

**TİMOKİNONUN MİKROBİYAL
TRANSFORMASYONU**

Gamze Çayırđere

Yüksek Lisans Tezi

**TİMOKİNONUN MİKROBİYAL
TRANSFORMASYONU**

Gamze Çayırđere

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Şubat 2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatih Demirci

*Bu tez çalışmasında TÜBİTAK-TBAG-106T117 No'lu Proje
imkanlarından yararlanılmıştır.*

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Gamze Çayirdere
Doğum tarihi ve yeri : 16 Mayıs 1984, İstanbul
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Petrol iş Mah. Şehit Murat Şenyüz Sok.
Özgenç Apt No:12/2 Kartal /İST
gamzeczayirdere@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : 50.Yıl General Refet Bele İlköğretim Okulu
Lise : Süleyman Demirel Yabancı Dil Ağırlıklı
Lisesi
Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yabancı dil : İngilizce

Yayınlar

Poster Bildirileri

Demirci, F., Çayirdere, G., Bütün, S., İşcan, G., Kırimer, N., Başer, K.H.C Timokininun fungal biotransformasyonu 18. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, İstanbul (2008).

Demirci, F., Temel, H.E., Çayirdere, G., Berber, H., İşcan, G., Başer, K.H.C The inhibition of acetylcholine butrylcholinesterases and lipoxygenase by *p*-cymene derivatives, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences Ankara (2009).

Demirci, F., Çayirdere, G., Demirci, B Göger, F., İşcan, G., Başer, K.H.C. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Cedrus libani* A. Rich from Turkey, 8th International Symposium on The Chemistry of Natural Compounds, Eskişehir (2009).

Temel, H.E., Demirci, F., Çayirdere, G., Kırimer, N., Farklı organik çözücülerin kolinesterazlar üzerindeki etkileri, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 ANTALYA (2009).

Dinleyici Olarak Katıldığı Bilimsel toplantılar

International Symposium 7th Plant Life of Southwest Asia, Anadolu University, Eskişehir, 2007.

Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Ege Üniversitesi, Kuşadası-AYDIN, 2007

Bilimsel Etkinlikler
Proje

Biyokatalizörler Yardımıyla *p*-simen'den Timokinon ve Benzeri Biyoaktif Metabolitlerin Üretimi, Tübitak Projesi, Proje No: 106T117. (Bursiyer)

Katılınılan kurslar ve eğitim programları

Training Course on Process Technologies, Quality Control and Utilization of Essential Oils Eskişehir, Haziran, 2008.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince sabır ve anlayışla manevi desteğini benden hiç esirgemeyen ve her türlü araştırma için değerli bilgilerini bana aktaran, danışman hocam Doç. Dr. Fatih Demirci'ye,

Tez çalışmamı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda yapmama imkan sağlayan, tecrübe ve bilgileriyle bana yardımcı olan Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer'e ve her zaman desteğini sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Neş'e Kırimer'e,

Çalışmalarım sırasında GK-KS analizlerimi gerçekleştiren Doç. Dr. Betül Demirci'ye ve Doç. Dr. Temel Özek'e,

Laboratuar çalışmaları ve diğer analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Dr. Gökalp İşcan'a, Uzm. Bio. Fatih Göger'e, Uzm. Ecz. Emil Civişov'a, Bio Gökhan Dualı'ya,

Enzim inhibisyon deneylerindeki çalışmalara destek olan Yrd. Doç. Dr. Halide Edip Temel'e,

NMR analizlerinin gerçekleştirilmesinde katkıda bulunan Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AUBİBAM) ve analizleri yapan Uzm. Kim. Güner Saka'ya,

Son olarak tüm çalışmalarım sırasında her türlü manevi desteği gördüğüm Farmakognozi Anabilim Dalı mensuplarına,

Beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Gamze ÇAYIRDERE

TİMOKİNONUN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, çörek otu (*Nigella sativa* L.) tohum uçucu yağında ana bileşik olarak bulunan monoterpen kinon yapısındaki timokinon molekülünün 35 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus niger* ATCC 10549 ile altı, denenen diğer mikroorganizmalar ile ancak bir tane aynı metabolitin oluştuğu gözlenmiş, ince tabaka kromatografisi (İTK), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GK-KS) ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) yöntemleri ile yapıları tayin edilmiştir. *A. niger* ile oluşan altı metabolitten timohidrokinonun kimyasal yapısı tanımlanabilmiştir. Bu çalışma ile ilk defa, timokinonun mikrobiyal transformasyonu araştırılmış ve elde edilen metabolit timohidrokinon, denenen mikroorganizmalardan 23'nde gözlenmiştir. Timokinonun *A. parasiticus* (NRRLY 2999) ile preparatif biyotransformasyonu sonucu oluşan timohidrokinon metaboliti biyolojik aktivite çalışmaları için kromatografik olarak saflaştırılmıştır.

Ayrıca *in vitro* olarak timokinon ve timohidrokinonun antimikrobiyal (antibakteriyel antikandida), antioksidan (DPPH ve ABTS radikal süpürücü etki) ve enzim inhibisyonu [asetilkolin esterase (AChE), butirilkolin esterase (BuChE)] biyoaktivite testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak elde edilen biyotransformasyon ürünü timohidrokinonun kullanılan substrata göre test edilen sistemlerde biyolojik aktivitesinin daha etkin olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: timokinon, timohidrokinon, biyotransformasyon, mikrobiyal transformasyon, *in vitro* biyolojik aktivite.

MICROBIAL TRANSFORMATION OF THYMOQUINONE

ABSTRACT

In this present work, thymoquinone a monoterpene quinone, which is the major constituent of the essential oil of Black Cumin seed (*Nigella sativa* L.) was subjected to microbial biotransformation studies by using 35 different microorganisms. Among the screened strains *Aspergillus niger* ATCC 10549 was the most metabolite-yielding species with six metabolites identified by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography/mass spectroscopy (GC-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), respectively. Thymohydroquinone was the only metabolite characterized for the first time transformed by 23 of the tested microorganisms among others. The preparative biotransformation of thymoquinone by the fungus *A. parasiticus* (NRRLY 2999) yielded the chromatographically purified thymohydroquinone for bioactivity tests.

The *in vitro* antimicrobial (antibacterial and anticandidal), antioxidant (DPPH and ABTS radical scavenging), and enzyme inhibition [Acetylcholinesterase (AChE) butyrylcholinesterase (BuChE)] bioactivities of thymoquinone and thymohydroquinone were evaluated.

As a result the biotransformation metabolite thymohydroquinone showed better biological activities when compared with the substrate in the tested bioassays.

Key words: thymoquinone, thymohydroquinone, biotransformation, microbial transformation, *in vitro* bioassay.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
<i>Nigella sativa</i> : Botanik Özellikleri ve Kullanım Biçimleri	2
<i>Nigella sativa</i> Türünün Kimyasal Bileşimi	2
Timokinonun Doğal Kaynakları	3
Çörek Otu Tohumlarının Biyolojik-Farmakolojik Aktiviteleri	3
<i>Timokinon ve Çörek otu (Nigella sativa L.) ile Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları</i>	4
<i>Antioksidan Aktivite Çalışmaları</i>	4
<i>Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları</i>	4
<i>Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Çalışmaları</i>	5
<i>Antidiabetik Aktivite Üzerine Çalışmalar</i>	5
<i>Karaciğer Koruyucu Etkinliği Üzerine Çalışmalar</i>	5
<i>Antikanser ve Antitümör Aktivite Üzerine Çalışmalar</i>	5
Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon)	6
Monoterpenlerin Biyotransformasyonunda Kullanılan Biyokatalizörler	7
Biyotransformasyon Reaksiyonlarında Rol Oynayan Enzimler	7
GEREÇLER	10
Numuneler, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar	10
<i>Kullanılan Numuneler</i>	10
<i>Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler</i>	10
<i>Kullanılan Cihazlar</i>	11

Çörek otu Tohumlarından Ekstre Hazırlanması	11
Ekstrenin Fraksiyonlanması ve Uygun Fraksiyonun Belirlenmesi	12
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Çörek Otu Ekstresinde Timokinon Miktar Tayini	12
Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması	12
Mikroorganizma İnokülasyonu	12
Kullanılan Mikroorganizmalar	13
Kullanılan Besi Ortamları	13
<i>Sıvı Besi Yeri</i>	13
<i>α-medyum besi yeri</i>	14
<i>Katı besi yeri</i>	14
Sterilizasyon	14
Mikroorganizmaların İmhası	14
Biyotransformasyon Çalışmaları	14
Kontrol Grupları	14
Metabolitlerin Ekstraksiyonu	14
Metabolit Teşhisi ve İzolasyonu	15
<i>İnce Tabaka Kromatografisi</i>	15
<i>Preperatif İTK</i>	15
<i>Vakum Sıvı Kromatografisi</i>	15
<i>Kolon Kromatografisi</i>	15
Metabolit İzolasyonu	16
Metabolitlerin Yapı Tayinleri	16
<i>Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi</i>	16
<i>Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi</i>	16
Biyolojik Aktivite Çalışmaları	17
Antimikrobiyal Aktivite	17
Antioksidan Aktivite Çalışmaları	18
<i>1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil Radikalini Süpürücü Etki Tayini</i>	18
<i>ABTS Radikal Süpürücü Etki</i>	18
Enzim İnhibisyon Deneyleri	19
<i>Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibisyonu</i>	19
BULGULAR VE TARTIŞMA	20
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Çörek otu Ekstresinde Timokinon Miktar Tayini	20
Biyotransformasyon Sonuçları	21
<i>Timokinonun Mikrobiyal Transformasyonu</i>	22
<i>Aspergillus niger ATCC 10549 ile Mikrobiyal Transformasyon</i>	22

Biyolojik Aktivite Sonuçları	24
<i>Antibakteriyel Aktivite</i>	24
<i>Antikandidal Aktivite</i>	25
<i>Antioksidan Aktivite</i>	25
<i>1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil Radikalini Süpürücü Etki Sonuçları</i>	25
<i>ABTS Radikal Süpürücü Etki Sonuçları</i>	26
<i>Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyon Sonuçları</i>	28
SONUÇ ve ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO VE ADI	SAYFA
Şekil 1 Çörek Otu Çiçeği ve Tohumları	3
Şekil 2 Substrat: Timokinon	4
Şekil 3 Metabolit: Timohidrokinon	4
Şekil 4 Biyotransformasyon ve Uygulama Alanları	6
Şekil 5 Çörek Otu Ekstresinden Timokinon İzolasyonu	11
Şekil 6 Standart Madde Timokinonun YBSK Kromatogramı	20
Şekil 7 Çörek Otu Tohum Ekstresinin YBSK Kromatogramı	20
Şekil 8 Diğer Timokinon Metabolitleri	22
Şekil 9 Timohidrokinonun Kütle Spektrumu	23
Şekil 10 Timohidrokinonun ^1H -NMR (CDOD_3) Spektrumu	23
Şekil 11 Timohidrokinonun ^{13}C -NMR (CDOD_3) Spektrumu	24
Şekil 12 Çörek Otu Ekstre ve Sabit Yağının Antibakteriyel Etki Sonuçları	25
Şekil 13 ABTS Serbest Radikalinin % İnhibisyon Grafiği	27
Şekil 14 Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasite [(TEAK) (mM)]	27
Şekil 15 Timokinonun Asetilkolinesteraz Aktivite Sonucu	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA	
Çizelge 1	Biyotransformasyon Sistemlerinin Bazı Avantajları ve Dezavantajları	7
Çizelge 2	Mikrobiyal Transformasyonlarla Elde Edilen Bazı Monoterpen Metabolitler	8
Çizelge 3	DeneySEL Aşamalarda Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler	10
Çizelge 4	Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar	13
Çizelge 5	İTK Çalışmalarında Kullanılan Çözücü Sistemleri	15
Çizelge 6	Mikrodilüsyon Yönteminde Kullanılan Mikroorganizmalar	17
Çizelge 7	YBSK Analizinde Kullanılan Standarta ait Kalibrasyon Denklemi ve Korelasyon Katsayısı	20
Çizelge 8	Biyotransformasyon Sonucu Oluşan Metabolitler	21
Çizelge 9	Antibakteriyel Etki Sonuçları [MİK (µg.mL ⁻¹)]	24
Çizelge 10	Antikandidal Etki Sonuçları [MİK (µg.mL ⁻¹)]	25
Çizelge 11	DPPH Radikal Süpürücü Etki Sonuçları	26
Çizelge 12	ABTS Radikal Süpürücü Etki Sonuçları	26
Çizelge 13	Enzim inhibisyon sonuçları IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	28

