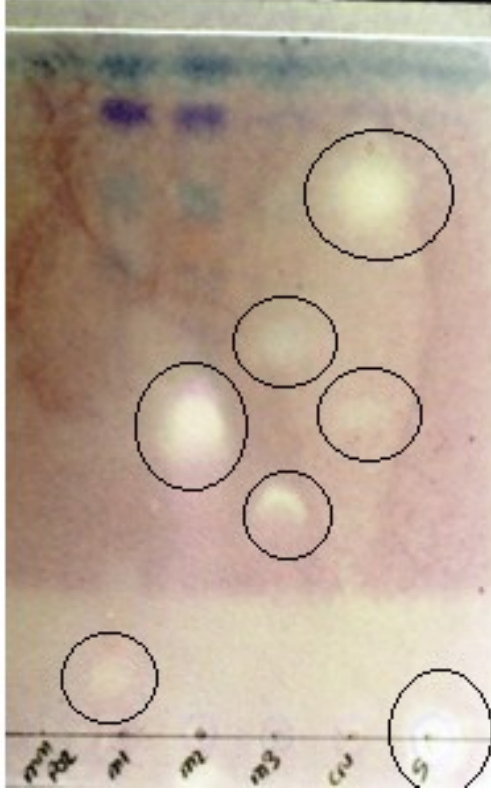
Üç Gram negatif (-) bakteri ve beş Gram pozitif (+) bakteri ile mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak numunelerin ve izole edilen metabolitin minimum inhibisyon konsantrasyonları $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4’ te toplu halde verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Antibakteriyal Etki Sonuçları (MİK, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)(*THK=Tetrahidrokarvon)

Bakteri	*THK	M1	M2	M3	Kontrol
<i>Escherichia coli</i>	31,25	46,875	187,5	39,062	0,976
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5	187,5	375	39,062	0,488
<i>Bacillus cereus</i>	125	187,5	375	156,25	3,906
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	125	93,75	93,75	78,125	1,953
<i>Erwinia caratovara</i> subsp. <i>Caratorava</i>	62,5	93,75	187,5	78,125	0,976
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	15,625	187,5	187,5	156,25	0,488
<i>Corynebacterium</i> spp.13A	125	187,5	375	312,5	1,953
<i>Corynebacterium</i> spp. 14 A	62,5	187,5	93,75	78,125	1,953

4.4. Pankreatik lipaz enzim inhibisyon sonuçları

Hassan (2011)’e göre pankreatik lipaz ihhibitörlerinin saptanması için kullanılan biyootografik yöntemle gerçekleştirdiğimiz deneyde, M1, M2 ve M3 metabolitlerinde pankreatik lipaz inhibisyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Standart madde olarak orlistat kullanılmış ve referans plakla karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 1. M1, M2, M3 metabolitlerinin pankreatik lipaz aktivite sonucu

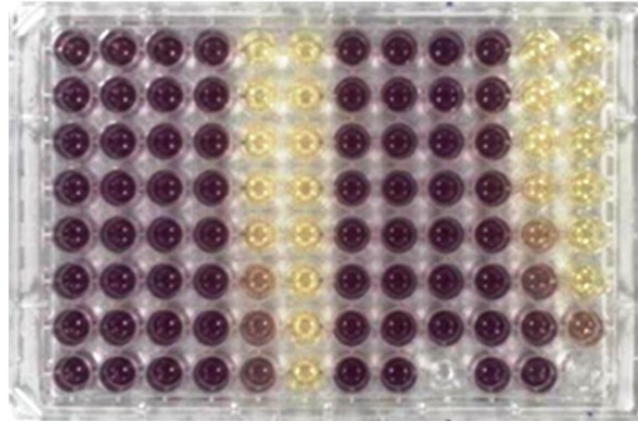
Sonuç olarak, plakta açıkça görülen beyaz spotlar M1,M2 ve M3 metabolitlerinin ($\approx 7 \mu\text{g}$) pankreatik lipazı inhibe ettiğini düşündürmektedir.

4.5. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.5.1. 1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil (DPPH') radikalini süpürücü etki sonuçları

3 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan numunelerin serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla öncelikle İTK plaklarına 5 μL olarak uygulanmış ve üzerine hemen DPPH radikal çözeltisi püskürtülerek, BHA standart maddesi kontrolüyle kalitatif olarak ön-tarama testi yapılmıştır.

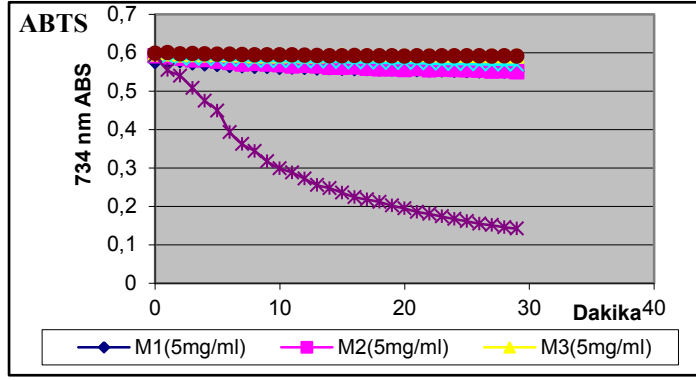
Bileşiklerin aktif olduğu görülmüş ve yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen deneyde Tetrahidrokarvon, M1, M2 ve M3'ün IC_{50} değerlerinin hesaplanması amacıyla 5 mg/mL ile 0.05 mg/mL arasındaki konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmış ve DPPH radikalini süpürücü etkisi araştırılmıştır. 517 nm' de okunan absorban sonuçlarına göre maddelerin denenen konsantrasyon aralığında DPPH radikalini soldurmadığı görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan ve IC_{50} değeri 0.0234 mg/mL olan BHT ile karşılaştırıldığında maddelerimizin oldukça zayıf etkiye (>5 mg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 2. Tetrahidrokarvon, M1, M2 ve M3'ün (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Sonuçları

