

**BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN MİKROBİYAL
ve
ENZİMATİK TRANSFORMASYONU
Doktora Tezi**

Damla KIRCI

Eskişehir 2022

**BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN MİKROBİYAL
ve
ENZİMATİK TRANSFORMASYONU**

Damla KIRCI

DOKTORA TEZİ
Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Betül DEMİRCİ

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Aralık 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1901S001 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Damla KIRCI'nın "Bazı Polifenolik Bileşiklerin Mikrobiyal ve Enzimatik Transformasyonu" başlıklı tezi 07/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı- Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez danışmanı):	Prof. Dr. Betül DEMİRCİ
Üye	: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Üye	: Prof. Dr. Gökalg İŞCAN
Üye	: Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ
Üye	: Prof. Dr. Tamer AKAR

Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi
Enstitü Müdürü

ÖZET

BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN MİKROBİYAL ve ENZİMATİK TRANSFORMASYONU

Damla KIRCI

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2022

Danışman: Prof. Dr. Betül DEMİRCİ

Tezin temel amacı, polifenolik yapıdaki hesperidin ve kersetin bileşiklerinin mikroorganizmalar ve enzim kullanılarak transformasyonudur. Bu bileşiklerinden hareketle klasik kimyasal yöntemlerle sentezlenmesi zor veya imkansız olan bileşiklerin biyotransformasyon yoluyla katma değerli metabolitlere dönüştürülmesi amaçlanmaktadır.

Tez kapsamında hesperidin ve kersetin 25 farklı mikroorganizma ve lakkaz enzimi kullanılarak mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmalarına tabi tutuldu.

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda kersetin’de altı, hesperidin’de sekiz metabolit tespit edildi. Kersetin’in mikrobiyal transformasyonu ile resveratrol, izoramnetin ve protokateşik asit olan üç metabolitin yapısı SK/KS-KS ile aydınlatıldı. Kersetin’in lakkaz ile enzimatik transformasyonundan iki metabolit izole edilip NMR ve kütle spektrumu ile yapıları 2-(3,4-dimetoksifenil)-3,5-dihidroksi-7-metoksi-kroman-4-on (M5) ve 3-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-7-metoksi-5-metil-kroman-4-on (M6) olarak aydınlatıldı. Resveratrol ve izoramnetin ilk kez kersetin’in mikrobiyal transformasyonu ile elde edilirken; M5 ve M6 metabolitleri yeni bileşik olarak tanımlandı.

Hesperidin’in mikrobiyal transformasyonunda pinosembrin ve naringenin’in yapısı SK/KS-KS ile aydınlatıldı. Eriodiktiyol ve hesperetin izole edilip NMR ve kütle spektrumu ile molekül yapısı tanımlandı. Pinosembrin, eriodiktiyol ve naringenin ilk kez hesperidin’in mikrobiyal transformasyonu ile elde edildi. Hesperidin’in lakkaz ile enzimatik transformasyonundan elde edilen metabolit SK/KS-KS analizi sonucunda naringenin olarak tanımlandı.

Substratların, biyotransformasyon ekstrelerinin ve metabolitlerin *in vitro* 5-lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyonu, antioksidan, antimikrobiyal ve akut toksisite aktivite çalışmaları yapıldı. Kersetin metabolitlerinden biri olan resveratrol’ün, *Salmonella typhimurium* (62.5 µg/mL) ve *Bacillus licheniformis* (62.5 µg/mL) suşlarına karşı kersetin’den daha etkili olduğu bulundu.

Hesperetin ve naringenin'in *Staphylococcus aureus* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi hesperidin'den daha yüksek bulundu. Bu sonuç doğrultusunda hesperetin ve naringenin'in *S. aureus* suşuna karşı biyofilm aktivitesi ve biyofilmde sinerji çalışmaları gerçekleştirildi. Biyofilm tabakalamada dama tahtası yöntemi ilk kez denenmiş olup metot geliştirildi. Bu iki bileşiğin sinerjik aktivite gösterdiği tespit edildi (FİKİ değeri 1.063). Brine Shrimp yöntemi ile akut toksisite çalışmasında en yüksek etki resveratrol'de bulundu.

Anahtar Sözcükler: Mikrobiyal ve enzimatik transformasyon, Hesperidin, Kersetin, Biyolojik aktivite.

ABSTRACT

MICROBIAL and ENZYMATIC TRANSFORMATION OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS

Damla KIRCI

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2022

Supervisor: Prof. Dr. Betül DEMİRÇİ

The main goal of the thesis is the transformation of hesperidin and quercetin compounds by using microorganisms and enzymes. Based on these compounds, it aims to convert compounds difficult or impossible to synthesize by classical chemical methods into value-added metabolites by biotransformation.

Within the scope of the thesis, hesperidin and quercetin are subject to microbial and enzymatic transformation studies using 25 different microorganisms and a laccase enzyme, respectively.

As a result of biotransformation studies, six metabolites were found in quercetin and eight metabolites in hesperidin. The microbial transformation of quercetin and the structure of three metabolites, resveratrol, isorhamnetin and protocatechuic acid, were elucidated by LC/MS-MS. Enzymatic transformation of quercetin via laccase was obtained to 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-chroman-4-one (M5) and 3-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-5-methyl-chroman-4-one (M6). Resveratrol, isorhamnetin, M5 and M6 metabolites were obtained for the first time by quercetin's microbial and enzymatic transformation.

The structure of pinocembrin and naringenin in the microbial transformation of hesperidin was elucidated by LC/MS-MS. Eriodictyol and hesperetin were isolated, and molecular structure was defined by NMR and mass spectrum. Pinocembrin, eriodictyol and naringenin were obtained for the first time by microbial transformation of hesperidin. The metabolite obtained from the enzymatic transformation of hesperidin with laccase was identified as naringenin due to LC/MS-MS analysis.

The biological activities of the substrates, the biotransformation extracts and the metabolites were examined in the *in vitro* 5-lipoxygenase (LOX) enzyme inhibition, antioxidant, antimicrobial, and acute toxicity activities. The antimicrobial activity of both hesperetin and naringenin against *S. aureus* is higher than hesperidin. Resveratrol, one of the

quercetin metabolites, was found to be more effective than quercetin against *Salmonella typhimurium* (62.5 µg/mL) and *Bacillus licheniformis* (62.5 µg/mL) strains.

The antimicrobial activity of hesperetin and naringenin against *Staphylococcus aureus* was higher than hesperidin. According to this result, biofilm and synergy-biofilm of hesperetin and naringenin were carried out against *S. aureus*. The checkerboard method in biofilm was done for the first time, and the technique was developed. These two compounds showed synergistic activity (FIKI value 1.063). In the acute toxicity study with the Brine Shrimp method, the highest effect was found in resveratrol.

Keywords: Microbial and enzymatic transformation, Hesperidin, Quercetin, Biological activity

ÖNSÖZ

Akademideki yolculuğuma başlamama vesile olup başladığım günden beri çalışmalarım sürecinde maddi ve manevi yardım ve desteğini eksik etmeyen, ufkumu genişletip bilimsel çalışmalarım da bana ışık tutan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Betül Demirci'ye,

Doktora sürecimin her aşamasında bana yol gösteren, sabır ve anlayışla desteğini esirgemeyen, fikirlerini ve deneyimlerini paylaşan ve çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Fatih Demirci ve Dr. Öğr. Üyesi Özge Özşen Batur'a,

Tez çalışmalarım süresince değerli bilgileriyle beni yönlendiren tez izleme komite üyeleri sayın Prof. Dr. Gökalp İşcan ve Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi'ye ve Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma,

Sayesinde tezimin en çözümsüz noktalarına çözüm bulup yoluma devam etmemi sağlayan kendisinden öğrendiklerim ile meslek hayatımda yeni bir deneyim yaşadığım güzel insan Ecz. Nagihan Faydalı'ya,

Sürecimde varlıkları ile destek olan, sürecimin daha keyifli geçmesini sağlayan en zor zamanlarımda bile yanımda olan beni yalnız bırakmayan çok değerli hocalarım Doç. Dr. A. Hakan Kurt, Doç Dr. Hacer Çoklar, Dr. Öğr. Ayşe Esra Karadağ ve çalışma arkadaşlarım Emre Oduncu, Ecz. Tuğsen Doğru, Gülsüm Bosdancı, Esengül Karahisar'a,

Tez deneylerimin bir kısmını çalışma şansı bulduğum Uppsala Üniversitesi'ndeki değerli hocam Prof. Dr. Ulf Göransson ve Quentin Laborde'a,

Süreçte öğrenmek kadar öğretmeyi de deneyimleme fırsatı bulduğum sonrasında çalışmalarına desteklerini eksik etmeyen Ecz. Nilay Doğan ve Koray Yetim'e,

Sürecime bilimsel bakış açıları ile olamasa da bana vermiş olduğu manevi destekle her zaman yanımda olan ömürlük dostuma,

Doktora çalışmalarına göstermiş olduğu maddi destekten dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve doktora eğitimim sürecinde 2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan sonsuz sevgisini ve ilgisini her zaman hissettiğim, verdikleri cesaretle ve güvenle bugünlere gelmemi sağlayan hayattaki en büyük destekçilerim olan anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

“Yapılırken heyecan duyulmayan işler başarılmaz.”

EMERSON

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Damla KIRCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Polifenolik Bileşikler	3
2.2. Kersetin.....	5
2.3. Kersetinin Biyolojik Aktivitesi	7
2.4. Hesperidin.....	15
2.5. Hesperidinin Biyolojik Aktiviteleri	16
2.6. Kersetin ve Hesperidinin Biosentez Yolağı	22
2.7. Mikrobiyal Tranformasyon	23
2.8. Enzimatik Tranformasyon.....	32
3. YÖNTEM	42
3.1. Materyal Temini	42
3.2. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.3. Deneysel çalışmada Kullanılan Cihazlar	43
3.4. Araştırma Yöntemleri	44

3.4.1. Mikrobiyal transformasyon	44
3.4.1.1. Mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışmaları	45
3.4.1.2. Mikrobiyal transformasyon preperatif ölçek çalışması	46
3.4.2. Enzimatik transformasyon	47
3.4.3. Metabolitlerin saflaştırılması.....	48
3.4.4. Metabolitlerin yapı tayini.....	48
3.4.5. Biyolojik aktivite yöntemleri	49
3.4.5.1. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivite	49
3.4.5.2. ABTS ⁺ radikal süpürücü aktivite	50
3.4.5.3. Anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları.....	50
3.4.5.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları.....	50
3.4.5.5. Biyofilm aktivite çalışması	51
3.4.5.6. Dama tahtası yöntemiyle biyofilm tabakada sinerjik aktivite	51
3.4.5.7. Brine Shrimp toksisite çalışmaları.....	52
3.4.6. İstatistiksel analiz.....	53
4. BULGULAR ve YORUM	54
4. 1. Kersetin Mikrobiyal Transformasyon Tepkimeleri	54
4.2. Kersetin Enzimatik Transformasyon Tepkimeleri.....	67
4.3. Hesperidin Mikrobiyal Transformasyon Tepkimeleri.....	78
4.4. Hesperidin Enzimatik Transformasyon Tepkimeleri	107
4.5. Biyolojik Aktivite Sonuçları.....	114
4.5.1. Antioksidan aktivite çalışmaları.....	114
4.5.2. Anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları.....	120
4.5.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	123
4.5.5. Biyofilm aktivite çalışması	125

	<u>Sayfa</u>
4.5.6. Dama tahtası yöntemi ile sinerjik aktivite çalışması	126
4.5.7. Brine Shrimp toksisite çalışmaları	126
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	129
KAYNAKÇA.....	141
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları	10
Tablo 2.2. Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları	18
Tablo 2. 3. Kersetin'in mikrobiyal transformasyon çalışmaları	28
Tablo 2.4. Hesperidin mikrobiyal transformasyon tepkimeleri	30
Tablo 2.5. Endüstride kullanılan enzimler, izole edildiği mikroorganizmalar ve kullanım alanları	34
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar.....	42
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve apareyler	43
Tablo 3.3. Mikrobiyal transformasyonda kullanılan suşlar	44
Tablo 3.4. Sıvı besiyerleri ve içerikleri.....	46
Tablo 4.1. Kersetin, M5 ve M6'ya ait ¹ H-NMR spektral bulgular	76
Tablo 4.2. Kersetin, M5 ve M6'ya ait ¹³ C-NMR spektral bulgular	77
Tablo 4. 3. Hesperidin ve M7'ye ait spektral bulgular	85
Tablo 4.4. M9'a ait spektral bulgular	95
Tablo 4.5. M10'a ait spektral bulgular.....	101
Tablo 4.6. Kersetin ve dönüşüm ekstralarının DPPH' antioksidan aktivite sonuçları	115
Tablo 4.7. Hesperidin ve dönüşüm ekstralarının DPPH' antioksidan aktivite sonuçları ..	116
Tablo 4.8. Substrat ve metabolitlerin DPPH' antioksidan aktivite sonuçları	117
Tablo 4.9. Kersetin ve dönüşüm ekstralarının ABTS ⁺ antioksidan aktivite sonuçları.....	118
Tablo 4.10. Hesperidin ve dönüşüm ekstralarının ABTS ⁺ antioksidan aktivite sonuçları	118
Tablo 4.11. Substratların ve metabolitlerin ABTS ⁺ antioksidan aktivite sonuçları	119
Tablo 4.12. Kersetin ve dönüşüm ekstralarının anti-enflamatuvar aktivite sonuçları	120
Tablo 4.13. Hesperidin ve dönüşüm ekstralarının anti-enflamatuvar aktivite sonuçları ..	121

Sayfa

Tablo 4.14. Substrat ve metabolitlerin anti-enflamatuvar aktivite sonuçları.....	122
Tablo 4.15. Substrat ve metabolitlerin MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	124
Tablo 4.16. Hesperidin, hesperetin ve naringenin MİK ve MBİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	125
Tablo 4.17. Substratların ve metabolitlerin akut toksisite sonuçları.....	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Bazı polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları	4
Şekil 2.2. Kersetin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Hesperidin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.4. Kersetin ve hesperidin'in biyosentez yolağı	23
Şekil 2. 5. Kersetin metabolitleri.....	29
Şekil 2.6. Hesperidin metabolitleri.....	32
Şekil 2.7. Flavonoitlerin enzimatik transformasyonunda kullanılan enzimler.....	36
Şekil 3.1. Mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışması.....	46
Şekil 3.2. Enzimatik transformasyon aşaması.....	48
Şekil 4.1. Kersetin mikrobiyal transformasyon mikroorganizmaları	54
Şekil 4. 2. Kersetin <i>A. flavus</i> dönüşüm ekstrelerinin ve metabolit MI (Rf: 0.54) ve M2 (Rf: 0.46) 365 nm'de İTK görüntüsü	55
Şekil 4.3. M1 metaboliti kütle spektrumu	56
Şekil 4.4. Resveratrol HRMS spektrumu	56
Şekil 4.5. Resveratrol'ün SK-SK spektrumunda parçalanma ürünleri ve <i>m/z</i> değerleri.....	57
Şekil 4.6. <i>A. flavus</i> 8. gün dönüşüm ekstresindeki resveratrol'ün HRMS spektrumu.....	58
Şekil 4.7. Resveratrol'ün (molekül ağırlığı: 228) kimyasal yapısı	58
Şekil 4. 8. Resveratrol biyosentez yolağı	59
Şekil 4.9. M2 metaboliti kütle spektrumu	60
Şekil 4.10. İzoramnetin (A) ve ramnetin (B) kütle spektrumları	61
Şekil 4.11. İzoramnetin (molekül ağırlığı: 316) kimyasal yapısı	61
Şekil 4.12. İzoramnetin'in biyosentez yolağı	62
Şekil 4.13. <i>A. flavus</i> kersetin mikrobiyal transformasyon zamana bağlı izoramnetin değişim grafiğı.....	63

Şekil 4.14. M3 kütle spektrumu	64
Şekil 4.15. M4 kütle spektrumu	65
Şekil 4.16. Protokateşik asit SK-SK spektrumunda parçalanma ürünü ve m/z değerleri....	65
Şekil 4. 17. Kersetin A. nidulans ile dönüşüm tepkimesi	66
Şekil 4. 18. Protokateşik asit (molekül ağırlığı: 154) kimyasal yapısı.....	66
Şekil 4.19. Kersetin kütle spektrumu	67
Şekil 4.20. M5 metaboliti kütle spektrumu	68
Şekil 4.21. M6 metaboliti kütle spektrumu	68
Şekil 4.22. Kersetin'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	71
Şekil 4.23. M5 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	71
Şekil 4.24. M5 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 4-8 ppm aralığı.....	72
Şekil 4.25. M6 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	73
Şekil 4.26. M6 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 4-8 ppm aralığı.....	73
Şekil 4.27. Kersetin'in $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	74
Şekil 4.28. M5 metaboliti $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	75
Şekil 4.29. M6 metaboliti $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	75
Şekil 4.30. Kersetin'in lakkaz ile enzimatik transformasyon tepkimesi	78
Şekil 4.31. Hesperidin mikrobiyal transformasyon mikroorganizmaları	78
Şekil 4.32. Hesperidin kütle spektrumu	81
Şekil 4.33. M7 metaboliti HRMS spektrumu.....	81
Şekil 4.34. Hesperidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	82
Şekil 4.35. Hesperidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 2.6-7.2 ppm aralığı	82
Şekil 4.36. M7 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	83
Şekil 4.37. Hesperidin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.....	84
Şekil 4.38. M7 metaboliti $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	84

Şekil 4.39. Hesperetin (molekül ağırlığı: 302) kimyasal yapısı	86
Şekil 4.40. Bakterilerle hesperidin mikrobiyal transformasyon 365 nm'de İTK görüntüsü	88
Şekil 4.41. Bakterilerle hesperidin mikrobiyal transformasyon 254 nm'de İTK görüntüsü	89
Şekil 4.42. M8 metaboliti kütle spektrumu	90
Şekil 4.43. Kolon fraksiyonu (Fr), Pinosembrin (Pino) ve Hesperidin (H) 254 nm ve 365nm'de İTK görüntüsü	91
Şekil 4.44. Pinosembrin'in (molekül ağırlık: 256) kimyasal yapısı.....	91
Şekil 4.45. M9 metaboliti HRMS spektrumu.....	93
Şekil 4.46. M9 metabolit ¹ H-NMR spektrumu.....	93
Şekil 4. 47. M9 metaboliti ¹³ C-NMR spektrumu	94
Şekil 4. 48. Eriodiktiyol (molekül ağırlığı: 288) kimyasal yapısı.....	96
Şekil 4.49. Pinosembrin sıçan karaciğer mikrozomları ile transformasyon yolağı.....	97
Şekil 4.50. M10 metaboliti HRMS spektrumu.....	99
Şekil 4.51. M10 metaboliti ¹ H-NMR spektrumu	99
Şekil 4.52. M10 metaboliti ¹ H-NMR spektrumunda 3-10.50 ppm aralığı.....	100
Şekil 4.53. M10 metaboliti ¹³ C-NMR spektrumu	100
Şekil 4.54. M10 metaboliti (molekül ağırlığı: 256) kimyasal yapısı.....	102
Şekil 4.55. M11 metaboliti SK/KS-KS spektrumu	102
Şekil 4.56. M11 metaboliti SK/KS-KS analizi EPI spektrumu.....	103
Şekil 4.57. M12 metaboliti kütle spektrumu	104
Şekil 4.58. M12 metaboliti SK/KS-KS analizi EPI spektrumu.....	104
Şekil 4.59. Hesperetin HRMS spektrumu	105
Şekil 4.60. Naringenin HRMS spektrumu	105
Şekil 4.61. Naringenin (molekül ağırlığı: 272) kimyasal yapısı	106
Şekil 4.62. <i>A. niger</i> dönüşüm metabolitlerinin zamana bağlı değişim grafiği	107

Şekil 4.63. M14 metaboliti SK/KS-KS kromatogramı.....	108
Şekil 4.64. M14 metaboliti kütle spektrumu	109
Şekil 4.65. M14 metaboliti EPI kütle spektrumu	109
Şekil 4.66. Naringin ve izonaringin bileşiklerinin <i>m/z</i> fragmentleri	110
Şekil 4.67. Narirutin ve Naringin kütle spektrumları.....	111
Şekil 4.68. Naringin (molekül ağırlığı: 580) kimyasal yapısı	112
Şekil 4.69. Naringin biyosentez yolağı	113
Şekil 4.70. Hesperetin SK-KS/KS spektrumu.....	114
Şekil 4.71. DPPH' antioksidan aktivitesi IC ₅₀ değerleri.....	116
Şekil 4.72. ABTS ⁺ antioksidan aktivitesi IC ₅₀ değerleri	119
Şekil 4.73. Substrat ve metabolitlerin anti-enflamatuvar aktivitesi IC ₅₀ değerleri	123
Şekil 4. 74. Emetin hidroklorür toksik etkisi	127
Şekil 5.1. Kersetin'in <i>A. niger</i> ile ikinci dönüşüm tepkimesi	129
Şekil 5.2. Kersetin'in <i>A. niger</i> ile dönüşüm tepkimesi	130
Şekil 5.3. Kersetin'in <i>A. nidulans</i> ile dönüşüm tepkimesi.....	131
Şekil 5.4. Kersetin'in lakkaz ile M5 metabolitine dönüşüm tepkimesi	132
Şekil 5.5. Kersetin'in lakkaz ile M6 metabolitine dönüşüm tepkimesi	132
Şekil 5.6. Hesperidin'in farklı suşlar ile mikrobiyal dönüşüm tepkimesi.....	133
Şekil 5.7. Hesperidin'in <i>A. altarnata</i> ile dönüşüm tepkimesi.....	134
Şekil 5.8. Hesperidin'in <i>A. altarnata</i> ile Eriodiktiyole dönüşüm tepkimesi.....	135
Şekil 5.9. Hesperidin'in <i>A. niger</i> ile dönüşüm tepkimesi	136
Şekil 5.10. Kersetin biyodönüşüm çalışmaları sonucu elde edilen metabolitler.....	138
Şekil 5.11. Hesperidin biyodönüşüm çalışmaları sonucu elde edilen metabolitler.....	139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2-Azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)
AMPK	: Aktive edici protein kinaz
°C	: Santigrad derece
CDCl ₃	: Dötero kloroform
CRP	: C-reaktif protein
CO ₂	: Karbondioksit
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
¹³ C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
d	: Dublet
DEPT	: Polarizasyon transferi ile distorsiyonsuz iyileştirme spektroskopisi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EtOH	: Etil alkol
EtOAc	: Etil asetat
eV	: Elektron volt
GİS	: Gastrointestinal system
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
¹ H-NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopi
Hz	: Hertz

IC ₅₀	: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
IFN- γ	: Interferon gama
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
<i>J</i>	: Bağlantı büyüklükleri
LC ₅₀	: Yarı maksimal letal konsantrasyonu
LOX	: Lipoksigenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
m	: Multiplet
MeOH	: Metil alkol
MHA	: Mueller Hinton agar (katı) besiyeri
MHB	: Mueller Hinton broth (sıvı) besiyeri
μ L	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
m/z	: Kütle/yük
Na ₂ HCO ₃	: Sodyum bikarbonat
Na ₂ SO ₄	: Sodyum sülfat
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
NMR	: Nükleer Magnetik Rezonans
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
g	: Gram

PEPCK	: Fosfoenolpiruvat karboksikinaz
PGE2	: Prostaglandin E2
ppm	: Bir litre çözültide çözünen bileşimin miligram cinsinden değeri (mg/L)
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Singlet
SK/KS-KS	: Sıvı Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi-Kütle Spektrometresi
t	: Triplet
TC	: Total kolesterol
THF	: Tetrahydrofuran
TG	: Tiroglobulin
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
TMS	: Tetrametilsilan
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Polifenolik bileşikler, doğada 8000'den fazla çeşidi bulunan, bitkilerde önemli fizyolojik ve morfolojik etkilere sahip sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler temelde bir veya daha çok hidroksil grubu taşıyan bir aromatik halkaya sahiptirler. Monosakkarit, disakkarit gibi şeker gruplarına bağlı halde bulunabilmektedirler (Balasundram vd., 2006; Popa vd., 2008). Polifenoller, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapılara göre birkaç sınıfa ayrılır. Polifenollerin ana grupları: flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilben ve ligandlardır (D'Archivio vd., 2007). Bu bileşikler şikimat ve asetat yolağı olarak adlandırılan iki farklı yoldan sentezlenmektedir (Bravo vd., 1998).

Çok fazla bileşiğı içinde barındıran büyük bir grup olmalarının yanı sıra sahip oldukları biyolojik aktivitelerinden dolayı da önem arz etmektedirler. Ateroskleroz, beyin disfonksiyon bozukluğu, mikrobiyolojik hastalıklar, enflamasyon, kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde de kullanılmalarını destekleyen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır (Naczki vd., 2006; Pinelo vd., 2005; Ignat vd., 2011; Popa vd., 2008).

Mikrobiyal transformasyon, mikroorganizmanın, hücre ve izole enzimlerin katalizörlüğü ile *in vivo* şartlarda hücreye giren yabancı maddeleri enzimler yardımıyla zararsız (detoksifikasyon) hale getirilmesi ya da farmakolojik etkilerinden dolayı kullanılan bileşiklerin etkinliğini arttırmak amacıyla gerçekleştirilen doğal kimyasal dönüşümlerdir. Mikrobiyal transformasyon, geniş çeşitliliğe sahip biyoteknolojik tepkimeler olup en önemli özelliklerinden birisi sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek tepkimelere de olanak sağlamasıdır (Zafar vd., 2016). Gıda, ilaç ve koku alanlarında yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmaları gün geçtikçe artış göstermektedir.

Mikrobiyal ve enzimatik transformasyon, polifenolik bileşiklerin de içinde bulunduğu, biyolojik aktivitesi bilinen doğal bileşiklerin yapısal değişimi ve bu değişim sonucu oluşan yeni metabolitlerin biyodönüşümünde etkili bir yöntemdir (Wang vd., 2010).

Bu gelişmelerden hareketle tez çalışmaları kapsamında henüz üzerinde pek az mikrobiyal transformasyon araştırması yapılmış polifenolik yapıda olan kersetin ve hesperidin kullanıldı. Bu bileşikler özellikle bitkisel gıda atığı olarak *Citrus* meyvelerinde içeriğinde bulunmaktadır. Ayrıca göstermiş oldukları güçlü biyolojik aktivitelerinden dolayı da gıda takviyesi olarak kullanım alanları da bulunmaktadır. Bu özelliklerinden hareketle doğada daha nadir bulunan veya bitkiler tarafından daha önce üretimi olmayan bileşiklerin eldesi amaçlanmakta olup elde edilen metabolitlerin aktiviteleri kanıtlanmış olan

substratlarla biyolojik etkileri karşılaştırılması hedeflendi. Bu şekilde literatüre ilaç adayı bileşiklerden hareketle potansiyel yeni bileşiklerin kazandırılması amaçlandı.

Tez kapsamında öncelikle 25 farklı mikroorganizma ve lakkaz kullanılarak substratları biyotransformasyona uğratan mikroorganizmalar ve enzimatik dönüşümler tespit edildi. Sonrasında belirlenen mikroorganizmalar ve enzimle hesperidin ve kersetin'in biyodönüşümü preparatif ölçekte çalışıldı. Oluşan metabolitlerin izolasyon ve saflaştırılma işlemleri kolon kromatografisi (KK), preparatif İTK ve orta performanslı sıvı kromatografisi (OPSK) yöntemleri ile gerçekleştirildi.

Metabolitlerin yapılarının tayininde sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (SK-KS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleri kullanıldı. Substratların, dönüşüm ekstrelerinin ve miktarı yeterli olan metabolitlerin biyolojik aktiviteleri *in-vitro* antioksidan ve 5-lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyon deneyleri ile değerlendirildi. Substratlar ve metabolitler için antimikrobiyal aktivite çalışmaları ve *in vivo* hayvan alternatifi Brine Shrimp yöntemi ile akut toksisite çalışmaları gerçekleştirildi.

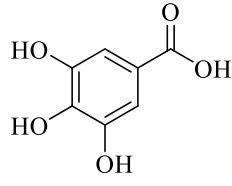
Antimikrobiyal aktivite sonucunda *Staphylococcus aureus* suşuna karşı hesperidin ve metabolitleri naringenin ve hesperetin'in aktivitelerinin yüksek çıkması biyofilm çalışmalarına yapılmasında etkili oldu. Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylere bağlı, kendi kendine sentezlenen polimerik matrislerle çevrili multimikrobiyal topluluklardır (Miquel vd., 2016). Oluşturmuş olduğu matris yapısından dolayı antibiyotikler mikroorganizmalara ulaşım etki gösterememektedir. Bu yüzden biyofilm çalışmalarda gözlemlenen etki oldukça büyük bir öneme sahiptir. Biyofilm aktivite sonuçları aktif bulunan hesperetin ve naringenin metabolitlerinin birlikte biyofilm çalışmalarına nasıl bir etkisi olacağını araştırmak için metot geliştirildi. Bu metot ile literatürde ilk defa biyofilm tabakada sinerjik aktivite çalışmasında iki metabolitin birbirine karşı göstermiş oldukları sinerjik etkisi araştırıldı.

2. KAYNAK BİLGİSİ

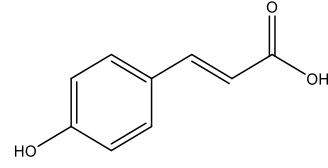
2.1. Polifenolik Bileşikler

Sekonder metabolitlerden polifenolik bileşikler, doğada özellikle bitkilerde 8000'den fazla çeşidi bulunmakta olup farmakolojik etkilerinden dolayı önemli bir yere sahiptir (Balasundram vd., 2006; Popa vd., 2008). Polifenolik bileşikler yapılarında buldukları fenol halkalarına ve bu halkaları birbirine bağlama şekillerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıflandırma fenolik asitler, flavonoidler, stilben, tanenler ve ligand şeklindedir (D'Archivio vd., 2007). Polifenolik bileşikler yapılarında aromatik halkaya bağlı bir veya daha çok hidroksil grubuna sahiptirler. Ayrıca yapılarında monosakkarit, disakkarit gibi şeker grupları içeren formları da bulunmaktadır. Kimyasal yapıları fenolik asitler gibi çok basit formda olabileceği gibi tanenler gibi çok kompleks formlarda da bulunabilmektedirler. (Balasundram vd., 2006; Popa vd., 2008). Polifenolik bileşiklerin büyük bir çoğunluğunu flavonoidler, tanenler ve fenolik asitler gruplarında yer almaktadırlar (Martinez-Gonzalez vd., 2017). Bu bileşiklerden bazılarının kimyasal yapıları Şekil 2.1'de yer almaktadır. Genellikle polifenolik bileşikler soya, keten tohumu, meyveler, sebzeler, tahıllar, çay, çikolata ve diğer tohumlarda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Hameed vd., 2020). Bu bileşikler şikimik ve asetat biyosentez yollarını kullanarak sentezlenmektedir (Bravo, 1998).

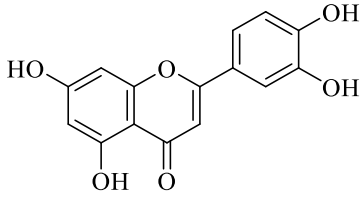
Polifenolik bileşikler özellikle sahip oldukları fitoaleksinin, antifeedant, antioksidan, kardiyoprotektif biyolojik aktivitelerinden dolayı büyük bir öneme sahiptir. Bu etkilerine ek olarak beyin disfonksiyon bozukluğunda, aterosklerozda, antimikrobiyal hastalıklar ve enflamasyon kaynaklı hastalıklar olmak üzere birçok hastalığa karşı etkili oldukları yapılan *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda östrojenik açıdan potansiyel etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir. Farmakolojik etkilerinin yanı sıra göstermiş oldukları UV ışınlarına karşı koruyucu özellikleri, polinatörler için cezbedici olmaları ve renk verici boyar madde olarak kullanılmaları gibi birçok farklı kullanım alanları bulunmaktadır (Ignat vd., 2011; Naczki ve Shahidi, 2006; Pinelo vd., 2005; Popa vd., 2008; Riobo Servan, 2013, Seo vd., 2011, Wu vd., 2014).



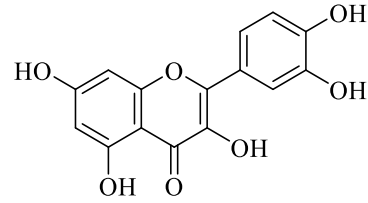
Gallik asit



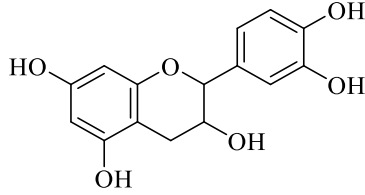
p-Kumarik asit



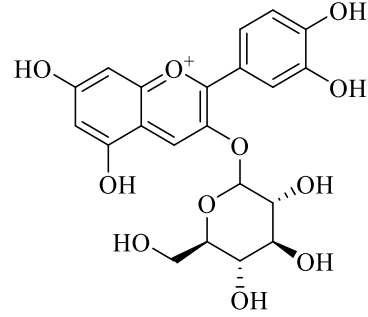
Luteolin



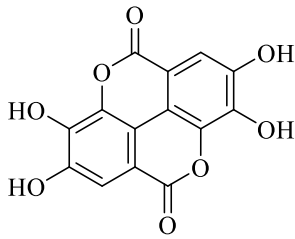
Kersetin



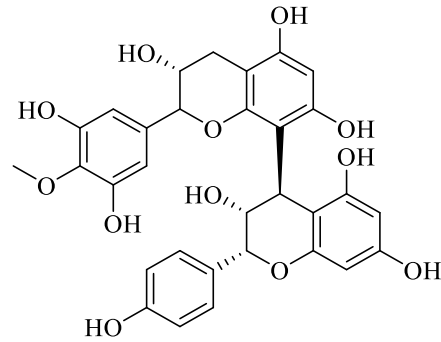
(-)-Epikatesin



Siyanidin-3-O-glikozit



Elajik asit



Proantosiyanidin

Şekil 2.1. Bazı polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları

- Flavonoitler

Flavonoitler, birçok bitkinin farklı kısımlarında meydana gelen doğal kaynaklı polifenolik yapıda sekonder metabolitlerdir. Genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, tohum, gövde veya kök vakuollerinde glikozit formunda bulunmaktadır. 7000'den fazla flavonoit

bileşiği tanımlanmış olup flavon çekirdek (2-fenil-kromon (C6-C3-C6)) iskeletine sahiptirler. Heterosiklik halkalardaki yapısal farklılıklar nedeniyle flavonoidler flavonoller, flavonlar, antosiyanidinler, flavanonlar, flavanoller, kalkonlar ve izoflavonlar dahil olmak üzere farklı alt gruplarda bulunmaktadır (Gong vd., 2020; Hameed vd., 2020). Flavonoidlerin metillenmiş formları (metoksiflavonoid) *Primula* L., *Aesculus* L., *Pityrogramma* Link ve *Notholaena* R.Br. cinslerinin filiz, dal, yaprak mum veya farinozlarında glikozit olarak bulunmaktadır. İzoflavonoidler soya fasulyesi ve yonca gibi Fabaceae familyasında yer alan bitkilerde mevcuttur (Seo vd., 2011).

Polifenolik yapıda olmalarına rağmen yapılarındaki farklılıklardan dolayı flavonoidlerin biyolojik aktivitelerinde çeşitlilik gözlemlenmektedir. Flavonoidler biyolojik aktiviteleri açısından özellikle kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları, kronik hastalıklar ve kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu kullanımlarının yanında flavonoid yapısındaki bileşikler antimikrobiyal, antioksidan, antiviral, anti-platelet, anti-iskemi, anti-enflamatuvar, anti-tümör, antialerjen ve radikal süpürücü aktiviteye de sahiptirler. Biyolojik aktiviteleri ve çeşitli uygulama alanlarından dolayı gün geçtikçe bu bileşiklere duyulan ilgi artmaktadır (Hameed vd., 2020; Seo vd., 2011).

Flavonoidlerin sentezi bitkilerde fenilpropanoid yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. Biosentez süreci fenil alaninin fenil alanin liyaz enzimi aracılığıyla sinamik aside dönüşmesi ile başlamaktadır (Seo vd., 2011). Flavonoidler genellikle glikozidik bağlarla şeker gruplarına bağlanmaktadır. Suda çözünen şeker grupları bulduran glikozit formları, düşük farmakolojik aktivitelere sahiptir ve gastrointestinal sistemde (GİS) absorbe edilmeleri zordur. Bu durum flavonoidlerin vücutta biyoyararlanımının düşük olmasına neden olmaktadır (Men vd., 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çoğu flavonoidin enzimatik bozunma, hidroliz, indirgeme, dehidroksilasyon ve diğer tepkimeler yoluyla bağırsak mikrobiyotası tarafından basit fenolik asitlere dönüştürölüp absorbe edildiğinde biyoyararlanımının arttığını göstermektedir (Men vd., 2015).

Bağırsak mikrobiyotası, makromolekül yapısındaki flavonoidleri O-glikozilasyon ve C-glikozilasyon yoluyla indirgemekle birlikte flavonoidlerin aglikon kısımlarındaki aromatik halkayı parçalayarak hidroksile edilmiş bir floroglukinol formu ve fenilasetat veya fenilpropionat üretmektedirler (Men vd., 2015).

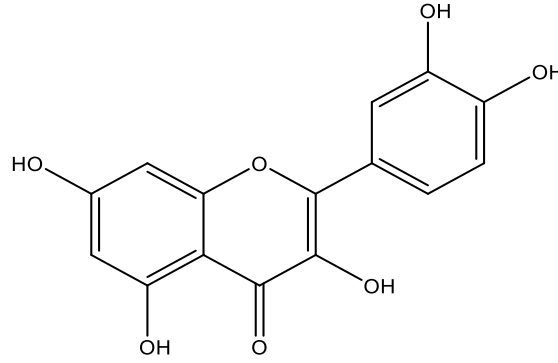
2.2. Kersetin

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) flavonol yapısında olan bir flavonoid türevidir. Kersetin sarı renkli olup yapısında şeker grubu içermeyen aglikon formundadır.

Kersetin'in kimyasal formülü Şekil 2.2'de yer almaktadır. Soğan kabuğu, elma kabuğu, turp yaprakları, karabuğday, fındık, çay, şarap gibi ürünler başta olmak üzere birçok bitkinin çiçek, meyve ve yaprak gibi kısımlarında yaygın olarak bulunmaktadır (D'Andrea, 2015; David vd., 2016; Guo ve Bruno, 2015).

Kimyasal yapısından dolayı alkolde oldukça iyi çözünmektedir. Kersetin doğada daha çok glikozit formunda bulunmakta olup bu formu rutin ve kersitrin olarak adlandırılmaktadır (David vd., 2016; Guo ve Bruno, 2015).

Antioksidan, anti-tümör, anti-enflamatuvar, antihipertansif, antiobezite, antikolesterolemik ve vazodilatör etkilerinden dolayı büyük bir öneme sahiptir (David vd., 2016; Guan vd., 2017; Salvamani vd., 2014) .



Şekil 2.2. Kersetin kimyasal yapısı

Kersetin'in glikozit konjugatı vücuda alındıktan sonra ince bağırsakta β -glikozidaz ailesinden laktat florizin hidrolaz enzimi tarafından deglikolizasyon tepkimesi gerçekleşmektedir. Aglikon yapısındaki kersetin'in %65-81'i ince bağırsak epitelinden geçer ve karaciğere ulaşır, burada başka biyotransformasyon olayları gözlenmekte olup fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri farklı metabolitler elde edilmektedir (Santangelo vd., 2019).

Dünya genelinde meyve olarak satışı yapılan narenciye türlerinde flavonoit yapısındaki kersetin yaygın olarak bulunmakla birlikte nutrasötikler ve gıda takviyelerinde de kullanılmaktadır. Ortalama kersetin tüketiminin ABD, Çin ve Avrupa'da 6-18 mg/gün aralığında olduğu hesaplanmıştır. Avrupa ve ABD piyasasında sublingual ve sulu ekstraları şeklinde preparatlarında bulunan kersetinin özellikle farklı birçok hastalığı karşı göstermiş olduğu biyolojik aktivitesi, gıda takviyesi olarak kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Kersetin içeren ürünler özellikle kersetin'in göstermiş olduğu yüksek antioksidan etkisinin terapötik uygulanabilirliği nedeniyle patentlenmiştir (Gandhi vd., 2020; Guo ve Bruno, 2015).

2.3. Kersetinin Biyolojik Aktivitesi

Kersetin antioksidan, anti-tümör, nörolojik, anti-enflamatuvar, antihipertansif, antiobezite, antikolesterolemik, antiviral, antimikrobiyal, hepatoprotektif, üreme sistemi koruyucu ve vazodilatör etki gibi birçok farmakolojik özelliğe sahip çok yönlü bir bileşiktir (David vd., 2016; Guan vd., 2017; Maalik vd., 2014; Salvamani vd., 2014).

Kersetin'in göstermiş olduğu antidiyabetik etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi için iskelet kası hücreleri (L6 miyotüpleri) kullanılmıştır. Çalışmanın çıktısı olarak AMPK yolağını düzenleyici etki göstererek glikoz alımını iyileştirdiğini gözlenmektedir (Dhanya vd., 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kersetin'in glikoz, lipit ve protein metabolizmalarında farmakolojik etkileri klinik olarak da kanıtlanmaktadır. Rezvan ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada polikistik over sendromlu kadınlarda kersetin'in (oral olarak kullanımda 12 hafta boyunca 1 g/gün) hem testosteron hem de luteinize edici hormon plazma seviyelerini ve ayrıca insülin direncini düşürdüğünü rapor etmiştir (Rezvan vd., 2017).

Kersetin, antiülser aktivitesini mide asidi salgılanmasını ve mide hücrelerinin lipit peroksidasyonunu engelleyerek göstermektedir. Ayrıca *Helicobacter pylori*'ye bağlı enfeksiyonları inhibe etmekte ve antibakteriyel etki göstermektedir. Özellikle mide-bağırsak sisteminde, solunum yolu, idrar ve deride etkili olan hemen hemen tüm bakteri türlerine karşı etki gösterdiği de bilinmektedir (David vd., 2016).

Pfeuffer ve diğerleri, çalışmalarında kersetin'in (oral olarak kullanımda 8 hafta boyunca 150 mg/gün) sağlıklı erkek deneklerde yemek sonrası triaçilgliserol seviyelerini düşürdüğünü ve HDL-kolesterol konsantrasyonlarını artırdığını göstermişlerdir (Pfeuffer vd., 2013). Yapılan başka bir çalışmada da kersetin'in (4 hafta boyunca 500 mg/gün oral uygulama) sağlıklı erkek deneklerde plazma ürik asit konsantrasyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir (Shi ve Williamson, 2016).

Kersetin içerikli gıda takviyelerinin kalp fonksiyonlarında iyileştirici etkileri bulunmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak Brull ve diğerleri, kersetin'in (6 hafta boyunca 150 mg/gün veya 162 mg/gün oral olarak) hipertansiyon hastalarında günde iki doz uygulandığında gündüz ve gece sistolik kan basıncını önemli ölçüde düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Brull vd., 2015). Denek olarak yüksek kilolu obez bireylerle yapılan bir

çalışmada Brull ve diğerleri tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde kersetin'in sistolik kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur (Santangelo vd., 2019).

Kersetin'in kardiyovasküler hastalıklara bağlı etkileri azaltmaktadır. Buna etkinin anti-enflamatuvar aktivite ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu konuda yapılmış *in vitro* çalışmada sıçan arterlerinde kersetin'in vazodilatör etki gösterdiği bulunmuştur (Larson vd., 2012; Maalik vd., 2014). Epidemiyolojik veriler de kersetin açısından zengin bir diyet ile kardiyovasküler problemlerde azalma arasında pozitif bir ilişki bulunduğunu göstermiştir (Jan vd., 2010).

Kersetin'in asetilkolinesteraz üzerindeki inhibisyon etkisiyle nörodejeneratif hastalıklara (örneğin, Alzheimer hastalığı) karşı yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Choi vd., 2012). Kersetin'in nörolojik aktivitesiyle ilgili yapılan başka bir çalışmada ise sıçanların beyin striatumundaki nöronlarda 6-hidroksidopamin tarafından indüklenen oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Haleagrahara vd., 2013). Sağlıklı P19 nöronları üzerine yapılan bir çalışmada, kersetin tedavisinin nöron sağkalımını etkilemediği, ancak hücre içi glutatyon içeriğinde sinir sisteminin çalışmasını etkileyebilecek bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (Jembrek vd., 2012).

Antioksidan etkili bileşikler serbest radikal üretiminden sorumlu oksidasyon tepkimelerinin gerçekleşmesini engellemektedir. Bu sayede serbest radikal kaynaklı meydana gelen patolojik durumların iyileştirilmesini sağlamaktadır. Bitkilerde yer alan flavonoidlerin fenolik yapıda olması bu bileşiklerin anti-enflamatuvar hastalıkların tedavisinde güçlü antioksidan özellik göstermesinde etkili olmaktadır (David vd., 2016). Kersetin ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda güçlü bir antikanser ajan olduğu bildirilmektedir. Kersetin radikal süpürücü ajan olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğu için oksidatif stresin neden olduğu kanseri önleyebilmektedir. Ayrıca tümör hücre hattında apoptozu destekleyip metastazı engelleyerek güçlü kemoprotektif etkisi göstermektedir. Bu etkilere ek olarak kersetin'in intratümöral doksorubisin enjeksiyonu ile kombinasyon halinde meme tümörlerinde büyümeye karşı bağışıklık yanıtlarının artmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Du vd., 2010; Maalik vd., 2014). Kersetin'in klinik çalışmalarda (Faz-I) tirozin kinaz üzerinde inhibitör etkisiyle antikanser aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir (Maalik vd., 2014).

Özellikle tez çalışması kapsamında değerlendirilecek olan anti-enflamatuvar aktiviteye yönelik çalışmalarda kersetin'in enflamasyondan sorumlu olan enzimlerden siklooksijenaz (COX-1, COX-2) ve lipooksijenazı (LOX) inhibe ederek prostaglandinler ve

lökotrienler gibi enflamasyonda rol oynayan medyatörlerin oluşumunu azaltmakta olduğu bilinmektedir (David vd., 2016; Xiao vd., 2011). Kersetin'in anti-enflamatuvar etkisiyle ilgili *in vitro* prelinik çalışmalarda, insan hepatositinden türetilmiş hücre hattında CRP, NO sentaz, COX-2 gibi enflamatuvar mediyatörlerinde önemli bir seviyede azalma gözlemlenmektedir (Garcia-Mediavilla vd., 2007). Bu enzimlere ek olarak, ksantin oksidazı inhibe etme kabiliyetine sahip olan kersetin, ürik asit birikimini önleyerek gut hastalığının tedavisinde takviye olarak kullanılabilir (Ahmad vd., 2008). *In vivo* çalışmada ratlarda kersetin hem akut hem de kronik enflamasyonu inhibe edip ayrıca adjuvant ile indüklenen artritte karşı önemli antiartritlik aktivite göstermektedir (Guardia vd., 2001, Mamani-Matsuda vd., 2006).

Kersetin ayrıca metabolik hastalıklarda gözlemlenen temel enflamatuvar mediyatörlerini modüle etme kabiliyeti nedeniyle en önemli *Citrus L.* flavonoiti olarak kabul edilmektedir (Gandhi vd., 2020).

Kersetin'in anti-enflamatuvar etkisine yönelik yapılmış *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Enflamasyon yolağının vücudumuzda meydana gelen birçok hastalıkta etkili olması da yapılan çalışmalardaki deney modellerinin çeşitliliğinin bir göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kapsamda yapılan en güncel çalışmalardan derlenen kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları Tablo 2.1'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları

<i>In vitro</i> deneysel çalışmalar			
Deney modeli	Doz	Sonuçlar	Referans
RAW 264.7	50, 100 ve 200 µM	NO konsantrasyonu ve fagositozu ↓	(Tian vd., 2021)
Retina pigment epitel hücre ARPE-19	0.01-1000 µM	TNF-α ile indüklenen ICAM-1 ve MMP-9 ekspresyonunu ↓	(Cheng vd., 2019)
K562 hücreleri	84.02 µM	COX-2 protein ekspresyonu ↓ NFκβ aktivasyonu ve NO inhibisyonunu	(Güran vd., 2019)
RAW 264.7	50, 100 ve 200 µmol/L	IL-6 and TNF-α ↓	(Liu vd., 2018)
Enflamatuvar mediyatörleri (Enzim)	-	12-HHT, TXB2, 12-HETE ve PGE2 enflamatuvar mediyatörleri ↓	(Lesjak vd., 2018)
Caco-2/RBL-2H3 (Ko-kültür sistemi)	75 µM	TNF- α üretimi ve IL-8 mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde blokajı	(Mizuno vd., 2017)
Dalak hücresi	3.5-15 µg/mL	IL-4, IL-5 ve IL-13 Th-2 ↓	(Oliveira vd., 2015)
T lenfosit	50 ve 100 µg	JAK-STAT yolağındaki IL-12 blokajı	(Yang vd., 2015)
Fare makrofajları RAW 264.7	2.5-20 ng/mL	NO, PGE2, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 ↓	(Endale vd., 2013)
İnsan mast hücresi LAD2	100 µM	NF-κB, IL-8 ve TNF-α inhibisyon IL-6 ↓	(Weng vd., 2012)
Sıçan karaciğer epitel hücreleri (RLE)	15-30 µmol/L	PI3K sinyal yolunun aktivasyon ihbisyonu COX-2 ekspresyonunun inhibisyonu	(Lee vd., 2010)
Fare dendritik hücreleri mDC	≥100 mmol/L ve ≤50 mmol/L	ERK, JNK, Akt, and NF-κB inhibisyonu	(Huang vd., 2010)
15-LOX (Enzim)	100 µM	15-LOX güçlü inhibisyon etki COX-1>COX-2 inhibisyonun	(Lee ve Kim, 2010)

Tablo 2.1. (Devam) *Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları*

<i>In vitro</i> deneysel çalışmalar				
Deney modeli	Doz	Sonuçlar		Referans
İnsan mast hücresi HMC-1	3 ve 30 µM	TNF-α, İnterlökin IL-1β, IL-6 ve IL-8 ↓ NF-κB ↓		(Park vd., 2008)
İnsan mast hücresi HMC-1	3-30 µM	TNF-α, İnterlökin IL-1β, IL-6 ve IL-8 ↓ NF-κB ↓		(Min vd., 2007)
İnsan mast hücresi hCBMC	0.01-100 µM	IL-6, IL-8 salım inhibisyonu Tümör nekroz faktörü -alfa (TNF-α) inhibisyonu		(Kempuraj vd., 2005)
<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Romatoid artrit (Sıçan)	50 mg/kg	60 gün 25 denek	Romatoid artrit ilerlemesinin önlenmesi	(Bossolani vd., 2019)
MC903 ile indüklenen atopik dermatit (Fare)	30 ve 90 µM	14 gün 24 denek	IFN-γ, CCL17, CCL22, TNF-α, IL-4 ve IL-6 ↓	(Hou vd., 2019)
Prenatal olarak stresli sıçan ateşli nöbet modeli (Sıçan)	10 mg/kg	14 gün 24 denek	IL-1β ve ardından ateşli nöbetler ↓	(Mkhize vd., 2017)
Epididimal yağ dokusu kaynaklı obezite (Fare)	0.05% diyet	18 hafta 2 yaşlı erkek denek	NFκB, CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ve T hücrelerinde ↓	(Kobori vd., 2016)
Hipertrigliseridemiye bağlı akut pankreatit (Sıçan)	100, 150 ve 200 mg/kg	9 saat 60 denek	NF-κB, IL-1β, IL-6, TNFα'nın mRNA ve protein ekspresyonunu ↓	(Zheng vd., 2016)

Tablo 2.1. (Devam) *Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları*

<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
<i>Blomia tropicalis</i> kaynaklı astım (Fare)	30 mg/kg	14 gün 20 denek	IL-4, IL-5 ve IL-13 Th-2 ↓	(Oliveira vd., 2015)
Adjuvant artrit (Sıçan)	150 mg/kg	28 gün 40 denek	IL-1 β , C-reaktif protein ve monosit kemotaktik protein-1 ↓ LOX-15 inhibisyonu	(Gardi vd., 2015)
Subaraknoit kanamalı deneysel sıçan modeli (Sıçan)	10 ve 50 mg/kg	2 gün 54 denek	Yüksek doz alan sıçanlarda kaspaz-3 ve beyin ödemi iyileşmesi	(Dong vd., 2014)
Radasyon kaynaklı immün sistem değişiklikleri (Fare)	10 ve 40 mg/kg	44 gün 36 denek	IL-1 β ve IL-6 ↓	(Jung vd., 2012)
Antioksidan ve bağışıklık aktivite (Sıçan)	50, 100 ve 150 mg/kg	7 gün 40 denek	Endojen antioksidan enzimlerin aktivitesi ve IL-10 ↑ Serbest radikal oluşumunun engellenmesi Kreatin kinaz, NO, NOS, IL-1, IL-8 ↓	(Liu vd., 2012)
Omurilik kompresyon yaralanması (Sıçan)	25 μ mol/kg	10 gün 74 denek	Akut omurilik yaralanmasının ve motor fonksiyonun fonksiyonel iyileşmesi	(Schültke vd., 2010)
Otoimmün miyokardit (Sıçan)	10 ve 20 mg/kg	21 gün 42 denek	IL17 ve TNF- α ↓ IL-10 ↑	(Milenković vd., 2010)

Tablo 2.1. (Devam) *Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları*

<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Ova kaynaklı astım modeli (Fare)	8 ve 16 mg/kg	18-20 gün ardışık olarak 24 denek	IL-4, Th2 ↓	(Park vd., 2009)
Alerjik astım (Fare)	10 mg/kg	21 gün 36 dişi denek	IL-5 ↓	(Rogerio vd., 2007)
Karragenan kaynaklı enfeksiyon (Sıçan)	10 mg/kg	2 gün 32 denek	Prostanoid sentezi PGE2, TNF-a, RANTES, MIP-2 ve siklooksijenaz-2 üretiminin modülasyonu	(Morikawa vd., 2003)
Klinik çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma süresi	Sonuçlar	Referans
Kas hasarından nöromusküler fonksiyonun iyileşme etkisi (16 erkek)	1000 mg	14 gün	↓Eksantrik egzersizden kaynaklanan hasarın büyüklüğü İkincil hasarın enflamatuvar yanıtı ile ilişkili semptomların ve nöromusküler fonksiyon iyileşmesi hızlandı	(Bazzucchi vd., 2020)
Romatoid Artritli (50 kadın)	500 mg	8 hafta	TNF-α ↓	(Javadi vd., 2017)
Pre-hipertansiyonu olan aşırı kilolu ila obez hastalarda (70 denek)	162 mg	6 hafta	Serum hs-CRP, plazma hs-TNFα, serum leptin ve serum adiponektin değerlerinde anlamlı bir değişim bulunmadı	(Brüll vd., 2017)

Tablo 2.1. (Devam) *Kersetin'in anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları*

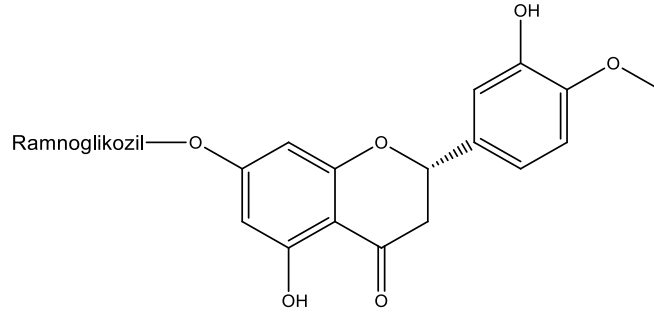
Klinik çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma süresi	Sonuçlar	Referans
Postmenopozal kadınlarda tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu (145 kadın)	-	12 ay	1 yılın sonunda vajinal östrojen tedavisi ile alınan kersetin önemli ölçüde atakları azalttı	(Torella vd., 2016)
Obez ve aşırı kilolu kadınlarda anti-enflamatuvar transkriptomik değişiklikler (48 kadın)	1000 mg kersetin (Karışık flavonoit-balık yağı takviyesi)	10 hafta	Antiviral etki ve enflamasyon tam kan transkriptomik yanıt uyarılması	(Cialdella-Kam vd., 2016)
Buzağularının metabolik ve antioksidatif etki (28 denek)	10 mg/kg	26 gün	Yeni doğan süt buzağularının metabolik ve antioksidatif durumu üzerinde hiçbir etki gözlemlenmedi	(Maciej vd., 2016)
Hiperkolesterolemik Hastalar (160 denek)	50 mg	-	Nitrik oksit, C-reaktif protein, γ -glutamilttransferaz \downarrow	(Qureshi vd., 2012)
Profesyonel olmayan düzenli spor yapanlar için gıda takviyesi (60 erkek)	500 mg	2 ay	CPR seviyesinde önemli \downarrow	(Askari vd., 2012)
Doğuştan gelen bağıışıklık ve enflamasyon (120 kadın)	500 ve 1000 mg	12 hafta	IL-6, TNF- α ölçümlerinde anlamlı değişim gözlemlenmedi	(Heinz vd., 2010)
Mitokondriyal Biyogenez (39 denek)	1000 mg	14 gün	C-reaktif protein (CRP) ve plazma interlökin 6 (IL-6) \downarrow İnterlökin 10 (IL-10) \uparrow	(Nieman vd., 2009)

\uparrow : Değerlerdeki artış

\downarrow : Değerlerdeki azalış

2.4. Hesperidin

Hesperidin (Hesperetin-7-*O*-rutinozit) bioz şekeri (ramnoz ve glikoz) ve hesperetin aglikon yapısından oluşan flavonudur. Göstermiş olduğu biyolojik aktivitelerinden dolayı biyoflavonoit olarak da adlandırılmaktadır. Hesperidin'in kimyasal formülü Şekil 2.3'te yer almaktadır. İlk olarak portakal albedosundan izole edilen hesperidin *Citrus* meyvelerinde yaygın olarak, domates ve aromatik bitkilerde de az miktarda bulunmaktadır. Turunçgillerde hesperidin en yüksek verimle bitkinin çiçeklenmeden 50 ila 60 gün sonrasında elde edilmektedir (Karim vd., 2021; Roohbakhsh vd., 2014).