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
^{13}C NMR	: Karbon-Nükleer Manyetik Rezonans
^1H NMR	: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
ABTS $^{\bullet+}$	: 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikali
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan tip kültür koleksiyonu)
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
CDCl_3	: Dötoro kloroform
CDOD_3	: Dötoro metanol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH $^{\bullet}$	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DTNB	: 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoat)
eV	: Elektron volt
ESOGÜ	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
EtOAc	: Etil asetat
GK	: Gaz Kromatografisi
IC_{50}	: % 50 inhibisyon konsantrasyonu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KS	: Kütle Spektrometresi
m/z	: Kütle/yük
M^+	: Moleküler iyon
MeOH	: Metanol
MHA	: Mueller Hinton Agar (katı besiyeri)
MHB	: Mueller Hinton Broth (sıvı besiyeri)
MHz	: Megahertz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mM	: Milimolar
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	: Nanometre

NRRL	: Northern Regional Research Laboratory Culture Collection of USDA (Amerikan Tarım Dairesi, Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarları Kültür Koleksiyonu)
PDA	: Patates Dekstroz Agar (katı besiyeri)
ppm	: Milyonda bir kısım
Rt	: Tutunma zamanı
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar (katı besiyeri)
TEAC	: Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TK	: Timokinon
THK	: Timohidrokinon
UV	: Ultraviyole
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde biotransformasyon, doğal ve sentetik organik bileşiklerin biyokimyasal yapı değişikliğinde ve metabolizma çalışmalarında önemli bir deneysel yöntem olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ilaç metabolizması modellemesi amacıyla yapılan *in vitro* mikrobiyal ve enzimatik transformasyon uygulamalarından daha fazla yararlanılmaktadır. Mikrobiyal transformasyonlar diğer enzimatik sistem transformasyonlarına göre genelde katalitik çeşitlilik ve aktivitelerinin daha yüksek olması, daha stabil ve daha ucuz olması ve fazla miktarlarda daha kolay elde edilebilme avantajlarından dolayı tercih edilmektedir (Kıran ve ark., 2006; Sun ve ark., 2009).

Bitkiler alemi günümüzde halen keşfedilmeyi bekleyen bir çok yeni doğal bileşiğin kaynağını oluşturmaktadır. Aromatik bitkilerin önemli bileşikleri arasında yer alan monoterpenler, sahip oldukları çok sayıdaki biyolojik fonksiyon ve aktiviteler ile dikkat çekmektedir. Timokinon, çörek otu (*Nigella sativa* L.) tohumlarının uçucu yağında bulunan aktif bileşiklerden biri olup birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip bir monoterpen kinondur (Kırimer ve ark., 2002; Pagola ve ark., 2004; Karıcı, 2006; Gali-Muhtasib ve ark., 2006b).

Kaynak taramaları sonucunda substrat olarak timokinonun kullanıldığı herhangi bir mikrobiyal transformasyon çalışmasına rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, ticari kaynaklardan temin edilen çörek otu tohumlarından Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile miktar tayininden sonra timokinon izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İlk defa timokinonun 35 farklı mikroorganizma ile mikrobiyal transformasyonu araştırılmış, oluşan metabolitler kromatografik (İTK) ve spektral yöntemlerle (KS, NMR) tanımlanmıştır. Elde edilen biotransformasyon ürünü timohidrokinon kromatografik (KK) yöntemlerle saflaştırılmıştır. *In vitro* yöntemlerle antimikrobiyal, antioksidan (DPPH ve ABTS radikal süpürücü) etki, asetilkolin esterase (AChE) ve butirilkolin esterase (BuChE) enzim inhibisyonu biyolojik aktivite testleri yapılmıştır. UV-spektrofotometrik makro- ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak substrat ve metabolit, standart maddeler ile karşılaştırılmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Bu bölümde Çörek otu (*Nigella sativa* L.) ve aktif bileşeni timokinon ile ilgili botanik, kimyasal ve farmakolojik araştırmalar özetlenmektedir.

Nigella sativa L.: Botanik Özellikleri ve Kullanım Biçimleri

Çörek otu Ranunculaceae familyasından olup, 20-30 cm yükseklikte, az çok tüylü, bir yıllık otsu bir bitkidir. Çiçek 5 parçalı, mavimtrak renkli olup involukrum taşımaz. Meyvada karpeller uç kısımda birleşmiştir. Tohumları, üç yüzlü, siyah renkli 1.5-2 mm uzunlukta acımsı lezzetli ve özel kokulu taneler olup, ezildiğinde koku kolaylıkla hissedilir. Çörek otunun anavatanı Doğu Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Güney Avrupa'dır. Tohum elde etme amaçlı yurdumuzda Afyon, Burdur, Isparta'da ekilmektedir (Baytop, 1999). Dünya'da çok yaygın biçimde Güney Avrupa, Suriye, Mısır, İran, Suudi Arabistan, Pakistan ve Hindistan'da kültürü yapılmaktadır.

Nigella sativa L. "kara çörek otu, siyah kimyon" olarak da bilinmekte olup uzun yıllardır geleneksel tıpta baş ağrısı, bronşiyal astım, dizanteri, hipertansiyon, sırt ağrısı, gastrointestinal problemler, kurt düşürücü, idrar/süt artırıcı, saç dökülmesi ve kepeğe karşı, ekzama, diabet, immün sistemi kuvvetlendirici, karaciğer/ böbrek fonksiyonları, romatizma gibi eklem hastalıkları iltihabını hafifletmede, öksürük gibi birçok hastalıkta yaygın olarak kullanılmıştır (Khan, 1999; Baytop 1999; Burits ve Bucar, 2000; Ali ve Blunden, 2003; Hajhashemi ve ark., 2004; Salem, 2005). Eski Mısır ve Yunan hekimlerince baş ağrısı, burun tıkanıklığı tedavisinde, antihelmantik ve diüretik amaçla kullanıldığı bilinmektedir (Salem, 2005). Ayrıca unlu gıdalarda (ekmek, çörek, bisküvi v.b.) kullanılan bir baharattır (Baytop, 1999).

Nigella sativa Türünün Kimyasal Bileşimi

Çörek otu ile ilgili ilk araştırmalar 1880'de Greenish tarafından yapılmış ve tohum içeriğinde % 37 yağ ve % 4.1 kül miktarı bildirilmiştir (El-Tahir ve Bakeet, 2006). Çörek otunun bileşiminde; sabit yağ (doymamış yağ asitlerince zengin) uçucu yağ, amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, saponinler, alkaloidler ve terpenoidler bulunmuştur (Khan, 1999). Çörekotu tohumlarında yaklaşık % 32 sabit yağ bulunduğu ve yağ bileşiminin % 55-60 linoleik asit, % 21-23 oleik asit, % 11-13 palmitik asit, % 1.2 miristik, % 2.9 stearik, az miktarda araşidik ve % 1.7 eikosadienoik asitten oluştuğu bildirilmiştir (Houghton ve ark., 1995; Nickavar ve ark., 2003; Kıralan, 2006). Çörekotu uçucu yağ miktarı % 0.01-0.1 arasında değişmekte ve ana bileşenlerini *p*-simen, timokinon, ditimokinon, timohidrokinon, β -pinen ve timol oluşturmaktadır (Akgül 1993; Ghosheh ve ark., 1999; Hajhashemi ve ark., 2004). Çörek otunun ayrıca dört tane alkaloid; iki nigellisin, nigellidin ve nigellimin içerdiği bildirilmiştir (Ali ve Blunden, 2003; Hosseinzadeh ve Parvardeh, 2004). Çörek otunda bulunan başlıca steroller β -sitosterol, stigmasterol ve kampesterol'dür (Kıralan, 2006).

Timokinonun Doğal Kaynakları

Timokinonun; *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae), *Callitris quadrivalvis* Vent. (Cupressaceae), *Monarda fistulosa* L. (Lamiaceae), *Juniperus cedrus* Webb & Berth. (Cupressaceae), *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae) ve *Nepeta leucophylla* Benth. (Lamiaceae) adlı bitkilerde bulunduğu bildirilmiştir (Pagola ve ark., 2004, Buckingham 2009). Timokinonun bu bitkilerdeki bulunma oranı % 0.09 – 45 arasında değişmektedir (http-3) .



Şekil 1. Çörek Otu Çiçeği ve Tohumları

Çörek Otu Tohumlarının Biyolojik – Farmakolojik Aktiviteleri

Mahfouz ve El-Dakhkhny 1960 yılında ilk kez, uzun yıllardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılan çörek otu tohumlarının uçucu yağından nigellon adı verilen polimer yapılı kristal bileşiğin izole edildiğini bildirmişlerdir (Salem, 2005; Akhtar ve ark., 2007). El-Dkhakhny 1963 yılında çörek otu uçucu yağından timokinon bileşiğini izole ettiğini bildirmiştir (Badary ve ark., 2003; Gali Muhtasib ve ark., 2006a; Khader ve ark. 2009). El-Fatetry, 1975 yılında çörek otu tohum uçucu yağından timohidrokinon izole etmiştir (Gali Muhtasib ve ark., 2006b).

El-Alfy ve arkadaşları 1975 yapılan çalışmalarda timokinondan sentez ile timohidrokinon isimli kristal yapıda olan maddeyi elde etmiştir (Khan, 1999). Çörek otu uçucu yağ çalışmalarında yapılan araştırmalar sonucunda timokinonun X-ışınları difraksiyon metodu ile kristal kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Pagola ve ark 2004). Gaz kromatografisi (GK) ve YBSK gibi metotlar kullanılarak çörek otu uçucu yağındaki timokinon miktarı tespit edilmiştir (Houghton ve ark., 1995; Ghosheh ve ark.,1999). Çörek otu tohumunda bulunan diğer önemli biyoaktif bileşenlerden ditimokinon, timohidrokinon ve timol YBSK ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri ile teşhis edilmiştir (Ghosheh ve ark., 1999; Khan, 1999; Gali-Muhtasib ve ark 2006a).

Şekil 2. Substrat: Timokinon

Şekil 3. Metabolit: Timohidrokinon

Timokinon ve Çörek otu (*Nigella sativa* L.) ile Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Çörek otunun içerdiği bileşenlerden timokinon, karvakrol, *trans*-anetol ve 4-terpineol'ün önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Houghton ve ark., 1995; Burits ve Bucar, 2000; Badary ve ark., 2003; Gali-Muhtasib ve ark., 2006a; Khalife ve Lupidi, 2007). Çörek otu tohumunun uçucu yağı ve ekstresi üzerine yapılan antioksidan aktivite çalışmasında, yüksek aktivitenin bulunduğu belirtilmiştir (Singh ve ark., 2005). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda timokinonun oksidatif hasarlara karşı önemli bir antioksidan ajan olduğu belirtilmiştir (Daba ve Abdel-Rahman, 1998; Mansour ve ark., 2001; Yıldız ve ark., 2008). Farelerde embriyo gelişimi esnasında meydana gelebilecek oksidatif hasarlara karşı timokinonun antioksidan aktivite özelliği araştırılmış, timokinon verilen dişi farelerde embriyonun serbest radikallere karşı korunduğu ve fiziksel gelişiminde her hangi bir hasarın olmadığı görülmüştür (Al-Enazi, 2007).

Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Çörek otunun bileşiminde bulunan nigellon, timokinon timohidrokinon gibi maddelerin antienflamatuvar aktiviteden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Khan, 1999). Çörek otu yağının artritte rahatlatıcı bir antienflamatuvar etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Salem, 2005; Ali ve Blunden, 2003). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada çörek otu uçucu yağının güçlü bir antienflamatuvar etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hajhashemi ve ark., 2004). Timokinon ve çörek otu yağının siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzim inhibitörü olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir (Houghton ve ark., 1995; El Mezayen ve ark., 2006). Çörek otu tohum uçucu yağı ve timokinon üzerinde yapılan bir çalışmada, doza bağımlı bir antienflamatuvar etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Hajhashemi ve ark., 2004; Ramadan, 2007). Yapılan başka bir araştırmada çörek otunun antienflamatuvar etkisinin 100 mg/kg'lık aspirin ile karşılaştırılabilir ölçüde olduğunu göstermiştir (Gali-Muhtasib ve ark., 2006a).

Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Çalışmaları

Çörek otu uçucu yağından izole edilen timohidrokinonun Gram pozitif bakterilere ve mayalara karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Toama ve ark., 1974). *Aspergillus niger* üzerine yapılan bir antifungal aktivite çalışmasında, timokinonun 2 mg/mL de Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerinde olduğu görülmüştür (Al-Jabre ve ark., 2003). Çörek otunun önemli bileşeni timokinon ve standart antifungal olan Amfoterisin B'nin *Fusarium solani*'ye karşı karşılaştırmalı olarak antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Timokinon Amfoterisin B'ye göre daha etkili bir inhibisyon göstermiştir (Akhtar ve ark., 2007). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı timokinon ve timohidrokinonun antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Halawani, 2009).

Antidiabetik Aktivite Üzerine Çalışmalar

İçlerinde Çörek otunun da bulunduğu tıbbi bitki karışımının sıçanlarda hipoglisemik etkisi araştırılmış ve bitki karışımının kan şekerini düşürücü etki de olduğu belirtilmiştir (Khan, 1999). *Nigella sativa*, *Commiphora myrrha*, *Ferula asafoetida*, *Aloe vera* ve *Olibanum* türlerinden hazırlanan bitki karışımının antidiabetik aktivitesi araştırılmış ve kan şekerini düşürücü etkide olduğu bulunmuştur (Al-awadi ve Shoukry, 1988). Başka çalışmalarda da hem çörek otunun hem de timokinonun hipoglisemik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Hawsawi ve ark., 2001, Fararh ve ark., 2005, Houcher ve ark., 2007; Pari ve Sankaranarayanan, 2009).

Karaciğer Koruyucu Etkinliği Üzerine Çalışmalar

Timokinonun, *t*-butil hidroperoksit (TBHP) bağlı karaciğer toksisitesinin de hepatoprotektif özelliği olduğu ortaya konulmuştur (Daba ve Abdel-Rahman, 1998). Çörek otu uçucu yağının bileşenlerinden timokinon, *p*-simen ve α -pinen'nin karaciğeri karbontetraklorür toksisitesine karşı korumada timokinonun etkili, ancak *p*-simen ve α -pinen'in ise etkisiz olduğu belirlenmiştir (Mansour ve ark., 2001). Etanol bağımlı toksisiteye karşı timokinonun karaciğer koruyucu etkinliği araştırılmıştır ve karaciğer hasarlarına karşı koruma gösterdiği ortaya konulmuştur (Alsaif, 2007). Yapılan bir çalışma da çörek otu bal karışımı ve zencefilin koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Çörek otu bal karışımının zencefile göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (Al-Elyani., 2008).

Antikanser ve Antitümör Aktivite Üzerine Çalışmalar

Çörek otu uçucu yağında bulunan timokinon ve timohidrokinonun antitümör aktivitesi araştırılmıştır; timokinon ve timohidrokinonun tümör hücrelerine karşı önemli oranda sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Ivankovic ve ark., 2006). Bir antitümör aktivite araştırmasında bitkinin metanollü ekstresinin bazı kanser hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etki ortaya koyduğu gösterilmiştir (Ali ve Blunden, 2003). Ayrıca çörek otu tohumlarının etanollü ekstresinin *in vitro* deneysel koşullarda kanser hücrelerini inhibe ettiği belirtilmiştir (Ramadan, 2007).

Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon)

Biyotransformasyon, canlı organizma veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla kimyasal dönüşümlerin gerçekleştirilmesi ve yararlı ürünlerin elde edilmesidir. Mikrobiyal transformasyon ise canlılığı ve gelişimi sağlanan mikroorganizmaların bulunduğu besi ortamlarına, substrat ilavesi ile gerçekleşen bir seri oksidasyon, redüksiyon, dekarboksilasyon veya hidroliz v.b reaksiyonlarını kapsayarak yeni metabolitlerin sentezlenmesine denir.

Biyotransformasyon reaksiyonları; optikçe saf bileşiklerin üretilmesi, rasemik karışımların ayrılması, seçimli olarak yapıya fonksiyonel grupların katılması gibi işlemler kolaylıkla gerçekleştirilir (Demirci, 2000; İşbakan, 2006; İşcan, 2009).



Şekil 4. Biyotransformasyon ve Uygulama Alanları

Monoterpenlerin Biyotransformasyonunda Kullanılan Biyokatalizörler

Biyotransformasyon reaksiyonların da kullanılan biyokatalizörler:

- A) Bütün hücre sistemleri
 - a) Mikroorganizmalar,
 - b) Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri,
 - c) Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri,
 - d) İnsan,
- B) Hücresiz preparatlar (Enzimler)
 - a) Saflaştırılmamış enzimler,
 - b) Saflaştırılmış enzimler.

(Houjin ve ark. 2006; Sharma ve ark., 2003; Miyazawa ve ark., 2004; Pereira ve ark., 2009).

Çizelge 1. Biyotransformasyon Sistemlerinin Bazı Avantajları ve Dezavantajları

	Avantajlar	Dezavantajlar
Bütün hücre sistemleri	Ucuz Kofaktör gereksinimine gerek duyulmaması	Büyük ekipman gerektirmesi, Büyük hacimlerde ortaya çıkan teknik problemler, Yan ürünlerinin fazla olması,
Enzimler	Spesifik reaksiyon vermeleri, Çözücülere karşı toleranslarının daha iyi olması, Belirli pH aralıklarında aktif	Pahalı Kofaktöre ihtiyaç duyulması,

(Xu ve ark., 2007; İşbakan, 2006)

Biyotransformasyon Reaksiyonlarında Rol Oynayan Enzimler:

1. Oksidoredüktazlar (EC-1)
2. Transferazlar (EC-2)
3. Hidrolazlar (EC-3)
4. Liyazlar (EC-4)
5. İzomerazlar (EC-5)
6. Ligazlar (EC-6)

Ticari fiyatlar araştırıldığında timokinonun 1g'nın 200-800 TL, timohidrokinonun 1 g'nın ise yaklaşık fiyatının 5000-7000 TL olduğu bilinmektedir (http-1, http-2)

Çizelge 2. Mikrobiyal Transformasyonlarla Elde Edilen Bazı Monoterpen Metabolitler

Substrat	Mikroorganizma	Metabolit	Kaynak
<i>p</i> -simen	<i>Aspergillus alliaceus</i> <i>A.niger</i> <i>Chaetomium cochloides</i> <i>Penicilium prilininum</i> <i>P. valentinum</i>	<i>p</i> -simen-2,3-diol <i>p</i> -simen-7-ol <i>p</i> -simen-8-ol <i>p</i> -simen-9-ol	Demirci ve ark., 2008
(-)- α -pinen	<i>Botrytis cinerea</i>	Verbenon 9-hidroksi- α -pinen 3 β -hidroksi-(-)- β -pinen 9-hidroksi- α -pinen	Farooq ve ark., 2002
β -pinen	<i>Aspergillus niger</i>	α -terpineol	Toniazzo ve ark., 2005
(R)-(+)-limonen	<i>Penicillium digitatum</i>	(R)-(+)- α -terpineol	Adams ve ark., 2003
(R)-(+)-limonen	<i>Alternaria alternata</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Corynespora cassicola</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	(+)-8- <i>p</i> -menten-1,2-diol Karvon ekzo-2-hidroksisineol	İşcan, 2009
1,8-sineol	<i>Aspergillus terreus</i>	2-ekso hidroksi-1,8-sineol 2-endo hidroksi-1,8sineol 3-ekso hidroksi-1,8sineol	Garcia ve ark., 2009
geraniol, nerol ve sitral	<i>Aspergillus niger</i>	linalol , α -terpineol limonen	Demyttenaere ve ark., 2000

Çizelge 2. (Devam) Mikrobiyal Transformasyonlarla Elde Edilen Bazı Monoterpen Metabolitler

linalol	<i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis cinerea</i>	8-hidroksi-linalol	Mirata ve ark., 2008
(-)-karvon	<i>Absidia glauca</i> <i>Cunninghamella</i> <i>echinulata</i> <i>Penicillium</i> <i>claviforme</i> <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> <i>Pseudomonas</i> <i>stutzerii</i>	(+)-neohidrokarveol (+)-izohidrokarveol (+)-dihidrokarveol (-)-cis-izohidrokarvon (+)- neoizohidrokarveol (+)-trans-karveol 10-hidroksi-(+)- neodihidrokarveol	Demirci, 2000
(+)-karvon	<i>Absidia glauca</i> <i>Cunninghamella</i> <i>echinulata</i> <i>Penicillium</i> <i>claviforme</i> <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> <i>Pseudomonas</i> <i>stutzerii</i>	(-)-neohidrokarveol (-)-izohidrokarveol (-)-dihidrokarveol (+)-cis- izohidrokarvon (-)- neoizohidrokarveol (-)-trans-karveol	Demirci, 2000

GEREÇLER

Bu bölümde biotransformasyon ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan numuneler, kimyasal maddeler, çözücüler, aletler, besi ortamları mikroorganizmalar ve deneysel çalışmalarla ilgili genel bilgiler verilmiştir.

Numuneler, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar

Kullanılan Numuneler

- Çörek otu tohumu (Yemen Baharat)
- Çörek otu tohumu sıkma yöntemi ile elde edilen sabit yağı (Cemre)
- Timokinon (Sigma-Aldrich)

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çizelge 3. Deneysel Aşamalarda Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (Sigma)	Hazır İTK plakları (Merck)
1,1-difenil-2-2, pikril hidrazil (Sigma)	Hidroklorik asit (Merck)
Agar (Fluka)	Ketokonazol (Merck)
Anisaldehit (Fluka)	Kloramfenikol (Sigma)
Asetilkolinesteraz (Sigma)	Metanol (Merck)
Asetiltiyokolinyodür (Sigma)	Müller Hinton Agar (Fluka)
Aseton (Merck)	Müller Hinton Broth (Merck)
Butirilkolinesteraz (Sigma)	<i>n</i> -hekzan (Merck)
Butiriltiyokolinyodür (Sigma)	Pepton (Fluka)
C vitamini (Sigma)	Petrol eteri (Merck)
Dimetilsülfoksit (Merck)	Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)
5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoat) (Sigma)	Potasyum hidroksit
Disodyum hidrojen fosfat (Fluka)	Potato Dextrose Agar (Merck)
Donepezil (Fargem)	Sabouraud Dextrose Agar (Fluka)
E vitamini (Sigma)	Sabouroud Glucose Agar (Fluka)
Eserin (Sigma)	Silikajel 60 G (Merck)
Etanol (Merck)	Sodyum klorür (Merck)
Eter (Merck)	Susuz sodyum sülfat (Sigma)
Etil asetat (Carlo Erba)	Sülfürik asit (Merck)
Galantamin (Sigma)	Troloks (Sigma)
Glasiyel asetik asit (Carlo Erba)	Yeast extract (Fluka)
Glikoz (Fluka)	