4.5.2. ABTS radikal süpürücü etki sonuçları

Yöntemler kısmında anlatılan TEAC metoduna göre örneklerimizin 30 dakika boyunca 5 mg/mL' lik konsantrasyonlarının ABTS'i soldurma derecesi ölçülmüş, antioksidan etkisi iyi bilinen aynı konsantrasyondaki BHT ile karşılaştırıldığında çok düşük antioksidan etkiye (>10 mg/mL) sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4. 5).



Şekil 4. 3. ABTS Serbest Radikalinin % İnhibisyon Grafiği

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan kaynak taramaları sonucunda daha önce herhangi bir mikrobiyal transformasyon çalışmasında substrat olarak kullanılmayan ve antimikrobiyal (antikandidal ve antimikrobiyal), antioksidan aktivite gibi biyolojik etkileri araştırılmamış tetrahidrokarvonun Çizelge 3.1’ deki 20 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu araştırılmış, oluşan metabolitler ince tabaka kromatografisi yöntemiyle izlenmiş ve gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi sistemiyle tanımlanmıştır. Biyotransformasyon süreçleri sonunda oluşan toplam 6 metabolit, Çizelge 4.1’de; metabolitlerin spektroskopik verileri Çizelge 4.2’de, spektrumları Ekler-2’de verilmiştir.

Ön tarama deneyleri sonucunda *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 türünün diğerlerine oranla daha verimli dönüşümlerle M1, M2 ve M3 metabolitlerini ürettiği belirlenmiştir. Bu nedenle *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 ile tetrahidrokarvonun preparatif ölçekli biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş, oluşan metabolitlerden M1-M3 metabolitleri kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Ayrıca daha sonraki aşamada *in vitro* olarak tetrahidrokarvon ve metabolitlerinin antimikrobiyal (antibakteriyel, antikandidal), antioksidan (DPPH ve ABTS radikal süpürücü etki) ve otobiyografik pankreatik lipaz inhibisyonu biyoaktivite testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında (+) ve (-)-karvotanasetonun *Aspergillus niger*’le biyotransformasyonu ile elde edilen *p*-mentan-2,9-diol ve *p*-mentan-1,2-diol metabolitlerinin, tetrahidrokarvonun mikrobiyal transformasyonu ile da elde edildiği görülmüştür (M1 ve M6) (Noma ve Asakawa, 2000; Noma ve Asakawa, 2010) Bunun yanısıra *Cladosporium sp.* T1 ile (4*R*)-1-*p*-mentenin biyotransformasyonu ile *p*-mentan-1,2 diolün oluştuğu rapor edilmiştir (Noma ve Asakawa, 2009). Noma ve ark. (1974)’nın (+)- ve (-)-karvotanasetonun *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1 ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlarında oluşan (+)-neoiso- ve (+)-neokarvomentol elde ettiğimiz M2 ve M3 metabolitlerinin aynısıdır (Grayson, 1994; Noma ve Asakawa, 2010; Noma ve Asakawa, 2009).

Biyootografi yöntemi ile tetrahidrokarvon ve metabolitlerinin belirli mikroorganizmalar için antikandidal ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandidal aktivite tayini sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.3.) elde edilen biyotransformasyon ürünlerinden *1R-2R-5R-p*-mentan-2-ol (M3) standart maddeye göre *Candida glabrata*'ya karşı daha etkili bulunurken (M3=19,531 µg/mL; Ketakonazol=31,248 µg/mL), metabolitin *Candida albicans* ATCC 90028'a etki eden derişiminin standart maddeye yakın olduğu gözlemlenmiştir (M3=39,062 µg/mL; Ketakonazol=31,248 µg/mL). Substratın bu mikroorganizmalara etki eden MİK değerlerine incelendiğinde ise tetrahidrokarvonun yalnızca *Candida glabrata*'ya karşı etkili olduğu görülmektedir (THK=31,25 µg/mL; Ketakonazol=31,248 µg/mL). Tüm bu verilere ek olarak, tetrahidrokarvon ve metabolitlerinin antibakteriyal aktiviteye sahip olmadığı mikrodilüsyon sonuçlarıyla ortaya konmuştur (Çizelge 4.4.).