Şekil 2.3. Hesperidin kimyasal yapısı

Genel olarak, flavonoidlerin yapısında şeker grubu bulunması bağırsaklardan emilimi arttırmakta ve hidroliz olmaktadır. Karaciğerde de metabolizasyonu gerçekleşmektedir (Murota ve Terao, 2003). Flavonoidlerdeki şeker gruplarının varlığı, biyoyararlanıma etki eden önemli bir faktördür. Genellikle yapıda glikoz bulunduran flavonoidlerin emiliminde enzimler veya transport sistemler görev almaktadır. Bu şekilde emilimleri kolaylaşmaktadır. Ancak bu mekanizmalar yapısında rutinoz bulunduran flavonoidler için geçerli değildir. Yapısında rutinozit kısmı bulundurması nedeniyle hesperidin de sudaki çözünürlüğü az olup oral alımlarda biyoyararlanımı düşüktür (Karim vd., 2021; Li ve Schluesener, 2017; Tejada vd., 2018). Sıçanlarda hesperidin'in biyoyararlanımı üzerine yapılan çalışmada bu bileşiğin kan dolaşımında maksimum konsantrasyona ulaşma süresi 45 dakika, vücutta yarılanma ömrü ise yaklaşık 10 saat olarak bulunmuştur (Hu vd., 2015).

Hesperidin oral olarak alındıktan sonra gastrointestinal sistemde ince bağırsaktan emilimi basit difüzyon ile gerçekleşebilmektedir. Bu sürecin devamında mikroflora tarafından hidrolize uğrayan hesperidin hesperetin'e dönüşmektedir. Bağırsak ve karaciğer hücrelerinde metabolize edilip glukurono- ve sülf- ile konjugatlarını oluşturmaktadır. Ayrıca kan plazmasında, idrar ve safrada glukuronitler ve sülf-glukuronitler halinde

agliskon yapısının tekrar dolaşım sistemine geçişi mümkündür (Karim vd., 2021; Tejada vd., 2018).

Bağırsak mikroflorasında yer alan *Bifidobacterium pseudocatenulatum* bakterisi rutinozit şeker bağıni parçalayarak hesperidin'i hidroliz edebilmektedir. İnce bağırsaktan emilimi gerçekleşmeyen hesperidin bu şekilde vücuttan atılımı gerçekleşmeden kalın bağırsaktan geri alınmaktadır. Kolon mikrobiyotası flavanon yapısındaki halkanın parçalanmasına yol açarak ferulik ve *m*-kumarik asitlerin, fenil propiyonik asitin, benzoik asitlerin, hippurik asit yapılarının oluşmasına neden olmaktadır (Amaretti vd., 2015; Tejada vd., 2018).

2.5. Hesperidin'in Biyolojik Aktiviteleri

Hesperidin'in günümüzde farmakolojik kullanımı ile ilgili olarak birçok prelinik ve klinik çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar antioksidan, anti-enflamatuvar, lipit düşürücü ve insülin duyarlılık özelliklerine sahip olduğunu ve nörolojik bozukluklar, psikiyatrik bozukluklar, kan basıncına etkilerinden dolayı kardiyovasküler hastalıklarda etkili olduğunu göstermektedir (Li ve Schluesener, 2017; Rangel-Huerta vd., 2015). Bu aktivitelerinden dolayı tek veya diğer flavonoidlerle kombine formlarda gıda takviyesi olarak kullanımları mevcuttur (Gandhi vd., 2020).

Hesperidin kullanılarak farelerde yapılan çalışmada fare serum ve karaciğerinde glikoz düzenleyici enzimlerin özelliklerini değiştirip lipit seviyesini düşürerek glikoz metabolizmasını düzenlediği gözlemlenmektedir (Jugran vd., 2021).

Hesperidin'in antidiyabetik aktivitesi ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda diyabetin neden olduğu motor sinir ve duyuşal sinir iletim hızındaki azalmayı inhibe ettiği gözlemlenmektedir. Bozulmuş sinir iletim hızı duyuşal, nosiseptif ve motor tepkileri etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, hesperidin, diyabetik sıçanlarda artan mekanik ve termal hiperaljeziyi azaltarak duyuşal tepkileri normalleştirmektedir. Ayrıca yüksek kan glikozu, total kolesterol (TC) ve serum tiroglobulin (TG) gibi çeşitli biyokimyasal parametreleri zayıflatırken; insülinin plazma konsantrasyonunu artırıp hemodinamik değişkenler üzerinde olumlu etkilere sebep olmaktadır. Diyabet ve ilişkili kardiyovasküler komplikasyonların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Gandhi vd., 2020).

Diyabetik sıçanlara gıda takviyesi olarak hesperidin ve naringin kompleksi verildikten bir süre sonra hepatik glukokinaz ve glikojen değerlerinde artış gözlenirken; glukoz-6-fosfat ve fosfoenolpiruvat karboksikinaz (PEPCK) ve hepatik glukoneojenezin azalttığı

bildirilmiştir. Bu duruma bağlı olarak glisemik indeks değerlerinde iyileşme tespit edilmiştir (Jugran vd., 2021).

Hesperidin ayrıca P vitamini olarak da bilinmektedir. Hesperidin yumurtalık kanseri hücrelerinde endoplazmik retikulumun stres sinyal yolları aracılığıyla kanserli hücre canlılığını inhibe edip apoptozu indükleyerek antikanser aktivite göstermektedir (Tajaldini ve Asadi, 2020).

Hesperidin'in göstermiş olduğu potansiyel anti-enflamatuvar etki ile ilgili *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış en güncel çalışmalar Tablo 2.2'de yer almaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunluğunda RAW 264.7 hücrelerinde (fare makrofaj hücre hattı) immün aktivatör olarak Lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır.

Hesperidin, COX-2 ve iNOS aktivitesini doza bağlı bir şekilde inhibe ederek prostaglandin E2 (PGE2) ve nitrojen dioksit (NO₂) ortamına salınmasını azaltmaktadır. Makrofaj hücrelerinde COX-2 aktivitesinin ve iNOS ekspresyonunun/aktivitesinin zayıflaması, anti-enflamatuvar etkiye yol açabilmektedir (Tejada vd., 2018).

Enflamasyonun kronikleşmesi kardiyovasküler/solunum, endokrin, merkezi sinir ve sindirim sistemleri dahil olmak üzere var olan birçok sistem arasındaki dengeyi bozmaktadır. Bu süreci kardiyovasküler hastalıklar gibi hayatı tehdit eden bazı hastalıklar ve çeşitli kanserlerin oluşumu takip etmektedir. Enflamasyon sürecinde yüksek düzeylerde bulunan sitokinler β -hücre apoptozunu indükleyebilmektedir. Ayrıca adiposit enflamasyonunu artırıp salgı disfonksiyona neden olabilmektedir (Agrawal ve Kant, 2014; Tejada vd., 2018) . Hesperidin, dolaşımdaki C-reaktif protein (CRP) ve E-selektin konsantrasyonlarını azaltırken; bir dizi çalışma hesperidin tüketildikten sonra enflamasyona sebep olan sitokinlerin [interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)] düzeylerinin azaldığını bildirmektedir (Haidari vd., 2015; Lorzadeh vd., 2019).

Citrus meyve suyunun anti-enflamatuvar etkileri ile ilgili olarak yapılmış birçok çalışma bulunurken hesperidin'in bu etkisine yönelik yeterince klinik çalışma bulunmamaktadır (Tejada vd., 2018).

Tablo 2.2. Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları

<i>In vitro</i> deneysel çalışmalar				
Deney modeli	Doz	Sonuçlar	Referans	
RAW 264.7	10, 20, 40 ve 80 µg/mL	NO üretimini ve pro-enflamatuvar sitokinlerinin inhibisyonu	(Zheng vd., 2021)	
RAW 264.7	0.01 ve 0.10 mg/kg	Nosiseptif uyararla indüklenen enflamatuvar infiltratların ve COX-2 ekspresyonunun inhibisyonu, LPS	(Li vd., 2021)	
İnsan osteoartrit kondrosit	2.0 mg/mL	Matris metaloproteinaz (MMP)-3, MMP-13, PGE2, NF-κB, IL-1β, COX-2 ve nitrik oksit ↓	(Fu vd., 2018)	
15-LOX, COX-1, COX-2, NO (Enzim)	10–100 µM	COX - 1 enzimine karşı zayıf bir inhibisyon (IC50> 100 µM) NO üretimi üzerinde zayıf bir inhibisyon COX-2 enzimi çalışmasında etkili bir inhibisyon	(Lee ve Kim, 2010)	
HMC-İnsan mast hücresi	0.001- 0.1 mg/mL	Sitokinler: İnterlökin IL-1β, IL-8 Tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) ↓	(Choi vd., 2007)	
RAW 264,7	10–30 µM	Prostaglandin E2 (PGE2) ↓ COX-2 protein seviyesinde belirgin bir değişim yok	(Sakata vd., 2003)	
İnsan umbilikal ven endotel hücresi (HUVECs)	5-50 µM	TNF-α kaynaklı VCAM-1 protein ekspresyon baskılanması ICAM-1 üzerinde etkisiz NF-κB'den bağımsız mekanizma ilr gerçekleşmekte	(Nizamutdi nova vd., 2008)	
Alveolar tip II epitel hücre (A549 hücresi)	50 µM	TNF-α, IL-1β, IL-6 ve MCP-1 ↓ Murine LPS kaynaklı akut akciğer iltihabı ↓	(Yeh vd., 2007)	
<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Alzheimer's hastalığı (Fare)	40 mg/kg intragastrit	90 gün 100 denek	CRP, MCP-1 seviyeleri, TFN-α ve NFκβ aktivitesi ↓ Heme oksijenaz-1 ekspresyonu ve seviyeleri ↑	(Hong ve An, 2018)
Kulak ödemi (Fare)	0.01 ve 0.10 mg/kg	5 gün 70 denek	Nosiseptif uyararla indüklenen enflamatuvar infiltratların ve COX-2 ekspresyonunun inhibisyonu	(Li vd., 2021)

Tablo 2.2. (Devam) *Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları*

<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Kalp ve beyin toksitesi (Sıçan)	100 ve 200 mg/kg	15 gün 35 denek	Nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) \downarrow Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) \downarrow İnterlökin-1 β (IL-1 β) ve sistein aspartata özgü proteaz-3 (kaspaz-3) seviyeleri \downarrow	(Kuzu vd., 2021)
Ülseratif kolit (Fare)	10, 30 ve 100 mg/kg	- 380 denek	Kolondaki pro-enflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-33 inhibisyonu	(Guazelli vd., 2021)
Dermal eksüzyon yarası (Fare)	Hesperidin: naringin (1:1; 1:2; 2:1)	20 gün 70 denek	NF-KB ve COX-2 inhibisyonu	(Vabeiryur eilai vd., 2021)
Omurilik yaralanması (Sıçan)	100 mg/kg	7 gün 25 denek	IL-1 β , TNF- α \downarrow Motor fonksiyonlar \uparrow	(Heo vd., 2020)
N, N'-dimetilhidrazin karşı koruyucu etki (Sıçan)	40, 100 ve 200 mg/kg	14 gün 30 denek	NF- κ B, IL-6, and COX-2 \downarrow Apatoz belirteçleri (p38-MAPK, p53, and kaspaz-3) \downarrow	(Afzal vd., 2021)
Karaciğer iskemisini / reperfüzyon hasar modeli (Fare)	100, 200 ve 400 mg/kg	3 gün 65 erkek denek	TNF- α , IL-6 and IL-1 β \downarrow	(Li vd., 2020)
Freund'un adjuvant (CFA) ile indüklenen artrit modeli (Sıçan)	40 ve 80 mg/kg	45 gün 56 denek	Serum interferon gama (IFN- γ) \downarrow İnterlökin-4 (IL-4) \downarrow	(Adefegha vd., 2020)
Kronik öngörülemez hafif stres (CUMS) (Sıçan)	20, 50 ve 100 mg/kg	28 gün 60 denek	Antidepresan etki IL-1 β , IL-6, TNF- α , Kaspaz-1 \downarrow	(Xie vd., 2020)

Tablo 2.2. (Devam) *Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları*

<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Karbon tetraklorür (CCl ₄) kaynaklı akut böbrek ve testis hasarı (Sıçan)	100 mg/kg Haftada 2 kez	28 gün 72 denek	Nükleer faktör kappa-B (NF-KB) ↓	(Abd-Elhakim vd., 2020)
Beyin, yumurtalık ve uterusu 4-vinilsiklohekzen diepoksit kaynaklı toksisite (Sıçan)	100 ve 200 mg/kg	30 gün 60 dişi denek	Nitrik oksit inhibisyonu	(Abolaji vd., 2020)
Sodyum arsenite bağlı nefrotoksisite ve hepatotoksisite (Sıçan)	100 ve 200 mg/kg	15 gün 35 erkek denek	TNF- α , NF- κ B, IL-1 β , kaspaz-3 ↓	(Türk vd., 2019)
Kardiyak hipertrofi (Sıçan)	200 mg/kg	28 gün 36 erkek denek	TNF- α ve IL-6 seviyesi ↓	(Bhargava vd., 2019)
Ovalbumin kaynaklı alerjik rinit (Sıçan)	100 mg/kg	22 gün 30 denek	TNF- α ↓	(Kılıç vd., 2019)
Bleomisin kaynaklı pulmoner fibroz (Sıçan)	25, 50 ve 100 mg/kg	28 gün 96 erkek denek	NF- κ B, I κ B α TNF- α , IL-1 β ve IL-6 inhibisyonu	(Zhou vd., 2019)
Akut miyokard infarktüsü (Fare)	50 ve 100 mg/kg	14 gün 36 denek	TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, ICAM-1, MDA, CAT, SOD ve kaspaz-3/9 ↓	(Meng vd., 2018)

Tablo 2.2. (Devam) *Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları*

<i>In vivo</i> deneysel çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma günü/ Denek sayısı	Sonuçlar	Referans
Kolistin kaynaklı böbrek hasarı (Sıçan)	300 mg/kg	7 gün 56 erkek denek	TNF- α , IL-6 ve IL-1 β \downarrow	(Hanedan vd., 2018)
Ovalbumin ile indüklenmiş astım (Fare)	10 ve 30 mg/kg	25-27 gün 50 dişi denek	Enflamatuvar medyatörler: ovalbumin-spesifik IgE ve Th2 sitokin seviyeleri (IL-3, IL-4, IL-5, GATA-3 transkripsiyon faktörü) \downarrow	(Wei vd., 2012)
STZ indüklemeli diyabet (Sıçan)	25, 50 ve 100 mg/kg	23 gün 48 denek	Antidepresan etki IL-6 \downarrow	(El-Marasy vd., 2014)
STZ indüklemeli diyabet (Sıçan)	100 ve 200 mg/kg	14 gün 100 erkek denek	Retinal TNF- α , IL-1 β , VEGF, ICAM-1, AGEs ve kaspaz-3 \downarrow Retina ve Plazma anormalliklerini önler	(Shi vd., 2012)
Azoksimetan kaynaklı kolon karsinogenez (Fare)	25 mg/kg	17 hafta 50 denek	Proliferasyon, oksidatif stres. NF κ β , iNOS ve COX-2 \downarrow Antioksidan etki \uparrow	(Saiprasad vd., 2013)
Klinik çalışmalar				
Hastalık modeli	Uygulama dozu	Uygulanma süresi	Sonuçlar	Referans
Sağlıklı bireylerde kardiyovasküler biyomarkerleri (68 denek)	450 mg/gün	6 hafta	E-selektin, Hücre içi yapışma molekülü-1, Vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1) \downarrow	(Salden vd., 2016)
Alkolden bağımsız yağlı karaciğer (50 erkek)	100 mg/gün	12 hafta	Tümör nekroz faktörü- α ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) \downarrow	(Cheraghpour vd., 2019)

Tablo 2.2. (Devam) Hesperidin'in anti-enflamatuvar aktive çalışmaları

Klinik çalışmalar				
Hastalık modeli	Hastalık modeli	Hastalık modeli	Hastalık modeli	Hastalık modeli
Tip-2 diyabet (64 denek)	500 mg/gün	6 hafta	Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin 6 (IL-6) ve yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hs- CRP) \downarrow	(Homayou ni vd., 2018)
Diyabetli bireyler (45 denek)	500 mg/gün	8 hafta	C-reaktif protein (CRP), IL-6 \downarrow	(Eghtesadi vd., 2016)
Miyokardiyal infarksiyon (75 denek)	600 mg/gün	4 hafta	E-selektin seviyesi \downarrow Adiponektin ve HDL-C seviyeleri \uparrow	(Haidari vd., 2015)
İmmünomodülasyona (24 erkek)	292 mg/gün	4 hafta	1,819 gen ekspresyonu CCL26, CX3CR1, CXCL17 \uparrow NF κ B \downarrow	(Perche vd., 2014)
Metabolik sendromlu (24 denek)	500 mg/gün	3 hafta	CRP, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin \downarrow	(Rizza vd., 2011)

\uparrow : Değerlerdeki artış

\downarrow : Değerlerdeki azalış

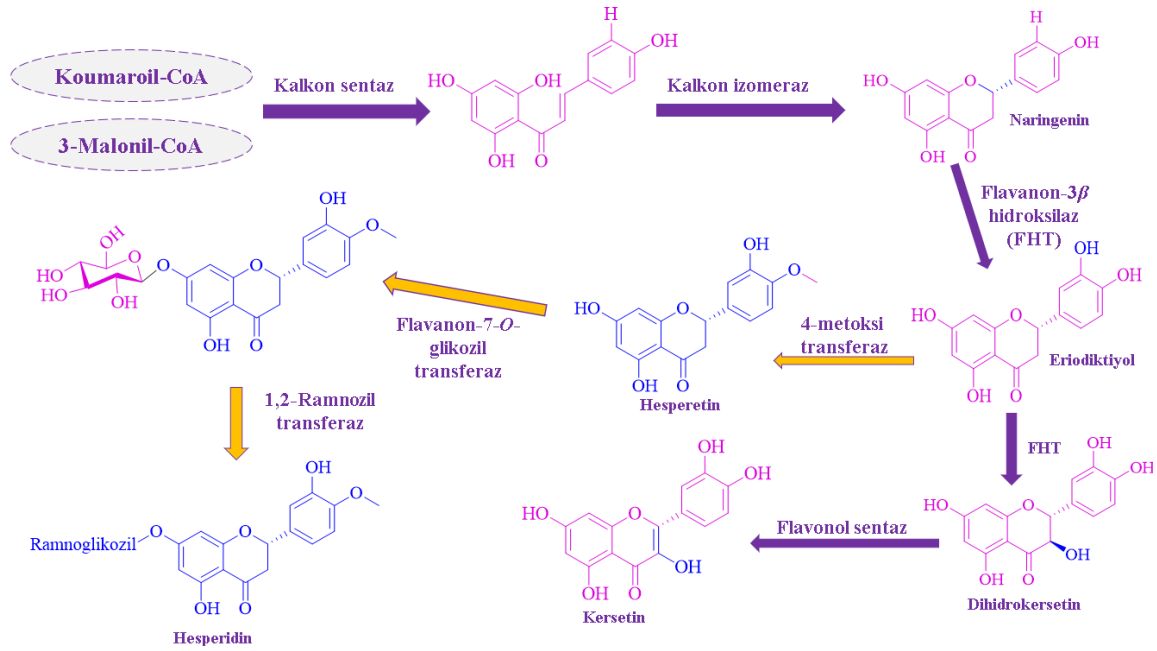
2.6. Kersetin ve Hesperidin'in Biyosentez Yolağı

Kersetin ve hesperidin'in biyosentezi malonil-CoA ile başlayan karbohidrat metabolizma yolağında gerçekleşmektedir. Bu biyosentez süreci Şekil 2.4'te yer almaktadır. Kumaroil-CoA ve 3-malonil CoA bileşiklerinin kalkon sentaz enzimi ile tepkimeye girmesi sonucunda stabil olmayan, sarı renkli naringenin kalkonunu oluşturmaktadır. Bu bileşik kalkon izomeraz enzimi yardımıyla stabil siklik naringenin flavanona dönüşmektedir. Naringenin flavanon-3 β -hidroksilaz enzimi tarafından hidroksilasyona uğrayıp eriodiktiyol flavanonu oluşmaktadır. Bu biyosentez basamağından sonra kersetin ve hesperidin'in dönüşüm yolları ayrılmaktadır.

Kersetinin sentezlenmesinde eriodiktiyol flavanon-3 β -hidroksilaz (FTH) enzimi tarafından 3-OH konumundan hidrolize edilmektedir. Bu şekilde elde edilen

dihidroksikeretin flavonol sentaz enziminin etkisi ile aglikon yapısındaki kersetin'e dönüşmektedir (Mateus vd., 2018; Sharma vd., 2018).

Hesperidin'in sentezlenmesi için eriodiktiyol 4'-*O*-metiltransferaz enziminin yardımıyla hesperetin'e dönüşmektedir. Hesperetin, 7-*O*-glukosiltransferaz C-7 konumunda glikozile edilerek glikoz bağlanarak hesperetin-7-*O*-glikoz oluşmaktadır. Yapısında iki şeker grubu olarak glikoz ve ramnoz taşıyan hesperedin'i elde etmek için 1,2-ramnoziltransferaz enzimi tarafından glukozil kısmının 2'-OH grubuna ramnoz bağlanmaktadır (Balasundram vd., 2006; Karim vd., 2021; Patel, 2018).



Şekil 2.4. Kersetin ve hesperidin'in biyosentez yolağı (Karim vd., 2021)

2.7. Mikrobiyal Transformasyon

Mikrobiyal transformasyon, farmakolojik etkilere sahip bileşiklerin etkinliğini arttırmak ya da *in vivo* şartlarda canlı organizmalar açısından zararlı olarak kabul edilen bileşiklerin enzimler yardımıyla zararsız (detoksifikasyon) hale getirmek amacıyla mikroorganizmalar veya izole enzimlerin katalizörlüğünde gerçekleşen doğal kimyasal tepkimelerdir. Mikrobiyal transformasyon, geniş bir çeşitliliğe sahip biyoteknolojik tepkimeler olup en önemli özelliklerinden birisi sentetik olarak gerçekleştirilmesi oldukça zor olan tepkimelere de olanak sağlamasıdır (Mutafova vd., 2016; Zafar vd., 2016). Bu şekilde kimyasal yapıları modifiye edilen doğal üründen daha güçlü biyolojik aktivitelere ve fizikokimyasal özelliklere sahip yeni biyoaktif bileşiklerin eldesi hedeflenmektedir (Cano-Flores vd., 2020).

Mikrobiyal transformasyon, daha yüksek stereo- ve regioselektif özelliği ve aynı zamanda enantiospesifik olmasından dolayı büyük öneme sahiptir. Rasemik karışımlardan kiral metabolitlerin üretimine izin verdiği için kimyasal sentez yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Mikrobiyal transformasyon deneylerinin gerçekleşme koşulları kimyasal sentez yöntemlerindeki ekstra işlem basamaklarına gerek olmaksızın tepkimeler tek seferde gerçekleşmektedir.

Kullanılan mikroorganizmaların hızlı büyümesi, kültür alınma kolaylığı, uygun genetik manipülasyonlar yapabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Mikroorganizmaların hızlı büyümesi ve preparatif ölçekli üretim kolaylığı gibi avantajları sebebiyle endüstriyel üretiminde mikrobiyal yöntemler tercih edilmektedir. Çevresel olarak daha güvenli bir teknoloji olan mikrobiyal üretim süreçleri ve atık seviyesini de etkin bir şekilde azaltılmasına olanak sağlamaktadır. Mikrobiyal dönüşümler süreç sonunda atıkların iyileştirilmesi ve uzaklaştırılmasından ziyade, atık oluşumunun ortadan kaldırılmasından dolayı 'Green Teknoloji' olarak nitelendirilmektedir. Bu çalışmaların diğer avantajlı yönleri;

- Basit, kolay ve düşük maliyetle hazırlanabilir olması,
- Çok sayıda suş ile çalışılmanın kolay ve tekrarlanabilir olması,
- Elde edilen çok sayıda metabolitin daha kolay tespit edilip izolasyon ve yapısal tanımlamaya uygun olması,
- Doğada var olmayan yeni metabolitlerin izole edilebilmesi,
- Birçok adımı içeren sentetik tepkimeler için uygun olması,
- Ara tepkimelere gerek kalmadan gerçekleşmesi,
- Süreç sonucunda elde edilen metabolit veriminin yüksek olması,
- Kemo-, regio- ve stereospesifikliğin gerekli olduğu tepkime koşullarında kullanılabilir olması,
- Mikroorganizmaların stok kültürlerinin bakımının, hücre ya da doku kültürlerinin veya laboratuvar hayvanlarının bakımından daha basit ve ucuz olması,
- Büyük ölçekli kurulumları ve manipülasyonlarının kolay olması,
- Toksik kimyasalların kullanımının azaltılması ve ürün eldesinde seçiciliğe olanak sağlaması,
- Güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır (Berger, 2007; Cano-Flores vd., 2020; Choi vd., 2015; Faber, 2011; Smitha vd., 2017; Telefoncu, 2010).

Mikroorganizmalar, biyokimyasal olarak birbirinden oldukça farklı dönüşümler gösterebilmektedir. Mikrobiyal transformasyonda kullanılan doğal ürünler üzerinde çeşitli

mikroorganizmaların hücreleri tarafından yükseltgenme, indirgenme, oksidasyon, hidroksilasyon, dekarboksilasyon, izomerleşme, fosforilleme, C-C bağlarının koparılması, esterleştirme, metilasyon, demetilasyon, izomerizasyon, hidroliz, glikozilasyon ve hidrojenasyon gibi tepkimelerin gerçekleştiği bilinmektedir. Kültürler bu tepkimeler sırasında oldukça farklı çevresel koşullara çok çabuk adaptasyon sağlayabilmektedirler (Cano-Flores vd., 2020; Faber, 2011; Schrewe vd., 2013; Telefoncu, 2010). *Aspergillus* ve *Bacillus* cinslerinin de içinde bulunduğu birçok mikroorganizma ile mikrobiyal transformasyon gerçekleşmektedir.

Mikrobiyal transformasyon çalışmaları tüm hücreler ile yapılabileceği gibi mikroorganizmalardan izole edilen enzim sistemleriyle de gerçekleştirilebilmektedir. İzole edilmiş enzim sistemleri ile yapılan çalışmalar daha spesifik ve yüksek verimle gerçekleşebilmektedir (Brenna vd., 2011; Cano-Flores vd., 2020).

Gıda, ilaç ve koku alanlarında yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmaları gün geçtikçe artış göstermektedir. Bu çalışmalara ek olarak endüstriyel atık maddelerin geri kazanılması gibi alanlarda da gelişmeler bulunmaktadır (Rajaguru vd., 2000). Funguslar doğal ürünlerin katalizlenmesinde ticari ve endüstriyel açıdan fermente içeceklerin, yiyeceklerin, biyolojik aktivitesi olan bileşiklerin, çözücülerin, organik asitlerin, polisakkaritlerin, antibiyotiklerin vb. ürünlerin üretiminde önemli bir rol oynamaktadırlar.

Endüstriyel ölçekteki çalışmalarda Zygomycota mantarlarından *Mucor* ve *Rhizopus* cinsleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *Rhizopus* sitrik asit üretiminde tercih edilirken *Mucor* ise yüksek miktarda lipaz enzimi içerdiği için çok çeşitli kimyasal bileşiklerin hidroksilasyon tepkimesini katalizlenmesinde kullanılmaktadır (Cano-Flores vd., 2020; Parra vd., 2009; Pollard ve Woodley, 2007; Straathof vd., 2002).

Mikrobiyal transformasyon ile aglikon yapılarındaki bileşiklerin suda çözünme ve biyoyararlanım problemlerine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalara *Beauveria* ve *Absidia* suşları ile prenilflavonoidleri ve diğer flavonoidlerin biyotransformasyonu örnek gösterilebilir (Cao vd., 2015).

Polifenolik yapıdaki flavonoidler mikrobiyal transformasyonla doğada var olmayan yeni metabolitlerin üretilmesini sağladığı için büyük öneme sahiptir (Cano-Flores vd., 2020). Flavonoidler kuvvetli biyolojik aktivite göstermelerine rağmen çözünürlük problemi ve kararsız yapılarından dolayı dozaj formülasyonları için sorun teşkil etmektedir. Aynı zamanda flavonoidlerin dahilen kullanımlarında ise biyoyararlanımları oldukça düşüktür. Flavonoidlerle ilgili karşılaşılan bu problemlere karşı enzimatik, kimyasal veya

kemoenzimatik modifikasyon yöntemleri kullanılabilir. Bu şekilde seçici olarak dönüşüm gerçekleştiği için verim de yüksek olmaktadır. Bunlara ek olarak biyotransformasyon enantiyomerik ürünler üretme ve nötral pH, ortam sıcaklıkları ve atmosferik basınçlarda çalışma imkânı sağlaması bakımından da avantaj sunmaktadır. Biyotransformasyon sonucu elde edilen ürünlerin oluşumunda ve veriminde kullanılan dönüşüm ortamı ve flavonoinin yapısı gibi faktörler etkili olmaktadır (Wang vd., 2010).

Flavonoidlerle ilgili günümüze kadar yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmalarında genellikle deneysel süreçte mikroorganizmalar sıvı besiyerinde büyütülen hücre süspansiyonları şeklinde hazırlanmıştır. Elde edilen metabolitler, C-18 veya kiral kolonlar kullanılarak Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile analiz edilmektedir. Bu metabolitler kromatografik yöntemlerle izole edilmiş metabolitlerin yapılarının aydınlatılabilmesi için de spektroskopik yöntemlerden genellikle NMR ve kütle spektroskopisinden yararlanılmaktadır (Seo vd., 2011).

Flavanonların mikrobiyal transformasyonunda kullanılan *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Streptomyces* mikroorganizmaları, flavanon yapısında hidroksilasyon, halka açılması ve dehidrolasyon tepkimeleri meydana getirerek çeşitli metabolitlerin elde edilmesini sağlamaktadır (Seo vd., 2011). *Cunninghamella* da dönüşüm çalışmalarında *Penicillium* ve *Aspergillus* kadar yaygın kullanılmakta olup yüksek verimlerle metabolit oluşumunu sağlamaktadır (Asha ve Vidyavathi, 2009). Mikrobiyal transformasyon sırasındaki flavonoid yapılarında gözlemlenen genel dönüşüm tepkimeleri, hidroksilasyon, dehidroksilasyon, *O*-metilasyon, *O*-demetilasyon, glikozilasyon, deglikozilasyon, dehidrojenasyon, hidrojenasyon, benzo- γ -piron yapısının C halkasında açılma, siklizasyon ve karbonil indirgenmesidir (Cano-Flores vd., 2020).

Gastrointestinal sistem mikrobiyotasında yüksek miktarlarda bakteri bulundurmaktadır. Bu bakteriler 10^4 /mL- 10^7 /mL oranında ince bağırsakta bulunurken 10^{11} - 10^{12} /g kalın bağırsakta yer almaktadır (Santangelo vd., 2019). Bir insan kolonunda 400'den fazla bakteri türü bulunmaktadır. Bunların büyük bir çoğunluğunu sporsuz anaerobik bakteriler oluşturmaktadır (Santangelo vd., 2019). Bu bakteriler sırasıyla *Bacteroides* (Gram-negatif, çubuk formu), *Eubacterium* (Gram-pozitif, çubuk formu) ve *Bifidobacterium* (Gram-pozitif, çubuk formu), *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Actinobacteria phyla*'dır (Santangelo vd., 2019). *Escherichia coli* (Gram-negatif, çubuk formu) bakterisine de bağırsaklarda az miktarlarda rastlanmaktadır (Santangelo vd., 2019).

Bağırsak florasında yer alan bu mikroorganizmalar, vücuda alınan fitokimyasal ve diğer gıda ürünlerinin içeriğindeki bileşiklerin halka açılması, redoks tepkimeleri, deglükalizasyon, demetilasyon ve dehidroksilasyon gibi mikrobiyal biyokatalitik süreçlerin gerçekleşmesinden sorumludur (Gong vd., 2020, Singh vd., 2020). Bu tepkimeler sayesinde bileşiklerin bağırsaktan absorpsiyonunda ve biyoyararlanımında artış gözlenmektedir (Selma vd., 2017).

Bağırsak mikrobiyotasında öncelikle α -ramnozidaz, β -glükuronidaz, β -glükozidaz, β -galaktozidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz, 7- α -hidroksilaz, proteaz enzimleri üretilmekte olup bileşiklerin dönüşümlerinden bu enzimler sorumludur (Gong vd., 2020).

Özellikle flavonoidlerin glükozidasyonu ile şeker grupları ayrılmaktadır. Bu durum bileşiğin daha hidrofobik hale gelmesine ve molekül ağırlığının düşük olması nedeniyle pasif difüzyonun artışı ile bağırsak lümeninden kolayca sistemik dolaşıma geçişine olanak sağlamaktadırlar (Singh vd., 2020). *Bacteroides* sp., *Streptococcus* sp. ve *Clostridium* sp. suşları flavonoidlerden kersetin, kaempferol, naringenin, izoflavonlar ve kateşin bileşiklerinin indirgenme tepkimelerinden sorumludur (Singh vd., 2020).

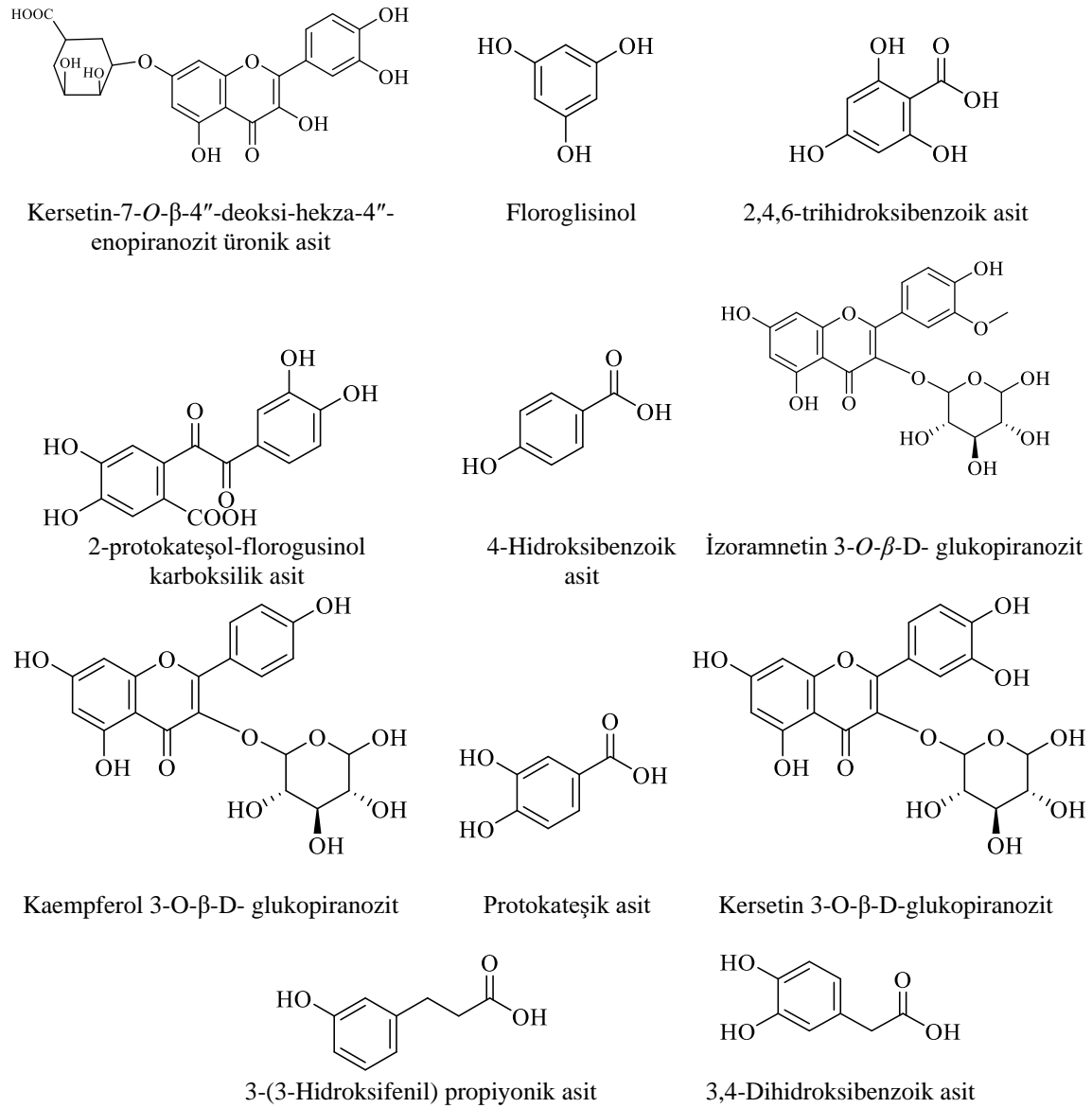
Tez çalışmasında kullanılan kersetin ve hesperidin flavonoid yapısındaki bileşiklerdir. Bu bileşikler ile ilgili olarak literatürde bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Kersetin'le yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmaları farklı yöntem ve materyaller kullanılarak gerçekleştirilmiştir. kersetin'in *Eucalyptus perfiniana* bitki hücre kültürü ortamı (Kasai vd., 2007), *in vitro* olarak oluşturulmuş yapay GİS sistem (Khairallah vd., 2018) ve fungustan izole edilmiş enzim sistemleri kullanılarak dönüşüm tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (Guan vd., 2017).

Kersetin'in GİS mikrobiyotasında gerçekleşen dönüştürülen tepkimeleri sonucunda homoproteşik asit olarak da bilinen 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 3-(3-hidroksifenil) propiyonik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik asit dönüşüm metabolitleri gözlenmiştir. Bu dönüşümlerden sorumlu suşlar *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium ramulus*, *Streptococcus* S-2, *Lactobacillus* L-2, *Bifidobacterium* B-9 ve *Bacteroides* JY-6'dır (Santangelo vd., 2019). Mikrobiyal transformasyonda kersetin'in substrat olarak kullanıldığı çalışmalar Tablo 2.3'te derlenmiştir. Şekil 2.5'te ise kersetin'in metabolitlerinin molekül formülleri yer almaktadır.

Tablo 2.3. *Kersetin'in mikrobiyal transformasyon çalışmaları*

Substrat	Katalizör	Metabolit	Referans
Kersetin	<i>Rhizobium loti</i> NZP2042 <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Lotus)	Floroglisinol Protokateşik asit	(Rao vd., 1991)
Kersetin	<i>Gliocladium deliquescens</i> NRRL 1086	2-Protokateşol-florogusinol karboksilik asit 2,4,6-Trihidroksibenzoik asit Protokateşik asit	(Xu vd., 2017)
Kersetin	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245	Kersetin 3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozit Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D- glukopiranozit İzorannetin 3- <i>O</i> - β -D- glukopiranozit	(Zi vd., 2011)
Kersetin	<i>Bacillus cereus</i>	Protokateşik asit İzokersitrin	(Rao ve Weisner, 1981)
Kersetin	Bağırsak mikrobiyotası <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Eubacterium ramulus</i>	Protokateşik asit 3- (3-Hidroksifenil) propiyonik asit 3,4-Dihidroksibenzoik asit 4-Hidroksibenzoik asit	(Santangelo vd., 2019)
Kersetin	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	Kersetin-7- <i>O</i> - β -4"-deoksi-hekza-4"- enopiranozit üronik asit	(Ma vd., 2013)



Şekil 2.5. Kersetin metabolitleri

Hesperidin mikrobiyal transformasyon çalışmaları da literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalarda Hesperidin'den daha etkili ve biyoyararlanımı daha yüksek yeni bir doğal ürün eldesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda funguslar, funguslardan izole enzimler veya gen transfer yöntemleri ile gerçekleştirilen biyoteknolojik yöntemler kullanılmıştır (Ferreira vd., 2013; Shen vd., 2010). İzole hesperidin ya da daha çok narenciye kabuk ekstralarında bulunan hesperidin'in funguslardan izole enzimlerle hangi miktarda hesperetin'e dönüştüğü ve verimleri araştırılmıştır (Madeira ve Macedo, 2015; Minig vd., 2011; Piñuel vd., 2013). Mikrobiyal transformasyon için tercih edilen bir diğer yöntem de insan deneklerine

hesperidin verilerek feçes yoluyla dönüşümlerin analizidir (Amaretti vd., 2015). Bu çalışmaların dışında hesperetin'in farklı şeker grupları ile yapmış oldukları konjugatların *Ipomoea batatas* (L.) Lam. ve *Eucalyptus perriniana* F.Muell. ex Rodway iki farklı bitki hücre kültürü içerisinde hesperetin yapısına dönüşümleri araştırılmıştır (Shimoda vd., 2008).

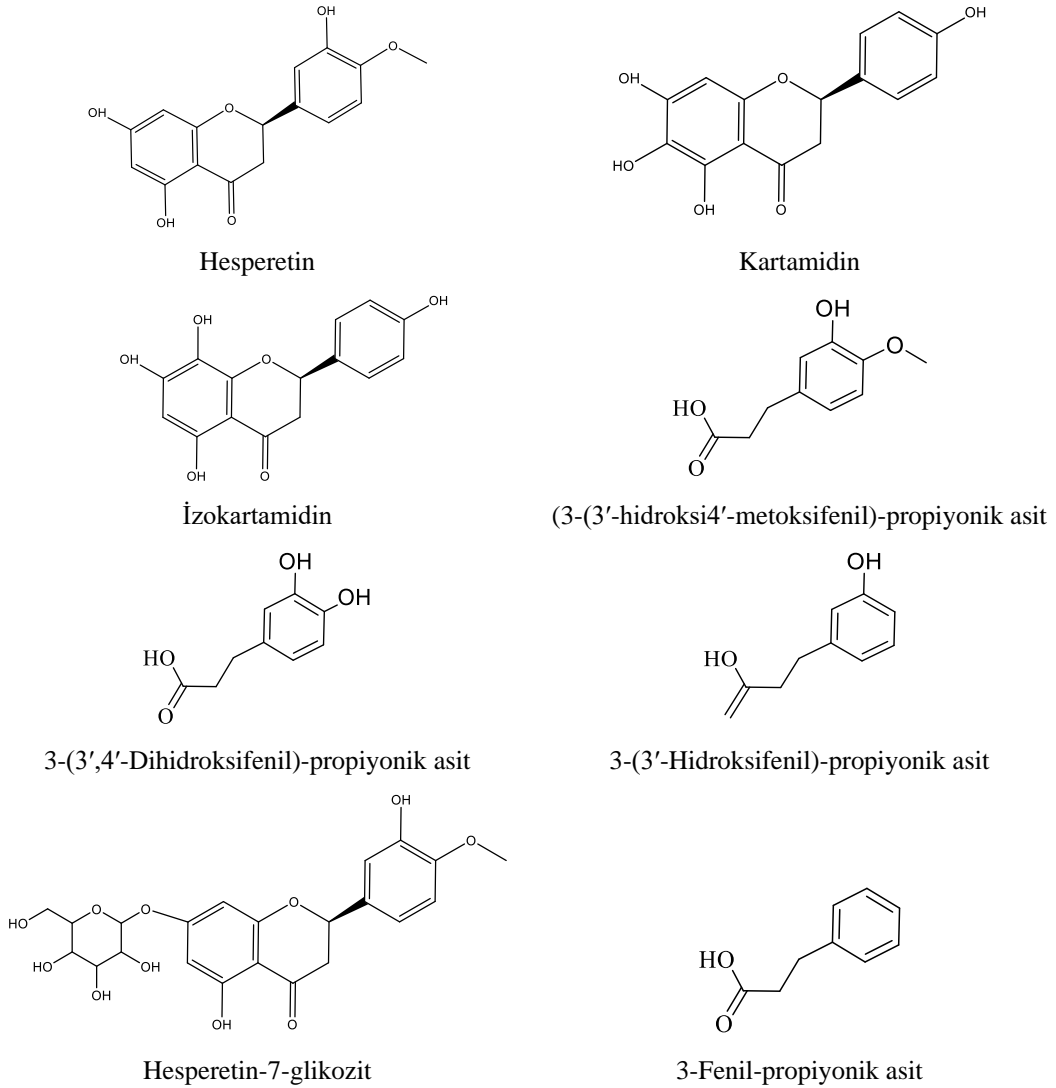
Literatürde hesperidin'in mikrobiyal transformasyonunda kullanılan mikroorganizmalar, substratlar, elde edilen metabolitler ve aktivite çalışmaları Tablo 2.4'te sunulmuştur. Yapılan bu çalışmalarda yapı tayini için çoğunlukla YBSK yöntemi kullanılmıştır. Metabolit izolasyonu ve yapı tayini dışında tanımlı bileşiklerin miktarlarındaki değişimler ve bunların biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Şekil 2.6'da ise hesperidin'in metabolitlerinin molekül formülleri yer almaktadır.

Tablo 2.4. Hesperidin mikrobiyal transformasyon tepkimeleri

Substrat	Katalizör	Metabolit	Aktiviteler	Referans
Brezilya Narenciye kabuk ekstresi	<i>Paecilomyces variotii</i>	Hesperetin	Total fenol, DPPH, ORAC, hücre kültürü (Yağ dokusunda lipoksijenaz için)	(Nakajima vd., 2016)
Brezilya narenciye kabuk ekstresi	<i>Paecilomyces variotii</i>	Hesperetin	DPPH, ORAC	(Madeira vd., 2014)
Brezilya narenciye kabuk ekstresi	<i>Paecilomyces variotii</i>	Hesperetin	MTT Anti-enflamatuvar	(Nakajima vd., 2017)
Hesperidin	1. <i>Aspergillus terreus</i> (NCIM 657) 2. <i>A. flavus</i> (MTCC 1783) 3. <i>A. ochraceus</i> (NCIM 1140) 4. <i>Cunninghamella elegans</i> (NCIM 689) 5. <i>C. blakesleeana</i> (MTCC 3729) 6. <i>C. echinulata</i> (MTCC 4279) 7. <i>Rhizopus stolonifer</i> (NCIM 880) 8. <i>Gliocladium roseum</i> (NCIM 1064)	Hesperetin	-	(Dodda vd., 2012)

Tablo 2.4. (Devam) *Hesperidin mikrobiyal transformasyon tepkimeleri*

Substrat	Katalizör	Metabolit	Aktiviteler	Referans
Naringin Hesperidin Baicalin Luteolin	<i>Streptomyces griseus</i> (ATCC 13273)	Naringenin-7-O- glikozit Naringenin Hesperetin Baicalein Baicalein-6-metil eter Krisoeriol	-	(Wang vd., 2005)
Hesperidin Hesperitin	<i>Bifidobacterium longum</i> (R0175) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> (NCTC 10302)	(3-(3'-Hidroksi4'- metoksifenil)- propiyonik asit 3-(3',4'- Dihidroksifenil) propiyonik asit 3-(3'-Hidroksifenil)- propiyonik asit 3-Fenil-propiyonik asit	-	(Pereira- Caro vd., 2018)
Hesperidin	<i>Rhodotorula glutinis</i> (AM242) <i>R. glutinis</i> (KCh735) <i>R. rubra</i> (AM4) <i>R. rubra</i> (AM82)	Kartamidin İzokartamidin	-	(Sordon vd., 2016)
<i>Citrus sinensis</i> L. var. <i>Navel</i> <i>late</i> (Huelva, İspanya) meyve suyu	Mikrobiyotadan izole <i>Pichia</i> <i>kluveri</i>	Hesperetin-7-O- glikoz Hesperetin	Toplam fenol miktarı Askorbik asit miktarı DPPH, FRAP, ORAC, TEAC	(Escudero- Lopez vd., 2016)
<i>Citrus sinensis</i> L. var. <i>Navel</i> <i>late</i> (Huelva, İspanya) meyve suyu	Mikrobiyotadan izole <i>Pichia</i> <i>kluveri</i>	Hesperetin	Toplam fenol miktarı Askorbik asit miktarı DPPH, FRAP, ORAC, TEAC	(Escudero- Lopez vd., 2013)
Hesperidin	İnsan feçes florası	Hesperetin	Anti-enflamatuvar, Antioksidan, Antibakteriyal, Antikanser	(Kim vd., 1998)



Şekil 2.6. Hesperidin metabolitleri

2.8. Enzimatik Transformasyon

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen ve tüm yaşamsal süreçleri için gerekli olan, metabolik biyokimyasal tepkimeleri katalize etmek için kullanılan protein yapısındaki bileşiklerdir. Enzimatik transformasyon ise enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı tepkimelerdir. Bu çalışmalar sentetik işlemlerdeki kimyasal katalizörlerin yerine, doğal katalizör olarak enzimler tercih edilmektedir (Novozymes, 2021; Yamada ve Shimizu, 1988).