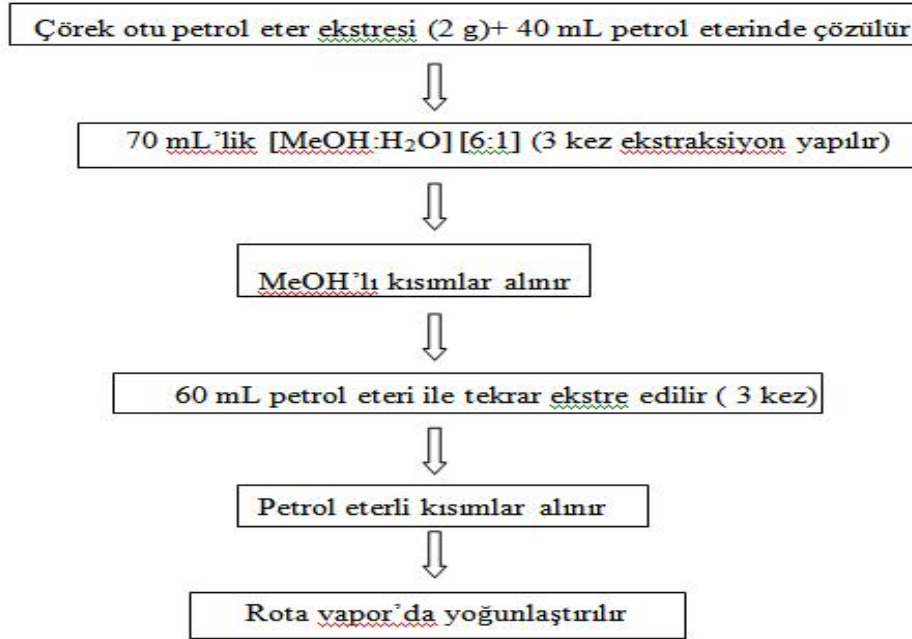
Kullanılan Cihazlar

- Gaz kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GK-KS) (Shimadzu GC 2010)
- Nükleer Manyetik Rezenans Spektroskopisi Sistemi (NMR) (Bruker DPX FT NMR-500 Mhz)
- UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV1700 PharmaSpec)
- Vakumlu sentrifügal yoğunlaştırıcı (Labconco) Otoklav (Hirayama, HV-50)
- Steril Kabin (Esco EN1822)
- Vorteks karıştırıcı (İka Genius 3)
- Ultrasonik banyo (Bandalin-Sonorex)
- pH metre (WTW Inolab)
- Santrifüj (Sigma)
- Etüv (MMM Incucell)
- Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific)
- Ultra derin dondurucu (New Brunswick Scientific)
- YBSK (Shimadzu Prominace sıvı kromatografisi sistemi)
- Mikroplate spektrofotometre (BioTek, Powerwave XS)
- Ultra derin dondurucu (-85°C) (New Brunswick Scientific)

YÖNTEMLER

Çörek Otu Tohumlarından Ekstre Hazırlanması

65g çörek otu tohumu değirmende öğütülerek kaba toz halinde Soxhlet apareyinde petrol eteri ile 3 saat süre ile ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstre 40°C’de rotavaporda çözücü uzaklaştırılarak yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 5. Çörek Otu Ekstresinden Timokinon İzolasyonu

Ekstrenin Fraksiyonlanması ve Uygun Fraksiyonun Belirlenmesi

Kuru ekstre 10 cm uzunluğunda ve 0.5 cm çapında cam kolonda silikajel G ile kolon kromatografisine tabi tutulmuş, petrol eteri (100 mL) kloroform (150 mL) ve MeOH (100 mL) olmak üzere üç fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların İTK’nde incelenmesi sonucunda yalnızca kloroform fraksiyonunda timokinon gözlenmiştir. Bu fraksiyonun vakum sıvı kromatografisi ile saflaştırılması *n*-hekzandan başlanılarak etil asetat ile gradient elüsyon yapılarak (100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 90:10, 80:20, 50:50) gerçekleştirilmiştir. 100’er mL lik fraksiyonlar toplanmış ve kolon metanol ile yıkanmıştır. Tüm fraksiyonlar İTK ile kontrol edilmiş ve *n*-hekzan: EtOAc (97:3) fraksiyonunda timokinon gözlenmiştir.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Çörek otu Ekstresinde Timokinon Miktar Tayini

Çörek otu ekstresinin içerdiği timokinon miktarının belirlenebilmesi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde Ghosheh ve arkadaşlarının (1999) kullandığı yöntem ile analiz gerçekleştirilmiştir.

YBSK Analiz Şartları:

Sistem	: Shimadzu SCL 10AVP HPLC system
Dedektör	: UV Dedektör 254 nm
Kolon	: Verspack C18 10 mikron 300 mm
Hareketli faz	: Su: Metanol: 2-Propanol (250:225:25)
Akış hızı	: 1 mL.dk ⁻¹
Fırın sıcaklığı	: 24 °C

Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması

Mikroorganizmalar Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), Müller Hinton Agar (MHA) katı besiyerlerinde eğik tüp, Petri ya da liyofilize halde orjinal kültür koleksiyonlarından (ATCC/ NRRL) temin edilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmiştir. 1 mL % 10’luk gliserol içeren kapaklı Eppendorf tüpler içine aktarılan stok mikroorganizmalar ise -85°C’de muhafaza edilmiştir. Eğik besi yerlerinde saklanan mikroorganizmalar 6 aylık periyotlarla canlandırılmıştır.

Mikroorganizma İnokülasyonu

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

Kullanılan Mikroorganizmalar: Biotransformasyon çalışmalarında toplam 35 adet mikroorganizma kullanılmıştır. **Çizelge 4** te kaynakları ile birlikte listesi verilmektedir.

Çizelge 4. Biotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar

NO	Mikroorganizmalar	Suş No
1	<i>Alternaria alternata</i>	NRRL 20593
2	<i>Alternaria alternata</i>	OGÜ-Fen
3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRL Y 2999
4	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL Y 326
5	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549
6	<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317
7	<i>Aspergillus niger</i>	Noma
8	<i>Aspergillus sp.</i>	CBSYN
9	<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 1957
10	<i>Aspergillus flavus</i>	DA 198
11	<i>Aspergillus niger</i>	DA 295
12	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 567
13	<i>Botrytis cinerea</i>	AHU 9424
14	<i>Corynespora cassiicola</i>	DSM 62474
15	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 1284
16	<i>Fusarium culmorum</i>	Anadolu Ü. Fen.Fak.Biyoloji Böl.
17	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374
18	<i>Giberella fujikuroi</i>	AHU 9078
19	<i>Hansenula anomala</i>	ATCC 20170
20	<i>Mucor ramannianus</i>	ATCC 1839
21	<i>Penicillium sp.</i> KCPYN	NOMA
22	<i>Penicillium sp.</i> YUZU	NOMA
23	<i>Penicillium adametzii</i>	NRRL 737
24	<i>Penicillium expansum</i>	DA 113
25	<i>Penicillium expansum</i>	DA 120
26	<i>Penicillium valentinum</i>	AnadoluÜ.Fen.Fak.Biyoloji Böl.
27	<i>Penicillium primilinum</i>	AnadoluÜ.Fen.Fak.Biyoloji Böl.
28	<i>Penicillium multicolor</i>	DA 60
29	<i>Penicillium odoratum</i>	DA 37
30	<i>Penicillium neocrassum</i>	NRRL 35639
31	<i>Rhizopus stolonifer</i>	NRRL 2710
32	<i>Thamnidium elegans</i>	ATCC 18191
33	<i>Trichoderma harzianum</i>	AnadoluÜ.Fen.Fak.Biyoloji Böl.
34	<i>Trichoderma viride</i>	H.Ü.
35	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ATCC 8661

Kullanılan Besi Ortamları

Sıvı Besi Yeri

Mikroorganizmalar yeterli büyüklüğe ulaştığında, biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, agarlı katı besiyerinden sıvı besiyerine transfer edilmiştir. Kullanılan sıvı besiyeri:

α -Medyum Besi Yeri

20 g glikoz, 5 g pepton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl ve 5 g Na₂HPO₄ 1000 mL'ye distile su ile tamamlanıp pH 7.0 olacak şekilde 0.1 N HCl veya KOH ilave edilmiştir.

Katı Besi Yeri

SDA, PDA, MHA besi yerleri orijinal ambalajlarındaki tarife uygun olarak hazırlanmıştır. Steril edilerek Petri kaplarına dökülmüştür.

Sterilizasyon

Besi yeri, mikroorganizmalar ile inoküle edilmeden önce, erlenlerde pamukla kapatılmış şekilde 121°C'de ve 1.1 atmosfer basınç altında, 20 dakika sterilize edilmiştir.

Mikroorganizmaların İmhası

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

Biyotransformasyon Çalışmaları

250 mL'lik erlenlerde bulunan 100 mL steril sıvı besi yerine, laminar akış kabininde oda sıcaklığında, tazelenmiş mikroorganizma öze ucu dolusu miktarda inoküle edilmiştir. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra (24-48 saat) bu besi yeri üzerine timokinon, besi yeri miktarına bağlı olarak %1-10 oranlarında ilave edilmiştir. 26°C, 200 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmış ve 1. 7. ve 14. günlerde örnekleme yapılmıştır.

Kontrol Grupları

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

Metabolitlerin Ekstraksiyonu***Ekstraksiyon***

Metabolit oluşumunu izlemek amacıyla yapılan işlemdir. Steril koşullar altında önceden 2-3 mL EtOAc ilave edilmiş deney tüplerine steril uçlu pipetörler ile biyotransformasyon besi ortamından eşit miktarda aktarılmış, 15-20 saniye vorteks kullanarak karıştırılmıştır. EtOAc'lı üst faz, başka bir pipet ile bir numune kabına aktararak bu işlem toplam 3 kere tekrarlanmıştır. 39-40°C konsantratör kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır. İTK veya GK-KS sistemi ile metabolit varlığı kontrol edilmiştir.

Metabolit Teshisi ve İzolasyonu

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Aluminyum destek üzerine 0.2/0.25 mm kalınlığındaki silikajel 40/60 GF₂₅₄ kaplanmış 20x20 cm ebatlarında hazır plaklar kullanılmıştır. Uygun çözücü sistemlerinde developpe edilip, plaklar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak anisaldehit-sülfürik asit ve ısı (120°C de 3-5 dakika) kullanılmıştır.

Çizelge 5. İTK Çalışmalarında Kullanılan Çözücü Sistemleri

Çözücüler	Oranları (v:v)
<i>n</i> -hekzan: EtOAc	4:1
<i>n</i> -hekzan: EtOAc	2:1
<i>n</i> -hekzan: EtOAc	1:1

Preperatif İTK

0.25 mm kalınlıkta 10x10 cm ebadında Silikajel G kaplanmış hazır aluminyum plaklar kullanılmıştır. Uygun çözücü sistemde developpe edilir, plaklar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak anisaldehit/H₂SO₄ kullanılmış, plakların bir kenarına püskürtülerek bantlar belirlenmiştir. İzole edilmek istenen maddeler ayrı bantlar halinde kazınarak Aseton:MeOH (9:1) karışımı ile 3 kez ekstre edilmiş daha sonra poröz cam süzgeçlerden yıkanarak alınmış ve azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır.

Vakum Sıvı Kromatografisi

Ekstrenin fraksiyonlanması için kullanılan bu yöntemde, ekstre miktarının 30-40 katı miktarında tartılmış ve 110°C'de 2 saat aktive edilmiş, silikajel G, 3 cm çapında ve 40 cm boyunda şilifli kolona yüklenmiştir. Kolon vakumlu erlene yerleştirildikten sonra elüsyona *n*-hekzandan başlanarak metanole kadar gradiyent elüsyon yapılarak ekstre fraksiyonlanmıştır. Toplanan fraksiyonlar İTK ile incelenmiş, benzer olanlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır.

Kolon Kromatografisi

Kolon *n*-hekzan ile ıslatılmış silikajel ile yaş usulde doldurulmuştur. Bunun için ekstre ve kullanılacak silikajel miktarına göre 5x40 ve 10x70 cm ebatlarında kolonlar tercih edilmiştir. Ekstre biraz çözücü ile çözülerek az silikajele emdirilmiştir. *n*-hekzan'dan başlanarak etil asetat ile gradient elüsyon yapılarak 100 mL'lik fraksiyonlar toplanmış ve son olarakta kolon metanol ile yıkanmıştır.

Metabolit İzolasyonu

Biotransformasyon büyük ölçekte çalışılmıştır. 500 mL veya 1 L'lik erlenlerde, 200-600 mL besi yeri olacak şekilde 1-2 erlen hazırlanmıştır. Mikroorganizmalar 48-72 saat içinde belirli bir büyüklüğe gelince 250 mg timokinon eşit miktarda tüm erlenlere ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve 200 rpm'de, uygun sürelerde çalkalanmıştır. Biotransformasyon işlemini durdurmak amacıyla besi yerlerine ½ oranında EtOAc ilave edilmiştir. İyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar ayırma hunilerinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstre edilmiştir. Toplanan ekstreler susuz Na₂SO₄'tan geçirilerek 40-60°C'de alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır.

Metabolitlerin Yapı Tayinleri

Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi (GK-KS)

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ürünlerin kütle spektrumlarının alınması için Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi sistemi kullanılmıştır.