Antioksidan aktivite varlığının araştırıldığı DPPH ve ABTS radikal süpürücü etki deneylerinde ise subtrat ve metabolitler standart maddelere göre etkisiz bulunmuştur (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.5). Enzim inhibisyonu deneylerinde ise, tabakadaki beyaz spotlar karşılaştırılmış; buna göre *1R-2R-p*-mentan-2-ol (M2) ve *p*-mentan-1,2 diolün (M1) substrata ve standart maddeye göre pankreatik lipaz inhibisyonunun daha yüksek oranda olduğu anlaşılmıştır.

Kaynak taramaları sonucu M2 ve M3 metabolitlerinin doğal olarak portakal (*Citrus sinensis* L) suyunda, portakal kabuğu yağında, limon (*Citrus limon*) kabuğu yağında, greyfurt (*Citrus paradisi*) suyu ve greyfurt kabuğu yağında, nane (*Mentha piperita*) yağında ve diğer *Mentha* türlerinde bulunan doğal aroma maddeleri olduğu görülmektedir. Birbirlerinin enantiyomeri olan bu metabolitlerin JECFA (Expert Committee on Food Additives- Katkı Maddeleri ve Bulaşanlar Konusunda Uzmanlar Komitesi) tarafından 1998 yılında aroma alkollü ve alkolsüz içeceklerde, jelatin ve pudinglerde, pişmiş ve dondurulmuş fırıncılık ürünlerinde ve yumuşak şekerlemelerde aroma ajanı olarak kullanılabilirliği kabul edilmiştir (COE No.: 2228 FEMA No.:3562 JECFA No.:376) (Anonim, 2001; Burdock, 2010). Bununla birlikte farklı alanlarda kullanılabilirliği henüz mevcut olmayan *p*-mentan-2-ol'ün enantiyomerlerinden (+)-neokarvomentolün (M3) pankreatik lipaz inhibisyon aktivitesine ve *C. albicans* ATTC 90028 ve *C.*

glabrata'ya karşı antikandidal aktiviteye sahip olduğu bu çalışmada ilk defa duyurulmuştur. Ancak elde edilen bu veriler dışında heyecan uyandıran herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bu anlamda tetrahidrokarvonun seçtiğimiz mikroorganizmalar dışında farklı mikroorganizmalarla biyotransformasyonunun denenmesi, yeni tetrahidrokarvon türevlerinin sentezlenmesini sağlayabilecek enzimlerle ilgili çalışmaların sürdürülmesi ve diğer biyolojik özelliklerinin ortaya konması için farklı biyoaktivite testleri uygulanması farklı sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Sonuç olarak tanımlanan metabolitler, bu çalışmada belirlenen mikroorganizmalar yardımıyla tetrahidrokarvondan hareketle bol miktarda elde edilerek biyoaktiviteleri açısından değerlendirilebilecektir. İzolasyonu gerçekleştirilen ve çeşitli biyoaktivite çalışmaları yapılan tetrahidrokarvon ve metabolitlerinin varolan fayda ve zararlarının anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Adams, A., Demyttenaere, J.C.R ve Kimpe, N. D. (2003), “Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to a-terpineol by penicillium digitatum investigation of the culture conditions,” *Food Chemistry*, **80(4)**, 525–534.
- Adams, T.B., Gavin, L., McGowen, M.M., Waddell, W.J., Cohen, S.M., Feron, V.J., Marnett, L.J., Munro, I.C., Portoghese, P.S., Rietjens, I.M.C.M. ve Smith, R.L. (2011), “The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients,” *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 2471.
- Aköz, T., Glutasyon-S-transferaz izozimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması (2000), *Genel Tıp Derg.*, **10(1)**, 1-6.
- Angel, G.D., Melendrez, R., Bertin, V., Dominguez, J.M., Wecote, P. ve Barbier, J. (1993), “Selective Hydrogenation Of Carvone On Pt And Pt-Au Catalysts” *Heterogeneous Catalysis and Fine Chemicals*, **3**, 171-174.
- Anonim (2001), *p*-mentan-2-ol
http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1330.htm
- Anonim (2009), *Karvon*
<http://citizendia.org/Carvone>
- Anonim (2010), *Averrhoa carambola resmi*,
<http://www.spice-world.de/fruechte/sternfrucht-karambole-averrhoa-carambola/>
- Anonim (2012a), *Monoterpenler*
<http://www.cyberlipid.org/simple/simp00041.htm>
- Anonim (2012b), *Tanacetum vulgare resmi*
http://www.agroatlas.ru/en/content/weeds/Tanacetum_vulgare/
- Armstrong, D.W ve Yamazaki, H (1986), “Doğal aroma maddeleri üretimine biyoteknolojik yaklaşım,” *Gıda (Çev: Kıvanç, M.)*, **14(3)**, 165-170.
- Attokaran, M. (2011), “Essential Oils,” *Natural Food Flavors and Colorants*, Blackwell Publishing, Iowa, A.B.D., 13-15.
- Başer, K.H.C. ve Demirci, F. (2007), “Chemistry of Essential Oils,” *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (Ed:Berger R. G), Springer, Almanya.