Enzimler, dar bir pH ve sıcaklık aralığında, uygun ortam koşullarında, katalizör etkileri sayesinde çok daha hızlı bir şekilde tepkimenin gerçekleşmesini sağlayan protein yapılarıdır.

Enzimin yapısına bağlı olarak iyonik çözücülerde veya organik deney ortamında tepkimeler gerçekleşmektedir. Laboratuvar çalışmalarında deney ortamında enzimin yapısı etkili olurken; basit apareylerle ve daha kolay uygulanabilir prosedürler kullanılmaktadır. Ayrıca kullanılan bazı enzimlerin yardımcı çözücülere daha iyi tolerans gösterebilmesi suda çözünürlüğü düşük olan bileşikler için avantaj sağlamaktadır (Yamada ve Shimizu, 1988).

Tepkime ortamının optimum şartlarının sağlanmasının daha kolay olması, yan ürünler olmadan yüksek verimde metabolit üretilebilmesi enzimatik transformasyonun kimyasal tepkimelere karşı önemli avantajlarından. Uygulanan transformasyon yöntemleri, biyolojik aktivitesi olan bileşiklerin üretiminde yenilik ve sürdürülebilirlik açısından da avantajlıdır (Novozymes, 2021; Xanthakis vd., 2010). Yapılan çalışmalar sonucunda enzimatik transformasyon birçok alanda giderek daha önemli bir yöntem haline gelmekte olup endüstriyel ölçekte de proseslerin geliştirilmesine imkan tanımaktadır. Bu çalışmalara verilebilecek en güzel örneklerden birisi penisilinin üretimidir (Yamada ve Shimizu, 1988).

Enzimlerin katalizör olarak kullanımı, kimya endüstrisinde köklü bir teknolojidir. Katalizör olan enzim bir tepkimenin aktivasyon enerjisini (E_a) düşürerek çalışır, böylece tepkime hızını önemli ölçüde artırır. Sonuç olarak metabolitler daha hızlı oluşur ve tepkimeler daha hızlı denge durumuna gelir. Tüm katalizörlerde olduğu gibi, enzimler katalize ettikleri tepkimeler tarafından tüketilmezler ve tepkimelerin dengesini değiştirmezler. Bununla birlikte enzimler, substratları için oldukça spesifik olmaları bakımından diğer katalizörlerden farklıdır (Novozymes, 2021).

Biyotransformasyon çalışmalarında enzimlerin diğer avantajları, tekli stereoizomerlerin üretiminde yüksek seçiciliğe sahip olması, daha az tepkime ara basamağı içermesi, yeniden işleme ve saflaştırma adımlarına sahip olması, daha kolay metabolit izolasyonu gerçekleştirilebilmesi, düşük maliyetli oluşu ve daha az çevre kirliliği oluşturmasıdır (Novozymes, 2021).

Flavonoidlerin enzimatik transformasyon çalışmalarında enzimlerin konsantrasyonu, enzimin bulunduğu sınıf, flavonoidlerin yapısı, optimum şartlar (sıcaklık, substrat ve çözücü) etkili olmaktadır. Bu duruma ek olarak enzim immobilizasyonunda son yıllarda çok güçlü cihazlarla enzim stabilizasyonu ve susuz ortamda regioselektif etkili enzim modifikasyonları sayesinde maliyet düşürülmüştür (Viskupičová vd., 2009).

Enzimatik transformasyon enzimlerin elde edilmesinin kolay olması, düşük maliyetli oluşu, farklı yapıdaki birçok bileşik ile tepkime verebilmesi, kofaktöre gerek olmaksızın substratın yapısının değiştirilerek fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin

iyileştirilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı laboratuvar ve endüstriyel çalışmalarda ilgi görmektedir (Wang vd., 2010). 1980 ve 1990'lı yıllarda enzim mühendisliğinin gelişmesiyle endüstriyel çapta farmasötik ve iyi kimya uygulamalarına göre yapısal olarak oldukça farklı metabolitler elde edilmeye başlanmıştır (Cano-Flores vd., 2020; Choi vd., 2015). Endüstriyel çapta enzim pazarının %90'dan fazlasını hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Hidrolitik enzimler en çok deterjan, yem, şeker üretimi, biyoetanol, yiyecek ve içecek endüstrilerinde kullanılmaktadır. Hidrolaz sınıfının alt grubunda yer alan lipazlar, proteazlar ve glikozidazlar gibi hidrolitik enzimler, %90'ın üzerinde pazar payıyla en önemli ticari enzimler olarak karşımıza çıkmaktadır (Blamey vd., 2017). Endüstride kullanılan enzimlerin izole edildikleri mikroorganizmalar ve bazı kullanım alanları Tablo 2.5'te verilmektedir (de Carvalho, 2011; Patel, 2018; Solano vd., 2012).

Tablo 2.5. Endüstride kullanılan enzimler, izole edildiği mikroorganizmalar ve kullanım alanları (Cano-Flores vd., 2020)

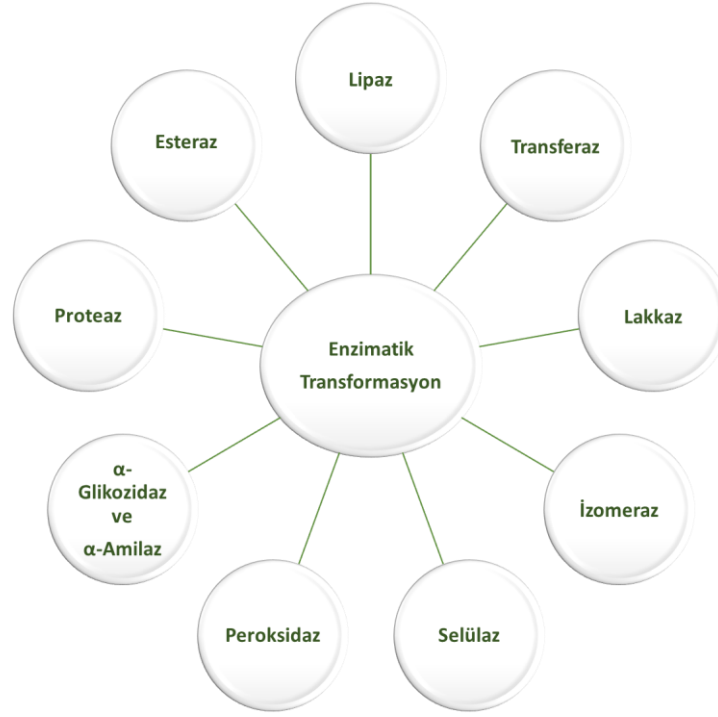
Mikrobiyal Enzimler	Mikroorganizma	Kullanım Alanı
α -Amilaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. licheniformis</i>	Piştirme, demleme, nişasta sıvılaştırma Meyve suyunun arıtılması Tekstil endüstrisi Kağıt endüstrisi
Glikoamilaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. awamori</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Bira üretiminde Konsantre glikoz ve früktoz şurupları
Proteazlar	<i>A. usami</i>	-
Laktaz (β -Glikozidaz)	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>K. fragilis</i>	İnsanların laktoz intoleransının azaltılmasında Prebiyotik gıdalarda
Lipaz	<i>Candida antarctica</i> <i>C. cylindraceae</i> Ay30 <i>Helvina lanuginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Peynirin tadını iyileştirmek Tıbbi uygulamalar Kozmetiklerde Biyosensör olarak kullanımı Biyodegradasyonda kullanımı
Fosfolipaz	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Peynirin tadını iyileştirmek

Tablo 2.5. (Devam) Endüstride kullanılan enzimler, izole edildiği mikroorganizmalar ve kullanım alanları (Cano-Flores vd., 2020)

Mikrobiyal Enzimler	Mikroorganizma	Kullanım Alanı
Lakkaz	<i>Funalia trogii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>A. niger</i>	Şaraptan polifenolik bileşenlerin uzaklaştırılması
Pektinaz	<i>A. wentii</i> <i>Rhizopus</i> sp.	Meyve suyunun artırılması
Esteraz	<i>Bacillus licheniformis</i>	Meyve suyunun koku ve tadının iyileştirilmesi
Ksilanazlar	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>A. niger</i>	Meyve suyunun artırılması Biranın kalitesinin artırılması
Glikoz oksidaz	<i>Penicillium glaucum</i> <i>P. adametzzi</i> <i>A. niger</i>	Yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak
Katalaz	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Psychrobacter piscatorri</i>	Yiyeceklerin korunması
Peroksidaz	<i>Streptomyces viridosporus</i>	Yiyeceklerin besin katilesi, rengi ve tadının iyileştirilmesi

Flavonoitler yapılarındaki kimyasal heterojenlik, etki mekanizmalarının, biyoyararlanımlarının ve farmakokinetik özelliklerinin değişmesi nedeniyle biyolojik aktivitelerinin araştırılmasını gerektirmektedir. Bileşiklerin stabilite ve düşük çözünürlükleri biyolojik aktivitelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Karşılaşılan bu sorunlardan dolayı, spesifik modifikasyonlar uygulanarak fizikokimyasal özellikleri iyileştirilmektedir. Bileşiklerin özelliklerinin iyileştirilmesi ve uygulama alanlarının genişletilmesi için kimyasal, enzimatik veya kemo-enzimatik modifikasyon yöntemleri tercih edilmektedir (Xanthakis vd., 2010). Tepkimelerin gerçekleşmesinde Van der Waals ve hidrojen bağlarında meydana gelen değişimler söz konusuysen, kimyasal çalışmalarda termal enerjiden yararlanılmaktadır (Yamada ve Shimizu, 1988).

Flavonoitlerin enzimatik transformasyonu için lipaz, transferaz, izomeraz, esteraz ve proteaz gibi çeşitli enzim grupları tercih edilmektedir. Flavonoitlerin enzimatik transformasyonunda kullanılan enzimler Şekil 2.7’de yer almaktadır.



Şekil 2.7. Flavonoitlerin enzimatik transformasyonunda kullanılan enzimler

Bu çalışmalarda yaygın kullanıma sahip enzim lipazdır (Wang vd., 2010). Enzimatik transformasyon çalışmalarını ele alacak olursak;

- **Lipaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:**

Lipazlar (triasilgliserol asilhidrolaz, EC 3.1.1.3.) serin hidrolazlar sınıfında yer almaktadır. Lipazlar hidroliz, inter-esterifikasyon, alkoliz, asidoliz, esterifikasyon ve aminoliz dahil olmak üzere birçok farklı tepkimede katalizleyici olarak rol almaktadırlar (Vakhlu, 2006). Günümüzde lipaz enzimi endüstride kullanımı en yaygın enzimdir. Lipazların gıda, agrokimya, oleokimya, farmasötik gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Lipazlar kendi aralarında pankreatik lipaz, fungal lipazlar (*Candida rugosa*, *Rhizomucor* ailesi) ve bakteriyel lipazlar (*Staphylococcus* ve *Pseudomonas* ailesi) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadırlar (Viskupičová vd., 2009). Lipaz enzimi hidrofobik bir yüzey ile karşılaştığında aktivasyonda ciddi bir artış gözlenmektedir. Tepkime süreci birçok farklı basamaktan oluşmaktadır. Bunlar yüzeyler arası etkileşim, konformasyonda değişim, yüzeyler arası penetrasyon ve lipaz enziminin kendi keline katalize etmesi ile süreç sona ermektedir. Bu süreç zarfında ortam koşulları da etkileyici olmaktadır. Eğer ortamda su yok denilecek kadar az ise tersine tepkime durumu söz konusu olmaktadır. Flavonoitlerle gerçekleşen tepkime mekanizması esterleşme üzerine olmaktadır (Viskupičová vd., 2009).

Flavonoitlerin lipaz enzimi ile transformasyonunda en yaygın kullanılan *Candida antarctica*'dan izole edilen lipaz B (CALB) enzimidir. Bu kapsamda rutin ve izokersitrin ile çalışılmıştır. Deney sonucunda iki bileşiğinde aglikon kısmında hidrojen bağı ile hidrofobik kısımlar arasında stabil olarak 4'-OH ve 6'-OH gruplarından asetilasyon gerçekleşmiştir (de Oliveira vd., 2009).

Pseudomonas cepacea'dan izole edilen lipaz enzim ile yapılan çalışmalarda da 3'-OH, 5'-OH ve 7'-OH konumlarında bulunan hidroksiller ile asetilasyon gerçekleşmektedir (Chebil vd., 2006).

Literatürde enzim immobilasyonu susuz ortamda stabilitesinin sağlanabilmesi ve bölgesel bir seçiciliğinin olması gibi enzim özelliklerinden dolayı oldukça avantajlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Lipaz enzimi ile gerçekleştirilen bu dönüşümlerde substratın karbon zincir uzunluğu, deneyin gerçekleştiği ortam koşulları, açıl grubunun etkileşime girebileceği substitüye grubun konumu elde edilecek yeni metabolit/lerin yapısında sıklıkla etkili olan faktörlerdir. İki farklı ortam koşulunda yapılan deneysel çalışmalarda iyonik ortamda tepkimeye girme oranı organik çözücülü ortama göre 4 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda da en yüksek verimin kısa zincirli asil grupları ile sağlandığı belirtilmiştir (Wang vd., 2010).

- **Transferaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:**

Transferaz enzimi EC sınıflandırmasında sınıf 2'de yer almaktadır. NovQ, prenil flavonoitlerinin biyotransformasyonunda başarılı bir rol oynamaktadır. Preniltransferaz enzimi sayesinde flavonoitlerin B halkasında yer alan dimetil allil transferi gerçekleşmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalardan birisinde naringenin ve genistein bileşenlerinin B halkasındaki 3'-OH ve 4'-OH dimetil allil gruplarının transferi ile yeni metabolitler elde edilmektedir (Ozaki vd., 2009).

Enzimatik glikozilasyonda kullanılan glikozil transferaz enzimi sayesinde flavonoit ve aglikon yapılarına göre suda çözünürlüğü ve stabilitesi daha yüksek bileşikler elde edilmektedir (Xiao vd., 2009). Flavonol yapısındaki kersetin beş hidroksil grubu bulundurmaktadır. Bu grupların birisi veya daha fazlasının glikozillenmesi ile bileşiğin çözünürlüğü ve stabilitesi artış göstermektedir (Haddad vd., 2006). Hesperidinaz enziminin hesperidin-7-glikozit ile tepkimeye girmesi ince bağırsaktan kolona kadar olan bölgede bileşiğin absorpsiyonunu düşürmektedir.

- ***İzomeraz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:***

İzomeraz enzimi EC sınıf 5'te yer almaktadır. Flavonoidlerin doğadaki biyosentez sürecinde kalkon izomeraz enziminin rol almaktadır. Bu enzim kalkon kimyasal yapısını flavonona katalizleyerek siklizasyonundan görevli enzimdir. 2(S)-Naringenin ve 2(S)-5-deoksiflavanon kimyasal yapılarının 6'-deoksikalkon ve kalkon dönüşümünden sorumludur (Ozaki vd., 2009)

- ***Lakkaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:***

Myceliophthora' dan izole edilen lakkaz enzimi (EC: 1.10.3.2), rutin substratı ile iki farklı deney ortamında (metanol ve tampon çözeltisi) hazırlanıp enzimatik transformasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Rutin ile karşılaştırıldığında elde edilen metabolitlerin fizyolojik özellikleri açısından daha etkili oldukları gözlenmiştir (Kurisawa vd., 2003).

Lakkaz enzimi yapılan başka bir çalışmada deney ortamında jelatin varlığında kateşinin oksidasyonunu katalize ederek kateşin-jelatin konjugatının sentezlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Chung vd., 2003). Elde edilen bu konjugat yapısı süperoksit anyon radikallere karşı iyi bir süpürücü aktivite gösterirken; insanlardaki düşük dansite lipoprotein oksidasyonu üzerinde inhibe edici etki göstermektedir.

- ***Peroksidaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:***

Armoracia rusticana' dan izole edilen peroksidaz enzimi (EC: 1.11.1.7) amin grubuna oktahedral silseskioksan substitüye olarak bulunan yeşil çaydaki kateşin'in konjugasyonunu katalize etmede kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen metabolit ile substratın biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleşmiştir. Bu kapsamda ksantin oksidaz ve süperoksit anyon radikal aktiviteleri değerlendirilmiş olup metabolitin substrattan daha etkili olduğu bulunmuştur (Ihara vd., 2005).

- ***Selüloz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:***

Pentinolitik ve selüloolitik selülozlar (EC: 3.2.1.4.) ana halka ve yan halka yapısındaki polisakkarit hidroliz aktiviteleri için karakteristiktir (Mandalari vd., 2006).

Ticari olarak bulunan *Trichoderma viride*' dan elde edilen selüloz preparatlarının glikozil yapısı olarak dekstrinin kullanıldığı (+)-kateşin ve (-)-epigallokateşin gallat karışımında transglikozilasyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Bazı (-)-epigallokateşin türevleri biyokatalizör olarak selüloz enziminin kullanılması ile hazırlanmaktadır. Hazırlanan bu türevlerden birisi olan 5-O- α -D-glikopiranozit çok yüksek sıcaklıklarda stabil

ve çözünürlüğü yüksek olup astrenjandır. Aglikon yapısından daha fazla stimüle edici astrenjan etki göstermektedir. (Noguchi vd., 2008).

- ***Proteaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:***

Proteazlar (EC 3.4.21.62), uluslararası sınıflandırma sisteminde "Hidrolazlar" sınıfında yer almakta olup proteinlerin yapısında bulunan ve amino asitleri birbirine bağlayan peptid bağlarının, bir su molekülünün tepkimeye katılımıyla hidrolizini sağlayarak proteoliz tepkimesini gerçekleştirmektedir. Bu tepkimelerin gerçekleşmesi sonucu amitlerin seçici hidrolizi, düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin oluşumu ve transesterifikasyonlar gözlenmektedir (Novozymes, 2021; Tacias-Pascacio vd., 2020). Bu enzimler, bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda olmak üzere çok geniş bir yayılım göstermektedir (Viskupičová vd., 2009).

Proteazlar, enantiyomerik formdaki bileşiklerin kompetatif olarak tepkimeye girdiği çalışmalarda da kullanılabilir. Proteaz katalizörleri, enantiyomerleri, karboksilik asit esterlerinin veya amitlerinin hidrolizini yaparak, esterleştirme veya transesterifikasyon tepkimeleri ve amit/peptid bağı oluşumu gibi çeşitli tepkimeleri gerçekleştirmektedir (Novozymes, 2021).

Proteazlar, fonksiyonel grupların aktif bölgelerine göre; serin proteaz (subtilisin), aspartik proteaz, sistein proteaz ve metalloproteaz olarak sınıflandırılmaktadır. Proteazlar fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin çoğunda kritik rol oynarken, aynı zamanda deterjan ve gıda endüstrisinde de temel olarak geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır (Viskupičová vd., 2009). İlaç endüstrisinde ve biyoteknolojide de oldukça kapsamlı kullanım alanı bulunmaktadır (Tacias-Pascacio vd., 2020; Viskupičová vd., 2009).

Proteaz sınıfında yer alan alkalaz enzimi (EC: 3.4.21.62), serin endo-peptidaz ve subtilisin A olmak üzere üç şekilde isimlendirilmektedir. Uygulama alanları, amino esterlerin stereoselektif hidrolizi ve ester gruplarına karşı seçicilik gibi uygulamaları karşımıza çıkmaktadır. Bazı esterlerin stereoselektif hidrolizini katalize etmesini sağlayan bir esteraz görevi görür. Alkalaz ayrıca heterosiklik amino esterlerini verimli bir şekilde hidrolize eder (Novozymes, 2021).

Serin proteazlar aktif bölgelerinde, substrat bağlanması ve bölünmesi için gerekli olan bir serin grubu içermektedir. Serin proteazlar, geniş substrat spektrumları ile karakterize edilir. Esteraz ve amidaz aktivitelerini içerecek şekilde saf peptidaz tepkimeleri de gözlemlenmektedir. Yaygın olarak gerçekleşen tepkimesinde bir nükleofil olarak serin, bir elektrofil olarak aspartat ve bir baz olarak histidin içeren katalitik merkez şeklindedir.

Tepkime mekanizması, amino asit veya peptit kısmının parçalanması ile sonuçlanan asilasyon yoluyla kovalent olarak bağlanmış enzim-substrat ara ürününün oluşumunu içermektedir. Su ile nükleofilik tepkime sonucunda, deasilasyon oluşur ve böylece peptidin hidrolizi gerçekleşmiş olur (Novozymes, 2021).

Flavonoitlerin enzimatik transformasyon çalışmalarında ilk kullanılan enzim, proteaz subtilisin enzimidir (Viskupičová vd., 2009). Proteaz enzimi ile ilgili olarak flavonoitlerden rutinoz disakkarit, monoglikozitlerin susuz piridin çözücüsü içerisinde subtilizin proteazın katalitik aktivitesi ile açılasyon işlemi gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Bu açılasyon tepkimesi ile rutin glikoza parçalanması sonucu yüksek verimlilikte tek bir monoester yapısı elde edilmiştir. Ayrıca subtilizin kullanılarak yüksek seçicilikte modifikasyon tepkimesi elde edilmektedir.

Triglikozit yapısındaki flavonoitler için glikozun parçalanması düşük verimde gerçekleşmektedir. Flavonoitlerin açılasyonunda enzimlerin tepkime üzerinde özellikle regioselektif etkisi bulunmaktadır (Xiao vd., 2005).

Xiao ve diğerleri tarafından *Bacillus subtilis*'den elde edilen alkalın proteaz enzimi (Novozyme 435) ile piridin ortamında 3''-O-substitüye vinil rutin esterleri ve tert-bütanol ortamında 4''-O-substitüye vinil rutin esterleri elde edilmiştir (Xiao vd., 2005).

- **Esteraz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:**

Esteraz enzimi (EC 3.1.1.1) karbonil esteraz sınıfında yer almaktadır. Tepkime mekanizması olarak lipazla aynıdır. Ancak substrat olarak kısa zincirli yağ asitlerini tercih ederken lipazlarda genellikle uzun zincirli yağ asitleri tercih etmektedir. Bu açıdan farklılık göstermektedir. İki enzim arasındaki diğer bir fark ise yüzeyler arasındaki aktivasyondur (Viskupičová vd., 2009).

Esterazların sınıflandırılmasının temeli substratın asit parçasına göre karboksil estereaz, aril esteraz, asetil esteraz gibi spesifik olmasıyla ilişkilidir. Laboratuvar uygulamalarında esteraz enzimi ile çalışmak çok pratik değildir. Bunun nedeni ise esterazların sadece asetat, propiyonat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitler üzerinde etkili olmasıdır (Viskupičová vd., 2009).

- **α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzimi ve Yapılan Çalışmalar:**

Vücudumuza alınan makromoleküllerden karbohidrat, lipit ve polipeptitlerin sindirimin %70'ten fazlası bağırsaklarda gerçekleşmektedir (Martinez-Gonzalez vd., 2017). Makromoleküllerden karbohidratların sindiriminden α -glikozidaz (EC 3.2.1.20) ve α -amilaz (EC 3.2.1.1) enzimleri sorumludur (Martinez-Gonzalez vd., 2017). Bu enzimlerin çalışma

mekanizması karbohidratların yapısındaki α -glikozidik bağların hidrolizi ile ilgilidir (Martinez-Gonzalez vd., 2017).

α -Amilaz enzimi insan tükürük ve pankreas salgısında izomer formlarında bulunurken α -glikozidaz enzimi ise ince bağırsakta bulunmaktadır. Her bir α -glukozidaz izoformu biri maltaz-glukoamilaz ve diğeri sükroz-izomaltaz aktivitesine sahiptir. Maltaz-glukoamilaz formu hidrolitik ortamda daha yüksek bir aktiviteye sahiptir (Martinez-Gonzalez vd., 2017).

3. YÖNTEM

3.1. Materyal Temini

Deneysel çalışması kapsamında Kersetin (Sigma-Aldrich) ve Hesperidin (Sigma-Aldrich) bileşikleri firmadan satın alındı. Bu iki bileşik mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmalarında substrat olarak kullanıldı.

3.2. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1. *Kullanılan kimyasallar*

Kimyasal Malzeme	Firma
1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil	Sigma-Aldrich
<i>Artemia</i> yumurtaları	Artemio®Pur JBL
Asetonitril	Sigma-Aldrich
Anisaldehit	Emboy
Asetik asit	Carlo erba
Aseton	Sigma-Aldrich
Dietil eter	Sigma-Aldrich
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Emetin hidroklorür	Sigma- Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Etil asetat	Sigma-Aldrich
Formik asit	Merck
Gallik asit	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hekzan	Sigma-Aldrich
Kersetin	Sigma-Aldrich
Lakkaz	Novozyme
Linoleik asit	Sigma-Aldrich
Lipooksijenaz (Soybean)	Fluka-BioChemika
Metanol	Sigma-Aldrich
Nordihidroguayaretik asit (NDGA)	Fluka-BioChemika
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum asetat	Carlo erba

Tablo3.1. (Devam) Kullanılan kimyasallar

Sodyum bifosfat dihidrat	Sigma-Aldrich
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	Sigma-Aldrich
Su (YBSK kalitesinde)	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit	Carlo Erba
Toluen	Merck

3.3. Deneysel çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında mikrobiyal ve enzimatik transformasyon, kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (İTK), preparatif İTK, yapı tayininde, antioksidan, enzim inhibisyon ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan cihazlar ve apareyler Tablo 3.2’de yer almaktadır.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve apareyler

Cihaz ve Aparey	Firma
Etüv	MMM Medcenter (37°C)
Çalkalayıcı	IKA KS 269 Basic
HPTLC	Camag
Mcfarland Densitometre	Biosan
Mikroplak okuyucu	BioTek Power Wave XS
Multikanal pipetör	Eppendorf
OBSK	Büchi Sepacore X10
NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Cihazı	Bruker, UltraShield 300 MHz, ABD
Otoklav	HMC Hirayama
Rotavapor	Heidolph
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	Shimadzu 20A Prominance
Su banyosu	GFL® 1086
Steril kabin	Class Bio II
pH Metre	Ohaus, Starter 3100M
UV okuyucu	Camag
UV Lamba	Camag
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex

3.4. Araştırma Yöntemleri

3.4.1. Mikrobiyal transformasyon

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında bakteri, maya ve mantarlardan oluşan 25 mikroorganizma kullanıldı. Deney kapsamında kullanılan mikroorganizmalara ait bilgiler Tablo 3.3'te yer almakta olup kod olarak belirtilen sütun Anadolu Üniversitesi Farmakognosi Laboratuvarı mikroorganizma kültür koleksiyonundaki kodlama sistemidir. Mikroorganizmaların temin edildiği firma/kurumlar mikroorganizma adlarının yanında belirtildi.

Tablo 3.3. Mikrobiyal transformasyonda kullanılan suşlar

No	Kod	Mikroorganizma
1	DK-A	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>clausii</i> (ATCC 9799)
2	DK-B	<i>Bacillus coagulans</i> (SNZ 1969)
3	DK-C	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>notto</i> (BN)
4	DK-D	<i>Lactobacillus fermentum</i> (CECT-5716)
5	DK-E	<i>Lactobacillus rhomnosus</i> (GG)
6	DK-F	<i>Streptococcus thermophilus</i> (TH-Ç)
7	EO	<i>Rhizopus stolonifer</i> (MF461023)
8	F-9	<i>Aspergillus parasiticus</i> (NRRL 2999)
9	F-10	<i>Aspergillus niger</i> (NRRL 326)
10	F-11	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 10549)
11	F-12	<i>Aspergillus alliaceus</i> (NRRL 317)
12	F-15	<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 9807)
13	F-17	<i>Penicillium claviforme</i> (MR 376)
14	F-21	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NRRL 792)
15	F-22	<i>Fusarium solani</i> (ATCC 1284)
16	F-24	<i>Fusarium culmorum</i> (Fen FAK.)
17	F-27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)
18	F-31	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> (ATCC 11385)
19	F-35	<i>Alternaria alternata</i> (NRRL 20593)
20	F-40	<i>Neurospora crassa</i> (Regensburg)
21	F-57	<i>Aspergillus niger</i> (NRRL 567)
22	F-69	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (E 446)
23	F-92	<i>Penicillium valentinum</i> (Fen. Fak. Biyo.)
24	F-93	<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i> (Fen. Fak. Biyo.)
25	F-98	<i>Aspergillus nidulans</i> (Abraham)

3.4.1.1. Mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışmaları

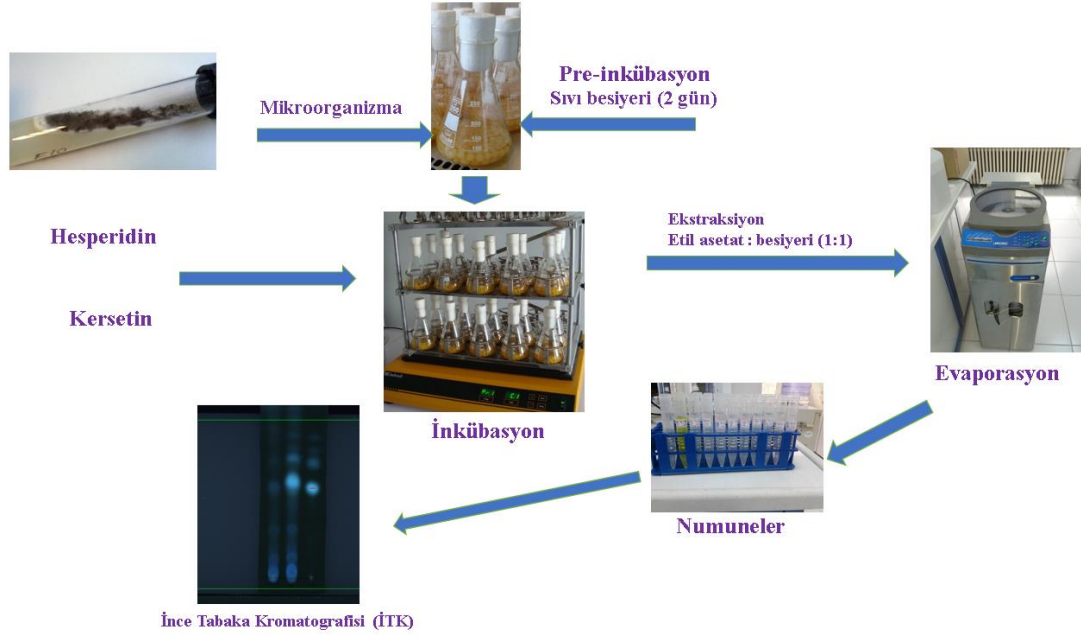
Çalışmada kullanılan kültürler, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki -80°C'de muhafaza edilen kültür koleksiyonundan temin edildi. Koleksiyondan alınan bakteriler daha önce steril edilen Mueller Hilton Agara (MHA) (Sigma M-9552) ekimi yapıldıktan sonra gelişen bakteriler Muller Hilton Broth (MHB) (Merck 1.10293) sıvı besiyerlerine ekildi. Eş zamanlı olarak funguslar önce yatkın agar daha sonrasında da α -medium sıvı besiyerlerine ekildi (Özşen, 2017).

Ön deneme çalışmaları kapsamında her mikroorganizma için sadece besiyeri ve mikroorganizma bulunan kör olarak adlandırılan erlenlerde hazırlandı. Ön deneme çalışmalarına ait şema Şekil 3.1'de yer almaktadır. Substratlar (kersetin ve hesperidin) için birer erlen içeriğinde besiyeri, mikroorganizma ve substrat (5 mg/mL) olacak şekilde hazırlandı. Bu şekilde ön hazırlıkları tamamlanan erlenler otoklavlandı. Otoklavlama işlemi sonrasında oda sıcaklığına getirilmiş erlenlere steril kabin ortamında daha önce katı besiyerinde aktive edilmiş mikroorganizmadan ekim yapıldı.

Bu şekilde ekimi gerçekleştirilen mikroorganizma içeren erlenler 25°C'de 120 rpm ayarlı çalkalamalı inkübatör ortamında funguslar 3, bakteriler 1 gün pre-inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların yeterince büyümesi sağlandıktan sonra steril kabinde substrat ilavesi gerçekleştirildi. Kör olarak adlandırılan erlenlere ise substratın çözünmesinde kullanılan çözücüden aynı miktarda ilave edildi.

Çalkalayıcılı inkübatörde transformasyon süreci devam eden erlenlerden 4, 8, 12 gün sonlarında 1-2 mL örnek alındı. Mikrobiyal transformasyon metabolitlerinin zamana bağlı oluşum süreçleri analiz edildi. Bu örnekler etil asetat ile 1:1 ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlandı. Daha sonrasında etil asetatlı kısım alınarak çözücüsü uçuruldu. Etil asetatlı ekstratlerde metabolit varlığı İTK sistemi kullanılarak kontrol edildi.

A. niger suşundan elde edilen metabolitlerin verimini arttırmak amacıyla β -siklodekstrin (molekül ağırlığı:1153) ile hesperidin kaplandı. İdeal çözünürlüğü 10 mM olarak belirlenen β -siklodekstrinin (Sigma) kaplandıktan sonra ilave edildiği besiyerinin hacmine göre substrat ve β -siklodekstrin miktarı hesaplanıp β -siklodekstrin'den 30 mg tartıldı. Daha sonrasında da hesperidin'in etanoldeki çözünürlüğü 500 mg/mL olduğu için 10 mg hesperidin tartılıp çözündürülerek β -siklodekstrin'e emdirildi.



Şekil 3.1. Mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışması

3.4.1.2. Mikrobiyal transformasyon preparatif ölçek çalışması

Mikrobiyal transformasyon büyük ölçek çalışmalarında bakteriler için MHB, funguslar için de α -medium sıvı besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinin içerikleri Tablo 3.4’de yer almaktadır. Deneysel çalışmalar kapsamında kullanılan bütün besiyerleri mikroorganizma ekimi gerçekleştirilmeden önce otoklavda 1.1 Atm ve 121°C’de, 1 saatlik bir süre boyunca steril edildi (Özşen, 2017).

Tablo 3.4. Sıvı besiyerleri ve içerikleri

Besiyeri	Besiyeri içeriği	
Muller Hilton Broth (MHB)	Nişasta	1.5 g
	Et ekstresi	5.0 g
	Kazein hidrolizat	17.5 g
	Saf su	1000 mL
α -Medium	NaCl	5.0 g
	Na ₂ HPO ₄	5.0 g
	Pepton	5.0 g
	Yeast ekstresi	5.0 g
	Glikoz	20.0 g
	Saf su	1000 mL

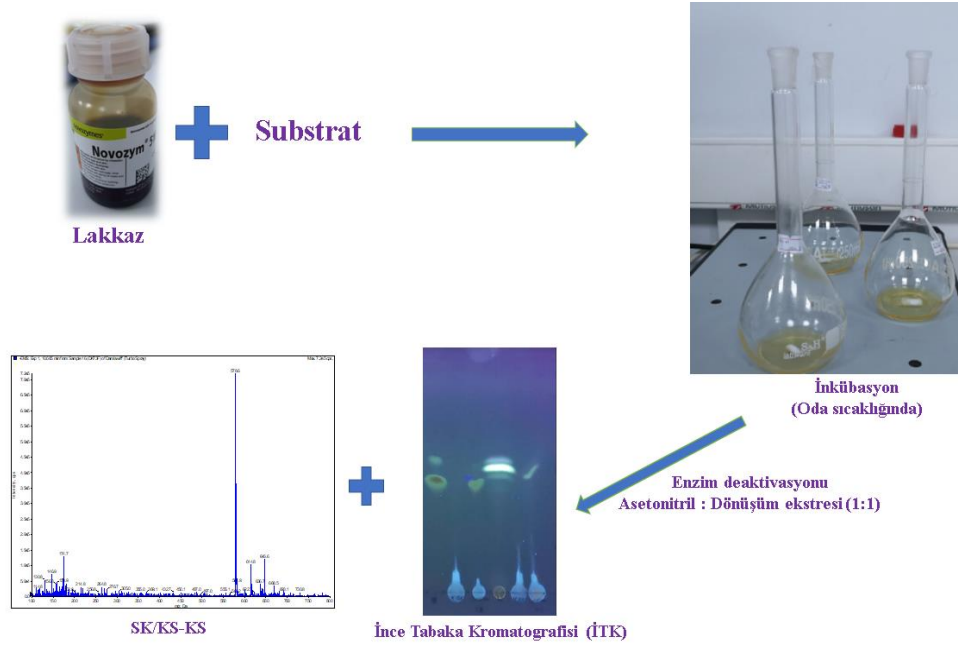
Ön deneme çalışmalarındaki İTK analiz sonuçlarını göz önünde bulundurarak izole edilmesi planlanan metabolitin en yüksek verimle elde edildiği gün baz alınarak büyük ölçek çalışmaları gerçekleştirildi. Mikrobiyal transformasyon çalışmasının 14. gününde besiyeri ortamına 1:1 oranında etil asetat eklenerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonrasında Buchner hunisi kullanılarak vakum pompasına bağlanmış olan Nuche erlenine süzüldü. Erlende toplanan ekstratlar ultrasonik banyoda yarım saat bekletildikten sonra dönüşüm ekstresi ve etil asetat 1:2 oranında olacak şekilde 3 kez ayrıma hunisinde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

Toplanan etil asetatlı kısım susuz Na₂SO₄ bulunan behere aktarıldı. Bu sayede dönüşüm ekstresinden gelen sulu faz uzaklaştırıldı. Etil asetatlı dönüşüm ekstresinin çözücüsü rotavaporda uzaklaştırıldı.

3.4.2. Enzimatik transformasyon

Enzimatik transformasyon çalışmaları kapsamında lakkaz enzimi Novozyme firmasından temin edildi.

Yöntem olarak literatürde Chakroun ve diğerleri tarafından yapılan deneysel çalışma modifiye edildi (Chakroun vd., 2012). Amekiran Farmakopesine (USP) göre 0.05 M pH=4.5 olan sodyum asetat tampon çözeltisi hazırlandı. Deneysel çalışmada substratlar metanolde çözüldürüldükten sonra hazırlanan tampon çözeltisine ilave edildi. Sonrasında 100 µL lakkaz enzimi ilavesi ile süreç başlatıldı. Deneysel süreçler balon jodede gerçekleştirildi. Ayrıca eşzamanlı olarak substrat bulunmayan aynı deney şartlarında hazırlanan kontrol grubu ile de balon jodede oda sıcaklığında çalışma gerçekleştirildi. Şekil 3.2’de enzimatik transformasyon aşaması yer almaktadır. Farklı günlerde dönüşüm ekstresinden örnekler alındıktan sonra örnekteki enzimin deaktive edilmesi için 1:1 oranında asetonitril ilave edildi. Enzimatik transformasyon tepkimesi 7. günün sonunda enzim deaktivasyonu ile durduruldu.



Şekil 3.2. Enzimatik transformasyon aşaması

3.4.3. Metabolitlerin saflaştırılması

Mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmalarında elde edilen metabolitlerin dönüşüm ekstrelerinden saflaştırılmasının gerçekleştirilebilmesi için orta basınçlı sıvı kromatografisi (OBSK), kolon kromatografisi ve preparatif İTK gibi farklı kromatografik yöntemler kullanıldı.

Kolon kromatografisi ve OBSK tekniğinde kuru doldurma yapılar hazırlanan silikagel kaplı kolonda gradient olarak %0-%95 *n*-hekzan:etil asetat çözücü sistemi kullanıldı. *n*-Hekzan:etil asetat %95'den sonra %100 etil asetat ve en sonunda da %100 metanol geçirerek izolasyon aşaması sonlandırıldı. Kolonlardan elde edilen fraksiyonlar İTK yapılarak metabolitlerin saf olarak elde edildiği fraksiyonlar tespit edildi.

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki safsızlıkları uzaklaştırabilmek için preparatif İTK yöntemi kullanıldı.

3.4.4. Metabolitlerin yapı tayini

Saflığından emin olunan metabolit/metabolitlerin yapı tayini için SK/KS-KS, HRMS, tek boyut NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) ve çift boyut NMR (NOESY, DEPT/HMBC) olmak üzere farklı spektroskopik analiz yöntemleri kullanıldı. Elde edilen analiz verileri literatürdeki verilerden destek alınarak yapılar aydınlatıldı (Özşen, 2017).

SK/KS-KS analizleri

SK/KS-KS, analizleri kapsamında Anadolu Üniversitesi Farmakognozi ABD'da mevcut cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. SK/KS-KS, analiz şartları 15 cm, RP-C18, 3µm'lik kolon; %10-%100B 20 dk; akış hızı: 0.7; Oda sıcaklığında; Mobil faz A: MeOH:Su:Formik asit (10:89:1) B: MeOH:Su:Formik asit (89:10:1) olarak belirlendi.

HRMS ve HPLC analizleri gerekli hallerde Dopnalab'dan hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) çalışmaları için Shimadzu SK-KS-IT-TOF (Kyoto, Japonya) sistemi kullanıldı. SK kısmı iki adet SK-20AD ikili pompa, DGU-20A3R gaz giderici ünite, CTO-10ASvp kolon fırını, SIL-20AC otomatik örnekleyici ve SPD-M20A PDA detektörden oluşmaktadır. Kütle analizleri iyon tuzaklı uçuş zamanlı kütle spektrometresinde (IT-TOF) elektron sprey iyonizasyon (ESI) pozitif ve negatif mod kullanılarak Shimadzu LCMSsolution yazılımı ile yapıldı. Analizler Shim-Pack FC-ODS (150 x 2 mm, 2 µm) C18 kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Hareketli faz olarak %0.1 formik asit içeren asetonitril su karışımı 0.25 mL/dk akış hızında sisteme gönderildi. 2 µL enjeksiyon hacminde gönderilen örneklerin kolon fırını sıcaklığı 40°C, CDL sıcaklığı 200°C, ısı bloğu sıcaklığı 200°C ve nebulizatör gaz akışı 1.5 L/dk şeklinde optimize edildi.

Miktar tayini çalışmaları da aynı cihaz üzerinde PDA dedektörle 254 nm dalga boyundaki UV absorbanları kullanılarak yapıldı.

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹HCOSEY, ¹H-¹³C HSQC ve ¹H-¹³C HMBC analizleri yapıldı. Dopnalab'ta yer alan Bruker DPX 300 (Alman) ve Ankara Üniversite Varian Mercury (Agilent) 400 MHz (Palo Alto, CA, USA) cihazları ile analizler gerçekleştirildi. Çözücü olarak dötoro-aseton (Aseton-*d*₆), dötoro-kloroform (CDCl₃-*d*₄) ve dötoro-DMSO (DMSO-*d*₆) kullanıldı. Kimyasal kayma değerlerinin ppm olarak hesaplandı.

3.4.5. Biyolojik aktivite yöntemleri

3.4.5.1. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivite

Substratların ve metabolitlerin antioksidan aktivitesi için Türkoğlu ve ark. tarafından yapılmış olan çalışma modifiye edilmiş olup 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ile deney gerçekleştirildi (Türkoğlu vd., 2006). Antioksidan aktivite çalışması için etanolde çözüldürülen substratlar, metabolitler ve dönüşüm ekstreleri seri dilüsyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 96 kuyucuklu plaka kullanılarak planlanan düzende numunelerin olduğu kuyucuklara DPPH' çözeltisinden (40 µg/mL) ilave edildi. 25°C'de

karanlık ortamda 30 dakika bekletilip inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra spektrofotometre ile 517 nm’de absorbansları belirlendi (3.1). Pozitif kontrol olarak askorbik asit ile çalışıldı. Deney çalışması üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{Abs(kontrol) - Abs(örnek)}{Abs(kontrol)} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.5.2. ABTS⁺ süpürücü aktivite

Substratların ve metabolitlerin 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS⁺) süpürücü aktivitesini tespit etmek amacıyla Ree ve ark. metodu kullanıldı (Re vd., 1999). Numunelerin konsantrasyonları DPPH[•] yöntemindeki gibi hazırlandı. ABTS⁺ radikali 15 mL 7 mM ABTS⁺ ve 264 µL 140 mM potasyum persülfat çözeltisi deney çalışmasından 16 saat önce hazırlanıp 25°C’de karanlık ortamda bekletildi. ABTS⁺ önce hazırlanan stok solüsyonunu metanol ile seyreltilerek 734 nm’deki absorbansı 0.70 ± 0.02 olacak şekilde ayarlandı. 96 kuyucuklu plaka üzerinde 50 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numune çözeltisinden, 100µL ABTS⁺’den ilave edildi. 25°C’de 10 dakika bekletilip 734 nm’de absorbansı köre karşı okunmuştur. Pozitif kontrol olarak trolox kullanıldı. Numunelerin ve trolox inhibisyon yüzdesi hesaplandı (3.1). Deney çalışması üç tekrarlı yapıldı.

3.4.5.3. Anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları

Baylac ve Racine tarafından yapılan çalışma modifiye edilerek lipooksijenaz enzim aktivitesi çalışmaları gerçekleştirildi (Baylac ve Racine, 2003). Çalışmada pozitif kontrol olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NDGA (Nordihidroguaiaretik asit) kullanıldı.

In vitro enzim aktivitesi çalışmasında tampon çözeltisi olarak pH 9’a ayarlı fosfat tamponu kullanıldı. 1 mg/mL lipooksijenaz enzimi çözeltisi tampon olarak hazırlandı. Deney çalışmasında 62.5 µM linoleik asit çözeltisi enzim aktivasyonundan sorumlu substrattır. Deney düzeneğinde 40 µL örnek çözeltisinden, 1940 µL tampon ve 20 µL enzim eklendikten sonra 25°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İşlem sonrasında substrat ilave edilerek ELİSA cihazında 234 nm’de 30 saniyede bir 40 kinetik okuma yapıldı. Deney çalışması dört tekrarlı yapıldı.

3.4.5.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Substratların ve metabolitlerin maya, bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirebilmek amacıyla Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

(CLSI) tarafından hazırlanmış olan standart yöntemlere göre çalışmalar gerçekleştirildi. Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 10 farklı mikroorganizma ile çalışıldı.

Bu mikroorganizmalar 6 bakteri (*Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378) 2 maya (*Saccharomyces boulardii* REFLOR® ve *S. cerevisiae* ATCC 9763) ve 2 fungusdan (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus nidulans* Abraham) oluşmaktadır. Bu kapsamda pozitif kontrol grubu olarak antibakteriyal etkili amoksisilin ve kloramfenikol; antifungal etkili amfoterisin B ve ketokonazol ilaçları kullanıldı. Deneysel çalışmalar iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Katı besiyerinde inkübe edilen mikroorganizmalardan bakteriler için MHB; maya ve fungus türleri için de RPMI broth ekim yapıldı. Tekrar inkübe edilen suşların bulanıklıkları turbidometrik olarak 0.5 Mc Farland olarak ayarlandı.

96 kuyucuklu ve steril mikroplaklarda steril ortam şartlarında kuyulara 100 µL hazırlanan örnek çözeltisinden ve steril edilmiş olan 100 µL sıvı besiyerleri ilave eklendi. Seri dilüsyon yöntemi ile kuyucuklarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin üzerine 100 µL 0.5 Mc Farland hazırlanmış olan mikroorganizma eklendi. Bu işlemler her mikroorganizma için tekrarlanmış olup bakteri bulunan plaklara 24 saat sonra fungus bulunan plaklara ise 48 saat sonunda rezaurin ilave edilerek substratların ve metabolitlerin 15.62-500 µg/mL konsantrasyon aralığı için MİK hesaplandı (CLSI, 2006).

3.4.5.5. Biyofilm aktivite çalışması

Antibiyofilm aktivite çalışması kapsamında MHB besiyeri bulunan tüplerde mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*) 37°C, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Yoğunluğu ayarlanmış mikroorganizmalar 1:10 seyreltilerek 200'er µL steril mikro plakalara ilave edildi. 37°C'de 2 gün inkübasyondan sonra %0.9'luk NaCl ile 2 kez dikkatlice yıkama yapıldı. Oluşan biyofilm tabakası üzerine 100 µL besiyeri ve 100 µL konsantrasyonu ayarlanmış bileşikler eklendi. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra 20 µL rezaurin ilavesi yapıp Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu (MBİK) hesaplandı. Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Elkhatib vd., 2014, Mariscal vd., 2009).

3.4.5.6. Dama tahtası yöntemiyle biyofilm tabakada sinerjik aktivite

Dama tahtası yöntemi (Checkerboard yöntemi) kombinasyonda kullanılan hesperetin ve naringenin bileşiklerinin sekizli seri dilüsyonları hazırlandı. 96 kuyucuklu steril mikro

plakaları alındı. Aynı plaka içerisinde yer alan 8'er kuyucuk üreme ve sterilite kontrolü olarak hazırlandı.

Stanojević ve diğerleri, 2010 tarafından yapılan çalışma modifiye edildi. Bu kapsamda biyofilm *Staphylococcus aureus* suşu ile biyofilm aktivite çalışmasında anlatıldığı şekilde hazırlandı. 2 kez yıkama isteminden sonra kombinasyondaki naringenin 8 yatay sıra; hesperetin 8 dikey sıra kullanılarak azalan konsantrasyonlarda plakaya her bir bileşik için 50 µL olacak şekilde eklenip üzerine 100 µL besiyeri ilave edildi.

Bu çalışmada 64 kuyucukta iki bileşiğin farklı konsantrasyonlarda kombinasyonu oluşturulmuş olup 24 saat, 37°C'de inkübe edildi. Sürenin sonunda Resazurin çözeltisinden 20 µL eklenip ve 3 saat daha aynı sıcaklıkta inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonunda üremenin olmadığını mavi renkli kuyucuklardan gözlemledi (Elkhatib vd., 2014; Stanojević vd., 2010). Dama tahtası yönteminde Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu İndeksine (FİKİ) göre hesaplama yapıldı.

FİK indeks (FİKİ) değerinin hesaplanması;

$$FİKİ = FİK X + FİK Y$$

FİK X = X'in kombinasyondaki MİK değeri/ X'in tek başına MİK değeri

FİK Y = Y'in kombinasyondaki MİK değeri/ Y'in tek başına MİK değeri

FİKİ değerlerine göre sonuçlar:

- FİKİ ≤ 0.5 = Sinerjik etki
- 0.5 < FİKİ ≤ 1 = Aditif etki
- 1 < FİKİ < 4 = Bağımsız etki
- FİKİ ≥ 4 = Antagonist etki

3.4.5.7. Brine Shrimp toksisite çalışmaları

Substratların ve metabolitlerin Brine Shrimp yöntemi kullanılarak akut sitotoksisiteleri araştırıldı. Bu kapsamda yapılan çalışmada pH:8 olacak şekilde deniz tuzu ile besiyeri hazırlanıp hava pompası ile besiyerine oksijen desteği sağlandı. *Artemia* yumurtaları (Artemio®Pur JBL) hazırlanan besiyerinde oda sıcaklığında 60 saat inkübasyona bırakıldı. 60 saatin sonunda gelişimini tamamlayan larvalar ile çalışmalar gerçekleştirildi.

Pozitif kontrol olarak emetin hidroklorür kullanılırken; negatif kontrol olarak %0.05'lik DMSO kullanıldı. Substratlar ve metabolitler 500, 250, 125 ve 62.5 µg/mL olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlandı. Her bir konsantrasyon için 96'lık mikro plakadaki kuyucuklara 20-25 karides eklendikten sonra hazırlanan çözücülerden 100 µL

ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakıldı Çalışma dört tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

24 saat inkübasyon sonrasında numuneleri içeren kuyucuklardaki karideslerden ölenler ve aktivitesini kaybedenler sayılarak konsantrasyona bağlı toksite sonuçları ve letal konsantrasyon (LC₅₀) hesaplandı (Jacobsson vd., 2021; Solis vd., 1993).