Sistem : Shimadzu GC 2010

Dedektör : Kütle Spektrometresi

Kolon : CPSil-5CB kolon (25 m x 0.25 mm çap, 0.25 µm film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz : Helyum (0.8 mL.dk⁻¹ akış hızı) kullanılmıştır.

Enjeksiyon portu sıcaklığı:200°C

Dedeksiyon aralığı : 70 eV elektron enerjisiyle, 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık Programı : 60°C'de 10 dk, 4°C/dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dk 1°C artışla 240°C dereceye çıkan toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır.

Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” nin yanı sıra Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 3.1 kütüphane tarama yazılımları kullanılmış ayrıca ilgili kaynaklardaki verilerden de yararlanılmıştır.

Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

¹H NMR (500 Mhz) , ¹³C NMR (125 Mhz) ayrıca iki boyutlu spektrumlar, Bruker DPX FT NMR sistemi ile BİBAM'da kaydedilmiştir. NMR çözücülerini olarak dötoro-kloroform (CDCl₃) ve dötoro metanol (CDOD₃) kullanılmıştır. Kimyasal kayma değerleri ppm olarak verilmiş kalibrasyon çözücü piklerine göre yapılmıştır.

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biyotransformasyonda kullanılan substrat, elde edildiği bitkisel kaynağı ve metabolitin biyolojik aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite

Mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. 8 mg numune 2 mL steril DMSO veya MeOH kullanılarak stok çözeltisi hazırlanmıştır. 96-kuyucuklu U-tipi mikropalakasının tüm kuyucuklarına 100 µL besiyeri (Müller Hinton Broth) konmuştur. İlk kuyucuğa stok çözeltiden 100 µL ilave edilmiştir. Daha sonra ilk kuyucuktan başlayarak tüm kuyucuklara log₁₀'a göre seyreltme uygulanmıştır. 24 saat Müller Hinton Broth'da 37°C'de çoğaltılmış mikroorganizmalar önce McFarland 0.5 standardına göre seyreltilmiştir. Daha sonra kuyucuklara 100 µL ilave edilip 24 saat ilgili sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki konsantrasyon, minimum inhibe edici konsantrasyon olarak (MİK) µg.mL⁻¹ cinsinden belirlenmiştir. Pozitif ve negatif kontrollerde dikkate alınarak deneyler en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçların ortalaması verilmiştir.

Standart madde: Bakteriler için kloramfenikol, mayalar için ketokonazol kullanılmıştır.

Çizelge 6. Mikrodilüsyon Yönteminde Kullanılan Mikroorganizmalar

	Mikroorganizma	Kaynak
B1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008
B2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
B3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
B4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567
B6	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
B8	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711
B10	<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	Klinik izolat
F1	<i>Candida albicans</i>	ESOGÜ-klinik izolat
F52	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
F3	<i>Candida glabrata</i>	ESOGÜ-klinik izolat
F4	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y-900
F5	<i>Candida tropicalis</i>	NRRL Y-12968
F6	<i>Candida krusei</i>	NRRL Y-7179
F7	<i>Candida zeylanoides</i>	NRRL Y-1774
F8	<i>Candida parapsilosis</i>	NRRL-Y-12696

Antioksidan Aktivite Çalışmaları

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

Numunelerin serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla 0.5-5 mg.mL⁻¹ konsantrasyonlarda hazırlanan test maddeleri öncelikle İTK plaklarına 5 µL olarak uygulanmış ve üzerine hemen DPPH çözeltisi püskürtülerek, kalitatif olarak ön tarama testleri yapılmıştır. Aktif olduğu görülen bileşiklerin, UV- spektroskopik mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak, kantitatif olarak inhibisyon konsantrasyon bulguları vitamin C, vitamin E ve BHT standartları ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Kantitatif yöntem: Her test bileşiğinin MeOH'deki stok çözeltisi 0.5 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden, 96-kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının ilk sütununa sırasıyla 100'er µL aktarılmıştır. Çok-kanallı pipet aracılığıyla, eşit miktarda 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⁻¹ olacak şekilde hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL DPPH çözeltisinden eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bırakılmıştır. C Vitamini, E vitamini ve butillenmiş hidroksi toluen (BHT) aynı konsantrasyonda pozitif kontrol, DPPH+MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı plakta uygulanmıştır. UV absorbans 517 nm'de mikropilaka 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) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

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

A₀ : kontrol absorbans

A₁ : numune absorbans

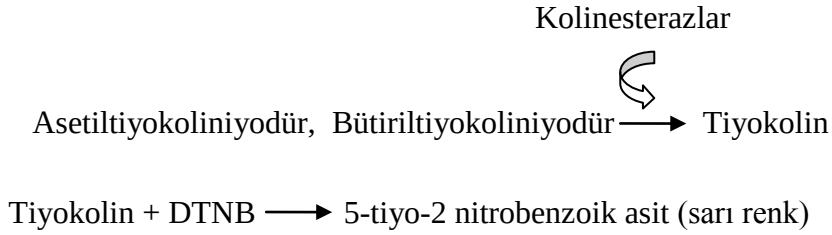
b) ABTS Radikal Süpürücü Etki

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

Enzim İnhibisyon Deneyleri

Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibisyonu

Kolinesterazlar, asetilkolini tiyokolin ve asetata parçalayan reaksiyonu katalizlerler ve ürün olarak açığa tiyokolin çıkar ve DTNB ile reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm’de ölçülmektedir (Ellman ve ark., 1961).



Deneysel çalışmalarda numunelerin çeşitli konsantrasyonları MeOH’de çözülerek hazırlanmıştır. Enzim deneylerinde standart inhibitör olarak Eserin, Galantamin ve Donepezil kullanılmıştır. Kullanılan tampon 0.1 M fosfat (pH= 8) tamponudur. Her iki deney çalışmasında da 1U/mL’lik enzim kullanılmıştır. Reaksiyonlarda kullanılan DTNB solüsyonu 0.01 M’lık hazırlanmıştır. Substrat olarak kullanılan asetiltiyokoliniodür 75 mM ve bütiriltiyokoliniodür ise 10 mM olarak hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler UV-VIS spektrofotometre ile 37°C’de 412 nm’de ölçülmüştür. Her iki deneysel yöntemde de çalışmalar 3 tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması AChE ve BuChE aktivitesi IC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

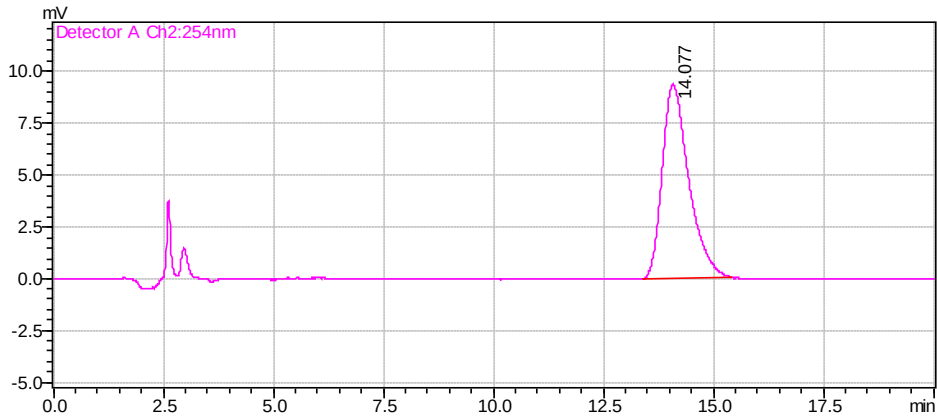
BULGULAR VE TARTIŞMA

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Çörek Otu Ekstresinde Timokinon Miktar Tayini

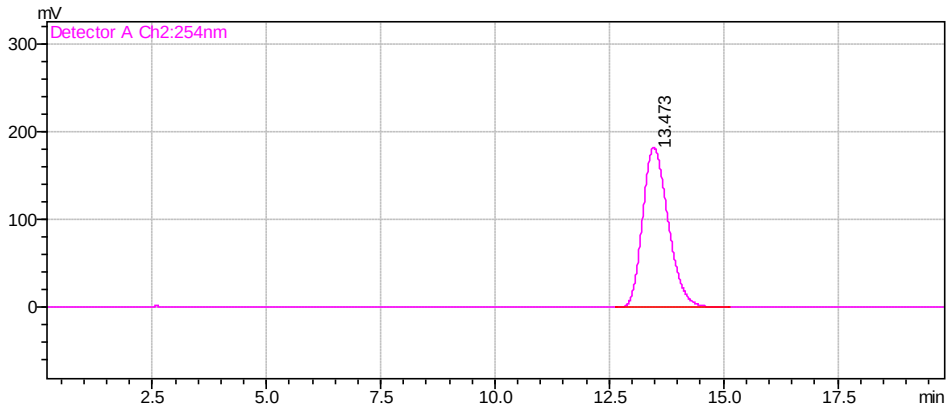
65 g Çörek otu Soxhlet apareyi ile ekstre edilmiş ve % 23 ± 2 verimle 15 g ekstre alınmıştır. Ekstredeki timokinon miktarı % 1.95 oranında bulunurken bitkide bu oran % 0.45 olarak bulunmuştur.

Çizelge 7. YBSK Analizinde Kullanılan Standarta ait Kalibrasyon Denklemi ve Korelasyon Katsayısı

Standart	Kalibrasyon denklemi [y = ax + b]	Korelasyon katsayısı [r]	Konsantrasyon aralığı [mg.mL ⁻¹]
Timokinon	y = 9.246333e+0.07x	0.997	0.001-0.700



Şekil 6. Standart Madde Timokinonun YBSK Kromatogramı



Şekil 7. Çörek Otu Tohum Ekstresinin YBSK Kromatogramı

Biyotransformasyon Sonuçları

Substrat olarak kullanılan timokinon 35 farklı mikroorganizma ile bir önceki bölümde açıklandığı gibi biyotransformasyona bırakılmış, metabolit varlığı İTK ile kontrol edilmiştir. Mikroorganizmaların isimleri ve çalışma sonuçları **Çizelge 8**'de özetlenmiştir.

Çizelge 8. Biyotransformasyon Sonucu Oluşan Metabolitler

NO	Mikroorganizma	Suş	Timokinon (mg)	Metabolit /Adet
1	<i>Alternaria alternata</i>	NRRL 20593	40	+ / 1
2	<i>Alternaria alternata</i>	OGÜ-Fen	25	+ / 1
3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRLY 2999	50 +150	+ / 1
4	<i>Aspergillus niger</i>	NRRLY 326	50	+ / 1
5	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549	50	+ / 6
6	<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317	50	+ / 1
7	<i>Aspergillus niger</i>	İzolat Noma	25	+ / 1
8	<i>Aspergillus sp.</i>	CBSYN	50	+ / 1
9	<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 1957	50	+ / 1
10	<i>Aspergillus flavus</i>	DA 198	50	+ / 1
11	<i>Aspergillus niger</i>	DA 295	50	+ / 1
12	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 567	50	+ / 1
13	<i>Botrytis cinerea</i>	AHU 9424	150	+ / 1
14	<i>Corynespora cassiicola</i>	DSM 62474	50	-
15	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 1284	30	-
16	<i>Fusarium culmorum</i>	Anadolu Ü. Fen.F.Biyoloji B.	50	+ / 1
17	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374	30	-
18	<i>Giberella fujikuroi</i>	AHU 9078	30	-
19	<i>Hansenula anomala</i>	ATCC 20170	30	-
20	<i>Mucor ramannianus</i>	ATCC 1839	30	+ / 1
21	<i>Penicillium sp. KCPYN</i>	NOMA	30	+ / 1
22	<i>Penicillium sp. YUZU</i>	NOMA	30+150	+ / 1
23	<i>Penicillium adametzii</i>	NRRL 737	30	+ / 1
24	<i>Penicillium expansum</i>	DA 113	30	+ / 1
25	<i>Penicillium expansum</i>	DA 120	30	+ / 1
26	<i>Penicillium valentinum</i>	Anadolu Ü. Fen.F.Biyoloji B.	25	-
27	<i>Penicillium primulinum</i>	Anadolu Ü. Fen.F.Biyoloji	25	-