- Berger, R. (1995), *Aroma Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, Newyork.
- Beşe, M. (1989), *Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri*, Kardeşler Basımevi, İstanbul.
- Bhatia, S.P. , McGinty, D., Letizia, C.S. ve Api A.M. (2009), “Fragrance Material Review On Menthol,” *Api Food and Chemical Toxicology*, **46**, 209–214.
- Bommarius, A.S. ve Riebel, B.R.(2004), “Overview: The Status of Biocatalysis at the Turn of the 21st Century, Introduction to Biocatalysis,” *Biocatalysis: Fundamentals and Applications* , John Wiley & Sons, A.B.D.
- Breitmaier, E. (2006), “Terpenes: Importance, General Structure and Biosynthesis, Hemi- and Monoterpenes,” *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, John Wiley & Sons, Weinheim.
- Brenna, E., Fuganti, C. ve Serra, S. (2003), “Enantioselective perception of chiral odorants,” *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 1–4.
- Brown, H.C. ve Pfaffenberger, C.D. (1974), “Hydroboration of terpenes—VIII : cyclic hydroboration of d-(+)-limonene: A stereoselective synthesis of d-(–)-(1*R*, 2*R*, 4*R*)-limonene-2,9-diol and d-(–)-(1*R*, 2*R*, 4*R*)-carvomenthol,” *Tetrahedron*, **31(8)**, 925–928.
- Burdock, G. (2010), *Fenaroli’s Hanbook of Flavor Ingredients*, Taylor and Francis Group, A.B.D.
- Carvalho, C.C.C.R. ve Fonseca, M.M.R. (2006b), “Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene”, *Food Chem.* , **95**, 413-422.
- Carvalho, C.C.C.R. ve Fonseca, M.M.R. (2006a), ”Biotransformation of terpenes,” *Biotechnology Advances*, **24**, 134-142.
- Cernuchova, P. ve Mihovilovic, M.D. (2007), “Microbial Baeyer–Villiger oxidation of terpenones by recombinant whole-cell biocatalysts formation of enantio complementary regioisomeric lactones,” *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1715–1719.
- Cheetham, P.S.J. (1997), “Combining the technical push and the business pull for natural flavours,” *Biotechnology of Aroma Compounds*, **55**, 1-49.
- Chen, J., Lu, M., Jing, Y. ve Dong, J. (2006), “The synthesis of L-carvone and limonene derivatives with increased antiproliferative effect and activation

- of ERK pathway in prostate cancer cells,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14(19)**, 6539-6547.
- Cramarossa, M.R., Nadini, A., Bondi, M., Messi, P., Pagnoni, U.M. ve Forti, L. (2005), “Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria,” *C. R. Chimie*, **8**, 849–852.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. ve Lewis, N.G. (2000) “Natural products (secondary metabolites),” *Biochemistry and molecular biology of plants* (Ed: Buchanan, B., Gruissem, W.), American Society of Plant Physiologists Rockville, MD.
- Crowell, P.L., Chang, R.R., Ren, Z., Elson, C.E. ve Gould, M.N. (1994), “Selective inhibition of isoprenylation of 21–26 kDa protein by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites,” *The Journal of Bio. Chem.*, **266**, 17679–17685.
- Deboukian, R.H. ve Ashok, R. (2007), *Spatial inhibitors and repellents for mosquitoes and midges*, A.B.D. patent no: US 2007/0049644 A1.
- Deboukian, R.,H. ve Ashok, R. (2010), *Control of termites, fire ants and carpenter ants*, A.B.D. patent no: WO 2010/062368 A1.
- Deboukian, R.,H. ve Ashok, R. (2011a), *Control of bed bugs*, A.B.D. patent no: US2011/0213038A1.
- Deboukian, Robert, Ashok, R. (2011b), *Control of termites, fire ants and carpenter ants*, A.B.D. patent no: US2011/0203160A1.
- Demirci F., Noma Y., Kırimer N. ve Başer K. H. C. (2004), “Microbial transformation of (-)-carvone,” *Z. Naturforsch.*, **59c**, 389-392.
- Demirci, F., (2000), *Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Demyttenaere, J.C.R, Bellegheem, K.V. ve Kimpe, N. D. (2001), “Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening,” *Phytochem.*, **57(2)**, 199-201.
- Demyttenaere, J.C.R. (2001), “Biotransformation of terpenoids by microorganisms,” *Studies In Natural Products Chemistry*, **25**, 125-178.