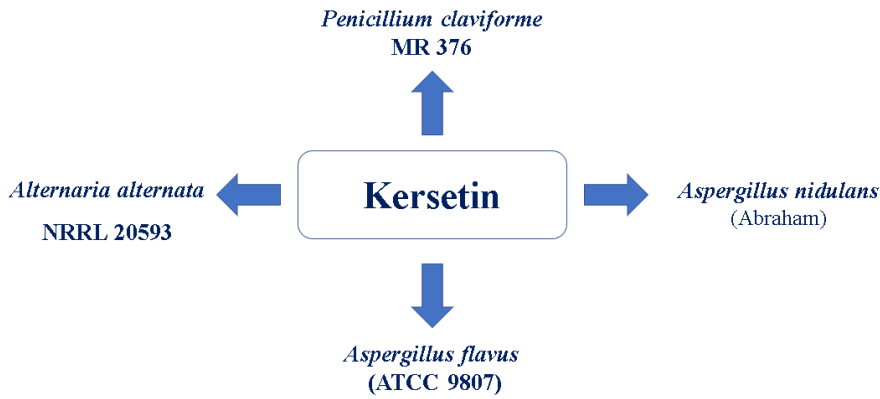
3.4.6. İstatistiksel analiz

Biyolojik aktivite çalışmalarında %50 inhibisyon gözlemlenen konsantrasyon değerleri için GraphPad Prism 8.0 kullanılarak istatistiksel IC₅₀ değeri hesaplandı. Çalışma sonucunda elde edilen veriler normal dağılım gösterenlerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Tukey ve Tamhane testleri IBM SPSS Statistics 20 yazılımı ile hesaplanıp yorumlandı. Her parametre için ortalama değer \pm SEM hesaplandı. Sonuçlar %95 güven aralığında $P \leq 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR ve YORUM

4. 1. Kersetin Mikrobiyal Transformasyon Tepkimeleri

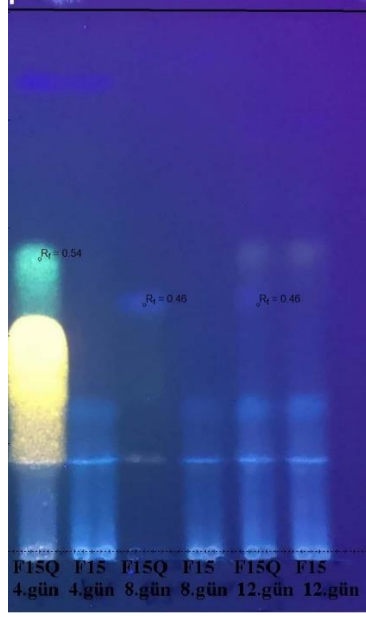
Kersetin'in mikrobiyal transformasyonu kapsamında 25 mikroorganizma ile çalışıldı. Sadece *Alternaria alternata*, *Penicillium claviforme*, *Aspergillus nidulans* ve *A. flavus* ile yapılan çalışmalarda Kersetin dönüşüm metabolitleri gözlemlendi (Şekil 4.1). *Penicillium claviforme* ile ön deneme çalışmalarında dönüşüm metaboliti gözlenmesine rağmen preparatif ölçek çalışmalarda suşun büyümesi ile ilgili sorunla karşılaşıldığı için metabolit izolasyonu gerçekleştirilemedi.



Şekil 4.1. Kersetin mikrobiyal transformasyon mikroorganizmaları

- *Aspergillus flavus* dönüşüm tepkimesi

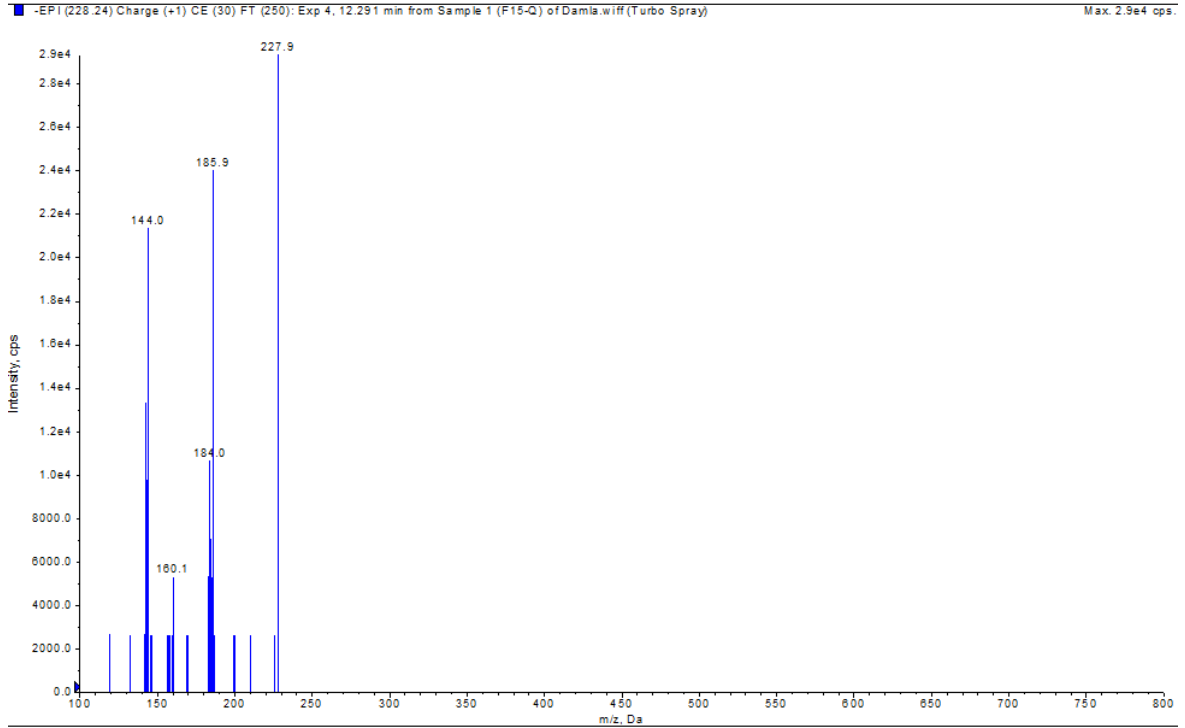
Aspergillus flavus ile 4, 8 ve 12. günlerde besiyerinden alınan dönüşüm ekstralarında metabolit oluşumunun zamana bağlı değişimi öncelikle İTK plağında incelendi. İTK plağının 365 nm'deki görüntüsü Şekil 4. 2'de yer almaktadır. İTK plağında iki metabolitin oluştuğu gözlenmektedir. Bu metabolitlerden Metabolit 1 (M1) UV ışık altında 245 nm'de siyah renkli, 365 nm'de mavi-mor leke vermektedir. Mobil fazı etil asetat: *n*-hekzan: formik asit (3:1:0.5) olan İTK sisteminde M1 metabolitinin Rf değeri 0.54 olarak hesaplandı. M1 ilk kez 8. gün sonunda elde edilen ekstrede gözlemlenirken; 12. gün ekstresinde de bulunduğu tespit edildi. İTK plağındaki en belirgin M1 lekeyi 8. günde gözlemlendi.



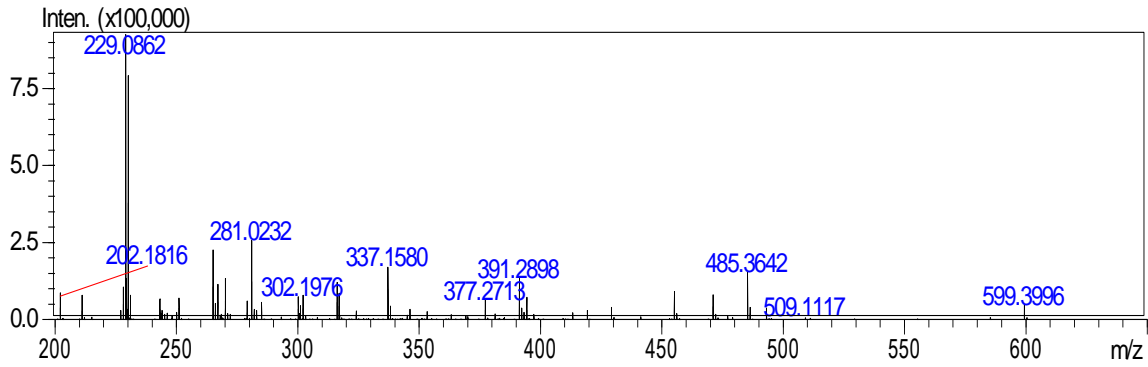
Şekil 4. 2. Kersetin *A. flavus* dönüşüm ekstralarının ve metabolit M1 (R_f : 0.54) ve M2 (R_f : 0.46) 365 nm'de İTK görüntüsü

F15Q 4. gün: *Aspergillus flavus* 4. gün dönüşüm ekstresi **F15 4. gün:** *A. flavus* 4. gün kör ekstresi kör ekstresi; **F15Q 8. gün:** *A. flavus* 8. gün dönüşüm ekstresi **F15 8. gün:** *A. flavus* 8. gün kör ekstresi kör ekstresi; **F15Q 12. gün:** *A. flavus* 12. gün dönüşüm ekstresi **F15 12. gün:** *A. flavus* 12. gün kör ekstresi kör ekstresi

M1 metabolitine ait kütle spektrumu Şekil 4.3'te yer almaktadır. SK/KS-KS analizi sonucunda M1 için $[M-H]^-$ 227.9 ve kütle spektrum fragmentleri değerlendirildiğinde m/z 227, 185 ve 143 majör pikleridir. Literatür bilgileri bize M1 metabolitinin stilben yapısındaki resveratrol olabileme ihtimalini göstermektedir (Flamini, 2013; Liu vd., 2015). TCI (Tokyo Chemical Industry) firmasından satın alınan resveratrol ile HRMS analizi gerçekleştirilmiş olup $[M-H]^+$ 229.0862 ait spektrum Şekil 4.4'te yer almaktadır.

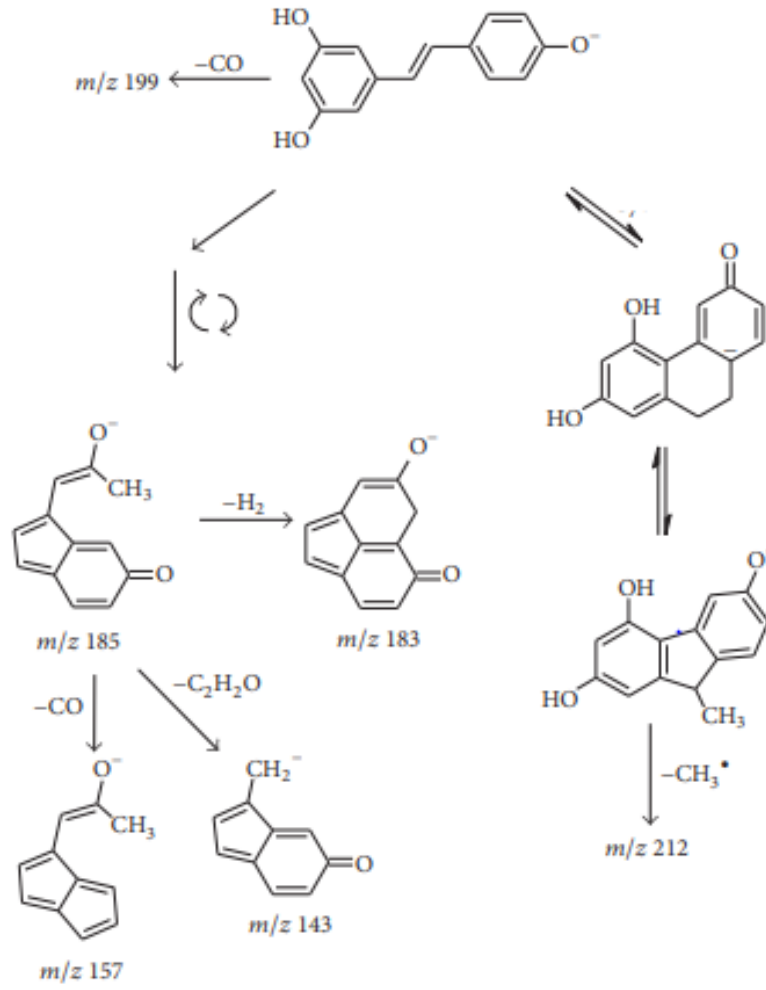


Şekil 4.3. M1 metaboliti kütle spektrumu



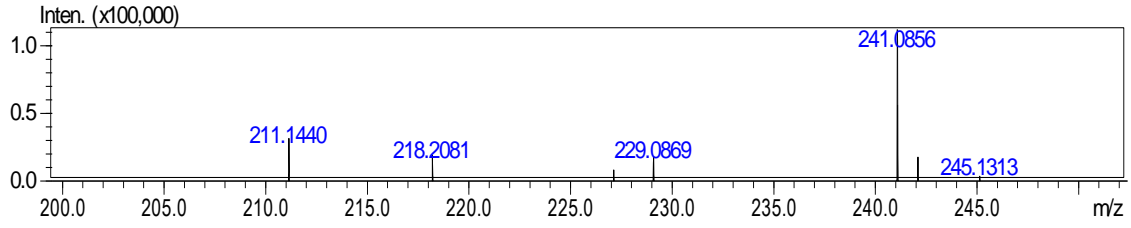
Şekil 4.4. Resveratrol HRMS spektrumu

Literatürde resveratrol'ün SK-SK spektrumunun parçalanma ürünleri ve m/z değerleri Şekil 4.5'te yer almaktadır. Resveratrol (m/z : 228) fragment iyonları m/z 185 \rightarrow 143 parçalanmaları karakteristiktir. Liu ve diğerleri çalışmasında yer alan resveratrol spektrum yarılımları ile Şekil 4.3'teki fragmentler uyumludur (Flamini, 2013; Liu vd., 2015).



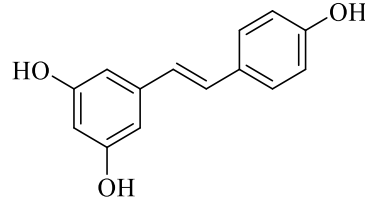
Şekil 4.5. Resveratrol'ün SK-SK spektrumunda parçalanma ürünleri ve m/z değerleri (Flamini, 2013)

Resveratrol varlığı İTK sistemi ile kalitatif olarak Şekil 4. 2'de gösterildi. Aynı dönüşüm ekstreleri ile önce kalitatif olarak HRMS analizinde resveratrol varlığı gösterildi. Şekil 4.6'da 8. gün dönüşüm ekstresine ait spektrum yer almaktadır. m/z 229 değeri resveratrol varlığını göstermektedir (Vlase vd., 2009). İkinci aşamada standart olarak firmadan temin edilen resveratrol ile SK-KS cihazında kantitatif analiz çalışması gerçekleştirildi. Yapılan çalışmada resveratrol'ün dönüşüm ekstrelerinde eser miktarda var olduğu belirlendi.



Şekil 4.6. *A. flavus* 8. gün dönüşüm ekstresindeki resveratrol'ün HRMS spektrumu

Resveratrol'e ait kimyasal formül Şekil 4.7'de yer almaktadır. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) fitoaleksinin özelliğinde stilben yapısında polifenolik bileşiktir. Resveratrol üzüm, *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc., yer fıstığı, kırmızı şarap, yabanmersini, şerbetçiotu, *Itadori* bitkisinin kökleri ve çayında yaygın olarak bulunmaktadır (Burns vd., 2002; Thapa vd., 2019).



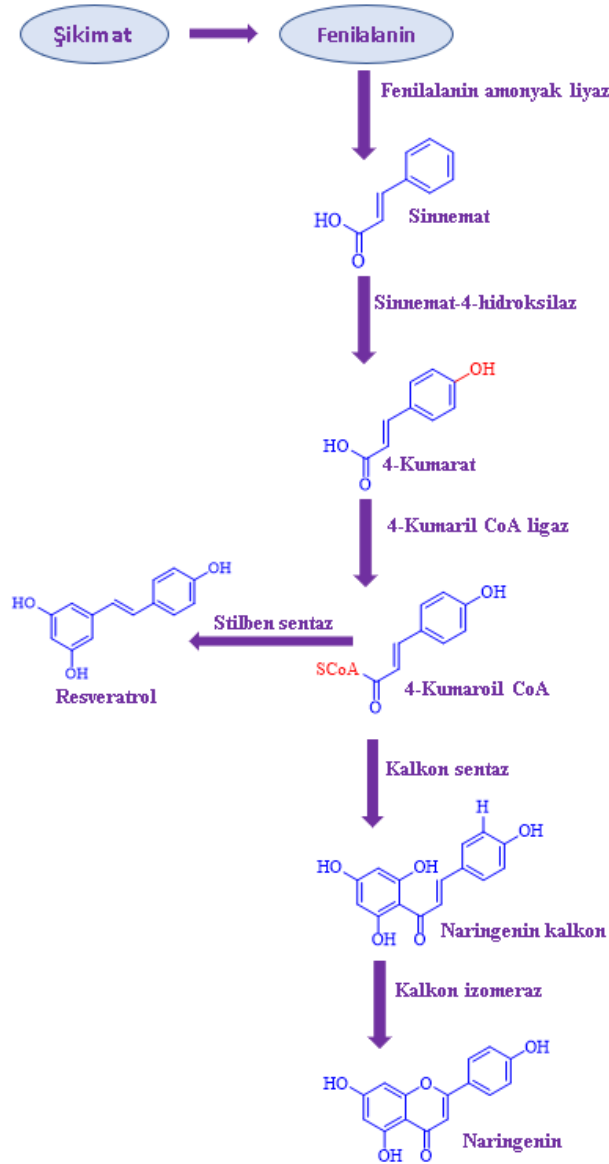
Şekil 4.7. Resveratrol'ün (molekül ağırlığı: 228) kimyasal yapısı

Resveratrol, çok çeşitli farmakolojik özelliklerle ilişkilendirilmektedir. Bu farmakolojik etkiler arasında antioksidan, anti-enflamatuvar, immünomodüle edici etki, antidiyabetik, antikanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara karşı aktivitesi yer almaktadır. Bitkilerde stres, yaralanma, enfeksiyon veya UV radyasyona karşı korumak amacıyla üretilmektedir (Harikumar ve Aggarwal, 2008; Pannu ve Bhatnagar, 2019).

Resveratrol'ün suda çözünürlüğü zayıf olup stabilite problemi bulunmaktadır. *In vivo* çalışmalarda, düşük biyoyararlanım nedeniyle karaciğerde meydana gelen metabolizasyonu oldukça sınırlıdır (Zupančič vd., 2015).

Resveratrol fenilpropanoit yolaktan sentezlenen sekonder bir metabolit olup biyosentez yolağı Şekil 4.8'de yer almaktadır. Resveratrol sentezi için fenilpropanoit yolağı aromatik aminoasit yapısındaki *L*-fenilalanin içermektedir. Bu aminoasit *L*-fenilalanin amonyak liyaz tarafından oksidatif olmayan deaminasyon reaksiyonla sırasıyla sinnamat ve 4-kumarat bileşiklerine dönüşümünü sağlamaktadır. 4-kumarat bileşiği 4-kumaroil CoA ligaz enzimi tarafından 4-kumaroil-CoA'ya dönüştürülmesi ile aktif bir ara bileşik üretilmektedir. Bu ara bileşik genellikle bitkilerin normal büyüme ve gelişmesinde rol

almaktadır. Ancak stres koşullarında flavonoidlerin üretiminde 4-kumaroil-CoA'nın bir kısmı kullanılmaktadır. 4-Kumaroil-CoA'nın siklizasyonu sonunda stilben yapısındaki resveratrol oluşmaktadır. Bu adım, stilben sentaz enzimi tarafından katalize edilmektedir (Pannu ve Bhatnagar, 2019).

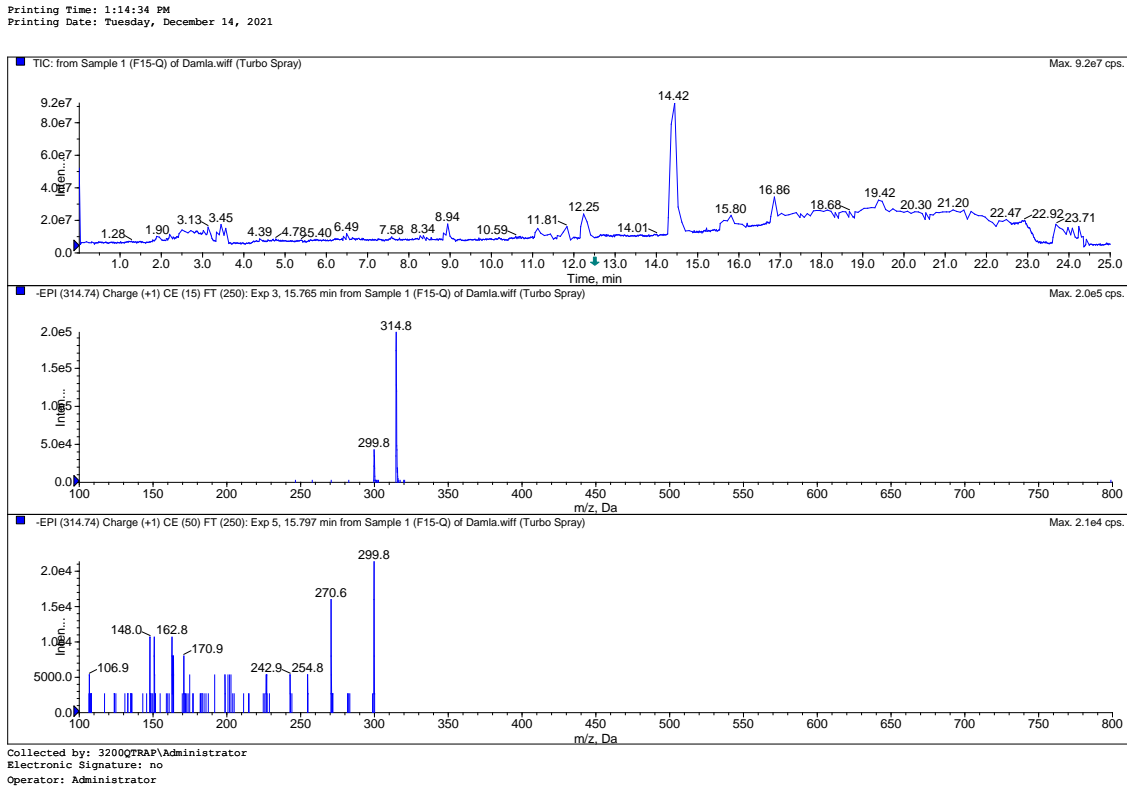


Şekil 4.8. Resveratrol biyosentez yolağı

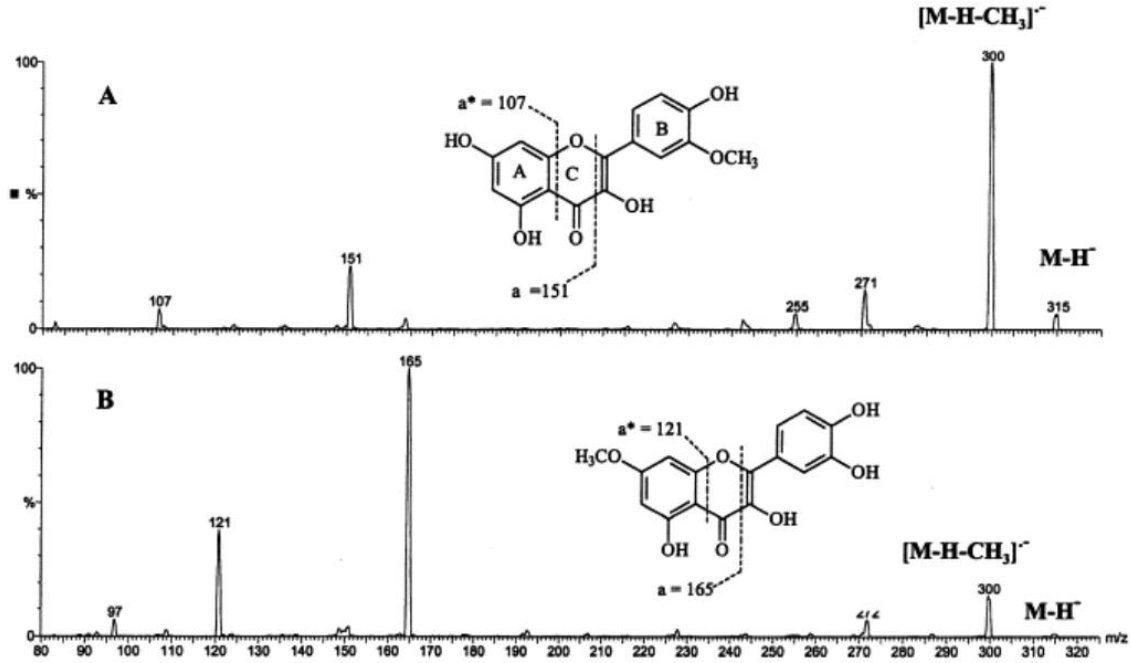
Resveratrol stres durumu söz konusu olduğunda biyosentezi gerçekleştiği için bitkilerde düşük miktarlarda bulunmaktadır. Literatürde resveratrol'ün üretimini artırmak için mikroorganizmaları ve farklı enzimlerin genetik manipülasyonunu içeren çeşitli yöntemler kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. *E. coli* ve *S. cerevisiae* suşlarına 4-kumaroil-

CoA ligaz ve stilben sentaz enzimlerinin genetik manipülasyonu ile 4-kumarik asit bulunan besiyerinde resveratrol sentezi gerçekleştiği gözlemlenmektedir (Beekwilder vd., 2006; Pannu ve Bhatnagar, 2019; Watts vd., 2006).

A. flavus dönüşüm sürecinde elde edilen ikinci metabolit **M2**'dir. Metabolitinin oluşumu ilk kez 4. günde gözlemlendi. İTK plağında 254 nm'de siyah, 365nm'de sarı leke olarak tespit edildi. Dönüşüm ekstralarına ait 365 nm'deki İTK plak görüntüsü Şekil 4. 2'de yer almakta olup M2 metabolitinin Rf değeri 0.46'dır. M2'ye ait kütle spektrumu $[M-H]^-$ 314.8'tir. Şekil 4.9'da farklı iki elektron voltta (15 ve 50 eV) M2 bileşiğine ait kütle fragmentlerini bulunmaktadır. Literatür ile karşılaştırıldığında M2 metabolitinin izoramnetin bileşiği ile benzerlik göstermektedir. Jutesen tarafından yapılan çalışmada izoramnetin ve ramnetin bileşiklerine ait kütle spektrumları Şekil 4.10'da yer almaktadır (Justesen, 2000). İzoramnetin yapısında 3' konumunda metoksi bulundurmaktadır. A halkası ait KS-KS fragmentlerinden m/z 151 ve m/z 107 izoramnetin için karakteristiktir. Ramnetin'in karakteristik fragmentleri m/z 165 and m/z 121'dir. İki bileşik SK/KS-KS spektrumları ile olası molekül olarak yapıları aydınlatıldı. Literatürdeki bilgilerden yola çıkılarak TCI (Tokyo Chemical Industry) firmasından izoramnetin bileşiği temin edildi.

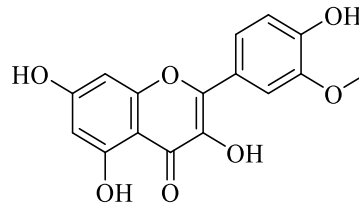


Şekil 4.9. M2 metaboliti kütle spektrumu



Şekil 4.10. İzoramnetin (A) ve ramnetin (B) kütle spektrumları (Justesen, 2000)

İzoramnetin (3'-metoksi-3,4',5,7-tetrahidroksiflavon) flavon yapısında bir flavonoittir. İzoramnetin'in kimyasal formülü Şekil 4.11'de yer almaktadır. İzoramnetin'in diğer flavonoit türevlerinde olduğu gibi suda çözünürlüğü düşük olup metanol ve DMSO'da daha iyi çözünme göstermektedir. Sarı kristal formda kullanılmaktadır (Wang vd., 2016).

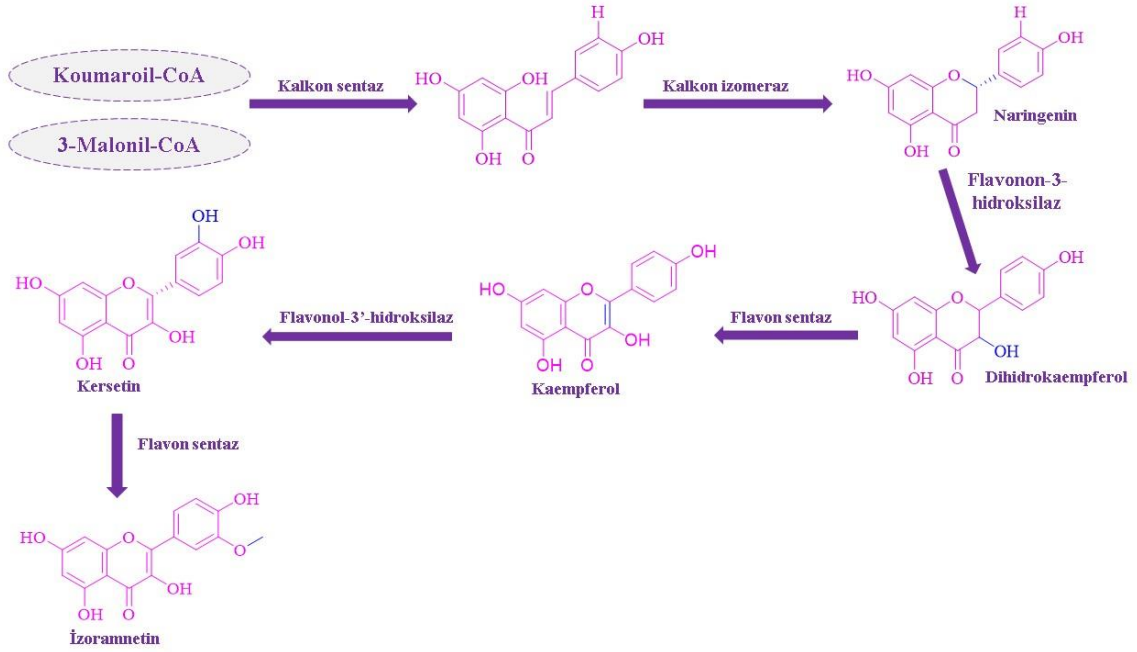


Şekil 4.11. İzoramnetin (molekül ağırlığı: 316) kimyasal yapısı

İzoramnetin, elma, böğürtlen, kiraz, armut, turp, kırmızı soğan, *Hippophae rhamnoides* L. ve *Ginkgo biloba* L.'nin yaprak, çiçek ve meyvelerinde bulunmaktadır. Ayrıca *Hippophae rhamnoides* ve *Oenanthe javanica* (Blume) DC. bitkilerinin içeriğinde bulunmakta olup bu bitkiler Yunanistan'da ve Danimarka'da geleneksel kullanımları ile bilinmektedir (Kandakumar ve Manju, 2017).

İzoramnetin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, nörolojik, kardiyovasküler, hepatoprotektif, anti-enflamatuvar, üreme sistemini koruyucu ve anti-diyabetik etkisi dahil olmak üzere birçok farmakolojik özelliğe sahip çok yönlü bir bileşiktir (Kandakumar ve Manju, 2017).

İzoramnetin doğada bitkide şikimik asit yolağında üretilmekte olup biyosentez yolağı Şekil 4.12’de yer almaktadır. Bu yolağa göre kersetin’e flavanol-3-metilaz enzimi aracılığıyla B halkasındaki 3’ konumuna metil grubu bağlanması ile elde edilmektedir (Crozier vd., 2000). İzoramnetin 3’-metilkersetin olarak da adlandırılmaktadır. Biyosentez yolağında kersetin’in dönüşüm ürünü olduğu için literatürde yer alan çalışmalarda kersetin metaboliti olarak da adlandırılmaktadır (Boesch-Saadatmandi vd., 2011).



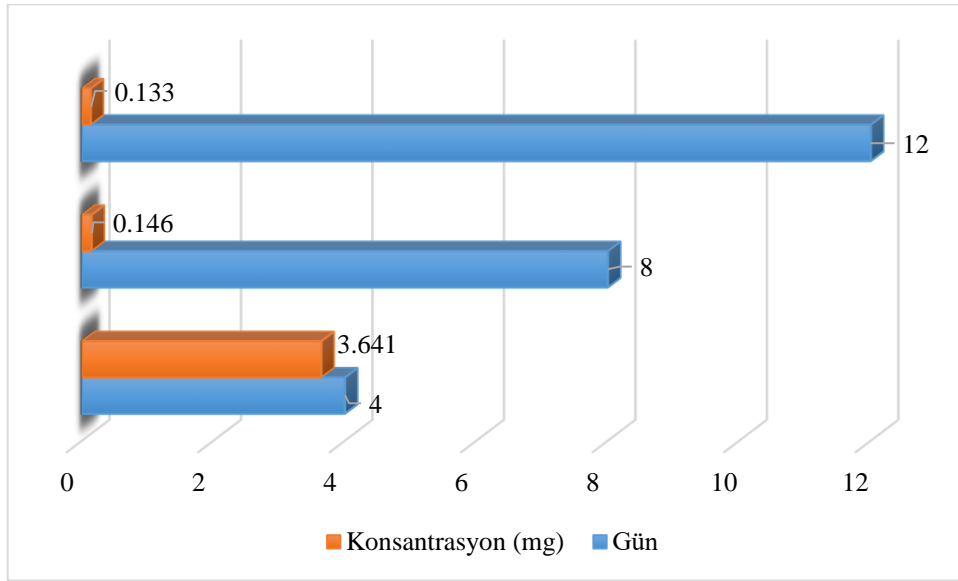
Şekil 4.12. İzoramnetin'in biyosentez yolağı (Crozier vd., 2000)

Aspergillus flavus kersetin dönüşüm sürecince üç farklı zaman diliminde (dört, sekiz ve onikinci günler) dönüşüm numuneleri toplanıp etil asetat çözücüsü ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Daha önce kalitatif analizi İTK sisteminde yapılmış olan ekstratların içeriğindeki izoramnetin'in kantitatif miktar tayini için SK-KS cihazı kullanıldı.

Bu çalışma kapsamında öncelikle izoramnetin'in kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Dört, sekiz ve onikinci gün dönüşüm ekstratlarındaki metabolit miktarları analiz edildi.

İzoramnetin zamana bağlı değişim grafiği Şekil 4.13'te yer almaktadır. Elde edilen verilere göre belirlenmiş olan zaman dilimlerinde izoramnetin'in en yüksek dönüşüm verimi

dördüncü günde %18.20 olarak hesaplandı. Grafikte de belirtildiği üzere dönüşüm metabolitinin miktarında zamanla ters orantılı değişim gözlenmektedir.



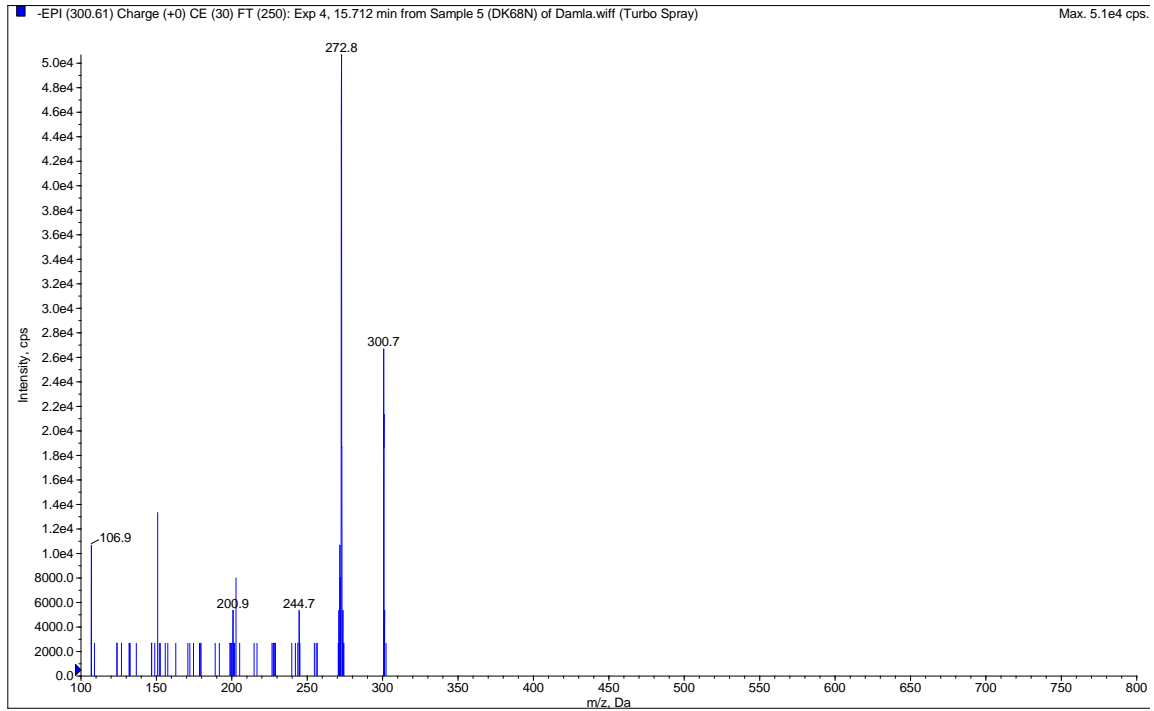
Şekil 4.13. *A. flavus* kersetin mikrobiyal transformasyon zamana bağlı izoramnetin değişim grafiği

- *Alternaria alternata* dönüşüm tepkimesi

Alternaria alternata ile mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışmalarında İTK plağında gözlemlenen metaboliti izole edebilmek için preparatif ölçek çalışma gerçekleştirildi. Bu dönüşüm ekstresi için OBSK ile kromatografik yöntemi ile izolasyon çalışmaları yapılmasına rağmen metabolit saf olarak elde edilemediği için yapı aydınlatılamadı.

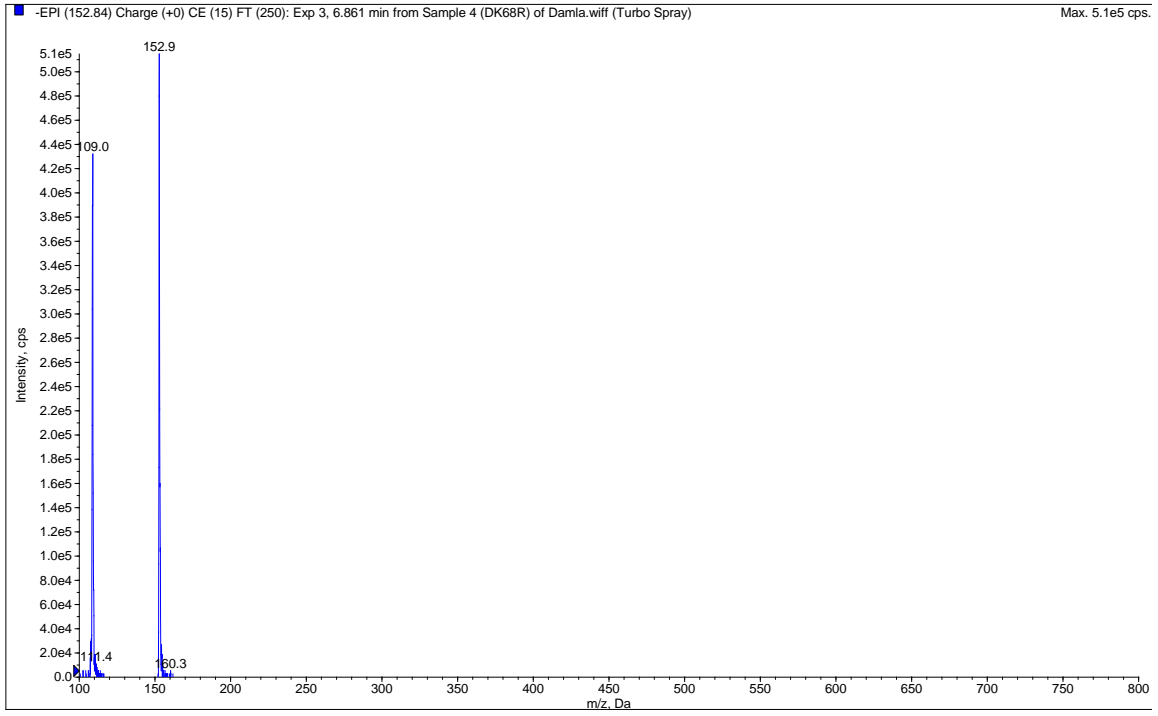
- *Aspergillus nidulans* dönüşüm tepkimesi

Aspergillus nidulans ile kersetin'e ait dönüşüm ekstresinin kolon kromatografisinden elde edilen %52-56 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonun majör bileşik olarak metabolit **M3** (13.2 mg) bulundu. Bu metabolite ait kütle spektrumu Şekil 4.14'te yer almaktadır. **M3** [M-H]⁻ 300.7 olup ayrıca kütle fragmentleri 272.8, 244.7, 200.9 ve 106.9 olarak tespit edildi. Literatür incelemesi sonucunda *Sorghum* cinsine ait çalışmada yapısı aydınlatılamayan flavonoit veya polifenolik bileşik olarak tanımlanan bileşik ile aynı kütle fragmentleri bulunmuştur (Kang vd., 2016).

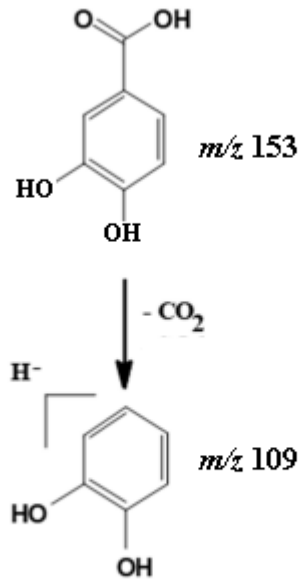


Şekil 4.14. M3 kütle spektrumu

Dönüşüm ekstresinin kolon kromatografisindeki %58-61 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonundan metabolit 4 (**M4**, 3.2 mg) elde edildi. M4 metabolitine ait analiz sonucu [M-H]⁻ 159.2 olarak bulunmakta olup kütle spektrumu Şekil 4.15'te yer almaktadır. Kütle fragmenti olarak *m/z* 109 tespit edildi. Literatürde taraması sonunda M4 kütle fragmentleri ile protokateşik asit kütle fragmentleri arasında benzerlik olduğu bulundu (Kang vd., 2016, Mendoza-Meza ve España-Puccini, 2016). Extrasynthese firmasından temin edilen protokateşik asit ile M4 metabolitin içeren fraksiyonu mobil fazı etil asetat:*n*-hekzan:formik asit (30:20:0.5) olan İTK sisteminde incelendi. Standart ile yapılan İTK çalışması protokateşik asit olduğunu doğruladı. Kütle fragmentlerinden *m/z* 109 protokateşik asitten asit grubu koptuktan sonra kalan aromatik halka ve ona bağlı hidroksil gruplarının varlığını göstermektedir (Gutierrez-Zetina vd., 2019). Protokateşik asit SK-SK spektrumunda parçalanma ürünü ve *m/z* değerleri Şekil 4.16'da yer almaktadır.

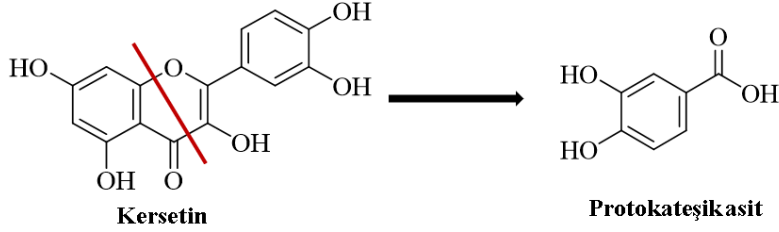


Şekil 4.15. M4 kütle spektrumu



Şekil 4.16. Protokateşik asit SK-SK spektrumunda parçalanma ürünü ve m/z değerleri

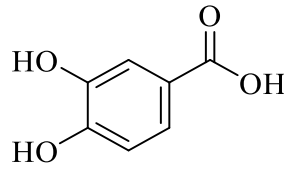
Kersetin'in protokateşik asite dönüşümü için C halka yapısından parçalanma tepkimesi gerçekleşmiştir. Bu tepkimeye ait Şekil 4.17'de yer almaktadır. Parçalanma tepkimesinin gerçekleştiği bölge kırmızı ok ile gösterildi.



Şekil 4.17. Kersetin *A. nidulans* ile dönüşüm tepkimesi

Protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit) fenolik asit grubunda yer alan sekonder metabolittir. Protokateşik asidin kimyasal formülü Şekil 4.18'de yer almaktadır. Bileşik yaygın olarak meyve, sebze, tahıl, kiraz, soğan, üzüm, kahverengi pirinç, biberiye, tarçında bulunmaktadır (Gutierrez-Zetina vd., 2019; Kakkar ve Bais, 2014).

Protokateşik asit gri ila ten rengi bir katı kristal toz yapısında olup hafif bir fenolik kokuya sahiptir. Suda az çözünür (1:50), alkol, eter gibi organik çözücülerde yüksek çözünürlüğe sahiptir (Kakkar ve Bais, 2014).



Şekil 4. 18. Protokateşik asit (molekül ağırlığı: 154) kimyasal yapısı

Protokateşik asit birçok farklı biyolojik yolak üzerinde etkisinden dolayı farklı farmakolojik etkileri bulunmaktadır. Bunlar antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiülser, antidiyabetik, antiaging, anti-enflamatuvar, analjezik aktivitelerdir (Gutierrez-Zetina vd., 2019; Kakkar ve Bais, 2014).

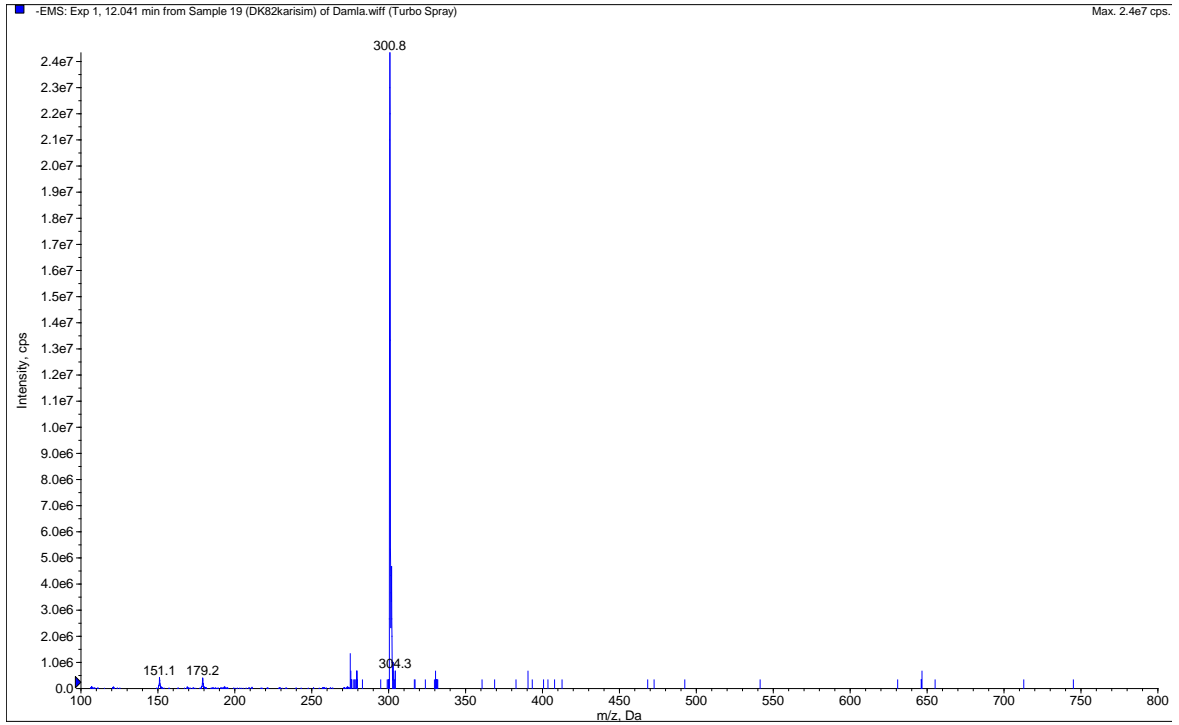
Protokateşik asitin biyosentezi bitkilerde şikimik asit yolağından gerçekleşirken; insanlarda ise flavonoidlerin özellikle antosiyaninler, flavonoller ve prosiyaninlerin insan bağırsak florasında degradasyonu ile elde edilmektedir (Gutierrez-Zetina vd., 2019).

Literatürde kersetin'in *Rhizobium loti* NZP2042 ve *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) ile mikrobiyal dönüşüm tepkimeleri gerçekleştirilmiş olup dönüşüm metaboliti olarak protokateşik asit tespit edilmiştir (Rao vd., 1991).

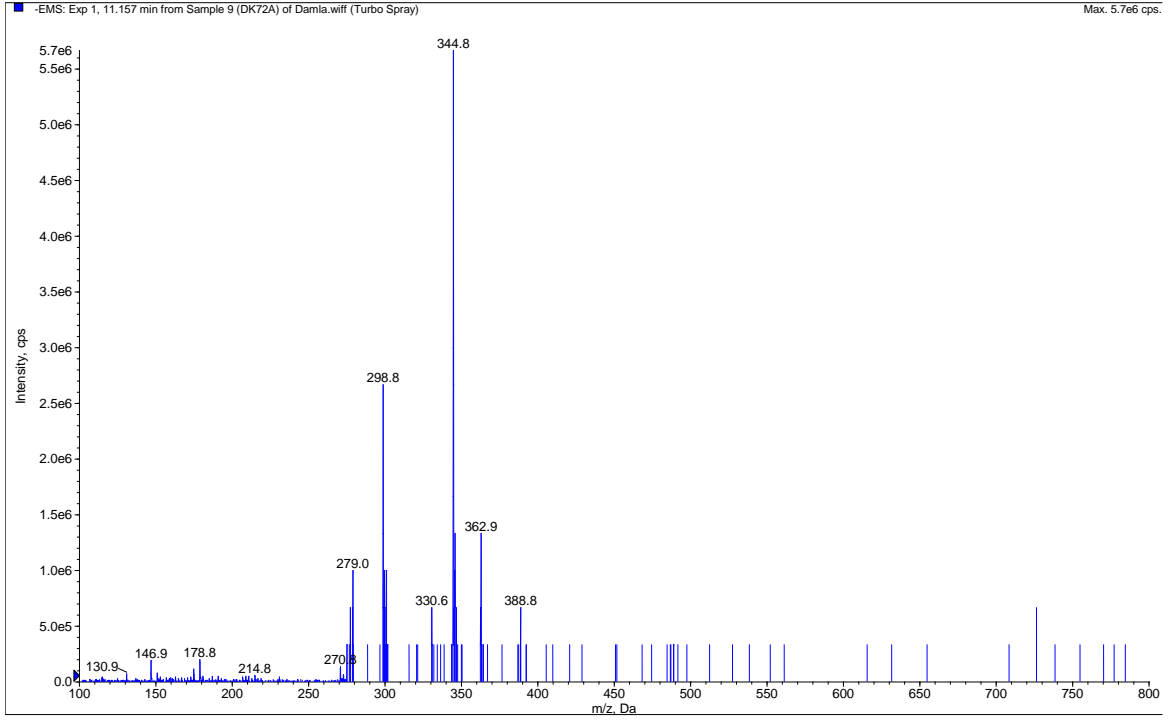
4.2. Kersetin Enzimatik Transformasyon Tepkimeleri

Kersetin enzimatik transformasyon çalışması lakkaz enzimi ile ön deneme çalışmasında flavonoit yapısına uygun modifiye edilmiştir. Bu metoda göre tepkime süresi 7 gün olarak belirlendi. 7. gün sonunda enzim deaktivasyonu ile deney sonlandırıldı. Elde edilen dönüşüm ekstresinde **M5** ve **M6** metabolitleri gözlemlendi.