Çizelge 8. (Devam) Biyotransformasyon Sonucu Oluşan Metabolitler

28	<i>Penicillium multicolor</i>	DA 60	40	+ / 1
29	<i>Penicillium odoratum</i>	DA 37	40	+ / 1
30	<i>Penicillium neocrassum</i>	NRRL 35639	40	+ / 1
31	<i>Rhizophus stolonifer</i>	NRRL 2710	30	-
32	<i>Thamnidium elegans</i>	ATCC 18191	40	-
33	<i>Trichoderma harzianum</i>	AnadoluÜ.Fen.F Biyoloji Böl.	30	-
34	<i>Trichoderma viride</i>	H.Ü.	30	-
35	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ATCC 8661	30	-

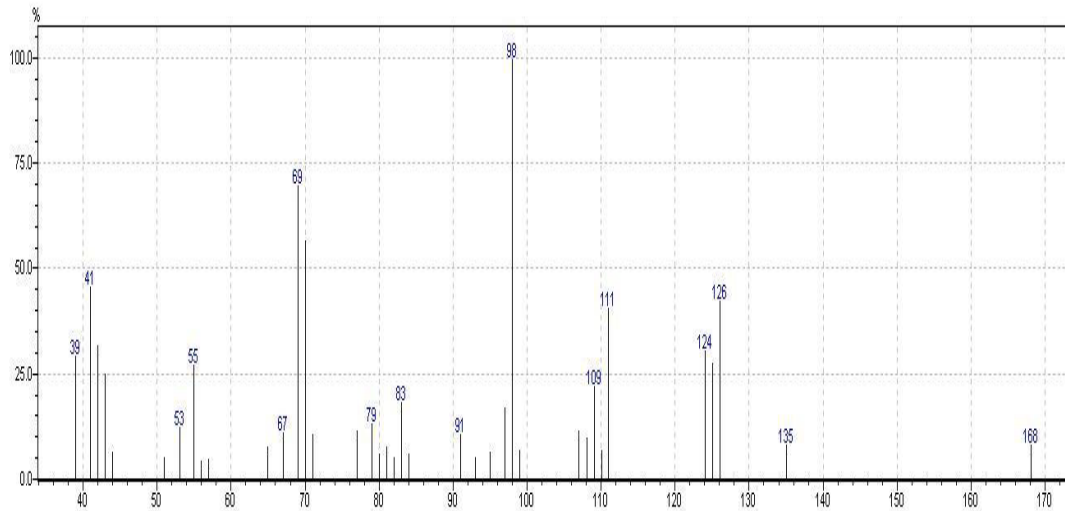
Timokinonun Mikrobiyal Transformasyonu

***Aspergillus niger* ATCC 10549 ile Mikrobiyal Transformasyon**

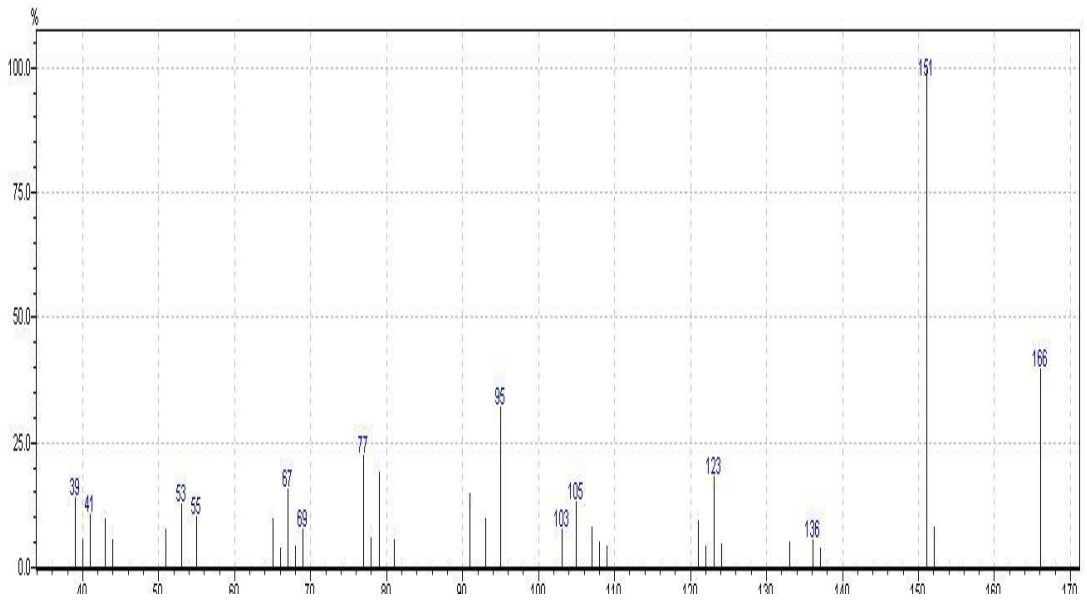
A. niger ile oluşan altı metabolitten timohidrokinonun kimyasal yapısı tanımlanabilmiştir. Diğer gözlenen metabolitler 4-hidroksi-5-izopropil-2-metil-siklohekza-2-dienon veya 4-hidroksi-6-izopropil-3-metil-siklohekza-2-dienon olabileceği tahmin edilmektedir. Bu metabolitler saf halde izole edilmedikleri için, kütle spektrumları **Şekil 8'** de verilmiştir.

Diğer çalışılan mikroorganizmalarda da aynı metabolit timohidrokinonun olduğu gözlenmiş, İnce tabaka kromatografisi (İTK), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GK-KS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleri ile yapısı tayin edilmiştir.

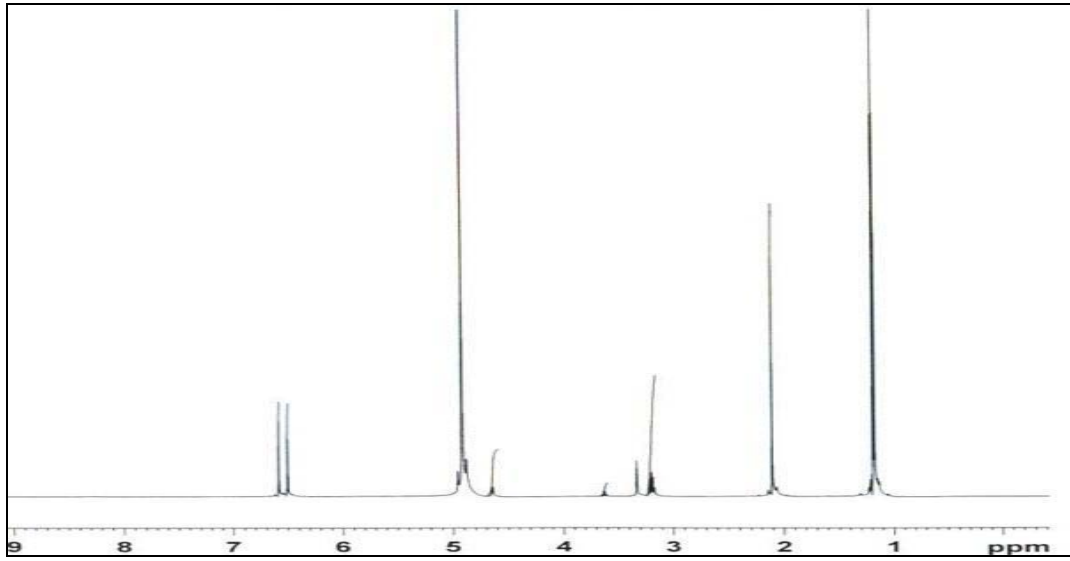
Metabolitin kütle spektrumu ve NMR spektrumları **Şekil 9'** da verilmiştir.



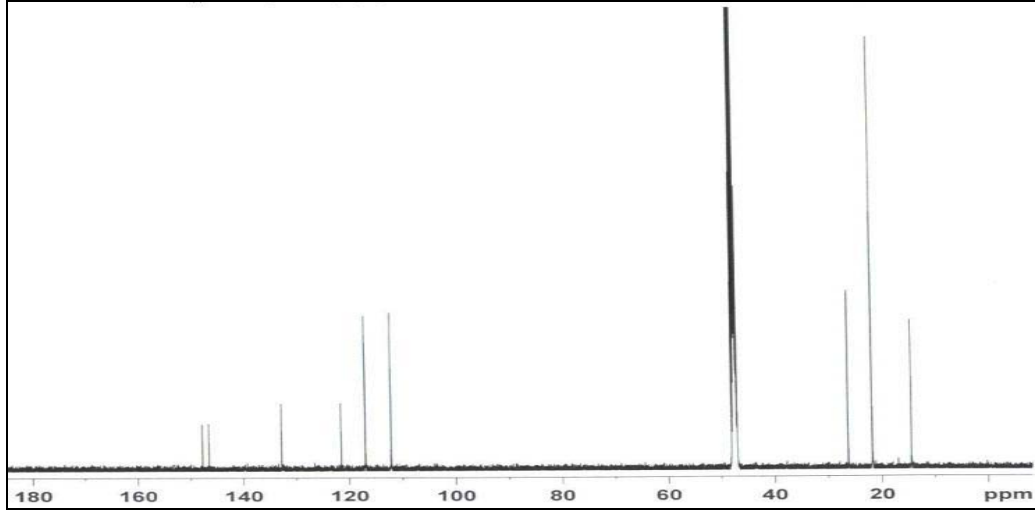
Şekil 8. Diğer Timokinon Metabolitleri [4-Hidroksi-5-izopropil-2-metil-siklohekza-2-dienon: C₁₀H₁₆O₂ MA: 168 veya 4-Hidroksi-6-izopropil-3-metil-siklohekza-2-dienon metabolitlerinin kütle spektrumu (Wiley, NIST)]



Şekil 9. Timohidrokinonun [$C_{10}H_{14}O_2$, 166 (M^+)] Kütle Spektrumu (Wiley GC/MS, Adams ve Mass Finder 3.1)



Şekil 10. Timohidrokinonun 1H -NMR ($CDOD_3$) Spektrumu



Şekil 11. Timohidrokinonun ^{13}C -NMR (CDOD_3) Spektrumu

Biyolojik Aktivite Sonuçları

Substrat timokinin ve metabolit timohidrokinon, bitkisel kaynakları (Çörek otu ekstresi ve Çörek otu sabit yağı) ve standartları ile gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmaları; antimikrobiyal (antibakteriyel ve antikandida), antioksidan (ABTS ve DPPH radikal süpürücü etki) ve enzim inhibisyonu deneylerini (asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz) kapsamaktadır.

Antibakteriyel Aktivite

Dört Gram negatif (-) bakteri ve üç Gram pozitif (+) bakteri ile mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak numunelerin ve izole edilen metabolitin minimum inhibisyon konsantrasyonları $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar **Çizelge 9**'da toplu halde verilmiştir.

Çizelge 9. Antibakteriyel Etki Sonuçları [MİK ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)]

Bakteri	Çörek otu ekstresi	Çörek otu sabit yağı	Timokinin	Timohidrokinon	Kloramfenikol
<i>Escherichia coli</i>	1000	500	250	250	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	500	500	500	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	1000	1000	62.5	62.5	62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	500	500	125
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1000	500	1000	1000	62.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	500	500	1000	1000	62.5
<i>Bacillus cereus</i>	500	1000	125	62.5	62.5



Şekil 12. Çörek Otu Ekstre ve Sabit Yağının Antibakteriyel Etki Sonuçları

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 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cinsinden belirlenmiştir.