- Dubal, S.A., Tilkari Y.P. ve Momin, S.A. (2008) , “Biotechnological routes in flavour industries,” *Advanced Biotechnology*, 20-31.
- Fessenden R.J. ve Fessenden J.S. (2001), “Bölüm 20: Doğal ürünler ve sentezleri,” *Organik Kimya* (Çeviri Ed.: Uyar, T), Güneş Kitabevi, Ankara.
- Fürstner, A. ve Hannen, P. (2006), “Platinum- and gold-catalyzed rearrangement reactions of propargyl acetates: total syntheses of α -cubebene, cubebol, sesquicarene and related terpenes,” *Chem. Eur. J.*, **12**, 3006 -3019.
- Gomez, R., Arredondo, J., Rosas, N. ve Angel, G. D. (1991), “Selective carvone hydrogenation on Rh supported catalysts,” *Heterogeneous Catalysis and Fine Chemicals*, **59**, 185-191.
- Grayson D.H., (1994), “Acyclic and monocyclic monoterpenoids,” *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (Ed: M. Sainsbury), **11 B**, 486-490
- Grogan G. (2009), ”Biotransformation, microbes and enzymes,” *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide*, WILEY, İngiltere.
- Harrewijn, P. , Oosten, A.M.V. ve Piron, P.G.M. (2001), *Natural Terpenoids As Messengers: A Multidisciplinary Study of Their Production, Biological Functions, and Practical Applications*, Kluwer Academic Publishers, Hollanda, 95-97.
- Hassan, A.M. (2011), “TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors,” *Phytochem. Anal*, DOI 10.1002/pca.1372.
- Houjin, L., Wenjian, L., Chuanghua, C., Yipin, Z. ve Yongcheng, L. (2006), “Biotransformation of limonene by marine bacteria,” *Chin. J. Anal. Chem.*, **34 (7)**, 946–950 .
- Humphrey, A.J. ve Beale, M.H. (2006), “Chapter 3: Terpenes,” *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (Ed: Crozier A., Clifford M. N. ve Ashihara, H.), Blackwell Publishing, Singapur.
- Ishikawa T., Kudo M. ve Kitajima J. (2002), “Water-soluble constituents of dill,” *Chem. Pharm. Bull.* **50(4)**, 501-507.

- İşcan, G. (2009), *Bazı doğal aromatik maddelerin mikrobiyal transformasyonu ve biyolojik etkileri*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Jager, W.J., Mayer M., Platzer P., Reznicek G., Dietrich H. ve Buchbauer G, (2000), "Stereoselective metabolism of the monoterpene carvone by rat and human liver microsomes," *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 191-197.
- Karatzas, A.K, Bennik, M.H.J., Smid, E.J. ve Kets, E.P.W. (2000), "Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes*," *Journal of App. Microbiol.*, **89**, 296-301.
- Krings U. ve Berger R.G. (1998), "Biotechnological production of Flavours and fragrance," *Appl Microbiol Biotechnol*, **49**, 1-8.
- Kroschwitz J.I. (2007), "Terpenoids," *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **24**, 36-39.
- Kurt, F. (2011), "Introduction and Background Information," *Biotransformations in Organic Chemistry A Textbook Sixth revised and corrected* Springer, New York, A.B.D.
- Lehmann, K., Crombie, A. ve Singer, A.C. (2008), "Reproducibility of a microbial riverwater community to self-organize upon perturbation with the natural chemical enantiomers (R)- and (S)-carvone," *Federation of European Microbiological Societies Microbiol Ecol.*, **66**, 208–220.
- Leuenberger H.G.W. (1990), "Biotransformation-a useful tool in organic chemistry," *Pure & Appl. Chem.*, **62(4)**, 753-768.
- Liese, A. ve Filho, M.V. (1999), "Production of fine chemicals using biocatalysis," *Current Opinion Biotech.*, **10**, 595-603.
- Longo, M.A. ve Sanromán, M.A. (2006), "Production of food aroma compounds," *Food Technol. Biotechnol.*, **44 (3)**, 335-353.
- Loughlin, W.A. (2000), "Biotransformations in organic synthesis," *Bioresource Technology*, **74**, 49-62.
- Mahmoud, S.S. ve Croteau, R.B. (2002), "Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants," *Trends in Plant Science*, **7(8)**, 366-373.

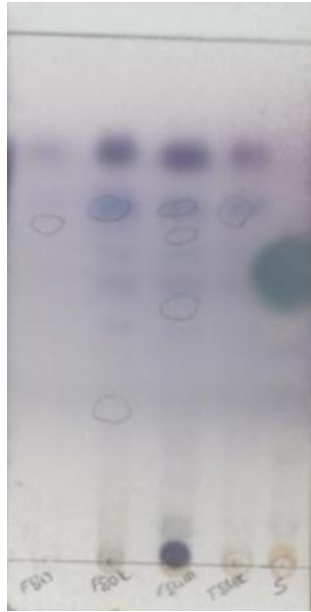
- Margetts, J. (2005), "Aroma chemicals V: natural aroma chemicals", *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, De Monchy Aromatics Ltd., İngiltere.
- Menzel, M., Schreier, P. (2007), "Chemistry of essential oils," *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (Ed:Berger, R.G), Springer, Almanya, 489.
- Noma, Y. ve Asakawa, Y. (2000), "Methabolic pathways of monoterpenoids by microorganisms," *Curr. Topics in Phytochem.*, **4**, 63-78.
- Noma, Y. ve Asakawa, Y. (2009), "14 Biotransformation of monoterpenoids by microorganisms, insects and mammals," *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications*, (Ed: Başer, K.H.C. ve Buchbauer, G.), CRC Press.
- Noma, Y. ve Asakawa, Y. (2010), "Biotransformation of monoterpenoids," *Comprehensive Natural Products 2* (Ed: Mander L. ve Liu, H.B.), Elsevier.
- Noma, Y., Nonomura, S. ve Sakai, H. (1974), "Conversion of (-)-carvotanacetone and (+)-carvotanacetone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1," *Agric.Biol.Chem.*, **38**, 1673.
- Papandreou, M.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, Margarity, P. ve Lamari, F.N(2006), "Inhibitory activity on amyloid- β -aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents," *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8762-8768.
- Pelosi, P. ve Viti, R. (1978), "Specific anosmia to *l*-carvone: The minty primary odour," *Chem. Senses*, **3** (3), 331-337.
- Pfaller, M.A., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Goseyi, L. L., Odds, F.C., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J., Walsh, T.J. ve Warnock, D.W. (1997)., "National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard" *NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Clinical and Laboratory Standards Institute, A.B.D.