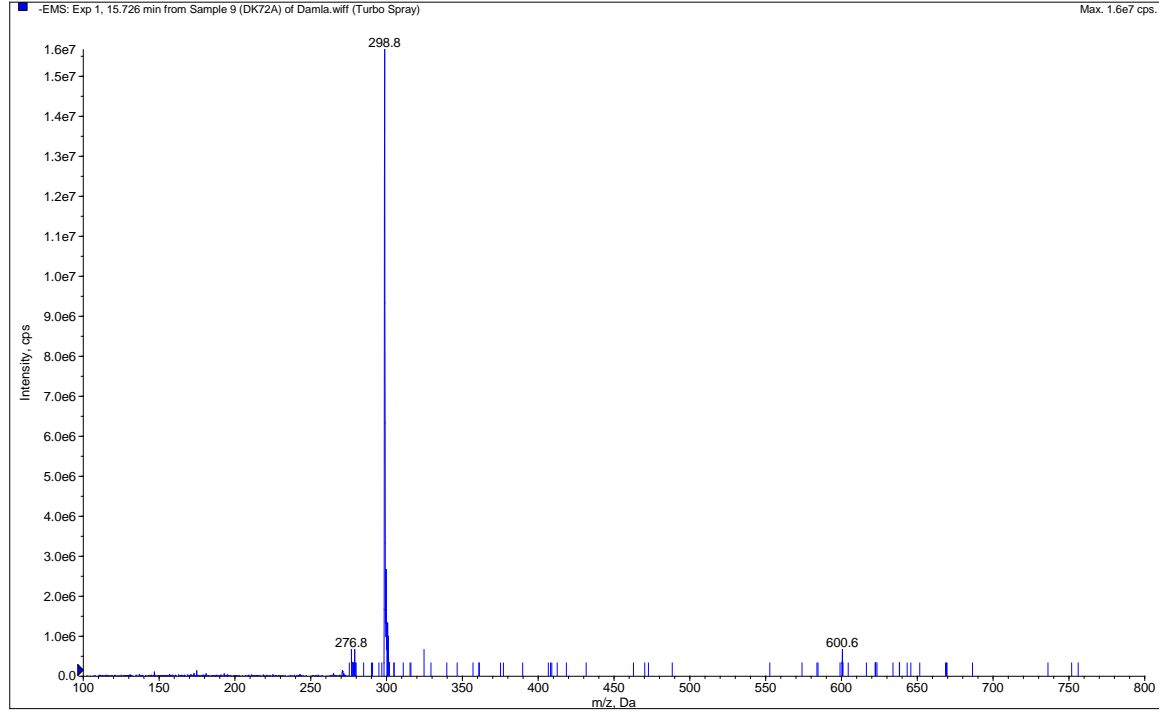
Dönüşüm metabolitlerinin SK/KS-KS analizi yapıldı. Kersetin, M5 ve M6 metabolitlerinin kütle spektrumları sırasıyla Şekil 4.19, Şekil 4.20, ve Şekil 4.21'de verilmektedir. Kersetin $[M-H]^-$ değeri 300.8, M5 metabolitinin $[M-H]^-$ değeri 344.8 ve M6 metabolitinin $[M-H]^-$ değeri 298.8 olarak bulundu.



Şekil 4.19. Kersetin kütle spektrumu



Şekil 4.20. M5 metaboliti küte spektrumu



Şekil 4.21. M6 metaboliti küte spektrumu

Kersetin'in lakkaz ile enzimatik transformasyon metabolitlerinin izolasyonu amacıyla preparatif ölçekte çalışmalar gerçekleştirildi. Metabolitlerin izolasyonu için mobil fazı etil asetat:*n*-hekzan:formik asit (30:10:0.5) olan prepİTK yöntemi kullanıldı.

M5 ve M6 saf olarak izole edilmiş olup yapıları ¹H ve ¹³C-NMR verileri ve kütle spektrumları ile aydınlatıldı. Kersetin ve izole edilen M5, M6 metabolitlerine ait ¹H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.22-Şekil 4.26'de yer almakta olup ¹³C-NMR spektrumları Şekil 4.27-Şekil 4.29'da bulunurken; Kersetin, izole edilen M5 ve M6 metabolitlerine ait spektral bulgular sırasıyla Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de yer almaktadır.

- ***Kersetin spektral bilgileri***

Kimyasal adlandırma: 2-(3,4-Dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4h-kromen-4-on (C₁₅H₁₀O₇)

¹H-NMR (400 MHz, Aseton-*d*₆): 6.27 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.52 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 7.00 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 7.70 (1H, dd, *J*=8.5 Hz, *J*₀=2.2 Hz, H-6'), 7.83 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 7.94 (1H, bs, OH-3), 8.27 (1H, bs, OH-3'), 8.48 (1H, bs, OH-4'), 9.61 (1H, bs, OH-7), 12.15 (1H, bs, OH-5).

¹³C-NMR (100 MHz, Aseton-*d*₆): 94.55 (C-8), 99.25 (C-6), 104.24(C-10), 115.87 (C5'), 116.31 (C-6'), 121.56 (C-2'), 123.88 (C-1'), 136.84 (C-3), 145.88 (C-3'), 147.02 (C-4'), 148.41 (C-2), 157.86 (C-9), 162.40 (C-5), 165.03 (C-7), 176.64 (C-4) (Charisiadis vd., 2014, Puranik ve Srivastava, 2017).

MS (ESI) (*m/z*) [M + H]⁺: 300.8

- ***M5 spektral bilgileri***

¹H-NMR spektrumu başlangıç bileşiği olan kersetin'e ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında kersetin'in 2 (5.06 ppm, s) ve 3 (4.47 ppm, s) konumunda yer alan karbonlar arasında çifte bağ bulunmaktadır. M5 metabolitine ait spektrumda belirtilen ppm aralığında singlet piklere karşılaşılmaması buradaki çifte bağın doyurulduğunu göstermektedir. Kersetin'de 7 (9.61 ppm, s), 3' (8.27 ppm, s) ve 4' (8.48 ppm, s) konumlarında yer alan hidroksi gruplarının yerine M5'te 7 (3.50 ppm, s), 3' (3.64 ppm, s) ve 4' (3.56 ppm, s) konumlarında metoksi bulunmaktadır.

¹³C-NMR spektrumu başlangıç bileşiği olan kersetin'e ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında 7 (62.77 ppm), 3' (64.37 ppm) ve 4' (63.57 ppm) pikleri M5'te bu üç konuma metoksi eklendiğini göstermektedir.

Kimyasal adlandırma: 2-(3,4-Dimetoksifenil)-3,5-dihidroksi-7-metoksikroman-4-on C₁₈H₁₈O₇

¹H-NMR (300 MHz, Aseton-*d*₆): 3.50 (3H, s, MeO-7), 3.56 (3H, s, MeO-4'), 3.64 (3H, s, MeO-3'), 4.47 (1H, s, H-3), 4.73 (1H, bs, OH-3), 5.06 (1H, s, H-2), 7.15 (1H, s, H-8), 7.32 (1H, d, *J*=7.40 Hz, H-6), 7.58 (1H, t, *J*=7.40 Hz, H-5'), 7.70 (1H, d, *J*=7.30 Hz, H-2'), 8.00 (1H, dd, *J*=7.34 Hz, *J*₀=2.70 Hz, H-6'), 12.69 (1H, bs, OH-5).

¹³C-NMR (75 MHz, Aseton-*d*₆): 62.77 (MeO-7), 63.57 (MeO-4'), 64.37 (MeO-3'), 72.54 (C-3), 78.87 (C-2), 89.56 (C-8), 95.09 (C-6), 105.84 (C-10), 122.05 (C-2', C-5'), 129.37 (C-1'), 133.02 (C-6'), 142.61 (C-4'), 149.75 (C-3'), 154.79 (C-9), 167.51 (C-5), 179.45 (C-7), 188.37 (C-4) (Puranik ve Srivastava, 2017).

MS (ESI) (*m/z*) [M + H]⁺: 344.6

- **M6 spektral bilgileri**

¹H-NMR spektrumu başlangıç bileşiği olan kersetin'e ait spektrum ile M6 metabolitine ait ¹H-NMR spektrumu karşılaştırıldığında 2 (5.06 ppm, s) ve 3 (4.57 ppm, s) konumunda yer alan karbonlar arasında çifte bağ bulunmaktadır. M6 metabolitine ait spektrumda belirtilen ppm aralığında singlet piklere karşılaşılmaması buradaki çifte bağın doyurulduğunu göstermektedir. M6'te kersetin'de yer alan 5 (12.15 ppm, s) ve 4' (9.61 ppm, s) hidroksi piklerinin yerine 5 (3.58 ppm, m) metil ve 7 (3.92 ppm, s) metoksi pikleri gözlemlenmektedir. 3 konuma bağlı hidroksi gruplarının kopmasından dolayı kersetinde 7.94 ppm, s olarak bulunan pik metabolitte gözlemlenmemektedir.

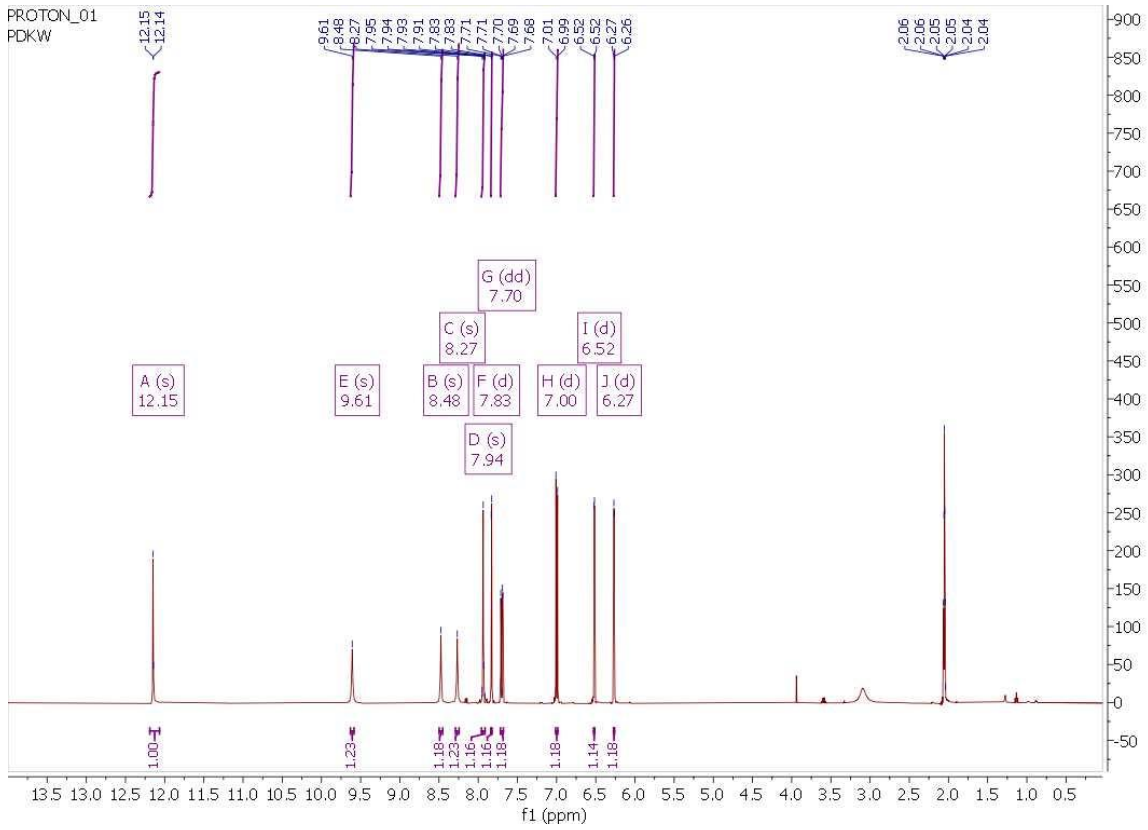
¹³C-NMR spektrumu başlangıç bileşiği olan kersetine ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında kersetin bileşiğine 5 (41.03 ppm) konumunda metil ve 7 (63.53 ppm) konumlarında da metoksi eklenmesiyle M6 elde edildi.

Kimyasal adlandırma: 3-Hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-7-metoksi-5-metilkroman-4-on
C₁₇H₁₆O₅

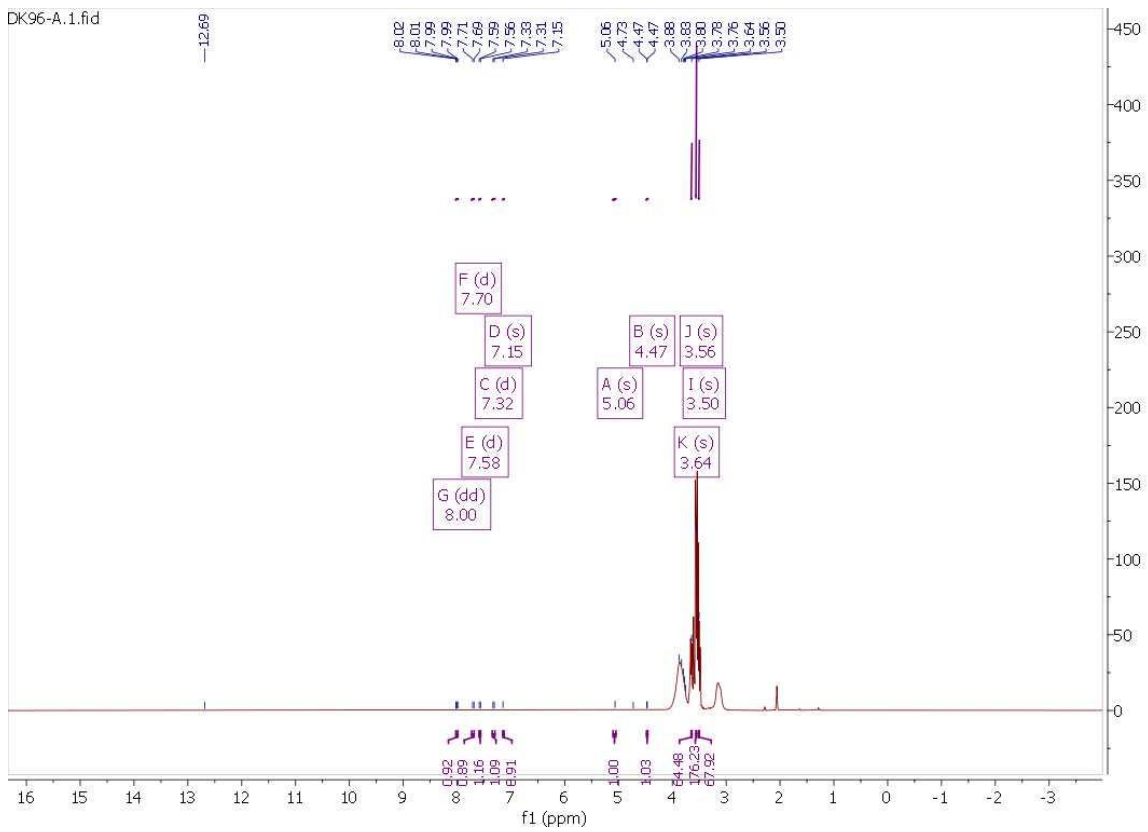
¹H-NMR (300 MHz, Aseton-*d*₆): 3.63 (3H, m, Me-5), 3.92 (3H, s, MeO-7), 4.05 (1H, s, OH-4'), 4.46 (1H, s, H-3), 5.06 (1H, s, H-2), 5.62 (1H, s, OH-4'), 7.35 (2H, dd, *J*=5.5 Hz, *J*₀=3.7 Hz, H-6), 7.15 (1H, m, H-8), 7.58 (2H, dd, *J*=8.1 Hz, *J*₀=2.2 Hz, H-3', C-5'), 7.69 (2H, dd, *J*=9.8 Hz, *J*₀=1.7 Hz, H-2', C-6').

¹³C-NMR (75 MHz, Aseton-*d*₆): 41.03 (CH₃-5), 63.53 (MeO-7), 72.56 (C-3), 82.03 (C-8), 85.49 (C-2), 85.72 (C-6), 120.51 (C-3', C-5'), 128.17 (C-2', C-6'), 134.16 (C-1', C-4'), 149.14 (C-9), 160.82 (C-5), 179.01 (C-7), 187.55 (C-4) (Puranik ve Srivastava, 2017).

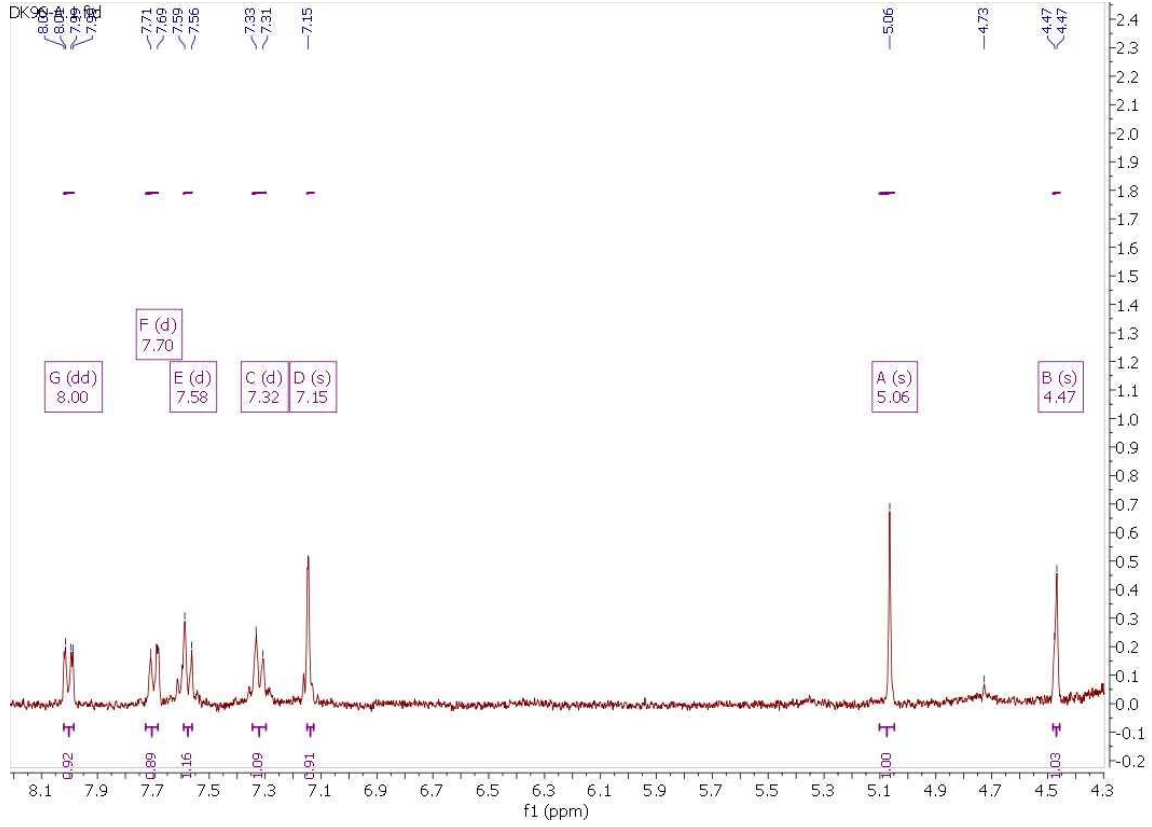
MS (ESI) (*m/z*) [M + H]⁺: 298.7



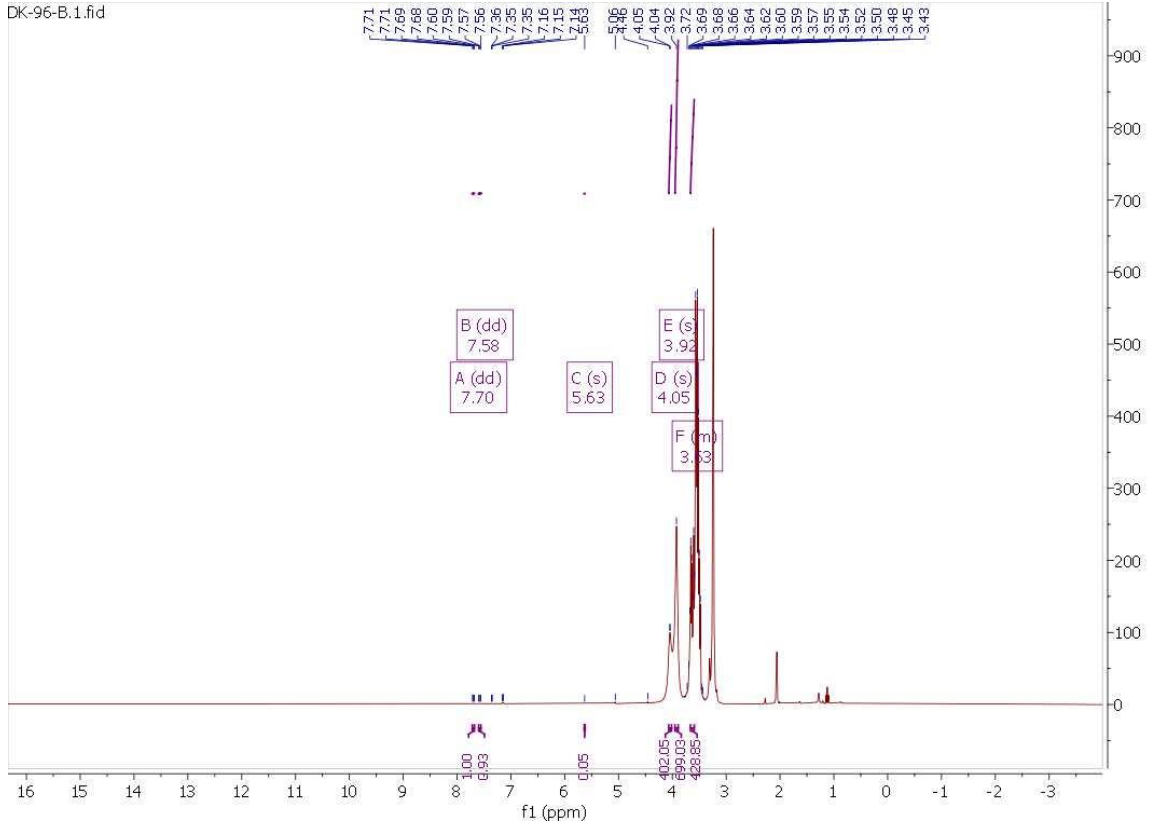
Şekil 4.22. Kersetin'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



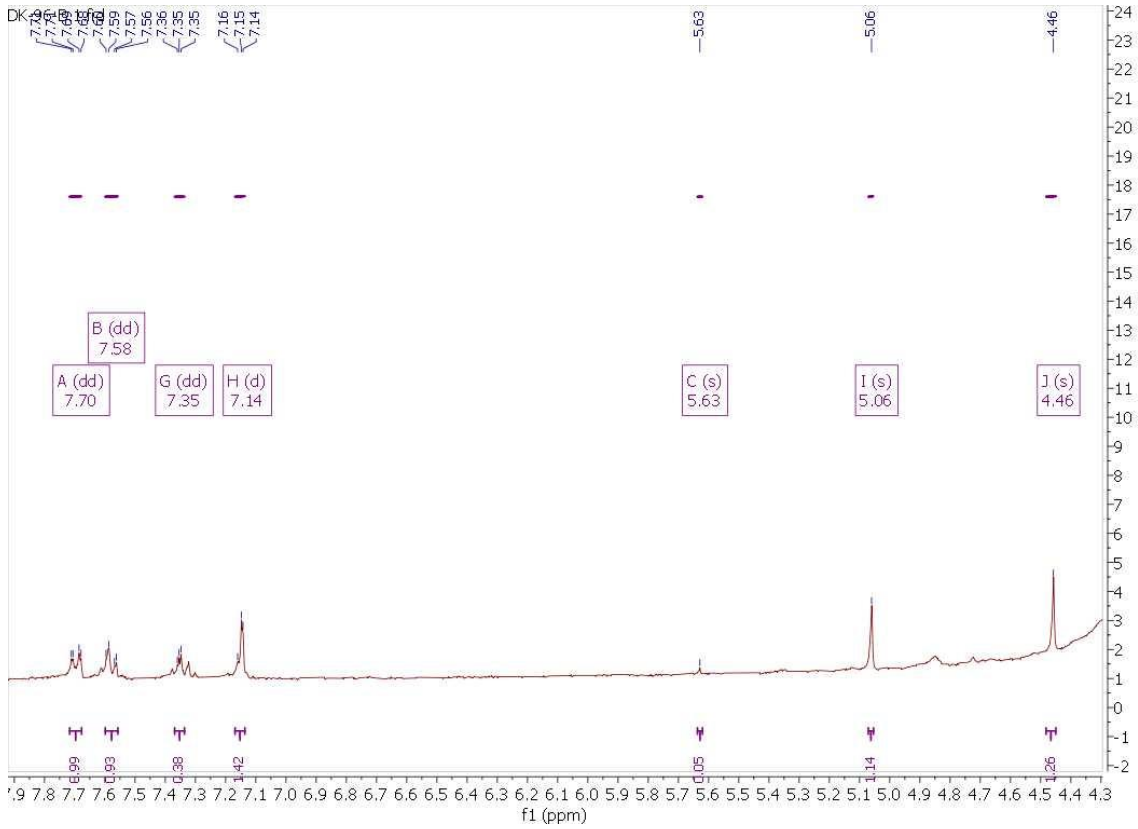
Şekil 4.23. M5 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



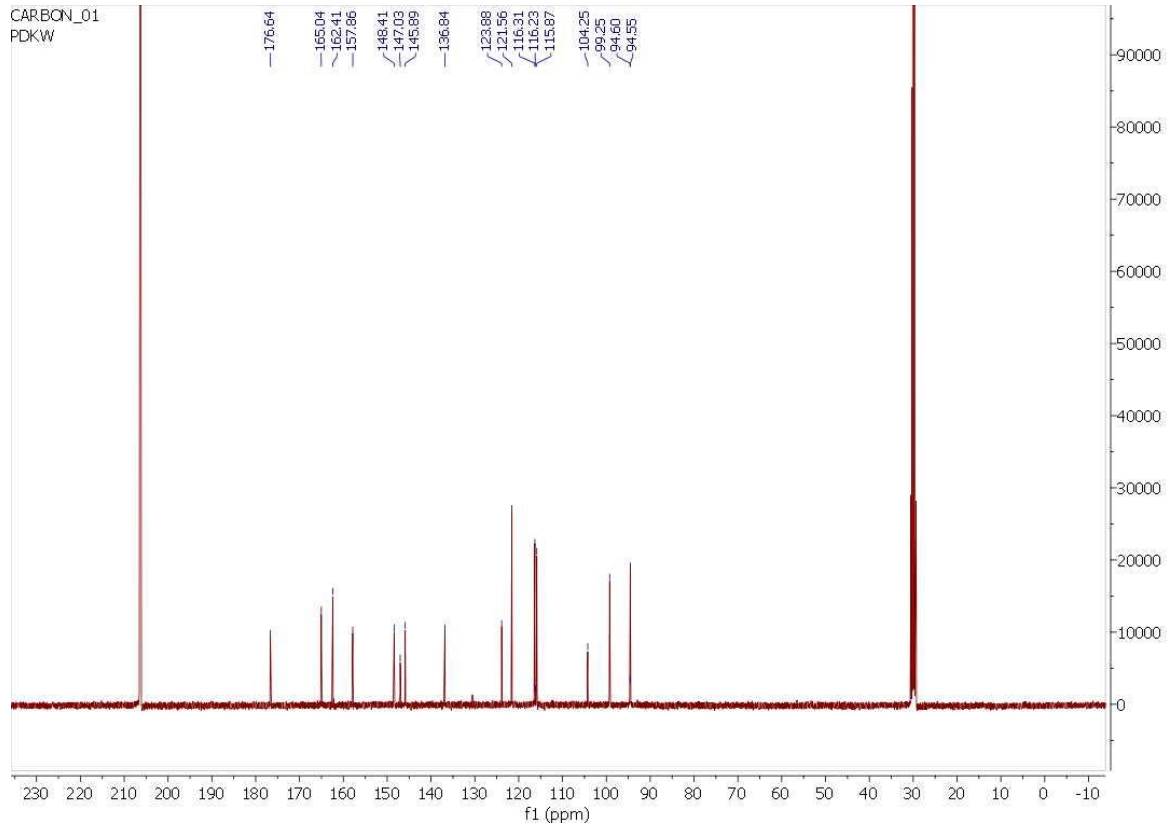
Şekil 4.24. M5 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 4-8 ppm aralığı



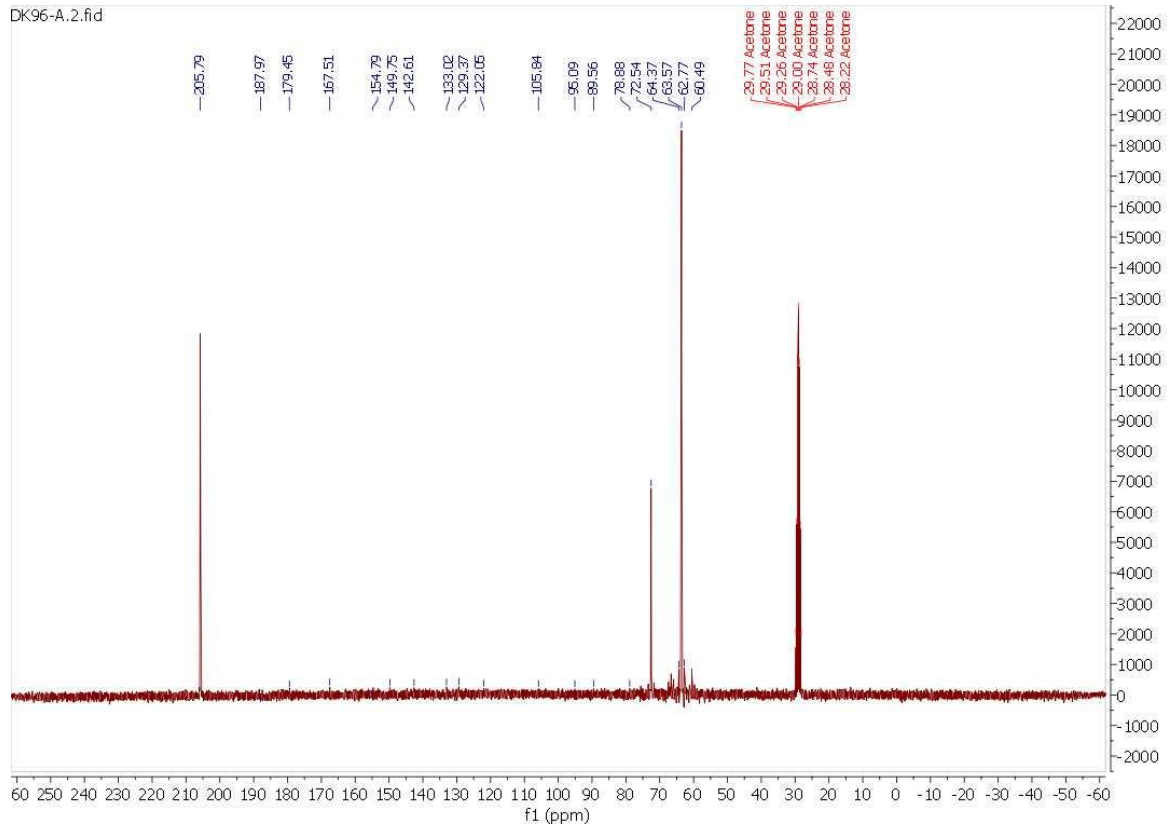
Şekil 4.25. M6 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



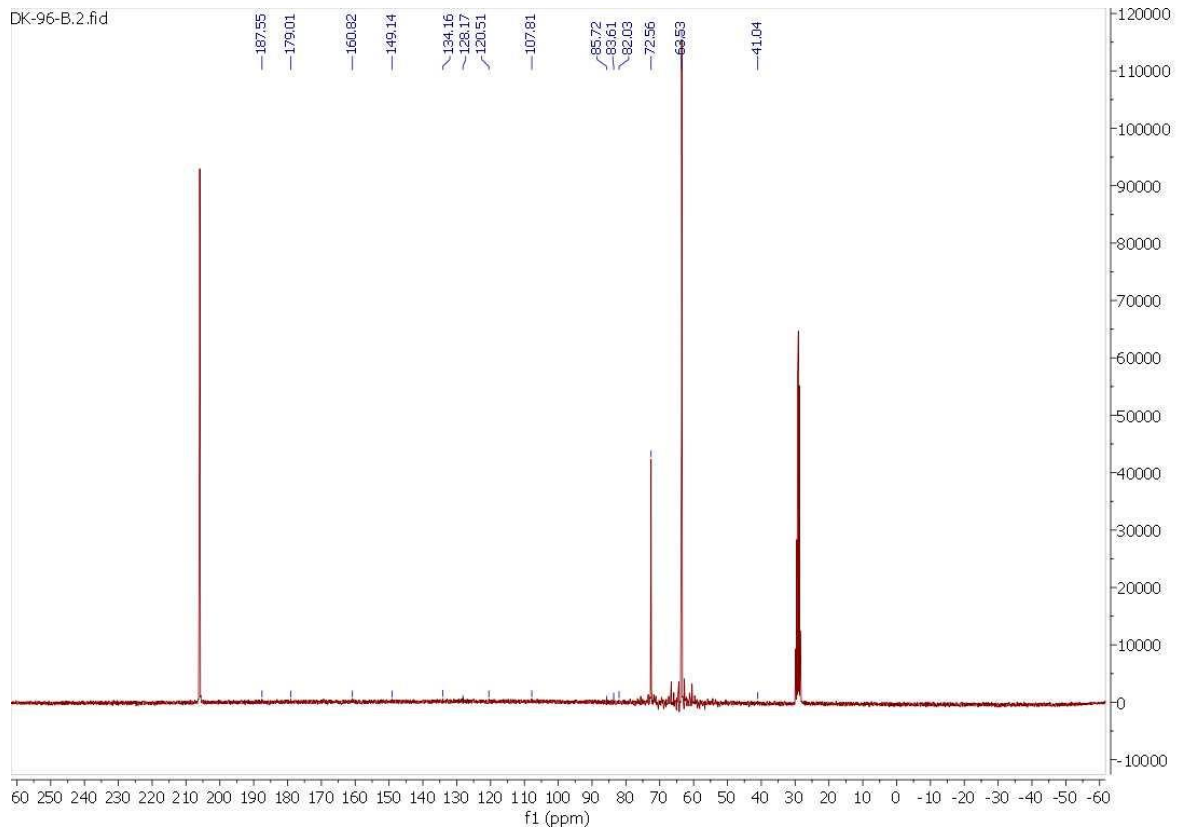
Şekil 4.26. M6 metaboliti $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 4-8 ppm aralığı



Şekil 4.27. Kersetin'in ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.28. M5 metaboliti ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 4.29. M6 metaboliti ^{13}C -NMR spektrumu

Tablo 4.1. *Kersetin, M5 ve M6'ya ait ¹H-NMR spektral bulgular*

Kersetin		Metabolit 5		Metabolit 6	
¹ H-NMR (400 MHz) δ	C	¹ H-NMR (300 MHz) δ	C	¹ H-NMR (300 MHz) δ	C
-	C2	5.06 s (1H)	C2	5.06 s (1H)	C2
-	C3	4.47 s (1H)	C3	4.57 s (1H)	C3
-	C4	-	C4	-	C4
-	C5	-	C5	-	C5
6.52 d, $J=1.6$ Hz (1H)	C6	7.32 d, $J=7.26$ (1H)	C6	7.34 dd, $J=7.8$ Hz, $J_o=1.3$ Hz (1H)	C6
9.61 s (1H)	C7	-	C7	-	C7
6.26 d, $J=1.6$ Hz (1H)	C8	7.14 s (1H)	C8	7.16-7.14 m (1H)	C8
-	C9	-	C9	-	C9
-	C10	-	C10	-	C10
-	C1'	-	C1'	-	C1'
7.83 d, $J=2$ Hz (1H)	C2'	7.69 d, $J=7.83$ (1H)	C2'	7.69 dd, $J=8.0$ Hz, $J_o=1.6$ Hz (1H)	C2'
-	C3'	-	C3'	7.58 dd, $J=7.5$ Hz, $J_o=2.1$ Hz (1H)	C3'
-	C4'	-	C4'	-	C4'
7.00 d, $J=8.8$ Hz (1H)	C5'	7.58 t, $J=7.68$ Hz (1H)	C5'	7.58 dd, $J=7.5$ Hz, $J_o=2.1$ Hz (1H)	C5'
7.71 dd, $J=8.8$ Hz, $J_o=2.2$ Hz (1H)	C6'	8.00 dd, $J=7.74$, $J_o=2.04$ (1H)	C6'	7.69 dd, $J=8.0$ Hz, $J_o=1.6$ Hz (1H)	C6'
12.15 s (1H)	C5 (OH)	4.73 s (1H)	C3 OH	3.92 s (1H)	7 OCH ₃
7.94 s (1H)	C3 (OH)	12.68 s (1H)	C5 OH	3.58 m (1H)	5 CH ₃
8.27 s (1H)	C3' (OH)	3.50 s (3H)	C7 OCH ₃	5.62 s (1H)	3 OH
8.48 s (1H)	C4' (OH)	3.64 s (3H)	C3' OCH ₃	4.04 s (1H)	4' OH
		3.55 s (3H)	C4' OCH ₃		

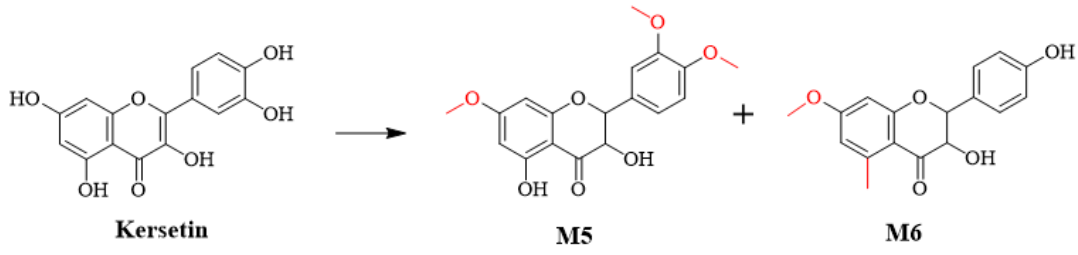
δ : Kimyasal kayma ppm; C: Karbon atomu

Tablo 4.2. *Kersetin, M5 ve M6'ya ait ¹³C-NMR spektral bulgular*

Kersetin		Metabolit 5		Metabolit 6	
¹³ C-NMR (100 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (75 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (75 MHz) δ	C
148.4126	C2	78.87	C2	89.14	C2
136.841	C3	72.54	C3	72.56	C3
176.641	C4	187.97	C4	179.01	C4
162.407	C5	167.51	C5	169.15	C5
99.251	C6	95.09	C6	85.41	C6
165.036	C7	179.45	C7	160.82	C7
94.549	C8	89.57	C8	82.00	C8
157.865	C9	154.79	C9	155.80	C9
104.242	C10	105.84	C10	107.81	C10
123.887	C1'	129.37	C1'	128.47	C1'
121.563	C2'	122.06	C2'	128.17	C2'
145.886	C3'	149.75	C3'	120.51	C3'
147.022	C4'	142.61	C4'	134.16	C4'
115.871	C5'	122.06	C5'	120.51	C5'
116.313	C6'	133.02	C6'	128.17	C6'
				63.53	7 OCH ₃
				41.03	5 CH ₃

δ : Kimyasal kayma ppm; C: Karbon atomu

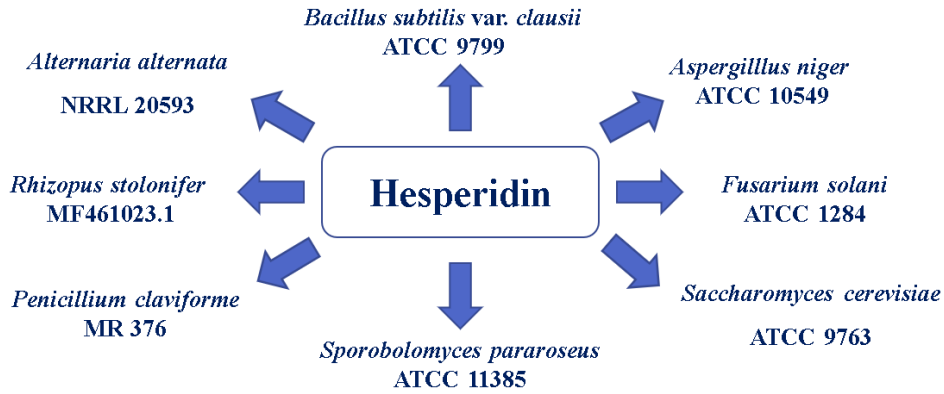
Şekil 4.30’da kersetin’in lakkaz ile enzimatik transformasyon tepkimesi yer almaktadır.



Şekil 4.30. Kersetin’in lakkaz ile enzimatik transformasyon tepkimesi

4.3. Hesperidin Mikrobiyal Transformasyon Tepkimeleri

Hesperidin’in mikrobiyal transformasyon ön deneme çalışmalarında kersetin ile yapılan çalışmaya benzer şekilde 25 mikroorganizma kullanıldı. Bu çalışmalar sonucunda hesperidin’in mikrobiyal transformasyon dönüşüm metabolit varlığı İTK analizi ile değerlendirildi. Elde edilen İTK plak görüntülerine göre suşlardan sadece dokuzunda dönüşüm gözlemlendi. Bu suşlardan ikisi bakteri (*Bacillus subtilis* var. *clausii* ve *Streptococcus thermophilus*), biri maya (*Sporobolomyces pararoseus*) ve beşi de farklı türde funguslar olarak tespit edildi. Bu mikroorganizmalar Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Hesperidin mikrobiyal transformasyon mikroorganizmaları

Ön deneme çalışmalarından elde edilen veriler doğrultusunda metabolitlerin izolasyonu amacıyla preparatif ölçekte çalışmalar gerçekleştirildi. *Fusarium solani* ve *Penicillium claviforme* suşları ile ön deneme çalışmalarında mikrobiyal transformasyon gözlenmesine rağmen preparatif ölçek çalışmalarda suşların büyümesi ile ilgili sorunla karşılaşıldığı için metabolit izolasyonu gerçekleştirilemedi.

Hesperidin preparatif ölçekte 5 farklı mikroorganizma ile çalışıldı. Bu çalışmalar sonucunda dönüşüm ekstreleri elde edildi. Dönüşüm ekstrelerinden hareketle izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmalar kapsamında *Alternaria alternata* ve *Bacillus subtilis* var. *clausii* dönüşüm metabolitleri izole edilip yapısı aydınlatıldı. *Rhizopus stolonifer* ve *Sporobolomyces pararoseus* ile preparatif ölçek çalışmalar gerçekleştirilmesine rağmen metabolitlerin miktarının az olmasından dolayı yapı tayini yapılamadı.

- ***Bacillus subtilis* var. *clausii* dönüşüm tepkimesi**

Bacillus subtilis var. *clausii* dönüşüm ekstresinden metabolit eldesi manuel kolon ile gerçekleştirildi. Toplanan %80-90 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonu ile ikinci kez manuel kolon ile çalışıldı. Kurulan ikinci kolondan alınan %10-20 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonu ile prepİTK yapılarak 12.5 mg Metabolit M7 izole edildi. Hesperidin'den daha polar olarak elde edilen M7 metaboliti İTK plağında 365 nm'de pembemsi renkte olup 254 nm'de siyah leke vermektedir.

Hesperidin'in ve izole edilen M7'nin kütle spektrumları sırasıyla Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de; ¹H-NMR spektrumları Şekil 4.34-Şekil 4.36;¹³C-NMR spektrumları Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de bulunurken; hesperidin ve izole edilen M7 metabolitine ait spektral bulgular Tablo 4. 3'te yer almaktadır.

- ***Hesperidin spektral bilgileri***

Kimyasal adlandırması: (2S)-5-Hidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(((2S,3R,4R,5R)-3,4,5-trihidroksi-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)kroman-4-on (C₂₈H₃₄O₁₅)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.08 (3H, d, *J*=6.0 Hz, Me-5'''), 2.76 (1H, dt, *J*=16.8 Hz, *J*_o=4.7 Hz, H-3α), 3.13 (1H, m, H-5'''), 3.21 (1H, m, H-4'''), 3.25 (1H, dd, *J*=8.9 Hz, *J*_o=4.4 Hz, H-3β), 3.39 (1H, t, *J*=4.3 Hz, H-3'''), 3.42 (1H, t, *J*=4.3 Hz, H-2'''), 3.53 (1H, m, H-5''), 3.62 (1H, t, *J*=4.1 Hz, H-3''), 3.76 (1H, s, -OMe-4')4.46 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-2''), 4.51 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-4''), 4.59 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-6''α), 4.67 (1H, d, *J*=5.5 Hz, H-6''β), 4.97 (1H, d, *J*=5.5 Hz, H-1'''), 5.38 (1H, d, *J*=4.9 Hz, H-1''), 5.51 (1H, dd, *J*=12.2 Hz, *J*_o=3.3Hz, H-2), 6.12 (2H, dd, *J*=6.4 Hz, *J*_o= 2.2 Hz, H-2'-H6'), 6.90 (1H, d, *J*=8.1, H-5'), 6.93 (2H, dd, *J*=5.2 Hz, *J*_o= 3.2 Hz, 6H-8H), 9.08 (1H, s, OH-3'), 12.01 (1H, s, OH-5).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 17.83 (Me-C5'''), 42.04 (C-3), 55.68 (OMe-C4'), 66.03(C-6''), 68.31 (C-2'''), 69.58 (C-4''), 70.26 (C-3'''), 70.69 (C-5'''), 72.06 (C-3''), 72.98 (C-2''), 75.51 (C-4'''), 76.26 (C-5''), 78.37 (C-2), 96.37 (C-8), 99.43 (C-6), 100.60

(C-1'''), 103.31 (C-10), 112.02 (C-3'), 114.14 (C-6'), 117.94 (C-2'), 130.89 (C-1'), 130.96 (C-1''), 146.45 (C-5'), 147.95 (C-4'), 162.49 (C-9), 163.03 (C-5), 165.13 (C-7), 197.02 (C-4) (Jadeja vd., 2017).

KS (ESI) (m/z) [M + H]⁻: 608.6

- **M7 spektral bilgileri**

¹H-NMR spektrumu hesperidin'e ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında şeker gruplarının varlığını gösteren 5.38-3.15 ppm aralığındaki pikler gözlemlenmedi. Ayrıca şeker grubundaki metile ait 1.07 piki (3H, d, $J=6.0$ Hz) sadece hesperidin spektrumunda yer almaktadır. Hesperidin'de bulunan 2 hidroksi grubunun pikleri 12.01 ppm ve 9.08 ppm'de gözlemlenirken; M7 metabolitine ait spektrumda hidroksi pikleri 12.18 ppm, 9.60 ppm ve 7.73 ppm'de singlet olarak gözlemlendi.

Hesperidin ¹³C-NMR spektrumunda 66-130 ppm aralığındaki pikler şeker grubuna ait olup aynı zamanda şeker grubundaki metile ait pik 1.83 ppm'de gözlemlenmektedir. M7 metabolitinde 56.33 ppm'de metoksi piki gözlemlenirken; aynı pik hesperidin'de 55.66 ppm'de bulunmaktadır.

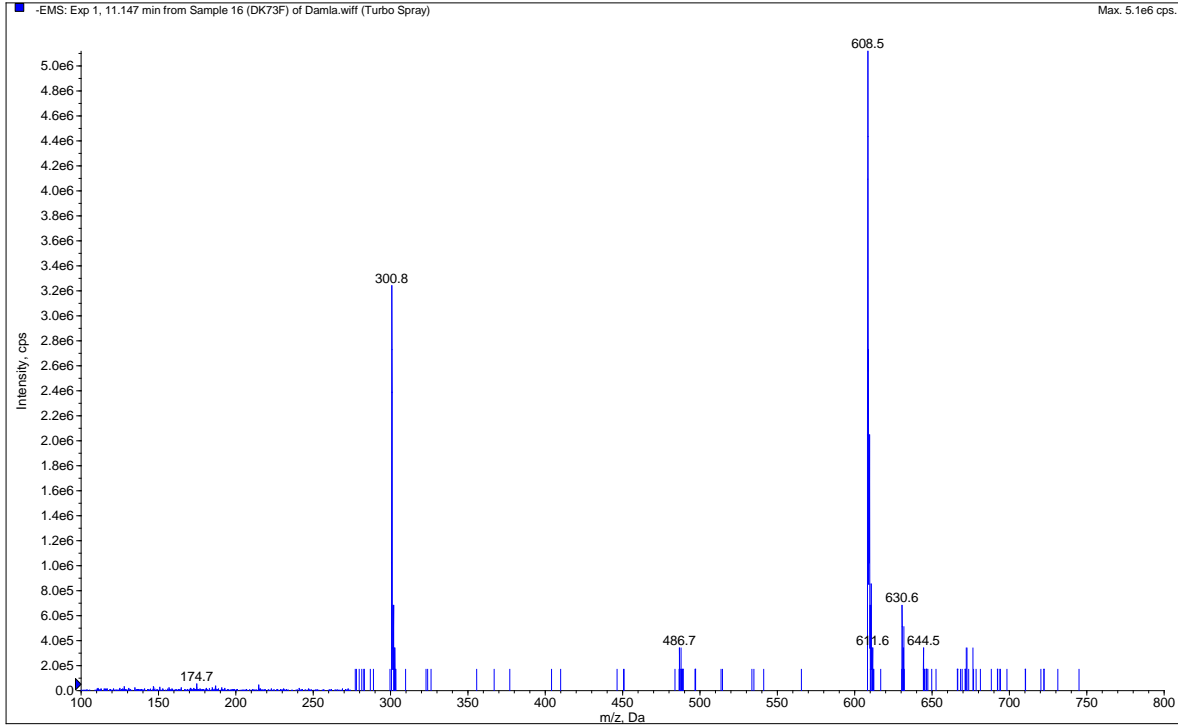
Elde edilen NMR ve kütle spektrum değerlerine göre M7 metabolitinin hesperidin bileşiğinin aglikon formu olan hesperetin olduğunu tespit edildi.

Kimyasal adlandırması: 5,7-Dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kroman-4-on
(C₁₆H₁₄O₆)

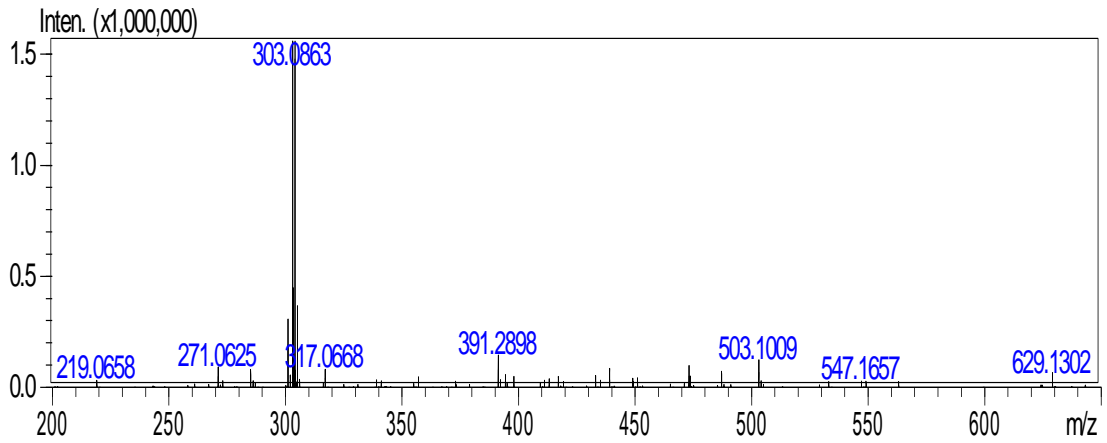
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.76 (1H, dd, $J=3.1$ Hz, $J_o=0.8$ Hz, H-3 α), 3.18 (1H dd, $J=4.5$ Hz, $J_o=1.0$ Hz, H-3 β), 3.87 (3H, s, OMe-4'), 5.51-5.40 (1H, m, H-2), 5.96 (1H, dd, $J=2.2$ Hz, $J_o=0.7$ Hz, H-8), 5.98 (1H, dd, $J=2.23$ Hz, $J_o=0.9$ Hz, H-6), 6.99 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-2'), 7.08 – 7.03 (2H, m, H-5', H-6'), 7.73 (1H, s, OH-3'), 9.67 (1H, s, OH-7), 12.19 (1H, s, OH-5).

¹³C-NMR (100 MHz, Aseton-*d*₆): 43.53 (C-3), 56.33 (OMe-4'), 79.82 (C-2), 95.88 (C-8), 96.83 (C-6), 103.23 (C-10), 112.32 (C-5'), 114.39 (C-2'), 118.78 (C-6'), 132.82 (C-1'), 147.61 (C-3'), 148.71 (C-4'), 164.29 (C-5), 165.29 (C-9), 167.42 (C-7), 197.14 (C-4) (Fletcher, 2011).