Çizelge 10. Antikandidal Etki Sonuçları (MİK, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

<i>Candida</i> sp.	Çörek otu ekstresi	Çörek otu sabit yağı	TK	THK	Keto-konazol
<i>Candida albicans</i> , klinik izolat	1000	125	125	125	62.5
<i>Candida albicans</i> , ATCC 90028	62.5	125	500	250	250
<i>Candida glabrata</i>	250	62.5	250	125	62.5
<i>Candida utilis</i>	250	500	125	125	125
<i>Candida tropicalis</i>	250	500	125	125	62.5
<i>Candida krusei</i>	250	250	250	125	125
<i>Candida zeylanoides</i>	500	500	250	250	125
<i>Candida parapsilosis</i>	500	500	125	250	15.62

Antioksidan Aktivite

a) 1,1-difenil-2-2 pikril hidrazil (DPPH[•]) Radikalini Süpürücü Etki Sonuçları

0.5 mg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanan numunelerin serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla öncelikle İTK plaklarına 5 μL olarak uygulanmış ve üzerine hemen DPPH çözeltisi püskürtülerek, kalitatif olarak ön-tarama testi yapılmıştır. Aktif olduğu görülen bileşiklerin, UV-spektroskopik- mikrodilüsyon yöntemleri (Sarker ve ark., 2006, Kumarasamy ve ark., 2002) kullanılarak, kantitatif olarak inhibisyon konsantrasyon bulguları vitamin C, vitamin E ve BHT standartları ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 11. DPPH Radikal Süpürücü Etki Sonuçları

Numuneler	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
Çörek otu ekstresi	> 0.5
Çörek otu yağı	> 0.5
Timokinon	0.039 ± 0.02
Timohidrokinon	0.012 ± 0.002
Vit C (standart)	0.008 ± 0.002
Vit E	0.022 ± 0.01
BHT	0.024 ± 0.002

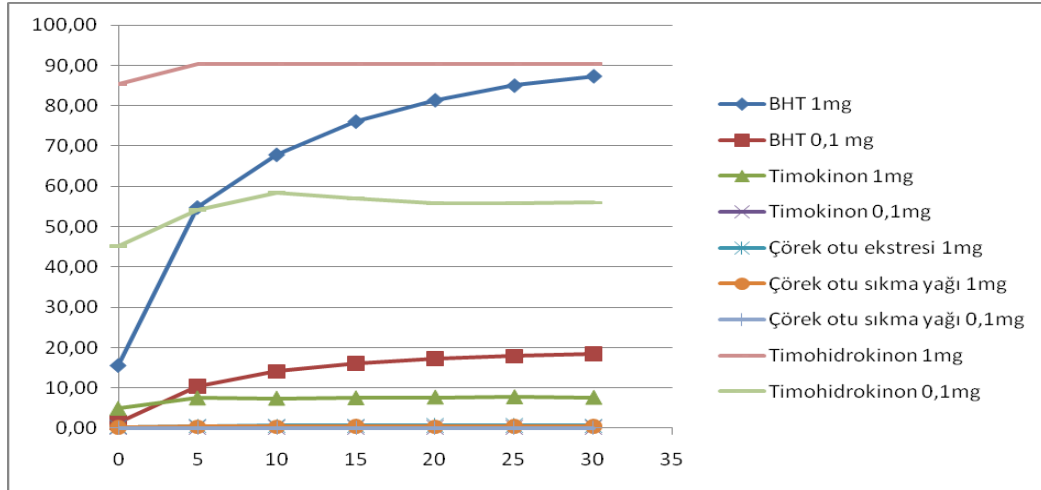
b) ABTS Radikal Süpürücü Etki Sonuçları

Timokinon (TK), Timohidrokinon (THK), çörek otu ekstresi ve çörek otu sıkma yöntemi ile elde edilen sabit yağ üzerinde yapılan ABTS sonuçları aşağıdaki grafik ve tablolarda verilmiştir. Ekstrelerin ABTS serbest radikalini 30 dk süresince inhibe etme yüzdeleri tablo ve grafik olarak verilmiştir.

Çizelge 12. ABTS Radikal Süpürücü Etki Sonuçları (% İnhibisyon)

Zaman (Dk)	BHT 1mg	BHT 0,1mg	Ekstre 1 mg	Ekstre 0,1 mg	Sabit Yağ 1mg	Sabit Yağ 0,1 mg	TK 1 mg	TK 0,1mg	THK 1 mg	THK 0,1mg
0	15,53	1,35	0,31	0,31	0,26	0,07	4,92	0,24	85,27	45,26
5	54,77	10,38	0,55	0,40	0,38	0,07	7,47	0,25	90,36	54,11
10	67,88	14,06	0,60	0,55	0,38	0,07	7,41	0,26	90,31	58,43
15	76,11	16,03	0,60	0,47	0,49	0,07	7,50	0,18	90,36	57,04
20	81,42	17,21	0,64	0,55	0,38	0,07	7,65	0,17	90,33	55,84
25	85,04	17,88	0,64	0,48	0,47	0,07	7,74	0,17	90,33	55,90
30	87,38	18,36	0,60	0,53	0,49	0,07	7,60	0,22	90,33	55,93

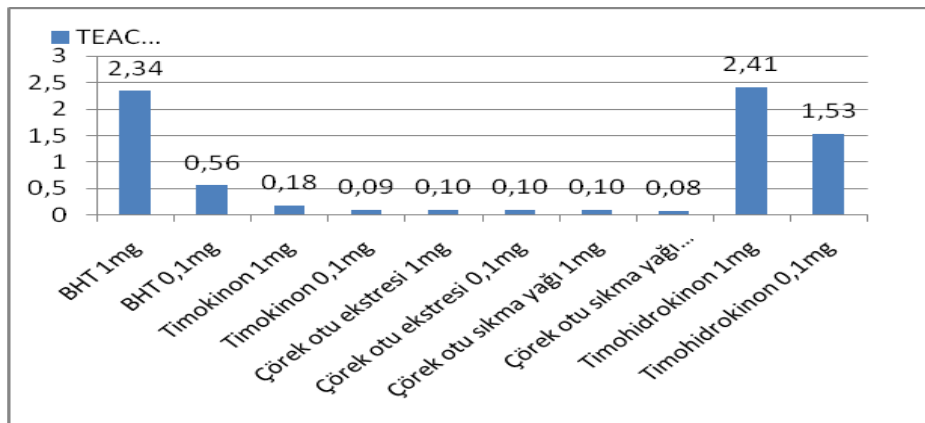
Çizelge 12'deki sonuçlarda görüldüğü gibi başlangıçta BHT 1 mg.mL⁻¹'lik konsantrasyonunda % 15 inhibe ederken timohidrokinonun 0,1 mg.mL⁻¹'lik konsantrasyonu BHT den yaklaşık 3 kat fazla inhibisyon göstererek % 45 lik bir inhibisyon sağlamıştır. Timohidrokinonun 1 mg.mL⁻¹'lik konsantrasyonu 0. dakikada ABTS serbest radikalini % 85'ni inhibe ederek aynı konsantrasyondaki BHT nin yaptığı inhibisyondan yaklaşık 5 kat fazla bir inhibisyon göstermiştir. BHT benzer etkiyi ancak 30 dk sonunda göstermiştir. Diğer denenen ekstre ve sıkma yöntemi ile elde edilen sabit yağ bu konsantrasyonlarda etkili bulunmamıştır.



Şekil 13. ABTS Serbest Radikalinin % İnhibisyon Grafiği

Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite [TEAK] sonuçlarının bulunması için ABTS radikali Troloks'un 3 mM (miliMolar), 2 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.5 mM ve 0.1mM lık konsantrasyonları kullanılarak % inhibisyon değerlerine bağlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve denenen numunelerin % inhibisyonları kalibrasyon denkleminde bulunmuştur.

Buna göre 30 dakika sonunda BHT 2.34 mM lık Troloks'a eşdeğer bir antioksidan aktivite gösterirken timohidrokinon 2.41 mM lık TEAK göstermiştir. Timohidrokinonun 0.1 mg lık konsantrasyonu 1.53 mM TEAK aktivite gösterirken BHT 0.56 mM da TEAK aktivitesi göstermiştir. Denenen diğer ekstre sıkma yöntemi ile elde edilen sabit yağ ve timokinin benzer aktivite göstermemiştir.



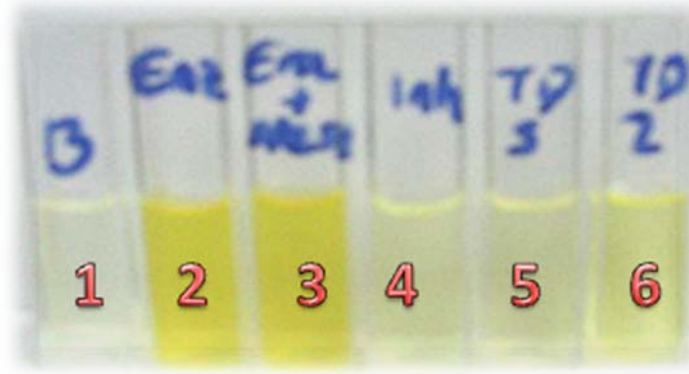
Şekil 14. Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasite [(TEAK) (mM)]

Asetilkolinesteraz ve Bütilkolinesteraz Enzim İnhibisyon Sonuçları

Ellman ve ark. (1961) ile Rahman ve ark. (2001) metodları baz alınarak inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart inhibitörlerle birlikte **Çizelge 13**'te IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) olarak verilmiştir.

Çizelge 13. Enzim İnhibisyon Sonuçları IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Test numuneleri	AChE	BuChE
Timokinon	58.4 ± 0.3	22.4 ± 7.4
Timohidrokinon	5.96 ± 0.68	34.8 ± 0.8
Eserin	$1.6 \times 10^{-4} \pm 0.4 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2}$
Gаланthamin	0.255 ± 0.005	8.1 ± 2.3
Donepezil	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.4 \times 10^{-2}$	4 ± 0.24



Şekil 15. Timokinonun Asetilkolinesteraz Aktivite Sonucu

[1. Kör, 2. Enzim 3. Enzim + MeOH, 4. Standart inhibitör, 5. Timokinon (5 mg.mL^{-1}), 6. Timokinon (2 mg.L^{-1})]

SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan kaynak taramaları sonucunda timokinon ile ilgili herhangi bir mikrobiyal transformasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu amaçla önce çörek otu tohum ekstrelerinden elde ettiğimiz timokinon ile daha sonra ticari olarak piyasada bulunan aynı substrat ile 35 farklı mikroorganizmanın biyotransformasyonu araştırılmış (bkz. **Çizelge 4**), oluşan metabolitler önce ince tabaka kromatografisi yöntemiyle izlenmiştir. Daha sonra metabolitlerin tanımlanabilmesi için gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi sistemlerinden elde edilen veriler çeşitli kaynaklarla karşılaştırılmıştır.

Timokinonun *Aspergillus niger* ATCC 10549 ile biyotransformasyon sonucu **Çizelge 8**'de listelendiği üzere toplam 6 metabolit oluştuğu belirlenmiş ve oluşan metabolitlerden timohidrokinonun kimyasal yapısının tanımlanması mümkün olmuştur. Diğer metabolitlerin 4-hidroksi-5-izopropil-2-metilsikloheksa-2-dienon veya 4-hidroksi-6-izopropil-3metil-sikloheksa-2-dienon olabileceği tahmin edilmektedir. Bu metabolitlerin saf olarak izolasyonu mümkün olmadığı için sadece kütle spektrumu **Şekil 8**'de verilmiştir.

Timokinonun mikrobiyal transformasyonu sonucu timohidrokinona dönüştüren 23 mikroorganizmadan *A. parasiticus* (NRRLY 2999) ile preparatif biyotransformasyon çalışması yapılmıştır. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılacak timohidrokinon kromatografik olarak saflaştırılıp KS, ^1H ve ^{13}C -NMR spektroskopisi verileri kaynaklardaki veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür (İvankoviç ve ark., 2006) (bkz. **Şekil 9-11**).

Timokinon ile ilgili mikrobiyal transformasyon çalışması olmamakla birlikte, enzimatik olmayan fizyolojik koşullarda indirgenmesi ile ilgili bir çalışma yayınlanmıştır (Khalife ve Lupidi, 2007).

Substrat ve timohidrokinon metaboliti, timokinon bitkisel kaynakları ile birlikte ilgili standartlarla karşılaştırmalı olarak biyolojik aktiviteleri çalışılmıştır. **Çizelge 9** ve **10**'daki test numulerinin antimikrobiyal aktivitelerine bakıldığında timohidrokinonun, *Bacillus cereus* NRRL B-3711 ve *Staphylococcus aureus*, MRSA bakterilerine karşı $62.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de en etkili olduğu, ayrıca *C. albicans*

(250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. glabrata* (125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ve *C. krusei* (125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) türlerine karşı ise, substratı timokinona göre daha güçlü antikandidal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışma içerisinde elde edilen değerler literatür çalışmaları ile de uyum göstermektedir (Toama ve ark., 1974; Akhtar ve ark., 2007).