- Pierce, E., Britton, R.W., Keziere, J. ve Smille D.R.İ (1971), "Stereoselective total synthesis of (+)- copaborneol, (+)- copaisoborneol and (+)- copacamphor," *Canadian J. Chem*, **49**, 2620.
- Rowe D. J. (2005), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, John Wiley & Sons, İngiltere.
- Sarker, S.D., Latif, Z. ve Gray A.I. (2006), "Natural product isolation," *Methods in Biotechnology*, Humana Press, Japonya.
- Schewe H., Mirata, M.A., Holtmann, D. Ve Schrader, J. (2011), "Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases," *Process Biochemistry*, **46**, 1885-1899.
- Schneider, D.F ve Murray, S.V. (2002), "Stereoselective synthesis of (6R)- and (6S)-diosphenol and Ψ-diosphenol," *Tetrahedron*, **58(26)**, 5307-5315.
- Schrader, J. , Etschmann, M.M.W. , Sell, D. , Hilmer, J.,M. ve Rabenhorst, J, (2004) "Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds, current industrial processes and future prospects", *Biotechnology Letters*, **26(6)**, 463-472.
- Sell C.S.,(2003), "Chapter 1: Backround," *Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, İngiltere.
- Sidhu, G. S ve Swaleh, M. (1965), "Stereochemistry of carvomenthols and related compounds," *Chemistry Of Natural Products Sempozyumu Bildirileri Kitabı*, Hindistan, Bölüm: A-4, **35**, 388-441.
- Silvestre, A.J.D. ve Gandini, A. (2008), "Chapter 2: Terpenes: major sources, properties and applications," *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources (Ed: Belgacem M. N. ve Gandini, A.)*, Elsevier, Amsterdam.
- Smith, D., M., Skakum, W. ve Levi, L. (1963), "Determination of botanical and geographical origin of spearmint oils by gas chromatographic and ultraviolet analysis," *Agri. and Food Chem.*, **11(3)** , 268-276
- Sonia O., Oz, C N ve Valpuesta, V. (2010), "Physiology and Biochemistry of Fruit Flavors," *Handbook Of Fruit And Vegetable Flavors* (Ed: Hui, Y.H.), John Wiley & Sons, İngiltere.

- Springob, K. ve Kutchan, T.M., (2009), "Introduction to the different classes of natural products," *Natural Products: Synthesis, Function, and Application* (Ed: Osbourn, A. E. , Lanzotti, V.), Springer, New York, A.B.D.
- Srivastava, R.K., Singh, A.K., Kalra A., Tomar V.K.S., Bansal R.P. ve Patra, T (2002), "Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the indo-gangetic plains", *Industrial Crops and Products*, **15**,189–198.
- Suga, T., Hamada, H. ve Hirata, T. (1988), "Oxidoreduction between cycloalkanols and the corresponding cycloalkanols in the cultured cells of *Nicotiana tabaccum*. stimulation of time courses in the oxidoreduction," *Bulletin of The society of Japan* , **61**, 1715-1718.
- Surburg, H. ve Panten, J (2006), *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, Wiley-VCH, Berlin.
- Swiegers, J.H., Saerens, S.M.G. ve Isak, S.P, (2008), "The development of yeast strains as tools for adjusting the flavor of fermented beverages to market specifications," *Biotechnology in Flavor Production: A Case-based Approach*. (Ed: Havkin-Frenkel, D., Faith., C.), Blackwell Publishing, Belanger.
- Tan, Q., Day, D.F. ve Cadwallader, K.R (1998), "Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202)," *Process Biochemistry*, **33(1)**, 29-37.
- Tanakol, R. (2003), "Obezite tedavisinde orlistat," *T. Journal of End. and Met.*, **2**, 87-97.
- Thomas, A.F. (1974), "Part 1: Monoterpenoids," *Terpenoids and Steroids: A Review of Chemical Literature*, (Ed: Overton, K. H.), 3-24.
- Torres, G.C., Ledesma, S.D., Jablonski, E.L., Miguel S.R. ve Scelza, O.A. (1999), "Hydrogenation of carvone on Pt-Sn/Al₂O₃ catalysts," *Catalysis Today*, **48**, 65-72.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. ve Bisignano, G. (2005), "Mechanisms of