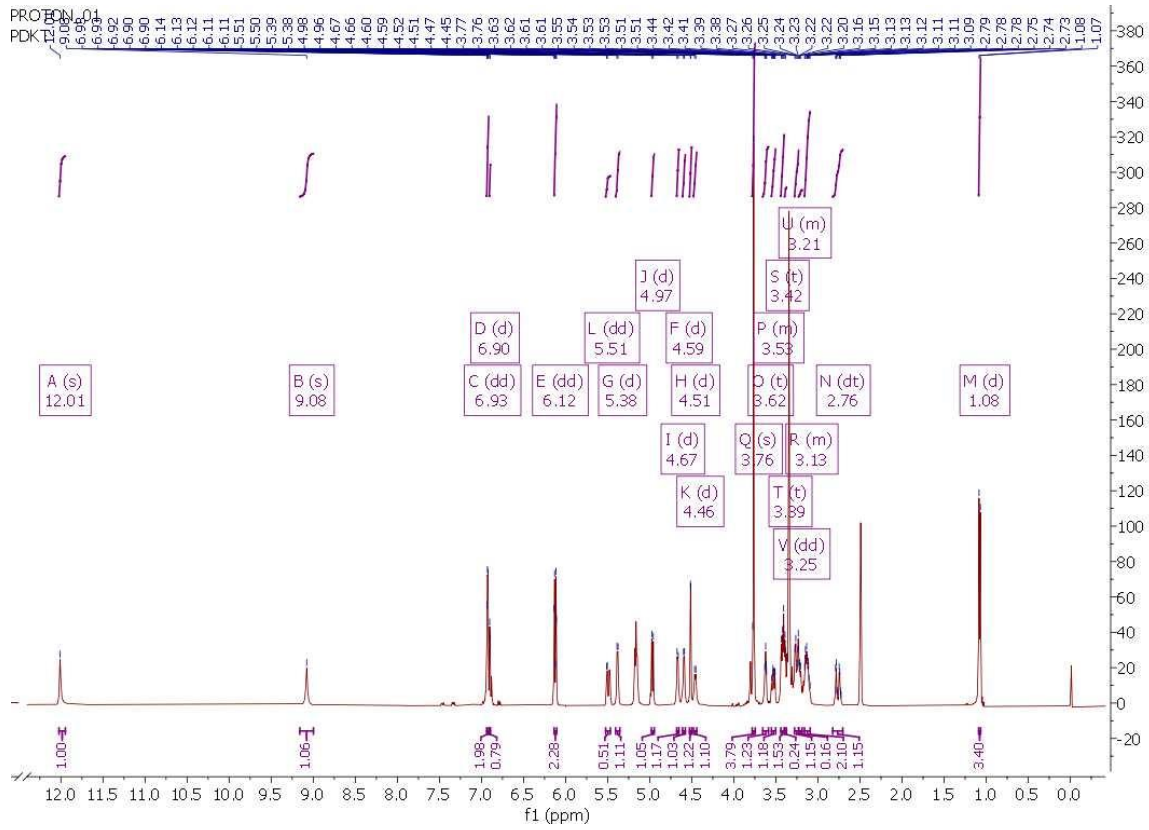
HRMS (ESI) (m/z) [M + H]⁺: 303.0863



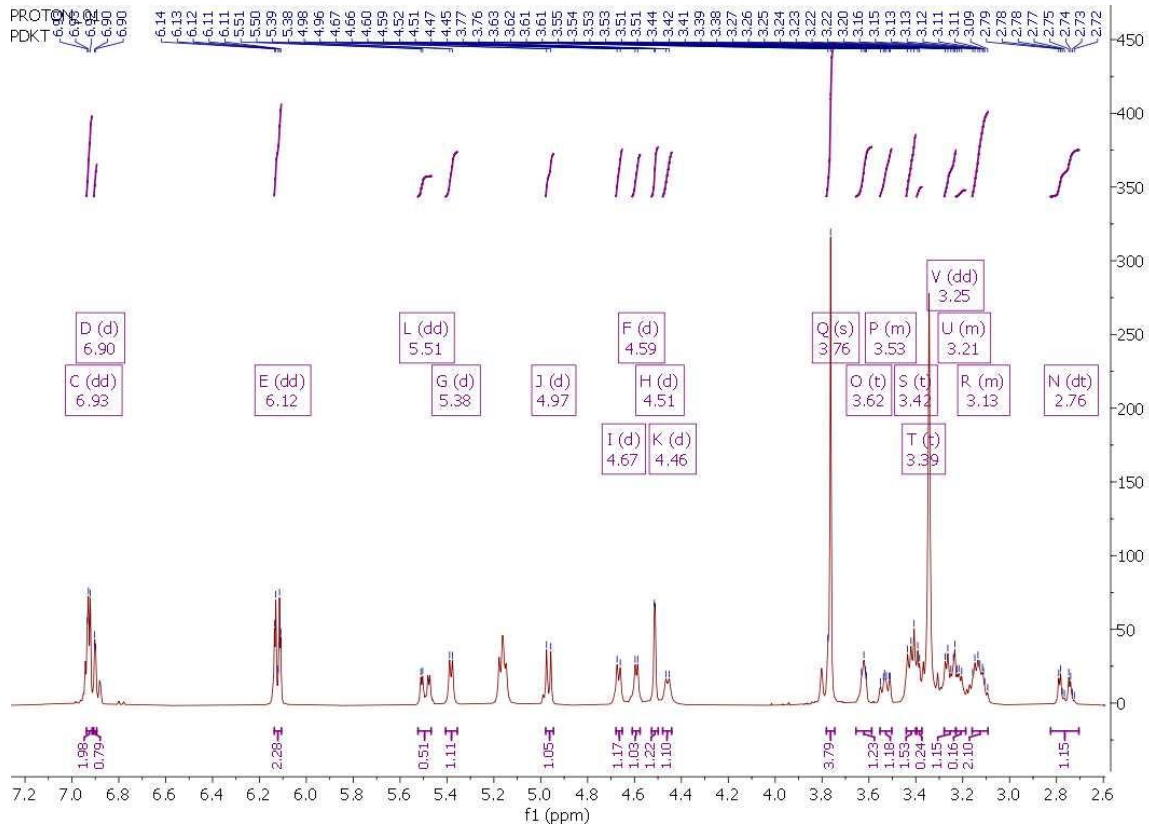
Şekil 4.32. Hesperidin kütle spektrumu



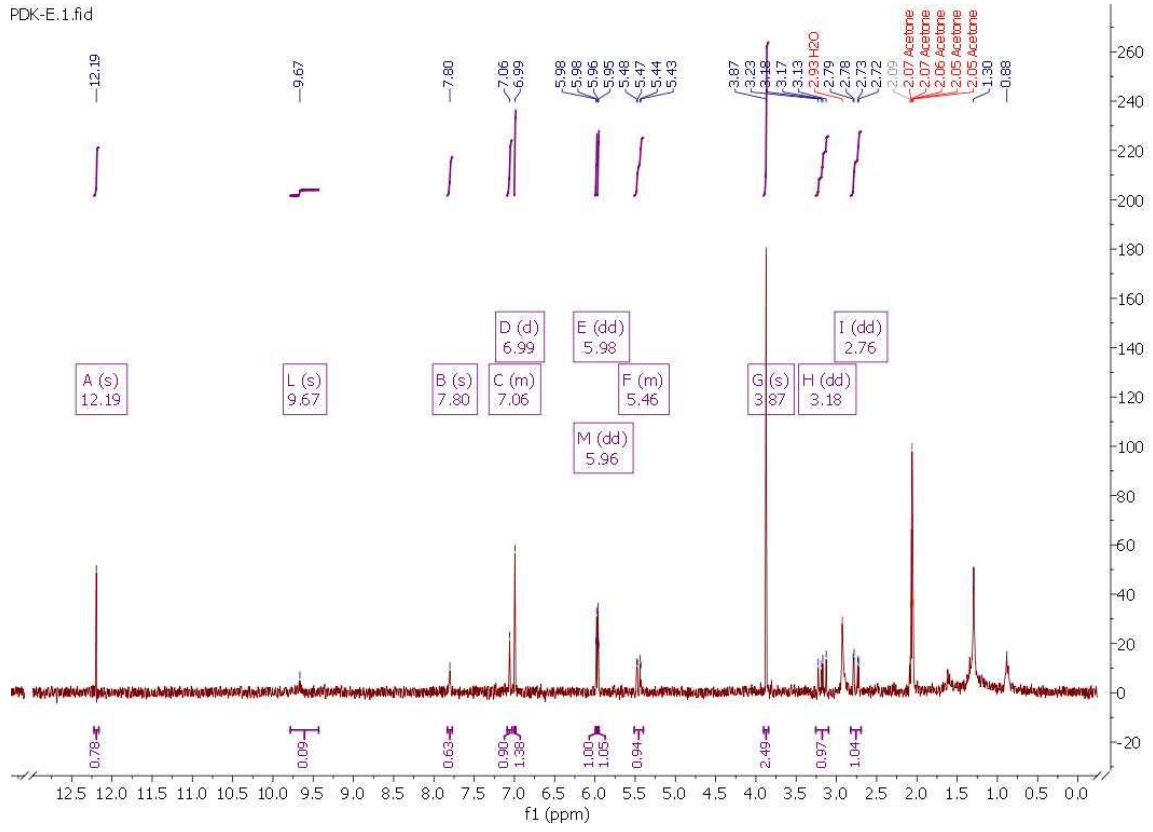
Şekil 4.33. M7 metaboliti HRMS spektrumu



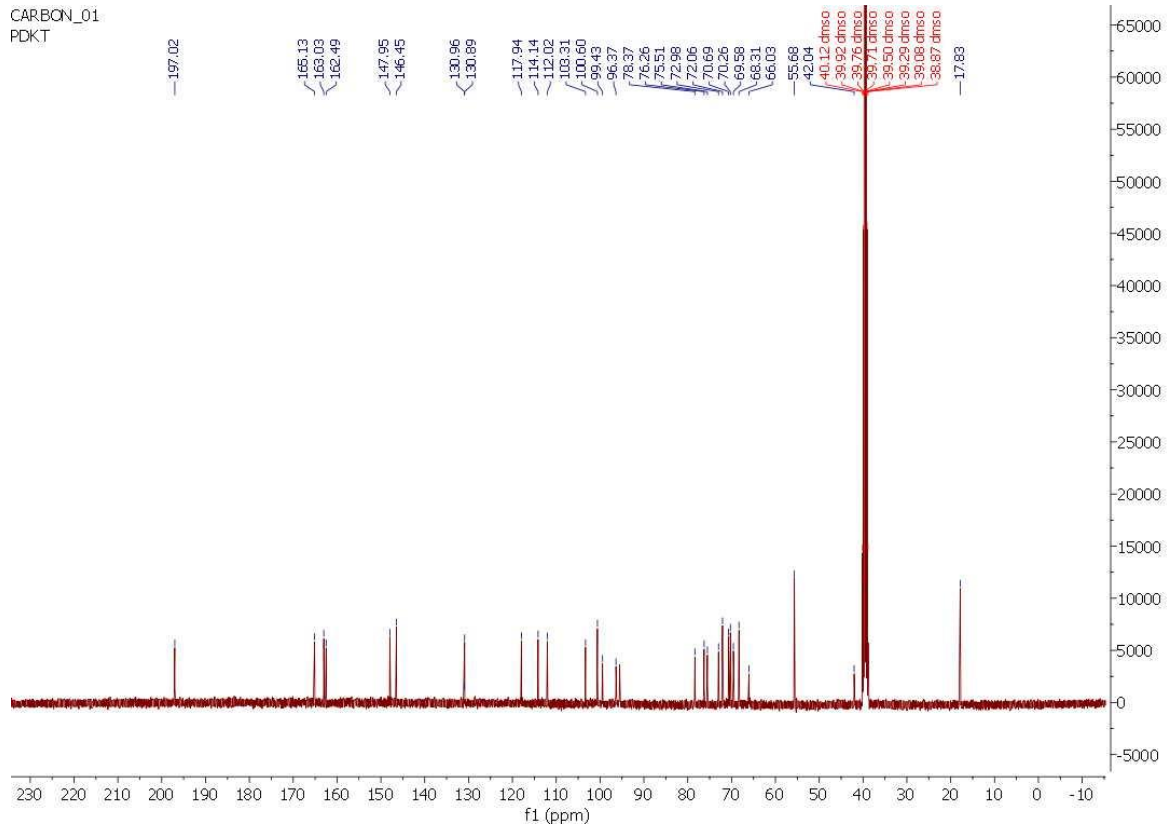
Şekil 4.34. Hesperidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



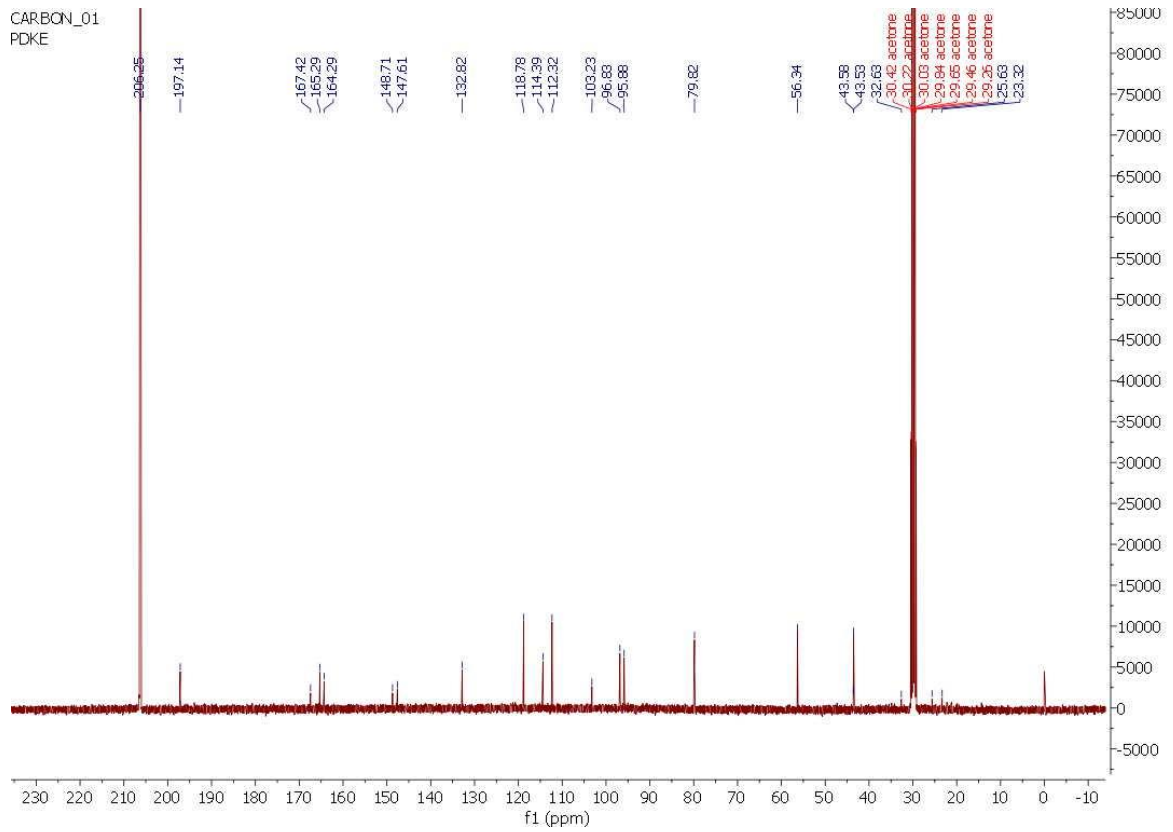
Şekil 4.35. Hesperidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu 2.6-7.2 ppm aralığı



Şekil 4.36. M7 metaboliti ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.37. Hesperidin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 4.38. M7 metaboliti ^{13}C -NMR spektrumu

Tablo 4. 3. Hesperidin ve M7'ye ait spektral bulgular

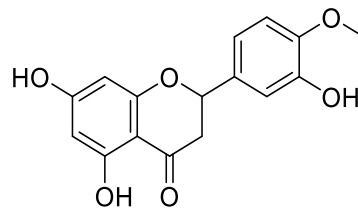
Hesperidin			Hesperetin (M7)		
¹ H-NMR (400 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (100 MHz) δ	¹ H-NMR (400 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (100 MHz) δ
5.49 dd, $J=12.2$ Hz, $J_o=3.3$ Hz (1H)	C2	78.37	5.45-5.41 m, 3.0 Hz (1H)	C2	79.82
2.76 dt, $J=16.8$ Hz, $J_o=4.7$ Hz (1H)	C3 α	42.04	2.78dd, $J=3.1$ Hz, $J_o=0.8$ Hz (1H)	C3 α	43.53
3.24 dd, $J=8.9$ Hz, $J_o=4.4$ Hz (1H)	C3 β		3.16 dd, $J=4.5$ Hz, $J_o=1.0$ Hz (1H)	C3 β	-
-	C4	197.02	-	C4	197.14
12.01 bs (1H)	C5 OH	163.03	12.18 s (1H)	C5 OH	164.29
6.93 dd, $J=5.2$ Hz, $J_o= 3.2$ Hz (2H)	C6	99.43	5.98 dd, $J= 2.2$ Hz, $J_o=1.1$ Hz (1H)	C6	96.83
-	C7	165.13	9.60 s (1H)	C7-OH	167.42
6.93 dd, $J=5.2$ Hz, $J_o= 3.2$ Hz (1H)	C8	96.37	5.95 dd, $J= 2.2$ Hz, $J_o= 0.7$ Hz (1H)	C8	95.88
-	C9	162.49	-	C9	165.29
-	C10	103.31	-	C10	103.23
-	C1'	130.89	-	C1'	132.82
6.13 dd, $J=6.4$ Hz, $J_o= 2.2$ Hz (1H)	C2'	117.94	6.98 dd, $J= 2.4$ Hz, $J_o= 0.7$ Hz (1H)	C2'	114.39
9.08 bs (1H)	C3' OH	112.02	7.73 s (1H)	C3' OH	147.61
-	C4'	147.95	-	C4'	148.71
6.89 d, $J=8.1$ (1H)	C5'	146.45	7.08 – 7.03 m (1H)	C5'	112.32
6.13 dd, $J=6.4$ Hz, $J_o= 2.2$ Hz (1H)	C6'	114.14	7.08 – 7.03 m (1H)	C6'	118.78
5.38 d, $J=4.9$ Hz (1H)	C1''	130.96	3.87 s (3H)	C4'-CH ₃	56.33

Tablo 4.3. (Devam)Hesperidin ve M7'ye ait spektral bulgular

Hesperidin			Hesperetin (M7)		
¹ H-NMR (400 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (100 MHz) δ	¹ H-NMR (400 MHz) δ	C	¹³ C-NMR (100 MHz) δ
4.46 d, <i>J</i> =6.0 Hz (1H)	C2''	72.98			
3.63 t, <i>J</i> =4.1 Hz (1H)	C3''	72.06			
4.51 d, <i>J</i> =1.6 Hz (1H)	C4''	69.58			
3.53 m (1H)	C5''	76.26			
4.59 d, <i>J</i> =4.5 Hz (1H)	C6''	66.03			
4.67 d, <i>J</i> =5.5 Hz (1H)	C6''				
4.97 d, <i>J</i> =5.5 Hz (1H)	C1'''	100.60			
3.41 t, <i>J</i> =4.3 Hz (1H)	C2'''	68.31			
3.39 t, <i>J</i> =4.3 Hz (1H)	C3'''	70.26			
3.24 m (1H)	C4'''	75.51			
3.13 m (1H)	C5'''	70.69			
1.07 d, <i>J</i> =6.0 Hz (3H)	C5'''	17.83			
	CH ₃				
3.76 s (3H)	C4'	55.66			
	OCH ₃				

δ : Kimyasal kayma ppm, C: Karbon atomu

Hesperetin (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksi flavanon) flavanon yapısında bir flavonoittir. Hesperidin'in aglikon yapısı olup hesperidin'den şeker gruplarının ayrılması sonucu oluşmaktadır (Salehi vd., 2021). Hesperetin'in kimyasal formülü Şekil 4.39'da yer almaktadır.



Şekil 4.39. Hesperetin kimyasal formülü (molekül ağırlığı: 302)

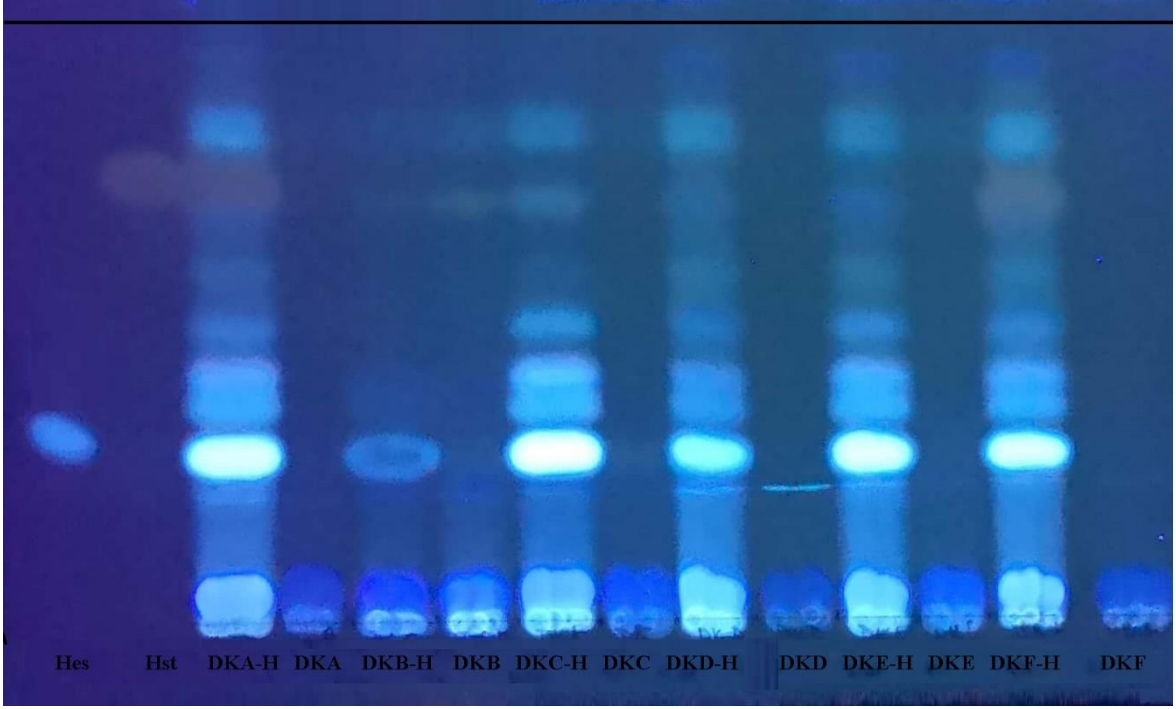
Hesperetin yaygın olarak genç narenciye meyvesinde (Rutaceae), aynı zamanda *Citrus sinensis* L. kabuğunda ve portakal suyunda bulunmaktadır. Ayrıca domates, elma ve çiçeklerde de bol miktarda bulunmaktadır (Salehi vd., 2021). Hesperetin hidrofobik bir yapıya sahip çoğu flavonoit yapısındaki bileşiğe benzer şekilde suda çözünürlüğü zayıf olup gastrointestinal sistemde düşük absorpsiyona sahiptir (Costa vd., 2019; Parhiz vd., 2015).

Ayrıca, hesperetin'nin hemoroit tedavisinde ve ayrıca ameliyat sonrası tromboembolizmi önlemede oldukça etkili olan vazoprotektif bir ajan olduğu bilinmektedir. Hesperetin umut vaat edici antioksidan (esas olarak serbest radikallerin süpürücü olarak işlev görür), östrojenik, anti-enflamatuvar, antikanser, antidiyabetik, antiaterojenik ve kardiyoprotektif etkiye sahiptir. Hesperetin bağırsak bakterilerinin etkisiyle hesperidin'in hidrolizinden elde edilebilmektedir (Parhiz vd., 2015; Salehi vd., 2021).

Bitki ve mikroorganizmada hesperetin sentezi eriodiktiyol 4'-*O*-metiltransferaz enzimiyle gerçekleşmektedir. Hesperetin biyosentezi Şekil 2.4'te yer almaktadır. Hesperetin, 7-*O*-glukosiltransferaz C-7 konumunda glikozile edilerek glikoz bağlanmakta olup hesperetin-7-*O*-glikoz oluşmaktadır. Yapısında glikoz ve ramnozdan oluşan iki şeker grubu taşıyan hesperidin'i elde etmek için 1,2-ramnosiltransferaz enzimi tarafından glukozil kısmının 2'-OH grubuna ramnoz bağlanmaktadır (Balasundram vd., 2006; Karim vd., 2021; Patel, 2018).

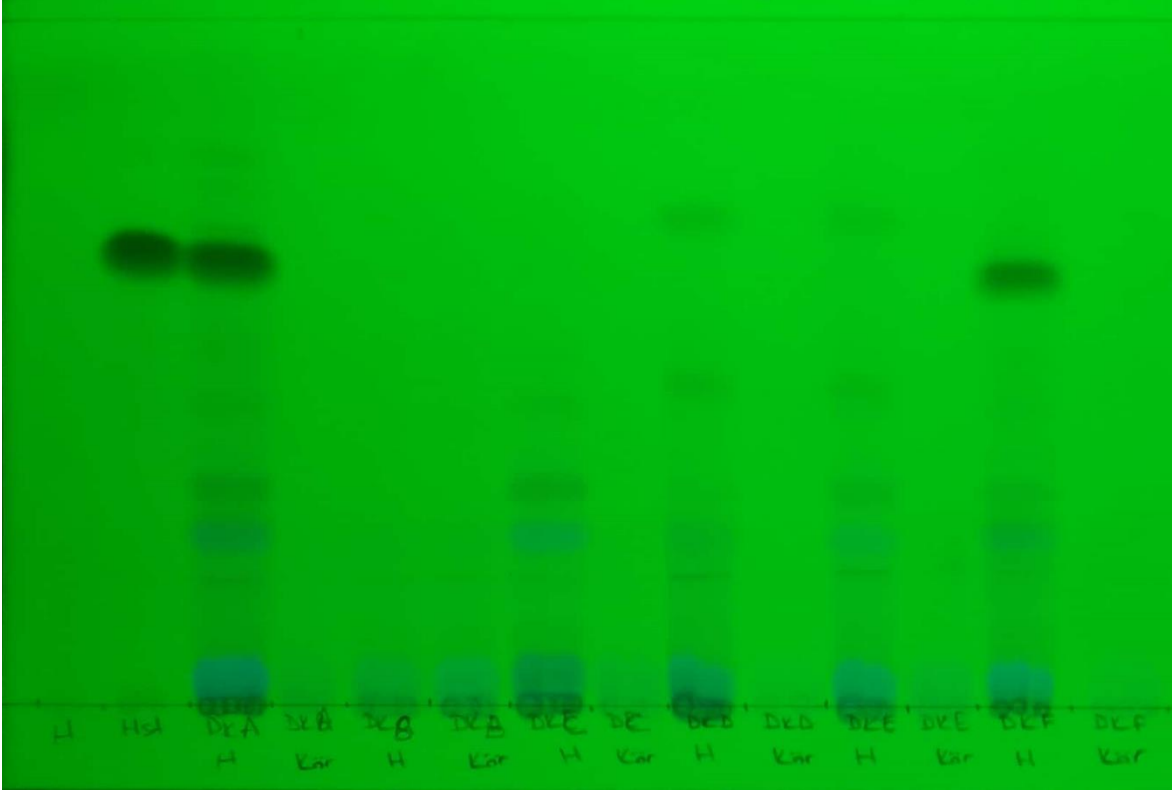
Literatürde mikrobiyal transformasyon çalışmaları kapsamında *Aspergillus* ve *Cunninghamella* cinsleri, *Rhizopus stolonifer*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces variotii*, *Streptomyces griseus* mikrobiyotadan izole *Pichia kluyverii* insan feçes florası kullanılarak hesperidin'den hesperetin dönüşümleri gözlemlenmiştir (Cheng vd., 2015; Dodda vd., 2012; Escudero-Lopez vd. 2016; Kim vd., 1998; Madeira vd., 2014; Nakajima vd., 2016; Nakajima vd., 2017; Sordon vd., 2016; Wang vd., 2005).

Tez çalışması kapsamında yer alan altı bakteri ile yapılan mikrobiyal transformasyon çalışmasına ait İTK plak görüntüleri 365 nm'deki Şekil 4.40'ta ve 254 nm'deki Şekil 4.41'de yer almaktadır. İTK çalışmasında mobil faz olarak etil asetat:*n*-hekzan:formik asit (30:20:0.5) hazırlandı. Bu İTK plağında bulunan metabolit (hesperetin) *Bacillus subtilis* var. *clausii* izole edildi. İzole edilen metabolit *Streptococcus thermophilus* dönüşüm ekstrelerinde de gözlemlenmektedir. Diğer bakterilerde hesperetin dönüşümü gözlemlenmedi.



Şekil 4.40. Bakterilerle hesperidin'in mikrobiyal transformasyon 365 nm'de İTK görüntüsü

Hes: Hesperidin, **Hst:** Hesperetin, **DKA-H:** *Bacillus subtilis* var. *clausii* dönüşüm ekstresi; **DKA:** *Bacillus subtilis* var. *clausii* kör ekstresi; **DKB-H:** *B. coagulans* dönüşüm ekstresi; **DKB:** *B. coagulans* kör ekstresi; **DKC-H:** *B. subtilis* var. *notto* dönüşüm ekstresi; **DKC:** *B. subtilis* var. *notto* kör ekstresi; **DKD-H:** *Lactobacillus fermentum* dönüşüm ekstresi; **DKD:** *L. fermentum* kör ekstresi; **DKE-H:** *L. rhomnosus* dönüşüm ekstresi; **DKE:** *L. rhomnosus* kör ekstresi; **DKF-H:** *Streptococcus thermophilus* dönüşüm ekstresi; **DKF:** *S. thermophilus* kör ekstresi



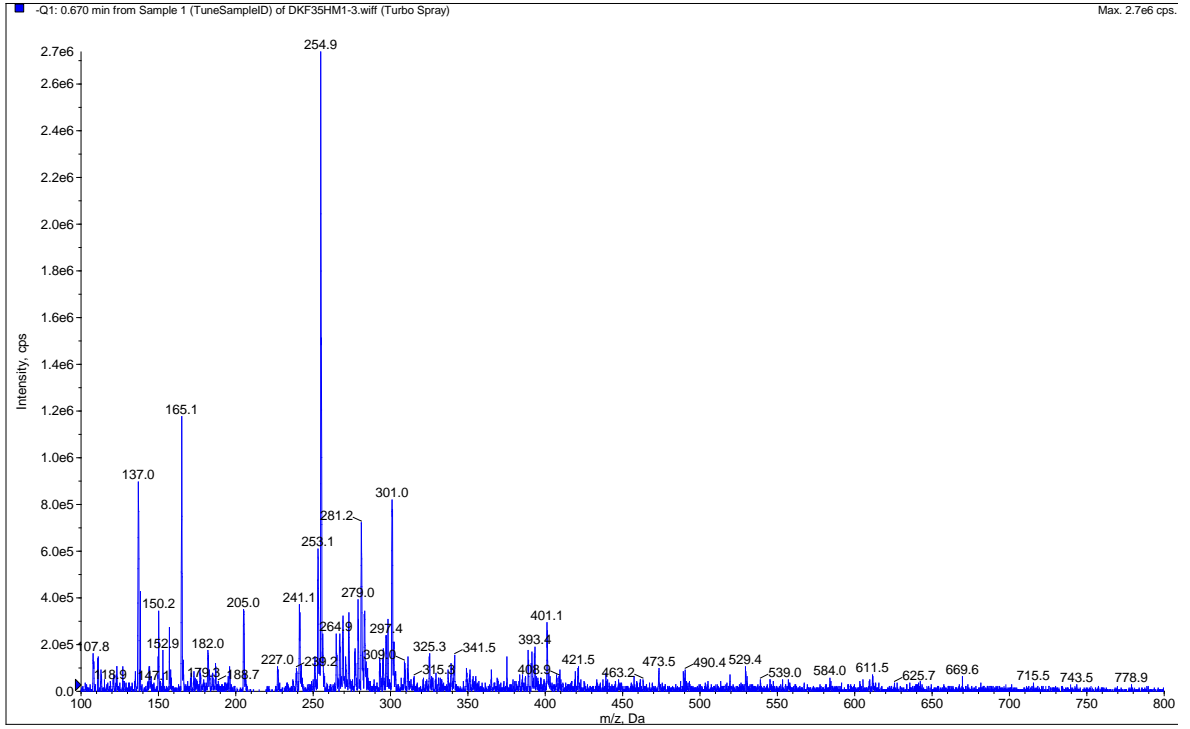
Şekil 4.41. Bakterilerle hesperidin'in mikrobiyal transformasyon 254 nm'de İTK görüntüsü

H: Hesperidin, **Hst:** Hesperetin, **DKA-H:** *Bacillus subtilis* var. *clausii* dönüşüm ekstresi; **DKA-kör:** *Bacillus subtilis* var. *clausii* kör ekstresi; **DKB-H:** *B. coagulans* dönüşüm ekstresi; **DKB-kör:** *B. coagulans* kör ekstresi; **DKC-H:** *B. subtilis* var. *notto* dönüşüm ekstresi; **DKC-kör:** *B. subtilis* var. *notto* kör ekstresi; **DKD-H:** *Lactobacillus fermentum* dönüşüm ekstresi; **DKD-kör:** *L. fermentum* kör ekstresi; **DKE-H:** *L. rhomnosus* dönüşüm ekstresi; **DKE-kör:** *L. rhomnosus* kör ekstresi; **DKF-H:** *Streptococcus thermophilus* dönüşüm ekstresi; **DKF-kör:** *S. thermophilus* kör ekstresi

- *Alternaria alternata* dönüşüm tepkimesi

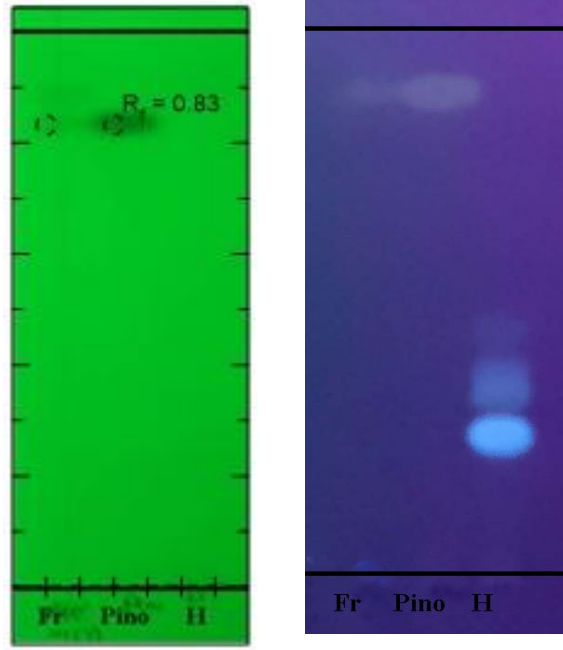
Alternaria alternata ile gerçekleştirilen preparatif ölçekten elde edilen dönüşüm ekstresi ile manuel kolon kromatografi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda dönüşüm ekstresinde tespit edilen üç metabolitten ikisinin yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılırken; biri literatürle destekli olası bileşik olarak tespit edildi.

Kolondan elde edilen %40-50 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonunda metabolit olarak **M7** (Hesperetin) gözlemlenirken; fraksiyonda ayrıca **M8** metaboliti gözlemlenmektedir. M8 ait kütle spektrumu Şekil 4.42'de yer almakta olup M8 [M-H]⁻ 254.9 olarak bulundu. NMR analizi için yeterli miktarda metabolit elde edilememiştir.



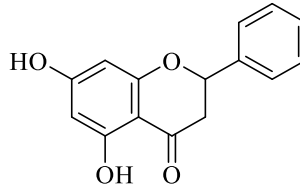
Şekil 4.42. M8 metaboliti kütle spektrumu

Literatürde kütle spektroskopisinden yola çıkılarak araştırıldığında pinosembrin ile benzer SK/KS-SK kütle fragmentleri gözlemlendi. Pinosembrin'in İTK analizden elde edilen görünür bölgede göstermiş olduğu morumsu leke dönüşüm metabolitinin İTK görüntüsü ile benzerlik göstermektedir (Melaku vd., 2017; Sang vd., 2012). Bu bilgidan yola çıkılarak Sigma-Aldrich firmasından temin edilen pinosembrin ile dönüşüm ekstresinden elde edilen fraksiyonla İTK çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışmaya ait Şekil 4.43'te yer almaktadır. Mobil faz olarak etil asetat:n-hekzan:formik asit (30:20:0.5) kullanılmış olup Rf değeri 0.38 olarak hesaplandı.



Şekil 4.43. Kolon fraksiyonu (Fr), Pinosembrin (Pino) ve Hesperidin (H) 254 nm ve 365nm'de İTK görüntüsü

Elde edilen fraksiyonun ve firmadan alınan pinosembrin bileşiğinin İTK ve SK-KS analiz sonuçlarına göre metabolitimizin pinosembrin olduğunu doğrulandı. Hesperidin'in şeker gruplarının koparılıp B halkasında bulunan 3' konumundaki hidroksi ve 4' metoksi konumundaki gruplarının kopması sonucu oluşmaktadır. Pinosembrin'in kimyasal formülü Şekil 4.44'te yer almaktadır.



Şekil 4.44. Pinosembrin'in (molekül ağırlık: 256) kimyasal yapısı

Pinosembrin (5,7-dihidroksiflavanon) flavanon yapısında bir flavonoittir. Pinosembrin çoğunlukla propolis içeriğinde bulunmaktadır. Ayrıca *Peperomia* Ruiz & Pav. ve *Piper* L. cinsleri ve Asteraceae familyasında bulunan bitkilerden de izole edilmiştir. Pinosembrin, düşük bir moleküler ağırlığa ve lipofilik özelliğe sahiptir, bu da kan-beyin bariyerinden (BBB) kolayca geçmesine izin vermektedir. Bu bileşiğin anti-enflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel ve nöroprotektif aktiviteleri ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilerek farmakolojik etkisi kanıtlanmıştır. Ayrıca pinosembrin'in iskemik inme tedavisi üzerinde de olumlu etkisi gözlemlenmektedir. Bu etkisinden dolayı Çin Gıda ve İlaç Dairesi (CFDA)

tarafından iskemik inme tedavisi için yeni bir ilaç olarak onaylanmıştır ve Faz II klinik deneme süreci başlatılmıştır (Lan vd., 2016; Rasul vd., 2013; Shen vd., 2019; Yang vd., 2012).

Bitkilerde pinosembrin üç enzimin etkisiyle fenilalanin'den sentezlenir: fenilalanin amonyak liyaz, 4-kumarat CoA ligaz ve kalkon sentaz olmak üzere. Bu bilgi doğrultusunda büyük ölçekte üretimi gerçekleştirebilmek için *Saccharomyces cerevisiae* ve *E. coli* rekombinant gen transferi ile glikozdan başarıyla sentezlenmektedir. Ayrıca endüstriyel boyutlarda üretim için primer amin veya sülfamid kullanılarak pinosembrin kimyasal olarak sentezlenmesi için yöntem geliştirilmektedir (Lan vd., 2016; Yan vd., 2005; Yuan vd., 2008).

Aynı kolon kromatografisinin %50-52 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonundan **M9** (3.6 mg) izole edildi. İTK plağında 365 nm'de turuncu-pembe renkte olup hesperidin'den daha apolar bir yapıya sahiptir. HRMS analizi sonucunda $[M-H]^+$ 288.2916 bulundu. M9 metaboliti daha önce literatürde eriodiktiyol olarak tanımlandığı görülmüştür (Silva vd., 2015). İzole edilen M9'ya ait kütle, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumu verileri sırasıyla Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4. 47'de bulunurken; M9 metabolitine ait spektral bulgular Tablo 4.4'te yer almaktadır.

- **M9 spektral bilgileri**

Hesperidin NMR analizlerinde çözücü olarak DMSO-*d*6 kullanılırken; M9 metabolitinde aseton-*d*6 çözücüsü kullanıldı. 1H -NMR spektrumu hesperidin'e ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında şeker gruplarının varlığını gösteren 5.38-3.15 ppm aralığındaki pikler gözlemlenmedi. Ayrıca şeker grubundaki metile ait 1.07 (3H, d, $J=6.0$ Hz) sadece hesperidin spektrumunda bulundu. Hesperidin'de bulunan 2 hidroksi grubunun pikleri 12.01ppm ve 9.08 ppm'de gözlemlenirken; M9 ait hidroksi pikleri 12.68 ppm, 9.45 ppm 8.98 ppm ve 8.54 ppm'de singlet olarak bulundu. Hesperidin'de 3.76 ppm'de gelen metoksi piki M9'da gözlemlenmezken; M9 metabolitinin 8.98 ppm'de C-4' yer alan hidroksi piki gözlemlenmektedir.

Hesperidin ^{13}C -NMR spektrumunda 66-130 ppm aralığındaki, pikler şeker grubuna ait olup aynı zamanda şeker grubundaki metile ait pik 1.83 ppm'de gözlemlenmektedir. Hesperidin'de 55.66 ppm'de metoksi piki gözlemlenirken; M9'de bu pik bulunmamaktadır.

Kimyasal adlandırması: 2-(3,4-Dihidroksifenil)5,7-dihidroksikroman-4-on

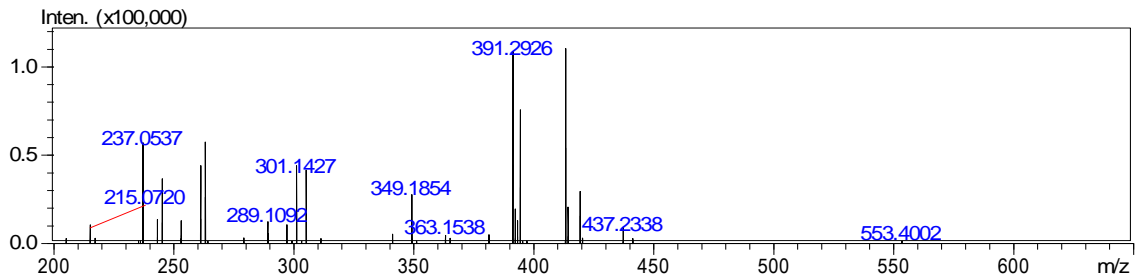
($C_{15}H_{12}O_6$)

1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): 2.87 – 2.81 (1H m, H-3 α), 3.55 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-3 β), 4.12 (1H, s, H-2), 5.34 (1H, s, H-6), 6.31(1H, s, H-8), 7.13 (2H, s, H-5', H-6'),

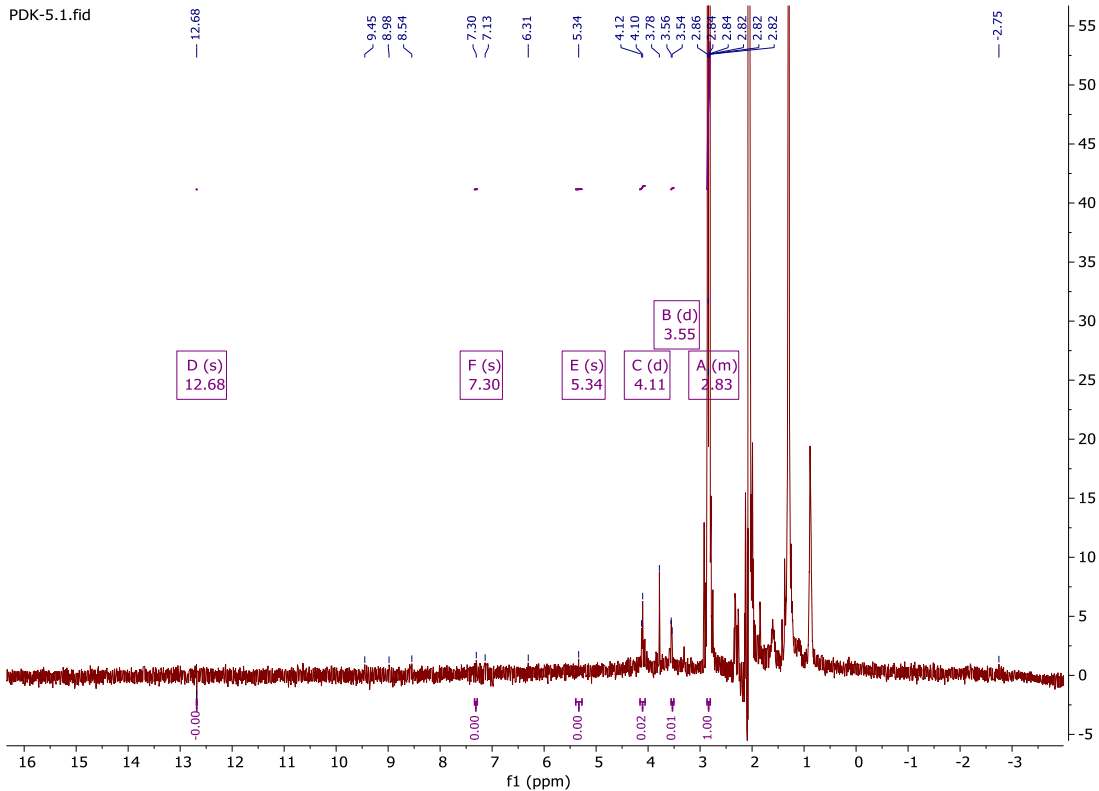
7.30(1H, s, H-2'), 8.54 (1H, s, OH), 8.98 (1H, s, OH), 9.45 (1H, s, OH-7), 12.68 (1H, s, OH-5).

^{13}C -NMR (75 MHz, Aseton- d_6): 46.67 (C-3), 67.02 (C-2), 89.14 (C-8), 89.14 (C-6), 102.80 (C-10), 112.55 (C-2'), 113.51 (C-5'), 113.51 (C-6'), 131.73 (C-1'), 139.54 (C-3'), 143.70 (C-4'), 155.84 (C-5), 176.53 (C-9), 180.38 (C-7), 202.39 (C-4) (Fletcher, 2011; Silva vd., 2015).

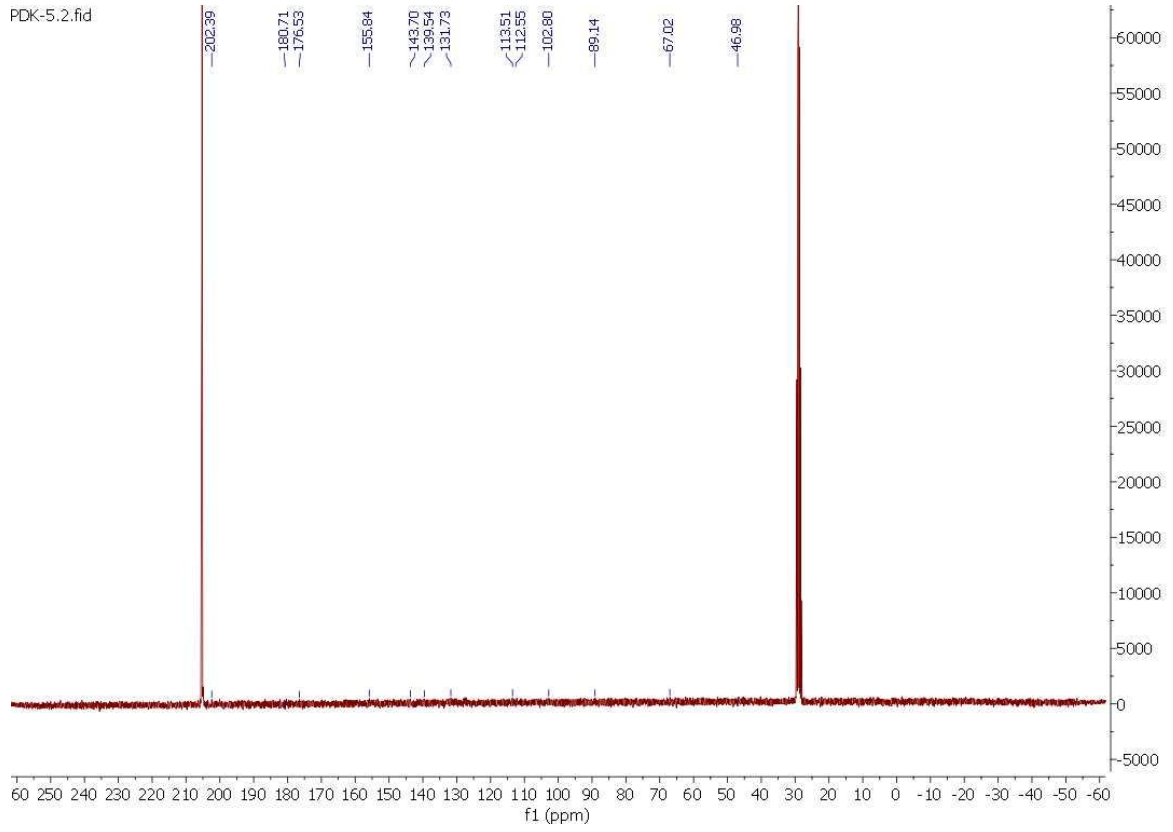
HRMS (ESI) (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$: 289.1092



Şekil 4.45. M9 metaboliti HRMS spektrumu



Şekil 4.46. M9 metabolit ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4. 47. M9 metaboliti ^{13}C -NMR spektrumu

Tablo 4.4. *M9'a ait spektral bulgular*

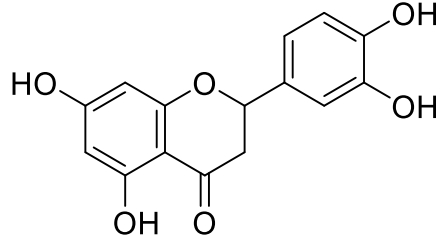
Metabolit 9		
¹H-NMR (400 MHz) δ	C	¹³C-NMR (75 MHz) δ
4.12 s (1H)	C2	67.02
2.87 – 2.81 m (1H)	C3 α	46.98
3.55 d, <i>J</i> = 5.1 Hz (1H)	C3 β	-
-	C4	202.39
12.68 s (1H)	C5 OH	155.84
5.34 s (1H)	C6	89.14
9.45 s (1H)	C7 OH	180.71
6.31 s (1H)	C8	89.14
-	C9	176.53
-	C10	102.80
-	C1'	131.73
7.30 s (1H)	C2'	112.55
8.54 s (1H)	C3' OH	139.54
8.98 s (1H)	C4'	143.70
7.13 s (1H)	C5'	113.51
7.13 s (1H)	C6'	113.51

δ : Kimyasal kayma ppm; C: Karbon atomu

NMR ve HRMS analiz sonuç yorumlaması ve literatürdeki verilerin desteği ile metabolit eriodiktiyol olarak doğrulandı. Hesperidin'in yapısındaki şeker gruplarının kopması ile hesperitin (aglikon formu) elde edilmektedir. Daha sonrasında B halkasının 4' konumunda demetilasyon tepkimesi gerçekleşmiştir. Bu konumdaki metil grubunun ayrılması ile eriodiktiyol elde edildi (Kim vd., 2011).

Eriodiktiyol (3',4',5,7-tetrahidroksiflavanon) flavanon yapısında bir flavonoittir. Eriodiktiyol'ün kimyasal formülü şekilde yer almaktadır. *Citrus* cinsinde ve sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır (Islam vd., 2020). Kuzey Amerika'da *Eriodictyon californicum*

(Hook. & Arn.) Decne. bitkisinden izole edilmiştir. Eriodiktiyol ayrıca *Eupatorium* bitkisinde bulunurken; limon, *Rosa canina* L., *Millettia duchesnei* De Wild. tomurcuklarında eriositrin (glikozit formu) tanımlanmıştır (Clavin vd., 2007; Islam vd., 2020; Ley vd., 2005).