Çörek otu ile ilgili yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında daha önce yayınlanmış kaynaklar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Houghton ve ark., 1995; Burits ve Bucar., 2000; Badary ve ark., 2003; Singh ve ark. 2005; Gali Muhtasib ve ark., 2006b; Khalife ve Lupidi, 2007). Timokinon dan türevlenen timohidrokinonun yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş, (DPPH) radikal süpürücü etkisi ($\text{IC}_{50}=0.012 \pm 0.002 \text{ mg.mL}^{-1}$) kullanılan standart, BHT den daha etkili ($\text{IC}_{50} = 0.024 \pm 0.002 \text{ mg.mL}^{-1}$) olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar ABTS serbest radikaline karşı da elde edilmiştir.

Alzheimer hastalığının kesin nedeni bilinmemesine rağmen, kolinerjik eksiklik sebebiyle asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan yöntemdir. Bu amaca yönelik olarak günümüzde en fazla kolinesteraz enzim inhibitörleri denenmekte ve yararlanılmaktadır (Şahin, 2002; Çokuğraş, 2003). Yapılan literatür araştırmasında timokinon ve timohidrokinon ile ilgili asetilkolinesteraz aktivite çalışması olmasına rağmen butirilkolinesteraz aktivite çalışmasına rastlanılmamıştır. İlk kez bu tez kapsamında timokinon ($\text{IC}_{50}=22.4 \pm 7.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve timohidrokinonun ($\text{IC}_{50}= 34.8 \pm 0.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) butirilkolinesteraz aktivite çalışmasına bakılmıştır ve timohidrokinonun asetilkolinesteraz enzimi üzerine ($\text{IC}_{50}= 5.96 \pm 0.68 \mu\text{g.mL}^{-1}$) etkili bir inhibitör olduğu bulunmuştur. Timokinonun ($\text{IC}_{50} = 0.14 \text{ mg.L}^{-1}$) ve timohidrokinonun ($\text{IC}_{50}= 0.04 \text{ mg.mL}^{-1}$) asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkili bir inhibitör olduğu yapılan diğer çalışmayla da uyumluluk göstermiştir (Jukic ve ark., 2007).

KAYNAKLAR

- Adams, A., Demyttenaere, J. C.R., Kimpe, N.D., Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* investigation of the culture conditions. Food. Chem., 80, 525–534, (2003).
- Akgül, A., Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 15, Ankara, 1993.
- Akhtar, N., Alakloby O.M., Aljabre, S.H.M, Alqurashi, A.R.M., Randhawa M.A., Comparison of antifungal activity of thymoquinone and amphotericin b against *Fusarium solani* in vitro, Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences), 8 (2) ,1428H (2007).
- Al-Awadi, F., Shoukry, M., The lipid lowering effect of an anti-diabetic plant extract, Acta diabetol. lat. 25,1 (1988).
- Al-Elyani, R.A.A., Protective effect of honey with *Nigella sativa* mixture, and the Ginger on the enoxaparin sodium (Anticoagulant Drug) hepatotoxicity of albino rats, J. Sci. Med. Eng., 20 (1), 39-48 (2008).
- Al-Enazi, M.M., Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice, Pak. J. Biol. Sci, 10 (18), 3115-3119 (2007).
- Al-Jabre, S., Al-Akloby, O.M., Al-Qurashi A.R., Akhtar, N., Al-Dossary, A. Randhawa, M.A., Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger* , Pakistan J. Med. Res, 42 (3), 102-104 (2003).
- Ali, B.H., Blunden, G., Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, Phytother. Res., 17, 299-305 (2003).
- Alsaif, M.A., Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in wistar rats, J. Med. Sci., 7 (7), 1164-1170 (2007).
- Badary, O.A., Taha, R.A., El-Din, A.M.G., Abdel-Wahab, M.H., Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, Drug Chem. Toxicol., 26 (2), 87-98 (2003).
- Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 359 (1999).
- Burits, M., and Bucar, F., Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, Phytother. Res. 14, 323–328 (2000).
- Buckingham, J., Dictionary of Natural Products on DVD, Chapman & Hall, London, 2009
- Çokuğraş, A.N., Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance Turk. J. Biochem, 28 (2), 54-61(2003).
- Daba, M.H., Abdel-Rahman M.S., Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes, Toxicol. Lett., 95, 23–29 (1998).
- Demirci, F., Berber, H., İşcan, G., Biyokatalizörler yardımıyla *p*-simen’den timokinon ve benzeri biyoaktif metabolitlerin üretimi, TÜBİTAK-TBAG 106T117, (2006-2008).

- Demirci, F., Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2000).
- Demyttenaere, J.C.R., Herrera, M.C., Kimpe, N.D., Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp., *Phytochemistry* 55, 363-373 (2000).
- El-Tahir, K.E.D.H., Bakeet, D.M., The blackseed *Nigella sativa* Linnaeus-a mine for multicures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil, *J.T.U. Med. Sc.*, 1 (1), 1-19 (2006).
- El Mezayen, R., El Gazzar, M., Nicolls M.R., Marecki, J.C., Dreskin, S.C., Nomiyama, H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation, *Immunol. Lett.*, 106, 72–81 (2006).
- Ellman Gl., Courtney Kd., Anders V., Featherstone RM.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95, (1961).
- Fararh, K.M., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., Ghanem, M.M., Takewaki, T Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters, *Res. Vet. Sci.*, 79 219–223 (2005).
- Farooq A., Tahara, S., Choudhary, M.I., Rahman, A., Başer, K.H.C., Demirci, F. Microbial oxidation of (-)- α -pinene by *Botrytis cinerea*, *Z. Naturforsch. C*, 57, 686-690 (2002).
- Gali-Muhtasib, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R., Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources, *Int. J. Biochem. Cell B.*, 38, 1249–1253 (2006a).
- Gali-Muhtasib, H.U., El-Najjar, N. Schneider-Stock R., The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components, in: new trends in research Strategies on Lead Molecules from Natural Products, M.T. Khan (Eds) Elsevier Publishers, 133-153, (2006b).
- Garcia, C., Rodriguez, Paula., Dias, E., Heinzen, H., Menendez, M.P., Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*, *J. Mol. Catal. B-Enzy.*, 59, 173–176 (2009).
- Ghosheh, O.A., Houdi, A.A, Crooks, P.A., High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 19, 757-762 (1999).
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Jafarabadi, H., Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug, *Phytother. Res.*, 18, 195-199 (2004).
- Halawani, E., Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics, *Advan. Biol. Res.*, 3 (5-6), 148-152, (2009).

Hawsawi, Z.A., Ali B. A., Bamosa, A.O., Effect of *Nigella sativa* (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats, *Annals of Saudi Medicine* 21, 3-4, (2001).

Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds in mice, *Phytomedicine* 11, 56-64 (2004).

Houcher, Z., Boudiaf, K., Benboubetra, M., Houcher, B., Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats, *Pteridines*, 18, 8-18 (2007).

Houjin, L., Wenjian, L., Chuanghua, C., Yipin, Z., Yongcheng, L. Biotransformation of limonene by marine bacteria, *Chin. J. Anal. Chem.*, 34 (7) 946-950 (2006).

Houghton, P.J., Zarka, R., De las Heras, B., Hoult, J.R., Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation, *Planta Med.*, 61, 33-36 (1995).

http-1: <http://www.acccorporation.com/CHM0008068.aspx> (19.01.2010).

http-2: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog> (19.01.2010).

http-3: <http://www.napralert.org/> (19.01.2010).

İşcan, G., Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eskişehir, Türkiye (2009).

Ivankovic, S., Stojkovic, R., Jukic, M., Milos, M., Milos, M., Jurin, M., The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone *in vitro* and *in vivo*, *Exp. Oncol.*, 28 (3), 220-224 (2006).

İşbakan, N., Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-fenil-1 Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2006).

Jukic, M., Politeo, O., Maksimović, M., Milos, M., Milos, M., In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone, *Phytother. Res.* 21, 259-261 (2007).

Karcı, A., Bitkisel Kökenli Bazı Uçucu Yağların Kıрма Un Biti, *Tribolium confusum* duval, (Col.: Tenebrionidae)'un Tüm Gelişme Dönemlerine Karşı Fumigant Etkisi, Yüksek lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye (2006).

Khader, M., Bresgen, N., Eckl, P.M., In vitro toxicological properties of thymoquinone, *Food. Chem. Toxicol.*, 47, 129-133 (2009).

Khalife, K.H., Lupidi, G., Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions, *Free Radical Res.*, 41 (2), 153-161 (2007).

Khan, M.A., Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn., *Int. Immunopharmacol.*, 1 (7), 15-35 (1999).

Kıralan, M. Ayçiçek yağının oksidatif stabilitesi üzerine ısırgan (*Urtica dioica*), keten (*Linum usitassium*), kişniş (*Coriandrum sativum*) ve çörekotu (*Nigella sativa*) tohum ekstraktlarının etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2006).

Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSU. J. Sci Eng., 9 (1) (2006).

Kırimer, N., Demirci, F., Başer, K.H.C., Monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu, (K.H.C.Başer ve N.Kırimer), 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Mayıs 29-31, Eskişehir, (2002).

Mansour, M.A., Ginawi, O.T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A.S., Al-Shabanah, O.A., Al-Sawaf, H.A., Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone, Res Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 110, 239-251 (2001).

Mirata, M.A., Wüst, M., Mosandl, A., Schrader, J., Fungal biotransformation of (±)-linalool, J. Agr. Food. Chem., 56, 3287–3296 (2008).

Miyazawa, M., Andoa, H., Okunoa, Y., Araki, H., Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst, J. Mol. Catal. B-Enzym., 27, 91–95, (2004).

Nickavar, B., Mojaba, F., Javidniab, K. and Amolia, M.A.R., Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran, Z. Naturforsch., 58c, 629-631 (2003).

Pagola, S., Benavente, A., Raschi, A., Romano, E., Molina, M.A.A., Stephens, P.W., Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution x-ray powder diffraction, AAPS Pharm. Sci. Tech., 5 (2), Article 28 (2004).

Papandreou, M.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P Margarity, M., Lamari, F.N., Inhibitory activity on amyloid-β-aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents, J. Agric. Food Chem., 54, 8762-8768 (2006).

Pari, L., Sankaranarayanan, C., Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats, Life Sci., 85 830–834,(2009).

Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C. A., Correia dos Santos, M. M., Robalo, M. P., Martins, L.O., Enzymatic biotransformation of the azo dye sudan orange G with bacterial Cot A-laccase, J. Biotechnol., 139, 68–77, (2009).

Rahman, A., Parveen, S., Khalid, A., Farooq, A., Choudhary, M. I., Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa* Phytochemistry, 58, 963-968 (2001).

Ramadan, M.F., Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview, Int. J. Food Sci. Tech., 42, 1208-1218 (2007).

Salem, M.L., Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed Int. Immunopharmacol., 5, 1749-1770 (2005).

Sarker, S.D., Latif, Z., Gray A.I. (Eds), Natural Product Isolation, 2nd edition Methods in Biotechnology Vol. 20, Humana Press, Totowa, (2006).

Şahin, H.A., Asetilkolin, kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı, Demans Dergisi, 2, 69-73 (2002).

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C.S., Catalan C., Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds, J. Sci. Food. Agric., 85, 2297-306 (2005).

Sun, X.H., Man, F., Pang L.Y., Gao, G.H., Li, X.Q., Qi, X.L., Li, F.M., Fungal biotransformation of mosapride by *Cunninghamella elegans*, J. Mol. Catal. B-Enzym., 59, 82–89 (2009).

Sharma, M., Shubert, D.E, Sharma, M., Lewis, J., McGarrigle, B.P., Bofinger, D.P., Olson, J. R., Biotransformation of tamoxifen in a human endometrial explant culture model, Chem-Biol Interact., 146, 237–249, (2003)

Toama, M.A., El-Alfy, T.S. and El-Fatetry, H.M., Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linneaus seeds, Antimicrob. Agents and Ch., 6 (2), 225-226 (1974).

Toniazzo, G., Oliveira, D.D., Dariva, C., Oestreicher, E.G. and Antunes, O.A.C. Biotransformation of (-)- β -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642, Appl. Biochem. Biotech, 121–124 (2005).

Yıldız, F., Çoban, S., Terzi, A., Ateş, M., Aksoy N., Çakır H., Ocak, A.R., Bitiren, M., *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver World J. Gastroenterol., 7, 14 (33), 5204-5209 (2008).

Xu, P., Hua, D., Ma, C., Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production, Trends. Biotechnol., 25 (12), 571-576 (2007).