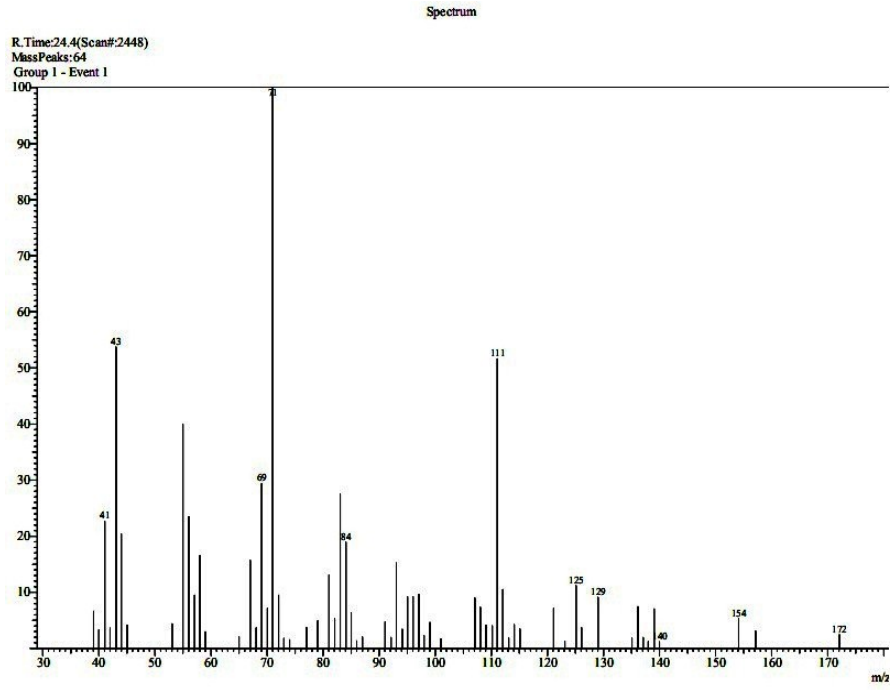
- antibacterial action of three monoterpenes,” *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **49(6)**, 2474–2478.
- Vandamme, E.J. (2003), ”Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes,” *Fungal Diversity*, **13**, 153-166.
- Vigushin, D.M., Poon, G.K., Boddy, A., English, J., Halbert, G.W., Pagonis, C., Jarman, M. ve Coombes, R.C. (1998), “Cancer research campaign phase 1/II clinical trials committee phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with,” *Advanced cancer Cancer Chemother Pharmacol.*, **42**, 111-117.
- Whiting, D.A. (1968), “The acyclic and monocyclic monoterpenoids”, *Rodd’s Chemistry of Carbon Compounds*, 2.Baskı, vol. II, part B, chapter 6, (Ed: Harper S.H), Elsevier, Amsterdam.
- Won, S., Kim, S., Kim, Y., Lee, P., Ryu J., Kim J. ve Rhee H. (2007), “Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*”, *Food Research International*, **40**, 1046-1050.
- Wouters, M.F.A., Apeldoorn, M.E. ve Speijers, G.J.A. (1999), Substances Structurally Related To Menthol, International programme On Chemical Safety World Health Organization Safety Evaluation Of Certain Food Additives WHO Food Additives Series: 42, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je04.htm>.
- Yamada, K., Murata, T., Kobayashi K., Miyase, T. ve Yoshizaki, F. (2010), “A lipase inhibitor monoterpene and monoterpene glycosides from *Monarda punctata*”, *Phytochemistry*, **71**, 1884-1891.
- Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T. ve Erten, H (2008), “Biyoteknolojik yollarla aroma maddelerinin üretimi,” *Gıda*, **33(1)**, 35-41.
- Zheng, G.Q., Kenney, P.M. ve Lam, L.K.T. (1992), “Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice,” *J. Agric. Food Chem.*, **40 (5)**, 751–755.
- Zwenger, S. ve Basu, C. (2008), “Plant terpenoids: Applications and future potentials,” *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3 (1)**, 1-7.