Şekil 4. 48. Eriodiktiyol (molekül ağırlığı: 288) kimyasal yapısı

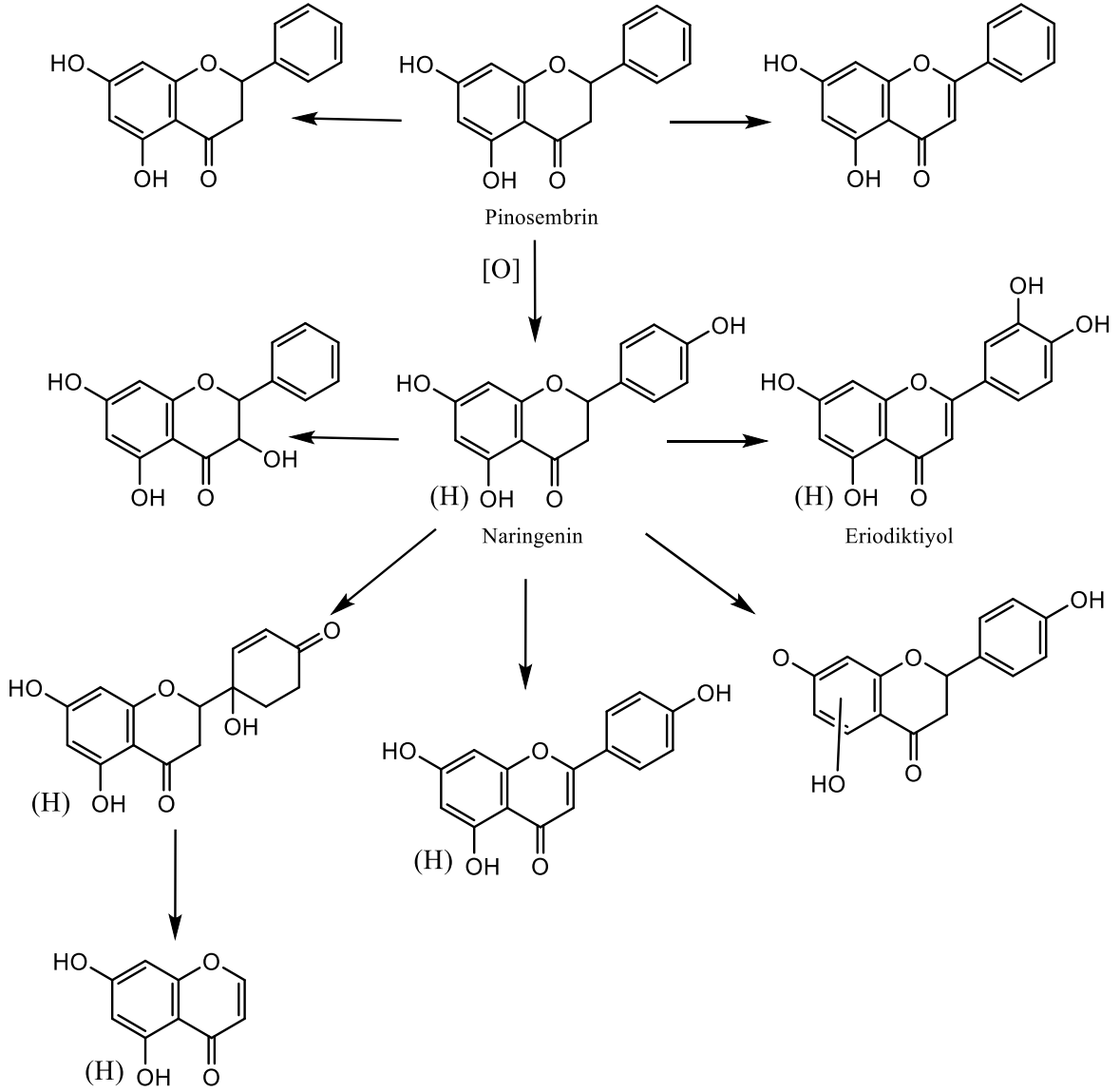
Eriodiktiyol farmakolojik olarak antioksidan, antidiyabetik, anti-enflamatuvar, antikanser, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiye sahiptir (Deng vd., 2020; Islam vd., 2020; Kwon ve Choi, 2019; Zhang vd., 2020; Zhu vd., 2015).

Bitki ve mikroorganizmanın yapısındaki biyosentez yolağında eriodiktiyol'ün sentezi hesperidin ile aynı yolaktan gerçekleşmektedir (Karim vd., 2021). Biyosentez yolağı Şekil 2.4'te yer almaktadır. Literatürde L-tirozin rekombinant gen teknolojisi ile *E. coli* suşundan hareketle eriodiktiyol sentezlenmiştir (Zhu vd., 2014).

Oral yoldan alınan eriodiktiyol genellikle, bağırsak mikrobiyotası tarafından glukuronidasyona uğramaktadır. Karaciğerde metoksilasyon tepkimesi ile metabolize edilip homoeriodiktiyol'a dönüşmektedir. Homoeriodiktiyol, eriodiktiyol'ün B halkasındaki 3' konumuna metil grubunun eklenmesi ile oluşmaktadır (Islam vd., 2020).

Literatürde sıçan karaciğer mikrozomları kullanılarak pinosembrin'den elde edilen dönüşüm metabolitleri araştırılmıştır. Bu çalışmada pinosembrin dönüşüm metabolitlerinin kimyasal formülleri Şekil 4.49'de yer almaktadır. pinosembrin 4'-hidroksilasyon yolağı ile naringenin'e dönüşümü gözlemlenmiştir. Naringenin'nin B halkasının 3' konumuna hidroksi eklenmesi ile eriodiktiyol dönüşümü gözlemlendi (Nikolic ve van Breemen, 2004).

Tez çalışmasında *A. altarnata*'dan elde edilen diğer bir metabolit ise eriodiktiyol'dur. Bu çalışmada gözlemlenen iki metabolitin ikisi de bitkide şikimik asit yolağının farklı yollarından elde edilmektedir. Bu çalışmada karaciğer mikrozomları ile bu metabolitlerin elde edildiği gösterilmiş olup iki metabolitin ara basamağı olarak elde edilen naringenin oluşumu gözlemlendi. Bitki biyosentez yolağında Şekil 2.4'te gösterildiği üzere önce eriodiktiyol daha sonra da naringenin dönüşümü gözlenmektedir. Literatürde yer alan bu bilgiler pinosembrin ve eriodiktiyol metabolitlerinin dönüşümlerini desteklemektedir.



Şekil 4.49. Pinosembrin sıçan karaciğer mikrozomları ile transformasyon yolağı (Nikolic and van Breemen, 2004)

Kolon kromatografisinden elde edilen %95 *n*-hekzan:etil asetat fraksiyonundan 30 mg metabolit **M10** izole edildi. 365 nm’de turuncu renkte olup hesperidin’den daha polar iken; hesperetin’den daha apolar bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi. İzole edilen M10’ya ait ¹H ve ¹³C-NMR verileri Şekil 4.51-Şekil 4.53 bulunmaktadır. M10 metabolitine ait HRMS spektrumu Şekil 4.50’de bulunurken; M10 metabolitine ait spektral bulgular Tablo 4.5’te yer almaktadır.

- **M10 spektral bilgileri**

¹H-NMR spektrumu hesperidin'e ait spektrumlar ile karşılaştırıldığında şeker gruplarının varlığını gösteren 5.38-3.15 ppm aralığındaki pikler gözlemlenmedi. Ayrıca şeker grubundaki metile ait 1.07 (3H, d, $J=6.0$ Hz) sadece hesperidin spektrumunda bulundu. hesperidin'de bulunan 2 hidroksi grubunun pikleri 12.01 ppm ve 9.08 ppm'de gözlemlenirken; hesperetine ait hidroksi pikleri 12.35 ppm, 10.51 ppm ve 9.22 ppm'de singlet olarak bulundu. Ayrıca 2.41 ppm 3H singlet piki metil varlığını göstermektedir. 3.95 – 3.92 (1H, m, H-2 α), 4.00 – 3.97 (1H, m, H-2 β) 3.43 (1H, dd, $J = 1.4, 0.8$ Hz, H-3 α) ve 3.41 – 3.40 (1H, m, H-3 β) pikleri yapının kalkona döndüğünü göstermektedir.

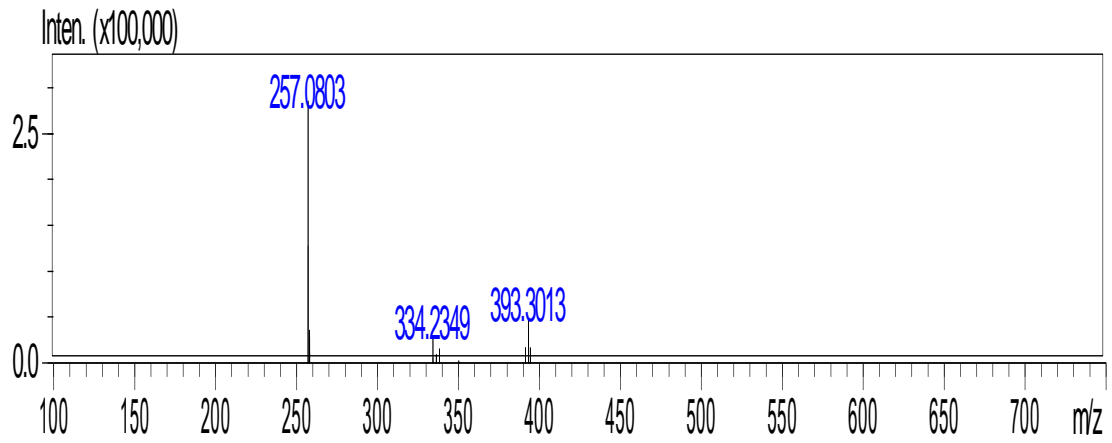
Hesperidin ¹³C-NMR spektrumunda 66-130 ppm aralığındaki, pikler şeker grubuna ait olup aynı zamanda şeker grubundaki metile ait pik 17.83 ppm'de gözlemlenmektedir. Hesperetin'de 35.50 ppm'de metil piki gözlemlenirken; aynı pik hesperidinde bulunmamaktadır. Kütle spektrumunun olmaması ve iki boyut NMR'da piklerin zayıf gelmesinden dolayı yapı tayini tam olarak gerçekleştirilememiş olup olası kalkon yapısı olarak tespit edildi.

Kimyasal adlandırması: 1-(2,4-Dihidroksifenil)3-(3-hidroksifenil)prop-2-en-1-on
(C₁₅H₁₂O₄)

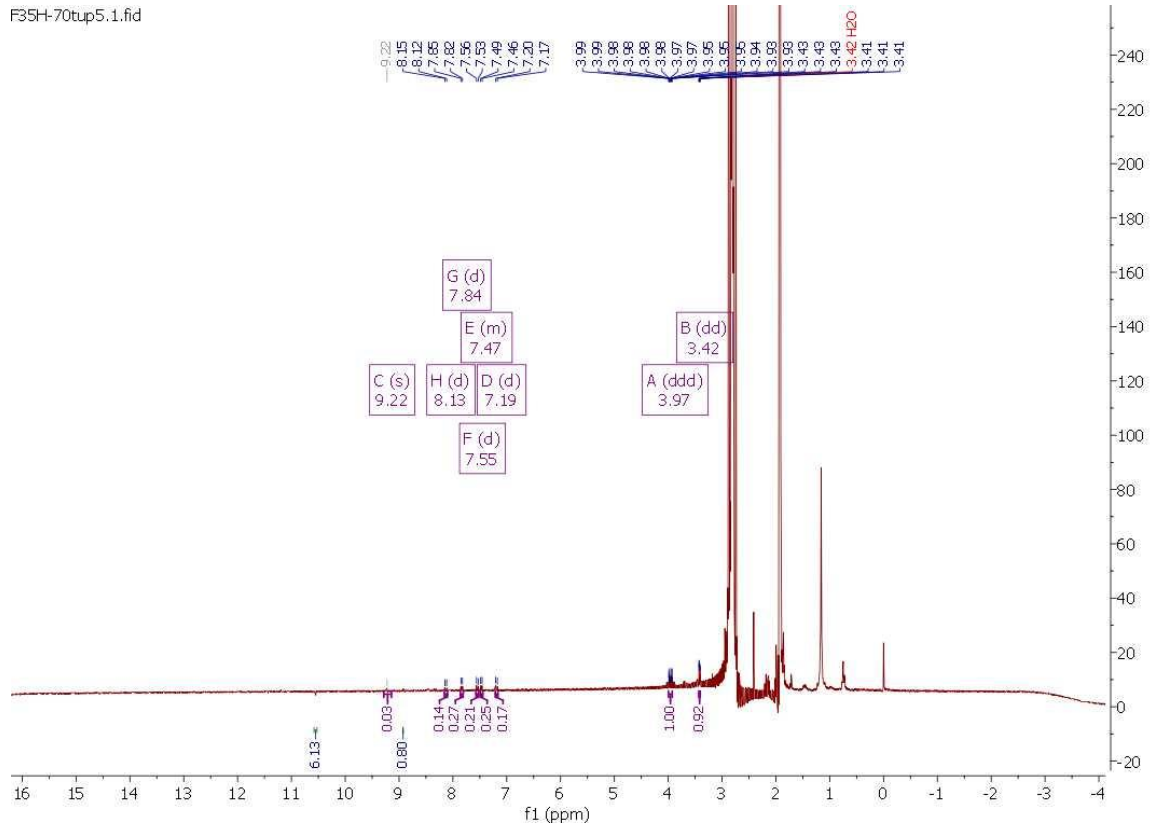
¹H-NMR (300 MHz, Aseton-*d*₆): 3.42 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J_o=0.8$ Hz, H-3), 3.96 (1H, dd, $J=7.28$ Hz, $J_o=0.19$ Hz, H-2), 7.19 (1H, d, $J= 9.0$ Hz, H-6''), 7.47 (1H, d, $J= 9.0$ Hz, H-2''), 7.55 (1H, d, $J= 9.5$ Hz, H-5'), 8.13 (1H, d, $J= 9.5$ Hz, H-3'), 7.84 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3'', H-5''), 8.93 (1H, s, OH-2'), 9.22 (1H, s, OH-4''), 10.51 (1H, s, OH-4').

¹³C-NMR (75 MHz, Aseton-*d*₆):46.31 (C-3), 53.52 (C-2), 103.08 (C-3'), 111.19 (C-1', C-5'), 116.77 (C-3'', C-5''), 120.12 (C-2'', C-6''), 127.81 (C-1''), 139.45 (C-6'), 153.56 (C-4''), 163.38 (C-4'), 167.64 (C-2'), 231.53(C-1) (Puranik ve Srivastava, 2017).

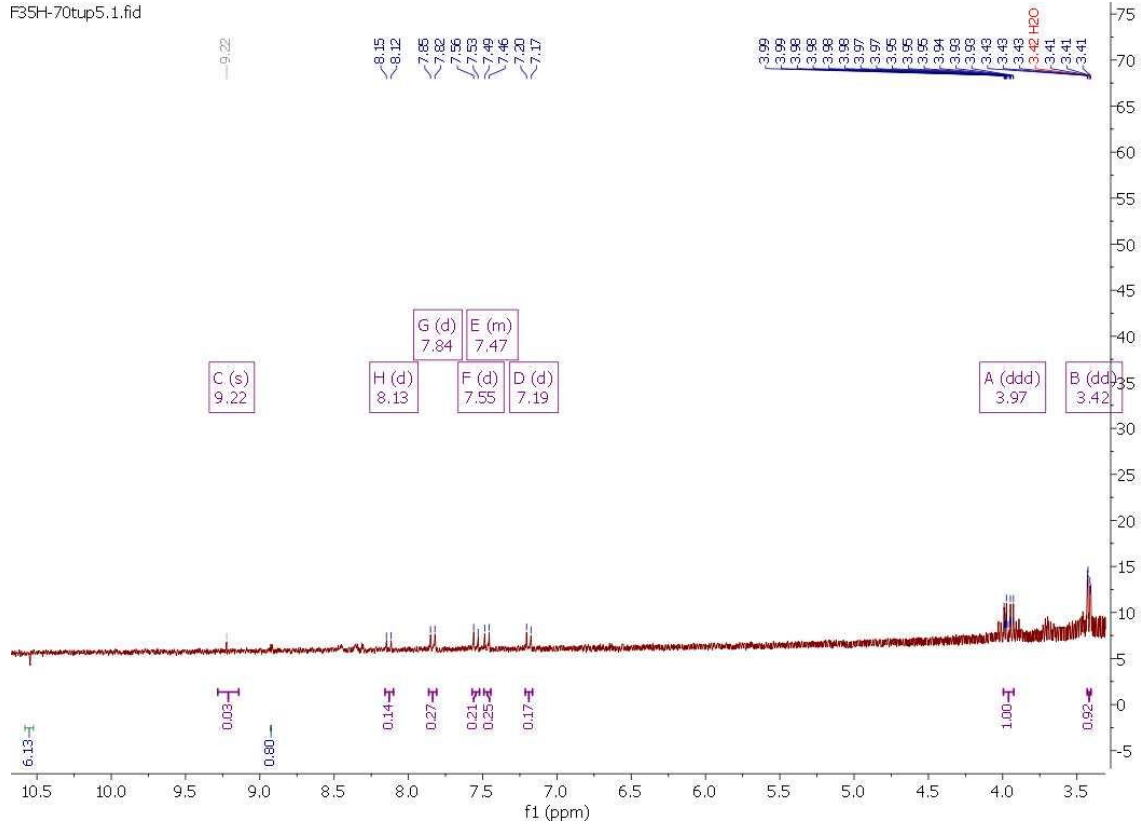
HRMS (E+): 257.0803



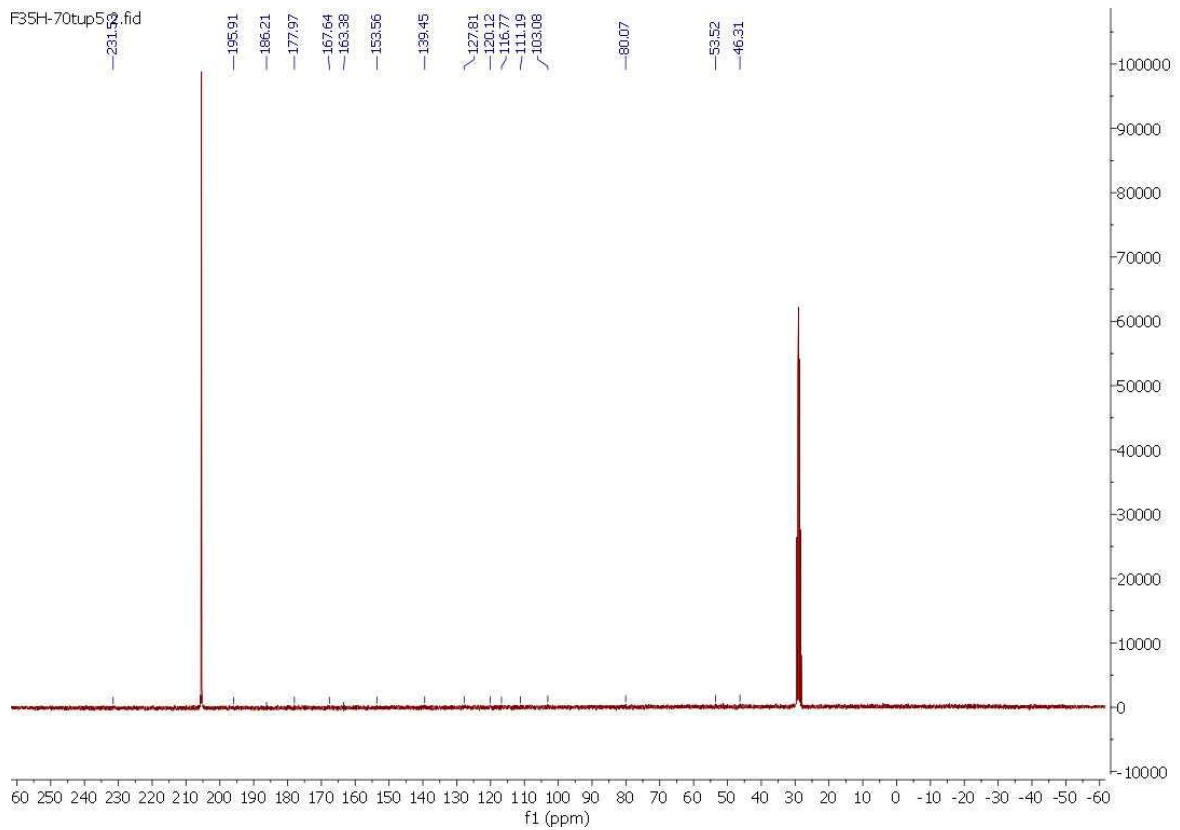
Şekil 4.50. M10 metaboliti HRMS spektrumu



Şekil 4.51. M10 metaboliti ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.52. M10 metaboliti ¹H-NMR spektrumunda 3-10.50 ppm aralığı

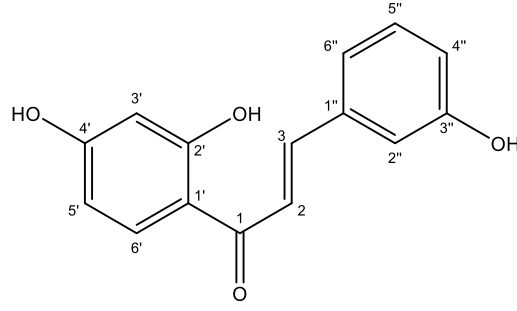


Şekil 4.53. M10 metaboliti ¹³C-NMR spektrumu

Tablo 4.5. *M10'a ait spektral bulgular*

Metabolit 10		
¹H-NMR (300 MHz) δ	C	¹³C-NMR (75 MHz) δ
-	C1	231.53
3.95 – 3.92 m (1H)	C2 α	53.52
4.00 – 3.97 m (1H)	C2 β	-
3.43 dd, $J = 1.4, 0.8$ Hz (1H)	C3 α	46.31
3.41 – 3.40 m (1H)	C3 β	-
-	C1'	111.19
12.35 s (1H)	C2' OH	167.64
8.13 d, $J = 9.5$ Hz (1H)	C3'	103.08
10.51 s (1H)	C4' OH	163.38
7.56 d, $J = 9.5$ Hz (1H)	C5'	111.19
-	C6'	139.45
-	C1''	127.81
7.49 d, $J = 9.0$ Hz (1H)	C2''	120.12
7.84 d, $J = 8.9$ Hz (2H)	C3''	116.77
9.22 s (1H)	C4'' (OH)	153.56
7.84 d, $J = 8.9$ Hz (1H)	C5''	116.77
7.19 d, $J = 9.0$ Hz (1H)	C6''	120.12
2.41 s (1H)	C6' CH ₃	35.50

δ : Kimyasal kayma ppm; C: Karbon atomu

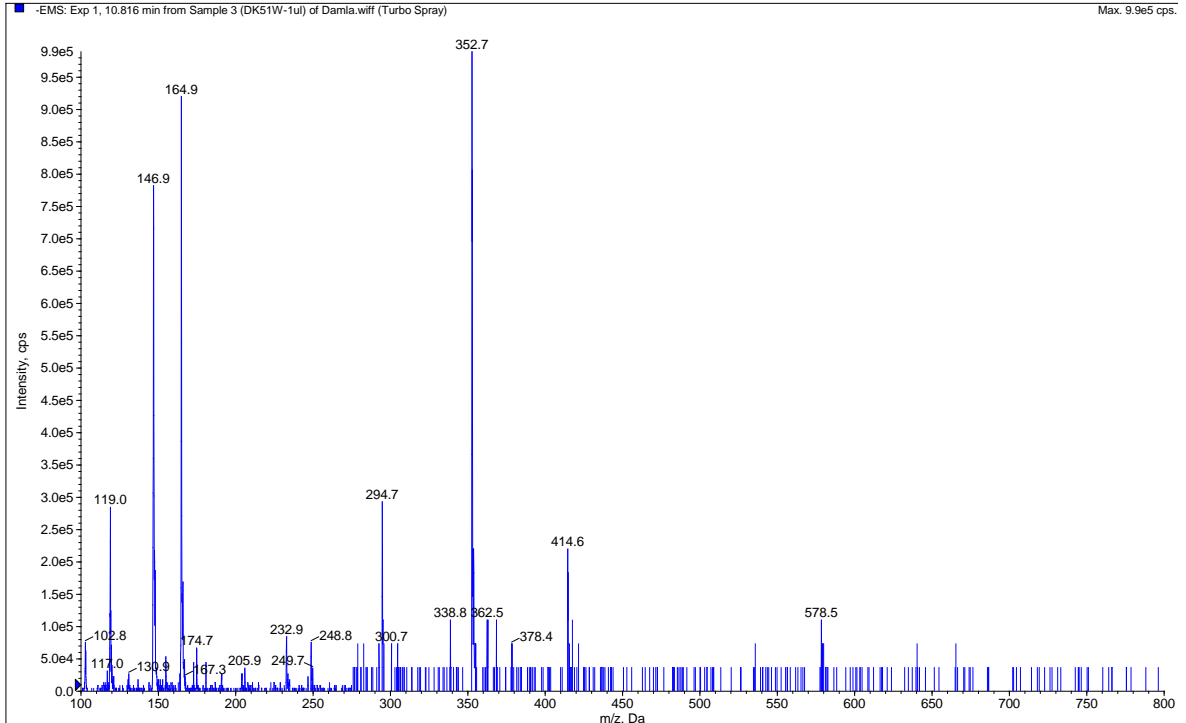


Şekil 4.54. M10 metaboliti (molekül ağırlığı: 256) kimyasal yapısı

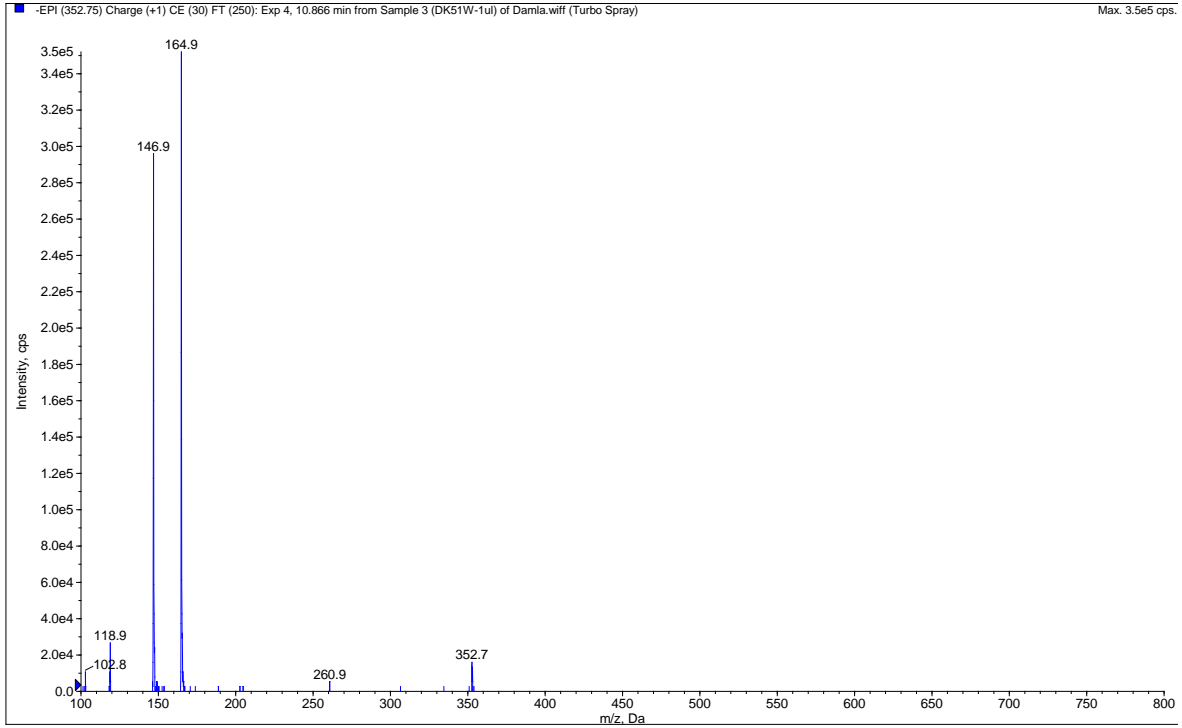
- *Sporobolomyces pararoseus* dönüşüm tepkimesi

Sporobolomyces pararoseus dönüşüm ekstresi ile OBSK cihazında *n*-hekzan ve etil asetat çözücü sistemiyle izolasyon çalışmaları yapıldı.

% 100 metanol fraksiyon metabolit **M11** İTK plağında 365 nm’de sülfürik asit reaktifi püskürtüldükten sonra sarı renkte floresans özellik göstermekte olup SK/KS-KS spektrumuna göre molekül ağırlığı 353 olarak tespit edildi (Şekil 4.55 ve Şekil 4.56). Metabolit miktarının az olmasında dolayı yapısı aydınlatılamadı.



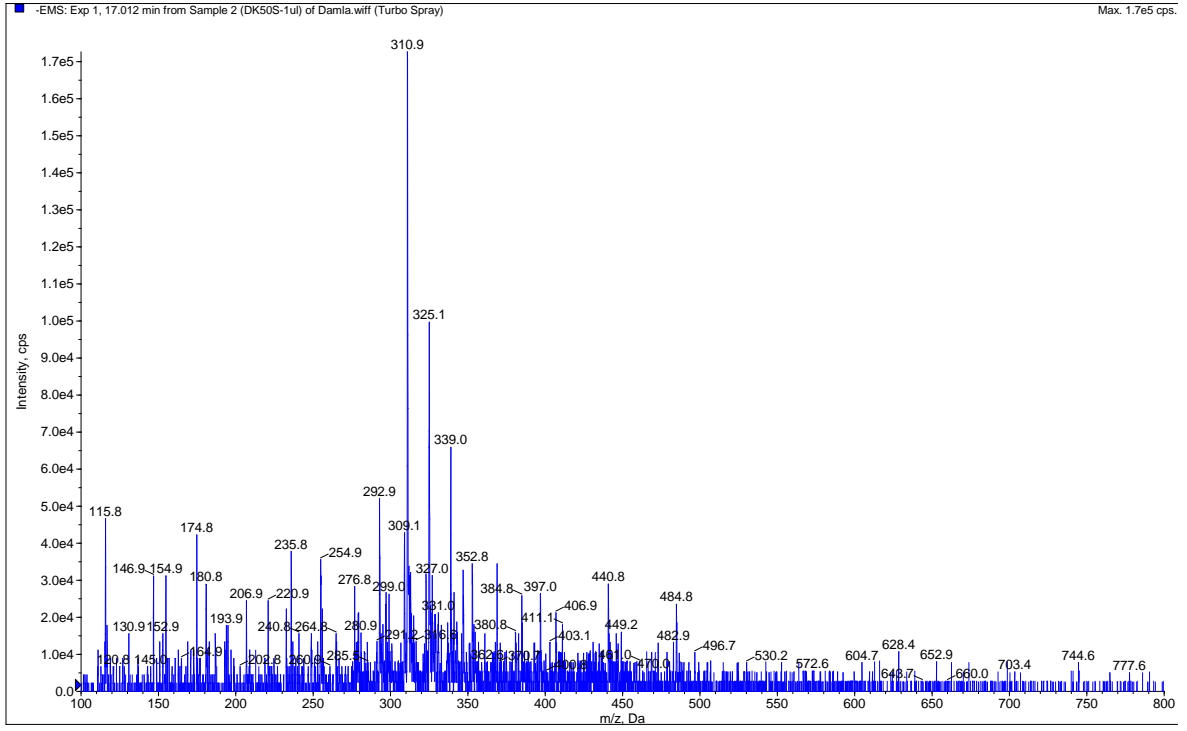
Şekil 4.55. M11 metaboliti SK/KS-KS spektrumu



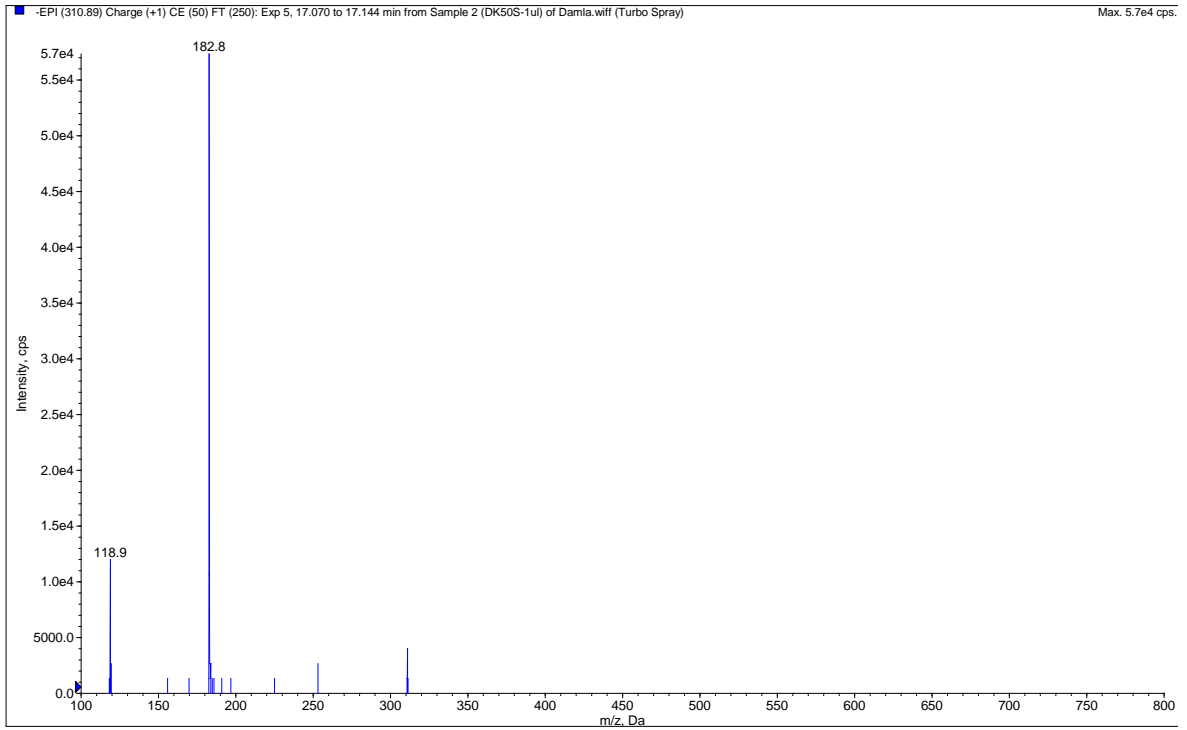
Şekil 4.56. M11 metaboliti SK/KS-KS analizi EPI spektrumu

- *Rhizopus stolonifer* dönüşüm tepkimesi

Rhizopus stolonifer dönüşüm ekstresinin kolon kromatografisi ile metabolit izolasyonu çalışmaları yapıldı. %100 etil asetat fraksiyonunda bulunan **M12** metabolitinin molekül ağırlığı 312 olup kütle spektrumu Şekil 4.57’de yer almaktadır. Aynı pik %100 metanol fraksiyonunda da ana bileşik olarak bulundu. M12 metabolitinin miktarı az olmasında dolayı yapısı aydınlatılamadı.



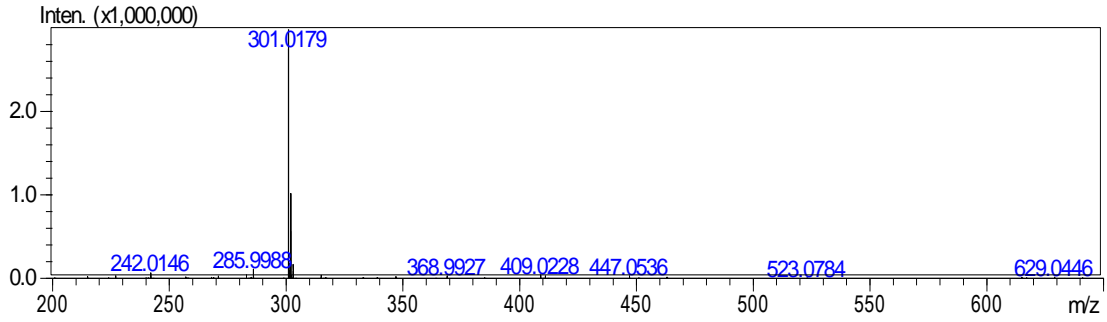
Şekil 4.57. M12 metaboliti kütle spektrumu



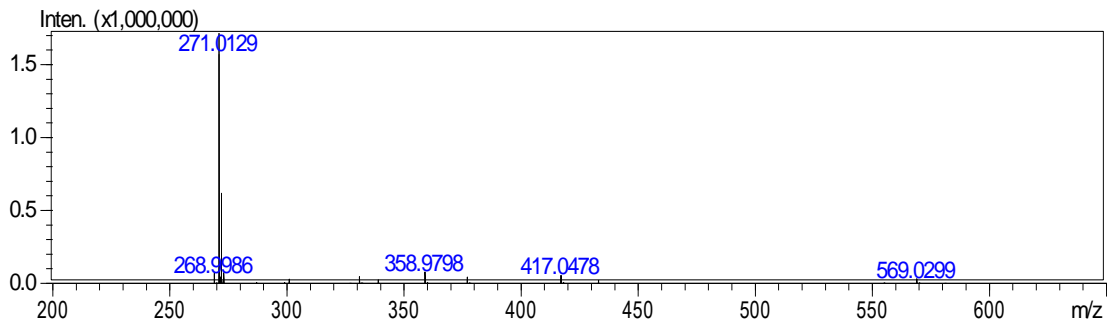
Şekil 4.58. M12 metaboliti SK/KS-KS analizi EPI spektrumu

- *Aspergillus niger* dönüşüm tepkimesi

Aspergillus niger suşu ile yapılan çalışma sonucunda İTK plağında iki metabolit gözlemlendi. Bu çalışma 4, 8 ve 12. günlerde numunelerde dönüşüm ekstresinden numune alınacak şekilde tekrarlandı. Ekstrelerin etil asetat ile ekstraksiyon işlemi gerçekleşti. Etil asetatlı fazlardaki çözücü evapore edildikten sonra hazırlanan numuneler SK-KS analizi yapıldı. Kütle spektrumundaki sonuçlar ve İTK plağındaki lekeleri literatürle karşılaştırıldığında metabolitlerin hesperetin ve naringenin olabileceği görüldü. Hesperetin ve naringenin'e ait standartlar ile **M7** (hesperetin) ve **M13** (naringenin) olarak doğrulandı. Bu metabolitler elimizde bulunan standartları ile karşılaştırılarak doğruluğu kanıtlanmış olup HRMS sonuçları Şekil 4.59 ve Şekil 4.60'da yer almaktadır. Naringenin'e ait HRMS negatif iyon piki 301.0179 ve molekül ağırlığı 272'dir. Hesperetin molekül ağırlığı 302 olup HRMS negatif iyon piki 271.0129'dur.



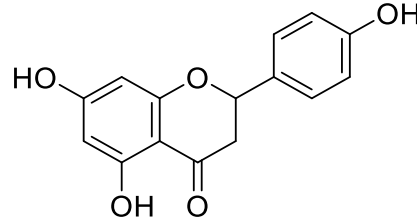
Şekil 4.59. Hesperetin HRMS spektrumu



Şekil 4.60. Naringenin HRMS spektrumu

Hesperidin'de yer alan şeker yapılarının parçalanıp aglikon haline dönüşmesinden sonra hesperetin metaboliti oluştu. Daha sonrasında B halkasında 4' konumunda yer alan metil grubunun uzaklaştırılması ve 3' konunda dehidroksilasyon tepkimeleri sonucunda naringenin metaboliti elde edildi.

Naringenin (4',5,7-Trihidroksiflavan-4-on) flavon yapısında bir flavonoittir (Salehi vd., 2019). Naringenin'e ait kimyasal formülü Şekil 4.61'de yer almaktadır.



Şekil 4.61. Naringenin (molekül ağırlığı: 272) kimyasal yapısı

Naringenin, naringin veya narirutin'den (glikozit formu) hidrolizinden türetilen bir flavanondur. naringenin'e iki ramnoz grubu şekerin bağlanması ile naringin elde edilmektedir. naringin ve naringenin birlikte *Citrus* türleri ve domates gibi bazı yenilebilir meyvelerde ve *Ficus carica* türüne ait meyvede yaygın olarak bulunmaktadır (Alam vd., 2014; Salehi vd., 2019).

Naringenin farmakolojik olarak antioksidan, antihipertansif, anti-enflamatuvar, antidiyabetik, hipoglisemik, hipolipidemik, kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve obeziteye karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır (Alam vd., 2014; Salehi vd., 2019).

Naringin suda orta derecede çözünürlüğe sahipken; alkol gibi organik çözücülerde çözünürlüğü yüksektir. Bağırsak mikroflorası, naringin'i bağırsakta aglikon naringenin'e dönüştürerek bağırsaktan emilimi sağlamaktadır (Alam vd., 2014).

Naringenin Şekil 2.4'teki bitki ve mikroorganizmada gözlemlenen biyosentez yolağında naringenin kalkanından kalkon izomeraz ile dönüşmektedir (Karim vd., 2021).

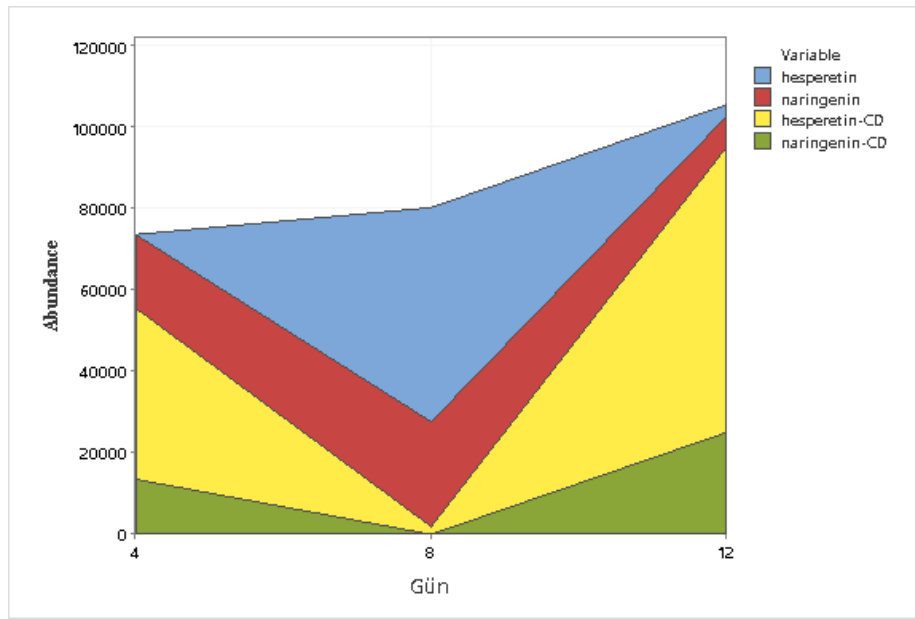
Naringenin bitkilerde düşük miktarlarda sentezlendiği için metabolik mühendisliği uygulamalarında *E. coli* ve *S. cerevisiae* suşları ile sentezlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Koopman vd., 2012; Wu vd., 2014a).

Dönüşüm metabolitlerinin verimlerini arttırmak amacı ile çalışma siklodekstrin (CD) kaplı hesperidin ile aynı metot kullanılarak tekrarlandı. hesperidin ve CD-hesperidin ile elde edilen 4, 8 ve 12. günlere ait ekstrelerin SK-KS analizi gerçekleştirildi. Hesperetin ve naringenin zamana bağlı değişim grafiği ise Şekil 4.62'de yer almaktadır. Bu sonuçlara göre CD-hesperidin ve hesperidin'den elde edilen iki metabolitin dönüşümünün olduğu yoğunluk 12. günde elde edildi. Şekil 2.4'te gösterilen biyosentez yolağında da görüldüğü üzere önce naringenin daha sonrasında sırasıyla hesperetin ve hesperidin dönüşümü gözlemlenmektedir. Yapılan bu çalışmada ise biyosentez yolağında yer alan sıra ile

dönüşümün tersi yönde gerçekleşmesi söz konusudur. Buna bağlı olarak 4. günde naringenin oluşumunun hesperetin'den düşük olması bu durumu kanıtlayıcı özelliğidir.

CD-Hesperidin ile suda çözünürlük problemi bulunan hesperidin'in dönüşüm metabolit veriminin artırılması amaçlandı. Fakat elde edilen veriler kaplama olmaksızın elde edilen dönüşüm metabolitlerinin daha yüksek verimlere sahip olduğunu göstermektedir.

En yüksek verimle naringenin'in dönüşümü 8. günde gözlemlenmekte olup CD-hesperidin dönüşümü en yüksek 12. günde gözlemlenmektedir. hesperetinde ise en yüksek verim 8. Günde gözlemlenirken; CD-hesperedin dönüşüm metaboliti olarak 12. günde gözlemlenmektedir.



Şekil 4.62. *A. niger* dönüşüm metabolitlerinin zamana bağlı değişim grafiği

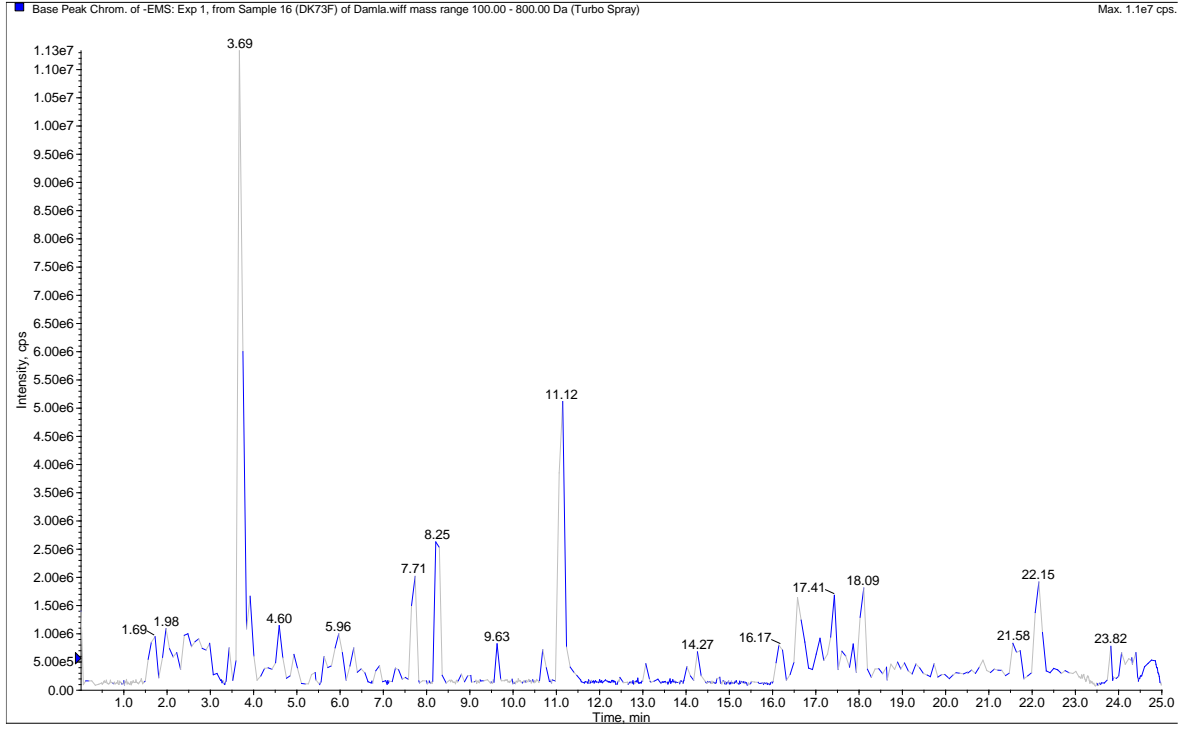
CD: Siklodekstrin kaplı Hesperidin metaboliti

4.4. Hesperidin Enzimatik Transformasyon Tepkimeleri

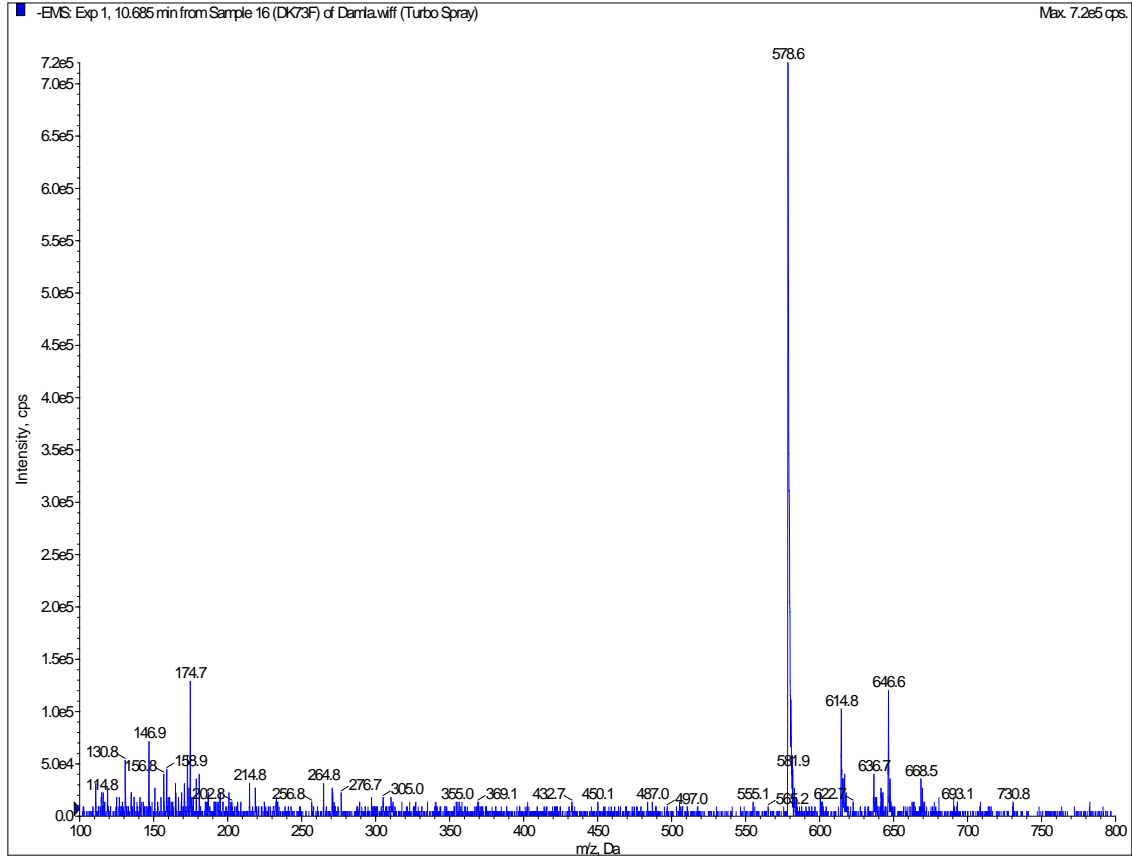
Enzimatik transformasyon çalışması kapsamında lakkaz enzimi ile ön deneme çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada elde edilen dönüşüm ekstresinin SK/KS-KS analizi gerçekleştirildi. Dönüşüm metaboliti olan **M14** ait $[M-H]^-$ değeri 578.6 olarak bulundu. Hesperidin molekülünün kimyasal yapısından dolayı dönüşüm metaboliti SK/KS-KS kromatogramı Şekil 4.63'te 10.68 dakikada yer alan pik M14'e, 11.12'deki pik ise hesperedin'e aittir. M14 ait EMS kütle spektrumu Şekil 4.64'te ve EPI spektrumu ise Şekil 4.65'te yer almaktadır.

M14 eser miktarda tespit edildiği için izolasyonu gerçekleştirilemedi. M14 metabolitine ait kütle spektrumlarında hesperidin m/z 610 \rightarrow 580 M14 metabolitine

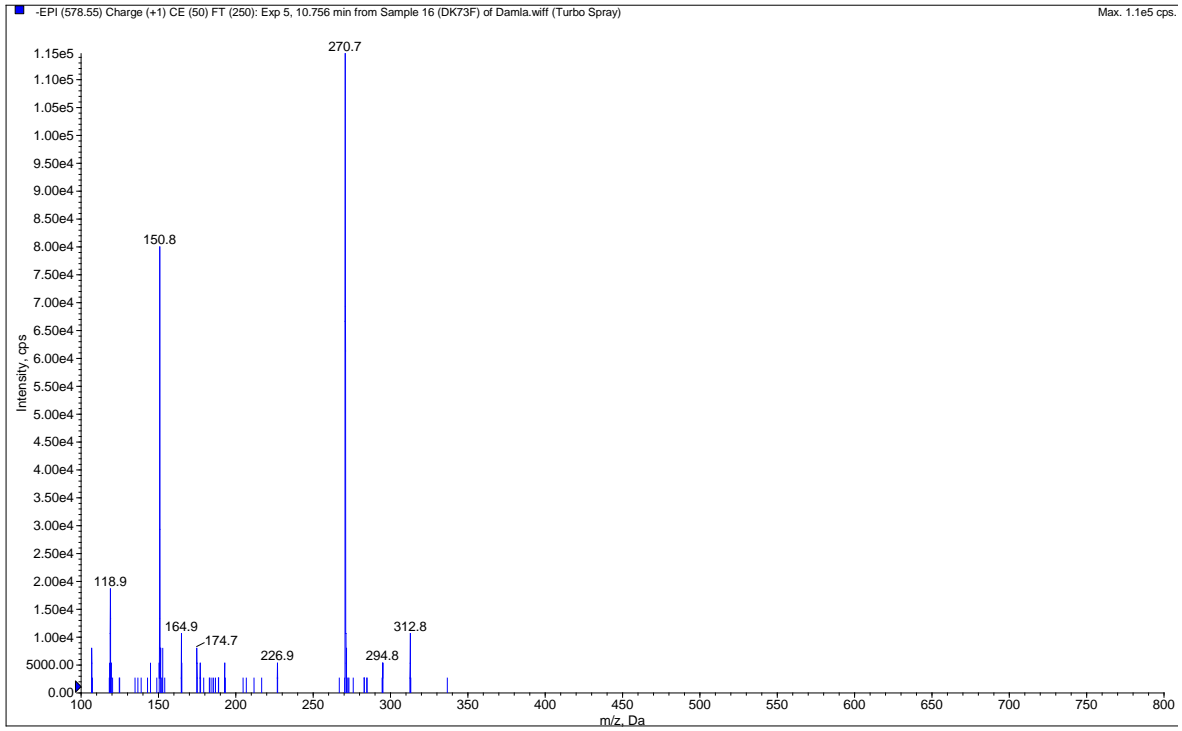
dönüşümü sırasında molekül ağırlığında meydana gelen 30'luk azalma hesperidin yapısından metoksi grubunun uzaklaştırıldığını göstermektedir. Hesperidin yapısında sadece 4' konumunda metoksi bulundurmaktadır. Bu durum bize bu konumdan metoksi uzaklaştığını göstermektedir.