Ek-1: Ön Tarama Deneyleri

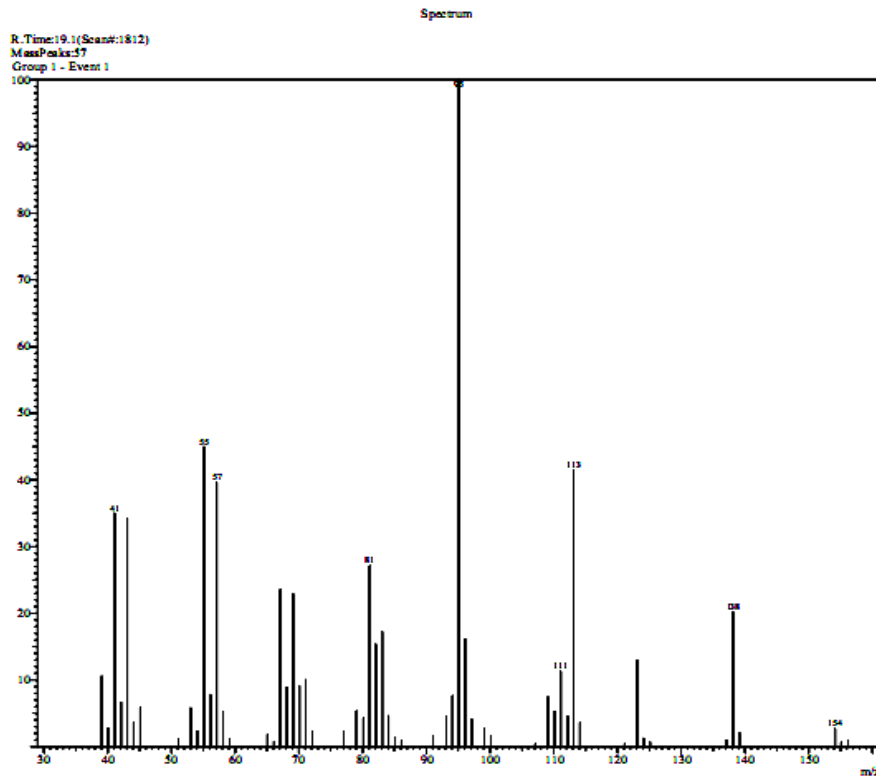


Ek-2: Kütle Spektrumları

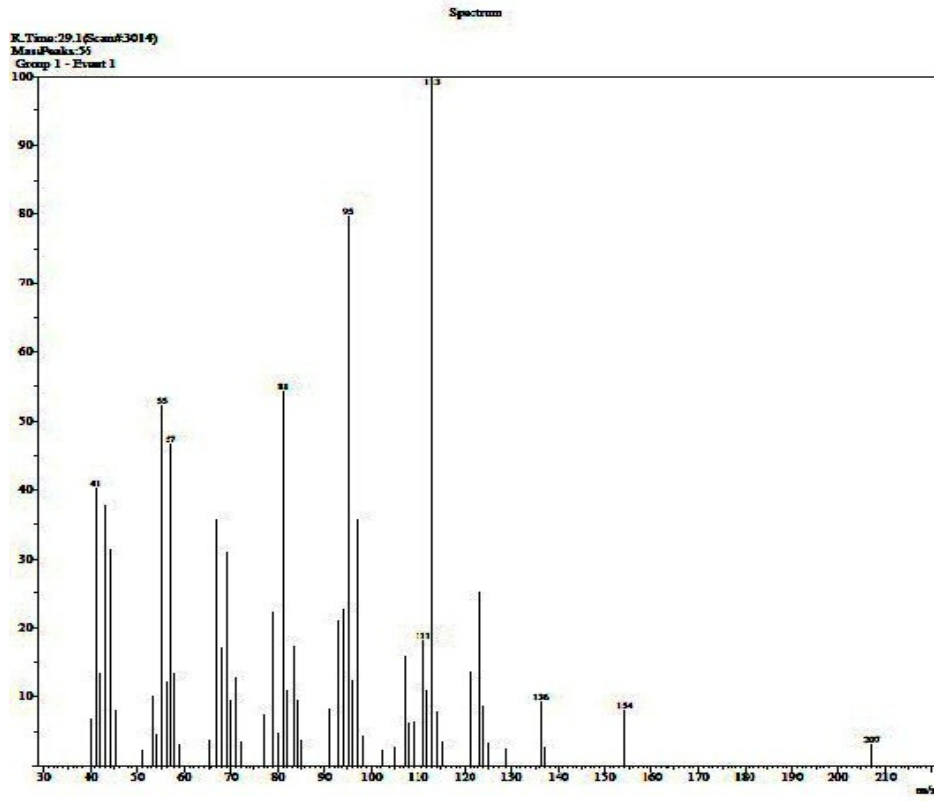
M1



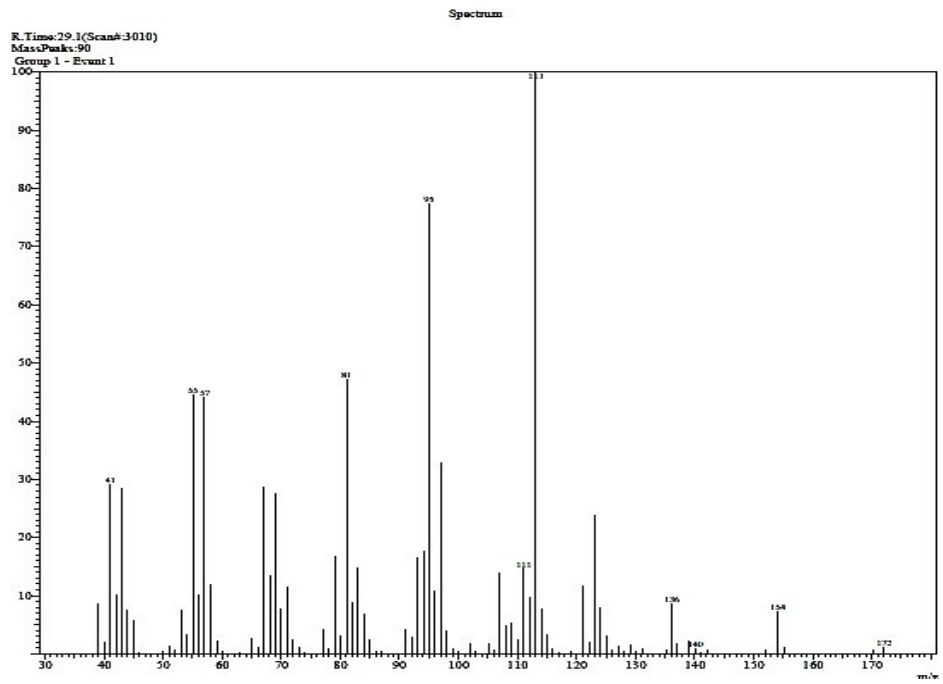
M2 ve M3



M4



M5



M6