Şekil 4.63. M14 metaboliti SK/KS-KS kromatogramı

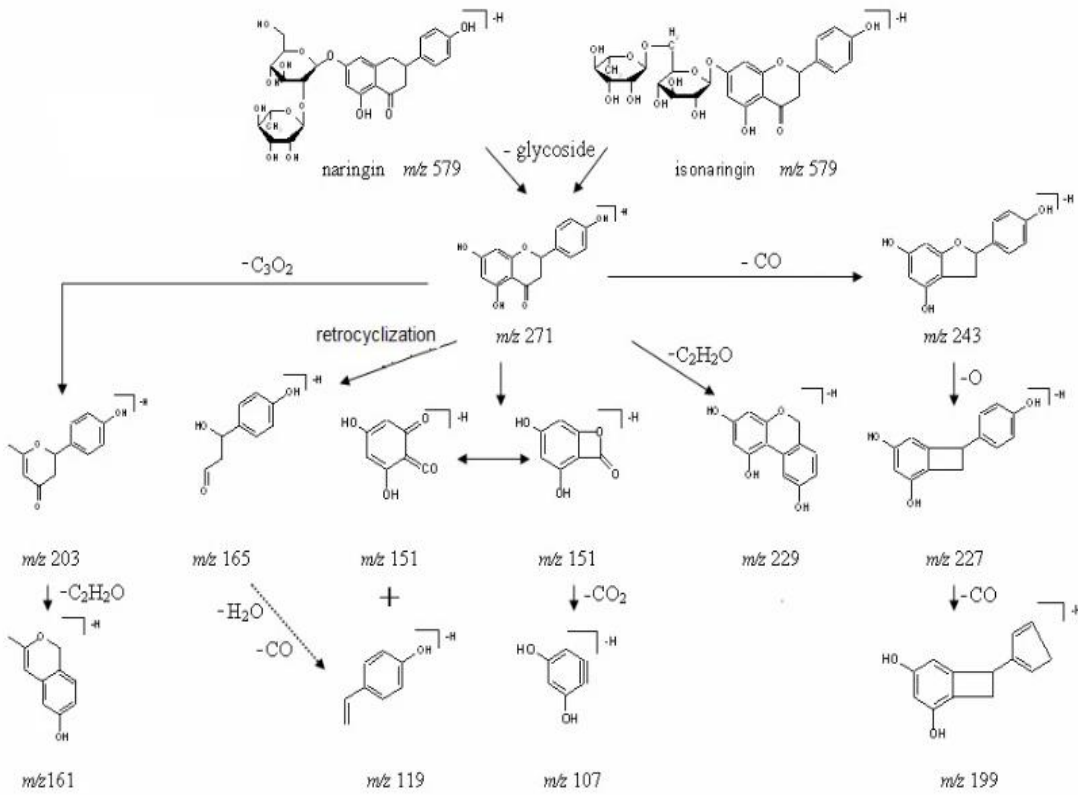


Şekil 4.64. M14 metaboliti kütle spektrumu



Şekil 4.65. M14 metaboliti EPI kütle spektrumu

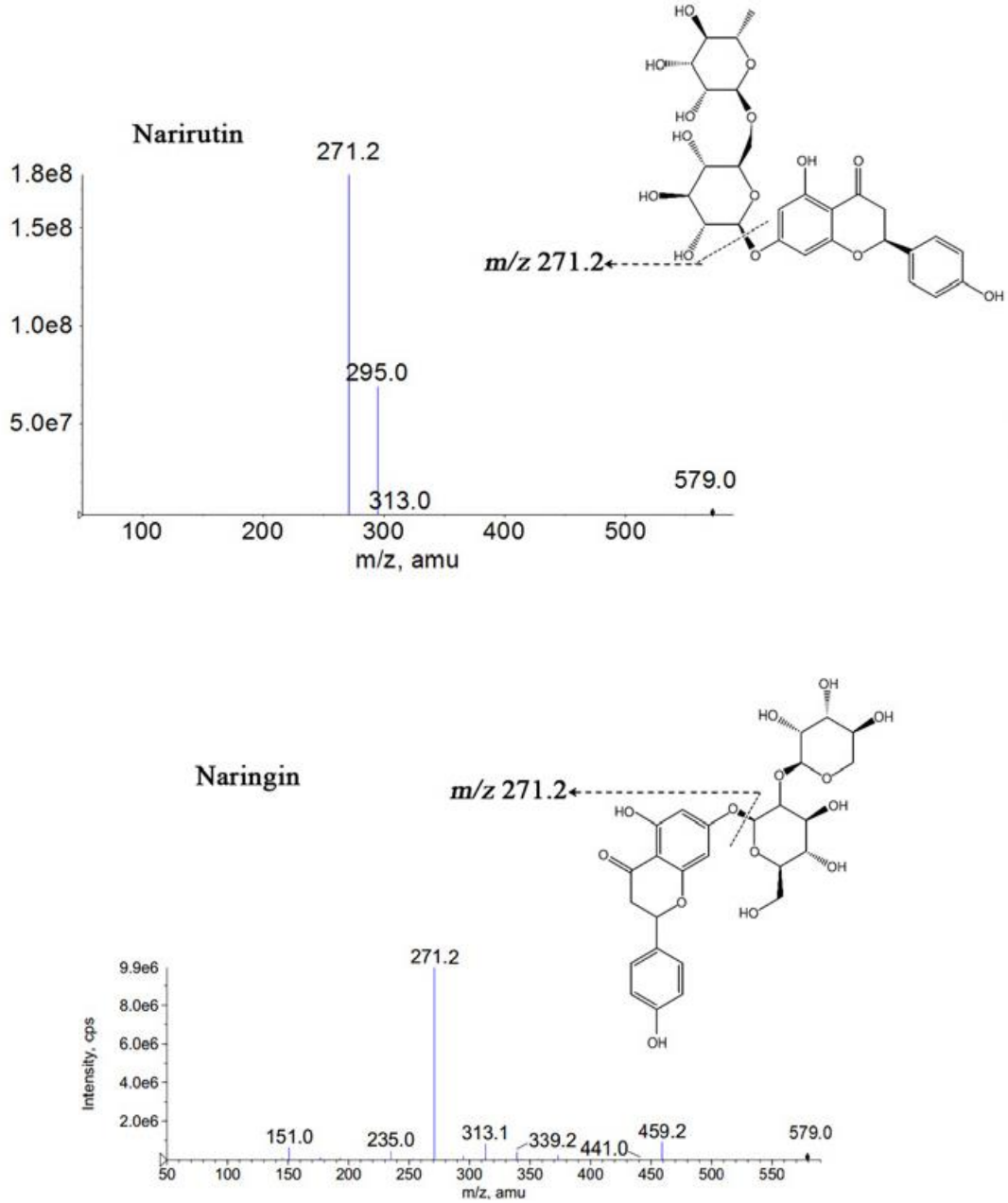
SK/KS-KS analizindeki M14'e ait spektrum değerlendirildiğinde Şekil 4.65'te yer almakta olup 50 eV'da [M-H]⁻ değeri 270.8'dir ve m/z 271 pikinin majör pik olduğu dikkat çekmektedir. Bu değer Şekil 4.66'da yer alan naringin ve izonaringin bileşiklerine ait kütle fragmentlerinin bulunduğu şekilde naringenin (m/z 271) olarak gösterilmektedir. M14 spektrumunda bulunan diğer bir fragment 150.8 olup literatürdeki fragmentler içerisinde yer almaktadır. Ayrıca m/z 151 olarak gösterilen fragment kütle spektrumunda kromon yapısına özgü fragmentlerdendir. Ayrıca m/z 271 → 151 parçalanmaları naringenin için karakteristik piklerdir (Xu vd., 2009).



Şekil 4.66. Naringin ve izonaringin bileşiklerinin m/z fragmentleri (Xu vd., 2009)

Yapının naringenin aglikon yapısı içeren iki şeker gruplu bir glikozit olduğu literatür ile desteklenmektedir. M14 metaboliti narirutin (izonaringin) veya naringin olası bileşiği çıkarımı yapılmaktadır. Narirutin (naringenin-7-rutinozit) şeker gruplarının 1 ve 6. konumları arasında bağlanma varken; naringin (naringenin-7-ramnoglikozit) şeker gruplarında 1 ve 2 konumlar arasında bağlanma söz konusudur (Wong vd., 2021; Xu vd., 2009; Zhang vd., 2018).

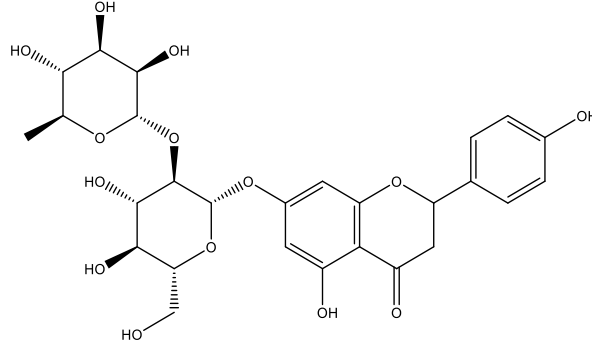
Literatürde Zhang vd. tarafından yapılan çalışmada narirutin ve naringinin bileşiklerine ait kütle fragmentleri Şekil 4.67’de gösterilmektedir (Zhang vd., 2018). SK/KS-KS ile incelenen M14 metaboliti literatürde yer alan bilgiler ile karşılaştırıldığında karakteristik parçalanmaların da etkisi ile naringin olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 4.67. Narirutin ve Naringin kütle spektrumları (Zhang vd., 2018)

Naringin (naringenin-7-ramnoglikozit), flavanon yapısındaki naringenin bileşiğinin glikozit formudur. Naringin’e ait kimyasal formül Şekil 4.68’de yer almaktadır. Yapısında

ramnoz ve glikoz olmak üzere iki şeker grubu içermektedir. Yaygın olarak aglikon haliyle birlikte *Citrus* meyvelerinde bulundurmaktadır. Ayrıca Çin tıbbında *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm., *Citrus aurantium* L. ve *Citrus medica* L. bitkilerinin de içeriğinde bulunmaktadır (Chen vd., 2016).

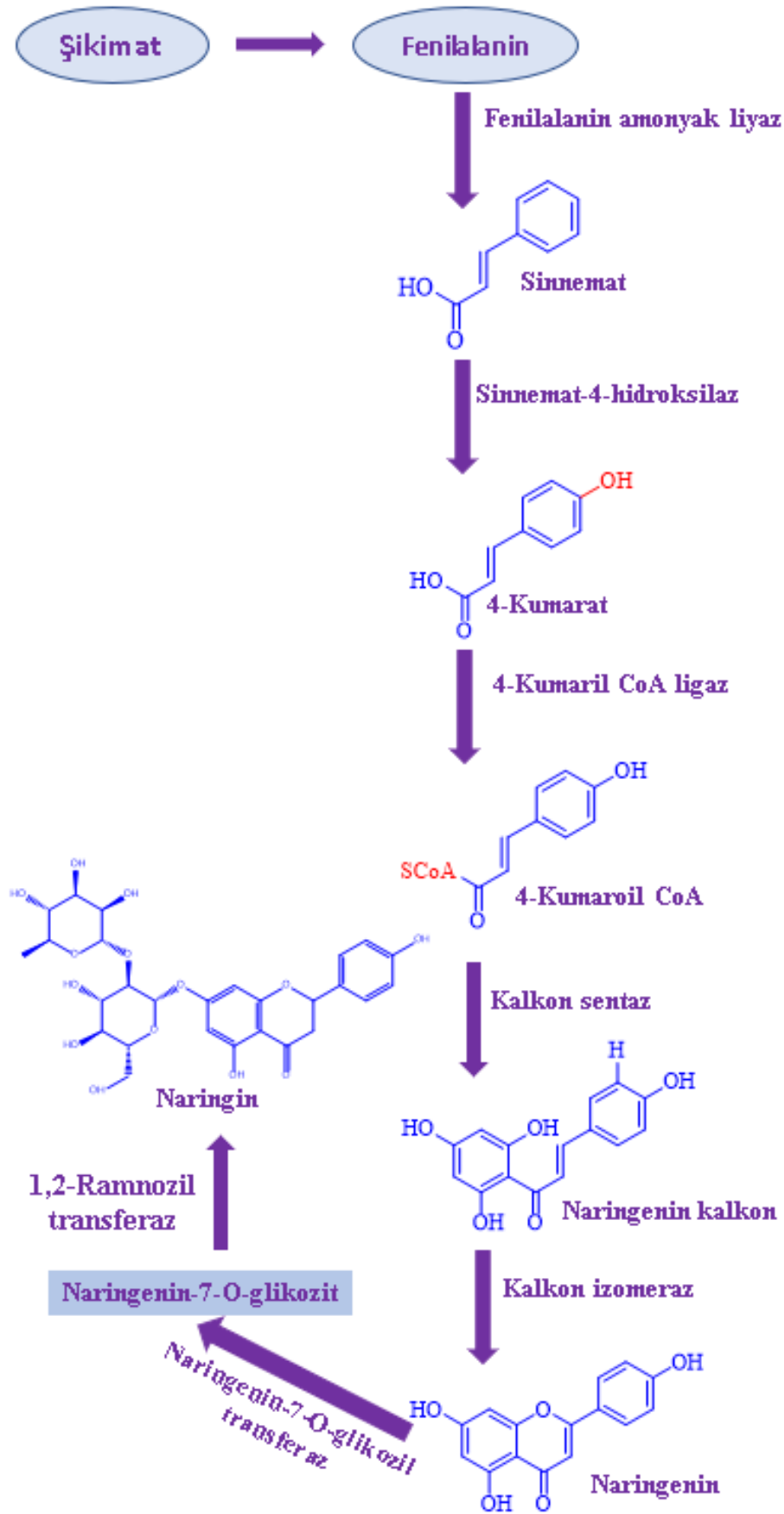


Şekil 4.68. Naringin (molekül ağırlığı: 580) kimyasal yapısı

Naringenin ve naringin'in kardiyovasküler sistem üzerindeki farmakolojik etkilerinden dolayı oldukça büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca patolojik durumlar üzerindeki yararlı etkileri ile ilgili olarak naringenin'in diyabetik sıçanların aortundaki vasküler disfonksiyonu iyileştirdiği ve yüksek yağlı bir diyetle beslenen düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü içermeyen farelerde ateroskleroza azalttığı belirtilmektedir (Wong vd., 2021). Ayrıca literatürde naringin'in antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-apoptotik, antiülser, antiosteoporotik ve antikanserojenik özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir (Chen vd., 2016).

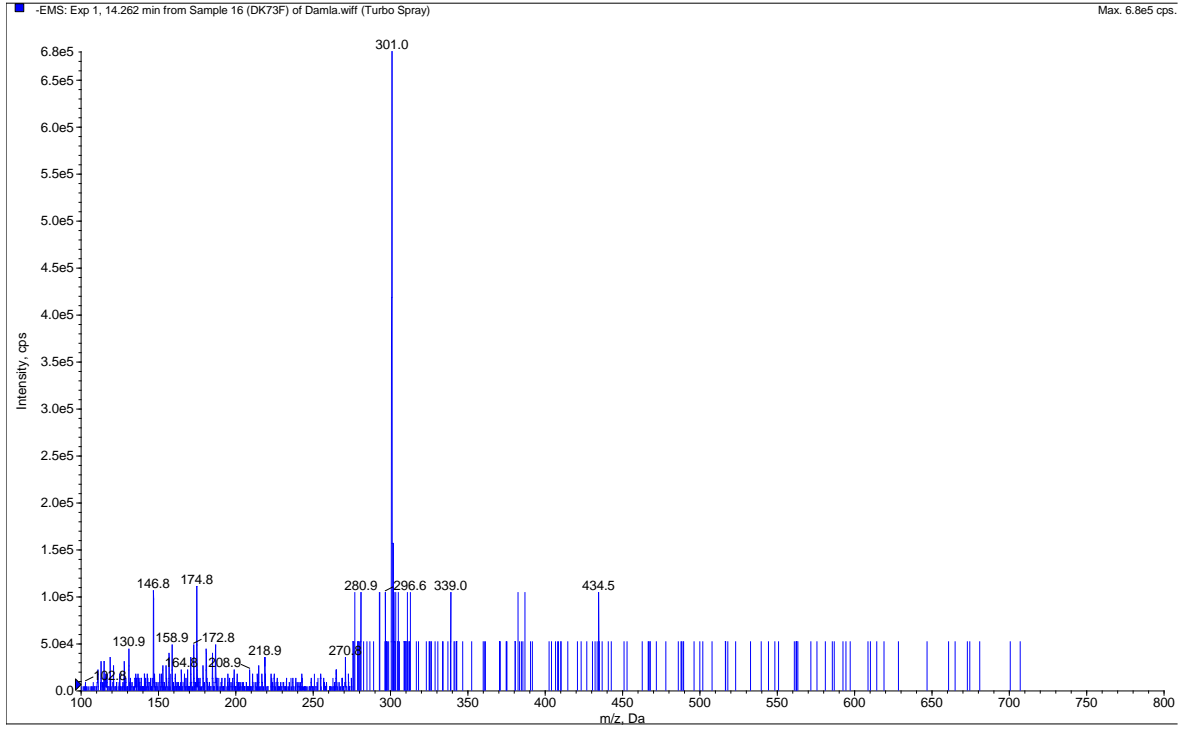
Son zamanlarda doğal bir sekonder metabolit olan naringin, öksürüğü giderme, balgamı azaltmadaki etkinliği ve düşük toksisiteye sahip olmasından dolayı Çin Gıda ve İlaç İdaresi tarafından birinci sınıf yeni bir ilaç ürünü olarak klinik deneyler için onaylanmıştır (Bai vd., 2020).

Flavonoitlerin genel sentez yolağı Şekil 4.69'da bulunduğu şekilde olup şikimat yolağından fenilalaninden başlayarak sentezlenen sekonder metabolittir. Aglikon yapısı olan naringenin'in eldesinden sonra naringenin-7-O-glikozil transferaz enzimi ile naringenin-7-O-glikozit ara ürünü 1,2-ramnozil tranferaz enziminin etkisi ile naringin'e dönüşmektedir (Sharma vd., 2019).



Şekil 4.69. Naringin biyosentez yolağı (Sharma vd., 2019)

Hesperidin'in lakkaz ile transformasyonu sonucunda oluşan diğerk bir metabolit hesperetin'dir. Hesperetin hesperidin'in aglikon formu olup daha önceki hesperidin'in mikrobiyal transformasyon tepkimelerinde gözlemlendi. Şekil 4.63'deki kromatogramda 14.27 dakikada gelen pik hesperetin'e ait olup kütle spektrumu Şekil 4.70' de yer almaktadır.



Şekil 4.70. Hesperetin SK-KS/KS spektrumu

4.5. Biyolojik Aktivite Sonuçları

Biyolojik aktivite çalışmaları substrat olarak kullanılan kersetin ve hesperidin, kersetin'in dört dönüşüm ekstresi ve hesperidin'in 8 dönüşüm ekstresi ile gerçekleştirildi. Aynı çalışmalar deneylerde izolasyonu ve yapı tayini çalışmaları gerçekleştirilmiş metabolitlerden M1(resveratrol), M5, M6, M7 (hesperetin) ve M13 (naringenin) ile de gerçekleştirildi. Bu çalışmalar kapsamında dönüşüm ekstreleri, metabolitler ve substratların *in-vitro* antioksidan, 5-LOX enzim inhibisyonu çalışmaları gerçekleştirilirken; substratlar ve metabolitlerin ayrıca antimikrobiyal ve akut toksisite aktiviteleri test edildi.

4.5.1. Antioksidan aktivite çalışmaları

Antioksidan aktivite çalışmalarında DPPH[•] ve ABTS^{•+} olmak üzere iki farklı metot kullanıldı. Kersetin ve hesperidin ve dönüşüm ekstrelerine ait konsantrasyona bağlı DPPH[•]

sonuçları sırasıyla Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de; %50’den fazla inhibisyon gösteren numunelerin IC₅₀ değerleri DPPH için Şekil 4.71’de yer almaktadır.

Kersetin göstermiş olduğu yüksek antioksidan aktiviteden dolayı bazı literatür çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tablo 4.6’da elde edilen sonuçlar kersetin’in mikrobiyal transformasyon çalışmalarında daha yüksek verimle metabolit elde edilen ekstrelerde DPPH inhibisyonunun daha düşük olduğunu göstermektedir. *Aspergillus flavus* dönüşüm ekstresinde (E2) ise kersetin’den daha yüksek antioksidan aktivite gözlemlenmektedir. E2 ekstresinde yapı tayini ile ilgili çalışmalar sonucunda metabolit olarak resveratrol ve izoramnetin varlığı gözlemlendi. Ayrıca bu ekstrenin içeriğinde mikrobiyal dönüşüme uğramamış kersetin varlığı da söz konusudur. E2 ekstresinde yer alan bu bileşiklerden kaynaklı bir sinerji söz konusu olduğu söylenebilir.

Tablo 4.6. Kersetin ve dönüşüm ekstrelerinin DPPH antioksidan aktivite sonuçları

	Konsantrasyon				F	p
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL		
Kersetin	45.207 ± 1.89 ^b	61.877 ± 0.29 ^a	62.312 ± 0.14 ^a	63.085 ± 0.59 ^a	6.296	0.017
E1	6.287 ± 1.67 ^c	9.404 ± 1.59 ^c	18.898 ± 0.94 ^b	39.264 ± 0.87 ^a	380.857	<0.001
E2	48.88 ± 2.18 ^c	57.432 ± 0.8 ^b	61.829 ± 3.94 ^{ab}	67.289 ± 1.27 ^a	32.313	<0.001
E3	8.027 ± 0.36 ^d	22.885 ± 2.32 ^c	52.745 ± 1.45 ^b	61.152 ± 1.67 ^a	717.813	<0.001
E4	7.664 ± 0.43 ^c	8.172 ± 0.07 ^c	20.807 ± 2.04 ^b	33.901 ± 2.06 ^a	216.540	<0.001

^{a-d}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E1: *Alternaria alternata*; **E2:** *Aspergillus flavus*; **E3:** *Penicillium claviforme*; **E4:** *Aspergillus nidulans*

Hesperidin substratının antioksidan aktivitesi kersetin’den daha düşük olup *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* dönüşüm ekstrelerinin DPPH antioksidan aktiviteleri diğer ekstrelerden daha yüksek bulundu. *A. niger* dönüşüm metabolitleri naringenin ve hesperetin olarak tespit edildi.

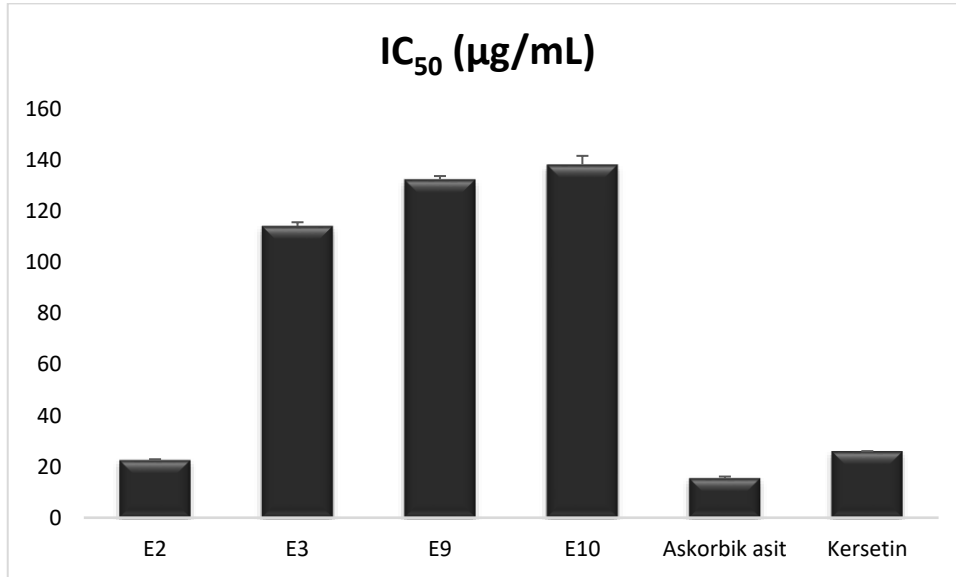
Tablo 4.7. Hesperidin ve dönüşüm ekstrelerinin DPPH' antioksidan aktivite sonuçları

	Konsantrasyon				F	p
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL		
Hesperidin	11.796 ± 1.09 ^a	15.782 ± 3.23 ^a	25.639 ± 3.62 ^a	31.437 ± 4.41 ^a	13.789	0.017
E5	11.94 ± 1.23 ^c	18.83 ± 2.32 ^b	24.407 ± 3.99 ^b	34.92 ± 1.16 ^a	46.909	<0.001
E6	8.433 ± 1.89 ^c	10.49 ± 0.36 ^{bc}	14.817 ± 1.48 ^b	23.573 ± 4.03 ^a	24.478	<0.001
E7	3.968 ± 1.38 ^b	4.83 ± 0.25 ^{ab}	6.456 ± 0.17 ^a	6.456 ± 0.89 ^a	6.649	0.015
E8	9.041 ± 1.38 ^c	15.782 ± 0.72 ^b	16.362 ± 4.49 ^b	28.683 ± 0.58 ^a	35.005	<0.001
E9	18.391 ± 1.38 ^d	30.76 ± 0.73 ^c	46.077 ± 0.38 ^b	58.93 ± 2.81 ^a	357.776	<0.001
E10	9.331 ± 3.26 ^d	23.658 ± 4.21 ^c	41.294 ± 1.81 ^b	60.138 ± 2.39 ^a	155.598	<0.001
E11	2.084 ± 0.22 ^c	5.732 ± 2.47 ^{bc}	8.969 ± 0.88 ^b	16.362 ± 1.16 ^a	53.532	<0.001
E12	7.519 ± 2.75 ^c	11.433 ± 0.29 ^b	11.796 ± 0.07 ^b	18.681 ± 0.14 ^a	33.558	<0.001

^{a-d}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E5: *Rhizopus stolonifer*; **E6:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E7:** *Bacillus subtilis* var. *clausii*; **E8:** *Penicillium claviforme*; **E9:** *Saccharomyces cerevisiae*; **E10:** *Aspergillus niger*; **E11:** *Alternaria alternata*; **E12:** *Fusarium solani*



Şekil 4.71. DPPH' antioksidan aktivitesi IC₅₀ değerleri

Kersetin, hesperidin ve metabolitlerinin konsantrasyona bağlı DPPH' aktivite sonuçları Tablo 4.8'de yer almaktadır.

Antioksidan aktivite sonucuna göre kersetin'in IC₅₀ değeri 26.06±1.48 µg/mL olarak hesaplandı. Tez kapsamında pozitif kontrol olarak askorbik asit ile çalışılmış olup IC₅₀ değeri 15.495±0.62 µg/mL olarak hesaplandı (Göger vd., 2020). Substrat olarak kullanılan kersetin'in antioksidan aktivitesi hesperidin'den daha yüksek bulundu. Kersetin metabolitlerinden M1 (%39.723±1.42) en yüksek aktiviteye sahip olduğunu gözlemlendi. Hesperidin metabolitlerinden M7 metaboliti M13 metabolitinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Bu çalışma sonucuna göre metabolitlerin aktiviteleri substratlardan daha zayıftır.

Tablo 4.8. *Substrat ve metabolitlerin DPPH· antioksidan aktivite sonuçları*

	Konsantrasyon				F	p
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL		
Kersetin	45.207 ± 1.89 ^b	61.877 ± 0.29 ^a	62.312 ± 0.14 ^a	63.085 ± 0.59 ^a	6.296	0.017
M1	22.667 ± 0.07 ^c	24.817 ± 0.94 ^c	29.625 ± 1.12 ^b	39.723 ± 1.42 ^a	134.265	0.001
M5	5.675 ± 0.62 ^b	8.679 ± 1.59 ^{ab}	9.223 ± 1.78 ^{ab}	11.759 ± 3.04 ^a	4.887	0.032
M6	5.055 ± 0.5 ^d	9.452 ± 0.67 ^c	15.443 ± 1.35 ^b	22.885 ± 0.63 ^a	246.037	<0.001
Hesperidin*	11.796 ± 1.09 ^a	15.782 ± 3.23 ^a	25.639 ± 3.62 ^a	31.437 ± 4.41 ^a	13.789	0.017
M7*	14.042 ± 0.77 ^a	14.332 ± 1.26 ^a	17.956 ± 1.53 ^a	21.242 ± 4.94 ^a	5.344	0.067
M13*	13.511 ± 1.23 ^a	15.637 ± 2.8 ^a	18.608 ± 1.81 ^a	18.198 ± 2.34 ^a	5.218	0.067

^{a-d} Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edilmiştir.

*: Anova Tamhane ile analiz gerçekleştirilmiştir.

M1: Resveratrol; **M5:** Lakkaz enzim metaboliti; **M6:** Lakkaz enzim metaboliti; **M7:** Hesperetin; **M13:** Naringenin

Kersetin ve hesperidin ve dönüşüm ekstrelerine ait konsantrasyona bağlı ABTS⁺ sonuçları sırasıyla Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da yer almaktadır. %50'den fazla inhibisyon gösteren numunelerin IC₅₀ değerleri Şekil 4.72'de yer almaktadır.

ABTS⁺ metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar DPPH ile tutarlılık göstermektedir. Hesperidin dönüşüm ekstrelerinden E6, E8 ve E9 yüksek antioksidan aktivitesi bulunmaktadır. Hesaplanan IC₅₀ değerleri Şekil 4.72'de yer almakta olup kersetin dönüşüm ekstrelerinden E2 ve E3'e ait sonuçlar hesperidin dönüşüm ekstrelerinden daha aktif olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.9. *Kersetin ve dönüşüm ekstrelerinin ABTS⁺ antioksidan aktivite sonuçları*

	Konsantrasyon				F	p
	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL		
Kersetin	71.006 ± 2.25 ^a	71.227 ± 2.86 ^a	74.492 ± 1.92 ^a	76.169 ± 0.79 ^a	5.242	0.074
E1	15.477 ± 2.16 ^c	23.992 ± 2.86 ^b	34.95 ± 0.14 ^a	37.393 ± 3.14 ^a	54.391	<0.001
E2	59.146 ± 5.14 ^a	59.611 ± 4.44 ^a	61.612 ± 0.28 ^a	63.985 ± 1.35 ^a	1.217	0.365
E3	21.941 ± 1.55 ^c	55.267 ± 2.95 ^b	63.111 ± 3.58 ^b	72.389 ± 4.05 ^a	143.611	<0.001
E4	12.327 ± 1.75 ^d	29.18 ± 2.61 ^d	36.53 ± 2.82 ^d	56.477 ± 2.02 ^d	183.325	<0.001

^{a-d}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E1: *Alternaria alternata*; **E2:** *Aspergillus flavus*; **E3:** *Penicillium claviforme*; **E4:** *Aspergillus nidulans*

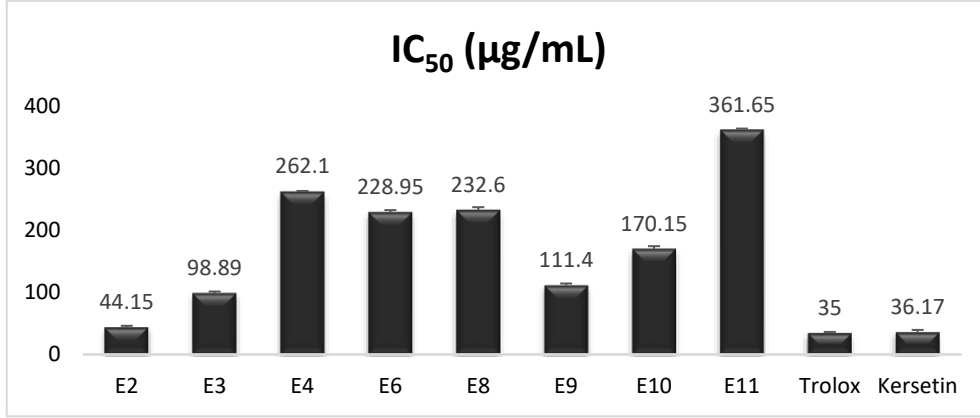
Tablo 4.10. *Hesperidin ve dönüşüm ekstrelerinin ABTS⁺ antioksidan aktivite sonuçları*

	Konsantrasyon				F	p
	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL		
Hesperidin	11.796 ± 1.09 ^a	15.782 ± 3.23 ^a	25.639 ± 3.62 ^a	31.437 ± 4.41 ^a	13.789	0.017
E5	20.193 ± 3.56 ^b	22.68 ± 4.41 ^b	44.33 ± 1.35 ^a	45.002 ± 1.08 ^a	38.307	<0.001
E6	17.167 ± 1.08 ^d	24.608 ± 2.98 ^c	41.372 ± 2.97 ^b	58.92 ± 0.47 ^a	217.879	<0.001
E7	10.354 ± 2.99 ^c	14.971 ± 1.75 ^c	23.353 ± 0.67 ^b	38.413 ± 3.85 ^a	66.874	<0.001
E8	26.177 ± 1.08 ^d	21.112 ± 1.62 ^c	41.909 ± 1.61 ^b	58.247 ± 1.01 ^a	457.548	<0.001
E9	29.269 ± 0.40 ^c	42.649 ± 2.62 ^b	65.105 ± 1.55 ^a	66.428 ± 2.95 ^a	215.928	<0.001
E10	9.906 ± 1.75 ^d	40.161 ± 2.09 ^c	53.877 ± 2.55 ^b	63.424 ± 4.1 ^a	212.299	<0.001
E11	13.383 ± 1.61 ^b	16.105 ± 4.49 ^b	23.829 ± 4.44 ^b	51.282 ± 3.49 ^a	41.637	<0.001
E12	12.267 ± 3.00 ^b	15.268 ± 2.37 ^b	18.758 ± 3.35 ^{ab}	26.11 ± 2.72 ^a	12.818	0.002

^{a-d}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E5: *Rhizopus stolonifer*; **E6:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E7:** *Bacillus subtilis* var. *clausii*; **E8:** *Penicillium claviforme*; **E9:** *Saccharomyces cerevisiae*; **E10:** *Aspergillus niger*; **E11:** *Alternaria alternata*; **E12:** *Fusarium solani*



Şekil 4.72. ABTS⁺ antioksidan aktivitesi IC₅₀ değerleri

E2: *Aspergillus flavus*; **E3:** *Penicillium claviforme*; **E4:** *Aspergillus nidulans*; **E6:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E8:** *Penicillium claviforme*; **E9:** *Saccharomyces cerevisiae*; **E10:** *Aspergillus niger*; **E11:** *Alternaria alternata*

ABTS⁺ metoduyla antioksidan aktivite sonuçları Tablo 4.11’de yer almaktadır. Buna göre Kersetin en yüksek aktiviteyi gösterirken (IC₅₀: 36.17±3.39 µg/mL); pozitif kontrol olarak kullanılan troloksun (IC₅₀: 34.703±1.66 µg/mL) olarak bulunmaktadır. Kersetin metabolitlerinden en yüksek aktivite sahip olan bileşik M1’in IC₅₀ değeri 97.74±0.52 µg/mL iken; M6’in IC₅₀ değeri 165.00±5.89 µg/mL olarak hesaplandı. Hesperidin dönüşüm metabolitlerinden M7 metabolitinin aktivitesi M13 metabolitinden daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen IC₅₀ değeri hesaplanamayacak kadar düşük bir aktivite gözlemlendi.

Tablo 4.11. Substratların ve metabolitlerin ABTS⁺ antioksidan aktivite sonuçları

	Konsantrasyon				F	p
	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL		
Kersetin	71.006 ± 2.25 ^a	71.227 ± 2.86 ^a	74.492 ± 1.92 ^a	76.169 ± 0.79 ^a	5.242	0.074
M1	30.7 ± 4.1 ^c	47.9 ± 4.4 ^b	53.4 ± 1.6 ^{ab}	69.8 ± 4.6 ^a	32.342	0.003
M5	19.858 ± 0.47 ^b	21.609 ± 0.47 ^{ab}	22.473 ± 0.69 ^a	22.939 ± 0.6 ^a	15.433	0.009
M6	15.47 ± 3.19 ^c	44.504 ± 4.88 ^b	55.674 ± 3.08 ^{ab}	66.844 ± 3.79 ^a	100.304	<0.001
Hesperidin	5.8 ± 1.8 ^c	13.9 ± 0.9 ^b	22.6 ± 1.1 ^a	27.9 ± 2.8 ^a	68.258	<0.001
M7	13.6 ± 1 ^c	19.8 ± 0.1 ^b	22.8 ± 3.8 ^{abc}	35.1 ± 1.5 ^a	107.621	0.001
M13	9.9 ± 1.1 ^a	10.1 ± 0.8 ^a	12.8 ± 0.8 ^a	16.4 ± 1.8 ^a	11.386	0.016

^{a-c}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tamhane ile analiz gerçekleştirilmiştir.

M1: Resveratrol; **M5:** Lakkaz enzim metaboliti; **M6:** Lakkaz enzim metaboliti; **M7:** Hesperetin; **M13:** Naringenin

Kersetin ve hesperidin'den metabolitlerden resveratrol (M1), hesperetin (M7) ve naringenin (M13) antioksidan aktiviteleri hakkında literatür bilgisi bulunmaktadır (Guo ve Jauregi, 2018; Leelavinothan ve Kalist, 2011; Shubina vd., 2021; Yu vd., 2016). Daha önce literatürde yer alan çalışmada kersetin'in yüksek antioksidan aktivitesinden dolayı pozitif kontrol olarak kullanıldığı gözlemlendi (Hasbal vd., 2015). Resveratrol'un kersetin'den daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Oktyabrsky vd., 2020).

Hesperidin, naringenin ve hesperetin ile yapılan çalışmalara göre farklı antioksidan aktivite metotları sonucunda göre hesperetin en yüksek etkiye sahipken; etkinlik açısından hesperidin de naringenin'inden daha yüksek yüzde inhibisyona sahiptir (Denaro vd., 2021; Lee ve Kim, 2010).

4.5.2. Anti-enflamatuvar aktivite çalışmaları

Anti-enflamatuvar aktivite çalışmasında soya 5-LOX enzimi kullanıldı. Substratların ve dönüşüm ekstrelerinin anti-enflamatuvar inhibisyon sonuçları Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'te yer almaktadır. Bu aktivite çalışması kapsamında pozitif kontrol olarak NDGA kullanılmış olup IC₅₀ değeri 3.63±0.29 µg/mL olarak bulundu. Hesperidin dönüşüm ekstrelerinden E3 (IC₅₀: 25.93±0.36 µg/mL), ve kersetin dönüşüm ekstrelerinden E10 (IC₅₀: 24.99±1.41 µg/mL) değerleri hesaplandı. Hesperidin *A. flavus* dönüşüm ekstresi hem antioksidan aktivite hem de anti-enflamatuvar aktive açısından aktif bulundu.

Tablo 4.12. Kersetin ve dönüşüm ekstrelerinin anti-enflamatuvar aktivite sonuçları

	Konsantrasyon			F	p
	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL		
Kersetin	41.603 ± 3.7 ^c	63.194 ± 1.09 ^b	70.139 ± 1.29 ^a	120.676	<0.001
E1	0.707 ± 0.66 ^c	18.74 ± 1.9 ^b	21.599 ± 2.2 ^a	129.943	<0.001
E2	26.092 ± 0.95 ^c	41.921 ± 4.27 ^b	64.52 ± 1.24 ^a	162.125	<0.001
E3	32.205 ± 2.56 ^b	34.989 ± 5.08 ^b	47.38 ± 2.86 ^a	14.502	0.005
E4	20.633 ± 0.68 ^b	21.288 ± 2.97 ^b	31.332 ± 0.5 ^a	33.903	0.001

^{a-c}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E1: *Alternaria alternata*; **E2:** *Aspergillus flavus*; **E3:** *Penicillium claviforme*; **E4:** *Aspergillus nidulans*

Tablo 4.13. *Hesperidin ve dönüşüm ekstrelerinin anti-enflamatuvar aktivite sonuçları*

	Konsantrasyon			F	p
	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL		
Hesperidin	43.584 ± 4.53 ^b	51.587 ± 3.34 ^{ab}	61.508 ± 4.01 ^a	15.202	0.004
E5	3.363 ± 1.74 ^b	5.714 ± 0.71 ^b	33.75 ± 5.04 ^a	37.765	<0.001
E6	12.143 ± 1.24 ^c	22.857 ± 1.43 ^b	32.262 ± 1.8 ^a	134.069	<0.001
E7	30.754 ± 1.43 ^c	41.151 ± 1.04 ^b	61.429 ± 0.36 ^a	672.927	<0.001
E8	21.786 ± 1.79 ^b	25.893 ± 1.61 ^b	35.00 ± 2.14 ^a	39.720	<0.001
E9	22.857 ± 2.5 ^b	25.476 ± 2.32 ^b	35.238 ± 2.86 ^a	19.298	0.002
E10	22.262 ± 0.74 ^c	32.679 ± 0.18 ^b	41.25 ± 1.61 ^a	256.916	<0.001
E11	2.893 ± 1.39 ^c	8.897 ± 0.82 ^b	12.227 ± 0.82 ^a	61.242	<0.001
E12	2.183 ± 0.82 ^c	26.31 ± 0.98 ^b	34.498 ± 2.05 ^a	435.834	<0.001

^{a-c}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edildi.

E5: *Rhizopus stolonifer*; **E6:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E7:** *Bacillus subtilis* var. *clausii*; **E8:** *Penicillium claviforme*; **E9:** *Saccharomyces cerevisiae*; **E10:** *Aspergillus niger*; **E11:** *Alternaria alternata*; **E12:** *Fusarium solani*

Dönüşüm ekstrelerinin biyolojik aktivite çalışmalarında en aktif çıkan numune E2 olup kersetin'in *Aspergillus flavus* dönüşümüne aittir. Yapılan çalışmaların üçünde de aktif olan diğer dönüşüm ekstreleri *Penicillium claviforme* (E3) ve *Aspergillus niger* (E10) olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar *Aspergillus* suşları ile yapılan çalışmada elde edilen yeni metabolitlerin antioksidan ve anti-enflamatuvar aktivite yönünden daha zengin olduğunu göstermektedir.

Substratların ve elde edilen metabolitlerin anti-enflamatuvar aktivite sonuçları Tablo 4.14'te yer almaktadır. Bu aktivite çalışması kapsamında substrat ve metabolitlerin IC₅₀ değerleri Şekil 4.73'te bulunmaktadır.

Kersetin ve hesperidin IC₅₀ değerleri sırasıyla 14.73±0.61 µg/mL ve 17.21±2.10 µg/mL olarak hesaplandı. Kersetin metabolitlerinden en yüksek aktivite enzimatik transformasyon metaboliti M5 (IC₅₀: 21.95±1.06 µg/mL) aittir. Hesperidin metabolitlerinden M7 40 µg/mL konsantrasyonda %72.884±2.48 inhibisyon göstermektedir. Hem antioksidan hem de anti-enflamatuvar aktivite sonuçlarına göre M7 metaboliti M13 metabolitinden daha aktif bulundu.

Literatürde yapılmış olan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre kersetin'in anti-enflamatuvar etkisi metaboliti resveratrol'dan daha yüksek bulundu. Hesperedin türevi naringenin ve hesperetin ise kersetin ve resveratrol'dan daha düşük bir aktiviteye sahiptir. Tez kapsamında yapılan çalışmadan elde edilen IC₅₀ değerleri bu çalışmayı desteklemektedir (Kutil vd., 2015; Lee ve Kim, 2010; Lesjak vd., 2018; Pinto ve Macias, 2005; Zhang vd., 2019). Hesperidin ve hesperetin'in 5-LOX enzimi ile yapılmış anti-enflamatuvar aktivite çalışması literatürde ilk kez gerçekleştirildi. *In vitro* olarak yapılmış diğer aktivite çalışmaları sonucunda iki bileşik için de IC₅₀ değeri hesaplanırken; birden farklı çalışmada hesperidin'in aktivite sonucu hesperetin'den daha yüksek bulundu (Denaro vd., 2021; Lee ve Kim, 2010; Parhiz vd., 2015). Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlar literatür ile tutarlı bulundu.

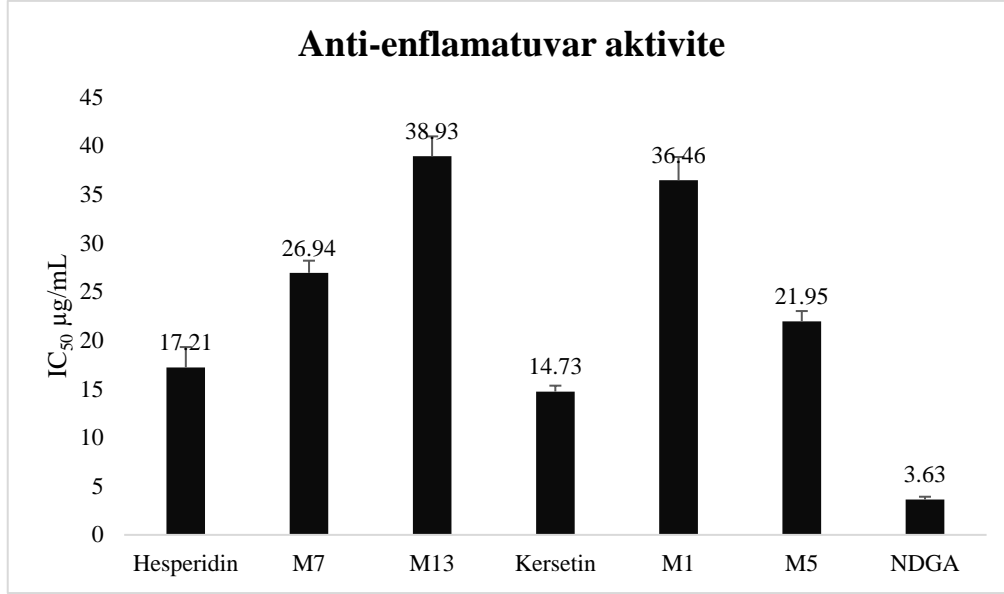
Tablo 4.14. *Substrat ve metabolitlerin anti-enflamatuvar aktivite sonuçları*

	Konsantrasyon			F	p
	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL		
Kersetin	41.603 ± 3.7 ^c	63.194 ± 1.09 ^b	70.139 ± 1.29 ^a	120.676	<0.001
M1	21.808 ± 1.68 ^c	36.868 ± 0.79 ^b	51.928 ± 1.79 ^a	307.271	<0.001
M5	21.362 ± 2.66 ^c	34.425 ± 2.28 ^b	67.917 ± 0.3 ^a	1217.794	<0.001
M6	9.458 ± 2.42 ^c	28.373 ± 2.15 ^b	34.392 ± 0.8 ^a	136.914	<0.001
Hesperidin	43.584 ± 4.53 ^b	51.587 ± 3.34 ^{ab}	61.508 ± 4.01 ^a	15.202	0.004
M7	6.25 ± 3.87 ^c	36.012 ± 4.85 ^b	72.884 ± 2.48 ^a	147.511	<0.001
M13	35.317 ± 6.55 ^b	41.27 ± 1.24 ^{ab}	51.389 ± 4.14 ^a	9.650	0.013

^{a-c}: Her bir ölçüm değeri için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Anova Tukey HSD ile analiz edilmiştir.

M1: Resveratrol; **M5:** Lakkaz enzim metaboliti; **M6:** Lakkaz enzim metaboliti; **M7:** Hesperetin; **M13:** Naringenin



Şekil 4.73. Substrat ve metabolitlerin anti-enflamatuvar aktivitesi IC₅₀ değerleri

M1: Resveratrol; **M5:** Lakkaz enzim metaboliti; **M7:** Hesperetin; **M13:** Naringenin

4.5.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kapsamında 10 mikroorganizma seçildi. Bu seçim yapılırken insan sağlığında ve bitkilerde önemli patolojik sorunlara sebep olan, biyofilm tabaka oluşumundan sorumlu olması göz önünde bulunduruldu. Ayrıca insan bağırsak florasında bulunan insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi bulunan mayalar seçilerek çalışmada kullanılan bileşiklerin yararlı mikroorganizmalara etkisine bakıldı (Pérez-Torrado ve Querol, 2016). Bu mikroorganizmalardan 6 tanesi bakteri (*Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378, *B. fragilis*, *B. licheniformis*) 2 maya (*Saccharomyces boulardii* REFLOR® ve *S. cerevisiae* ATCC 9763) ve 2 fungus (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus nidulans* Abraham) bulunmaktadır Antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 4.15'te yer almaktadır.

Substratlar ve metabolitler funguslara karşı oldukça yüksek antifungal etki göstermişlerdir. Deneysel çalışmada 15.6 µg/mL konsantrasyonun altındaki etkiye bakılamamasının nedeni aktivite çalışmasının gerçekleşmesi için yeterli miktarda numunenin bulunmamasıdır. Bununla birlikte hesperidin metabolitleri M5 ve M13 her ikisinin de *S. aureus* suşuna karşı göstermiş oldukları etki hesperidin'den daha yüksektir. Bu sonuç cilt patojenlerine karşı daha etkili metabolitler elde edildiğini göstermektedir. Kersetin metabolitlerinden M1 *S. typhimurium* (62.5 µg/mL) ve *B. licheniformis* (62.5 µg/mL)

suşlarına karşı kersetinden daha etkili bulundu. M1 metabolitinin yararlı mikroorganizmalardan *S. cerevisiae* MİK konsantrasyonu 31.25 µg/mL olarak bulundu. Bu durumda non-patojen ve selektif özellikli mikroorganizmaları inhibe ettiği ve toksik etki gösterebileceği yorumunu yaptırmaktadır.

Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) çalışmasının devamında MBK (Minimum bakterisidal konsantrasyon) ve MFK (Minimum fungisidal konsantrasyon) çalışmaları gerçekleştirildi. MBK ve MFK ile bileşiklerin hangi konsantrasyonda mikroorganizmalarda inhibe edici mi yoksa öldürücü etkiye mi sahip olduğu hakkında bilgi vermektedir.

MBK sonuçlarına göre sadece M13 metabolitinin *Staphylococcus aureus* suşuna karşı 500 µg/mL konsantrasyonda bakteriosidal etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Flavonoitler yapılarında bulundurdukları 5 ve 7. konuma bağlı hidroksi gruplarından dolayı *Staphylococcus aureus* suşuna karşı daha yüksek antibakteriyal etkiye sahiptir (Cushnie ve Lamb, 2005). MFK etki sonuçları *Aspergillus nidulans* karşı kersetin 125 µg/mL ve M7 62.5 µg/mL olarak bulundu.

Literatürde kersetin, hesperidin ve metabolitleri M1, M7 ve M13 hakkında yapılmış çalışmalar mevcuttur (Attia vd., 2021; Črnivec vd., 2021; Dimkić vd., 2016; Hao vd., 2021; Iranshahi vd., 2015; Lather vd., 2020; Pal ve Tripathi, 2020; Vestergaard ve Ingmer, 2019).

Tablo 4.15. Substrat ve metabolitlerin MİK değerleri (µg/mL)

	(1)	M1	M5	M6	(2)	M7	M13	B1	B2
<i>Escherichia coli</i>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<10	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	<15.6	31.25	>500	>500	125	62.5	31.25	<10	10
<i>Salmonella typhimurium</i>	>500	62.5	>500	>500	>500	500	500	<10	10
<i>Bacillus subtilis</i>	>500	250	>500	>500	>500	500	500	<10	5
<i>Bacillus fragilis</i>	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	40	10
<i>Bacillus licheniformis</i>	>500	62.5	>500	>500	>500	500	500	40	20
<i>Candida albicans</i>	125	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	4*	2**
<i>Saccharomyces boulardii</i>	125	<15.6	>500	500	>500	62.5	125	1*	0.5**
<i>S. cerevisiae</i>	125	31.25	>500	>500	>500	125	125	2*	2**
<i>Aspergillus nidulans</i>	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6	31.25	2*	0.12**

(1): Kersetin; (2): Hesperidin; M1: Resveratrol; M5: Lakkaz enzim metaboliti; M6: Lakkaz enzim metaboliti; M7: Hesperetin; M13: Naringenin; B1: Amoksisilin; B2: Kloramfenikol; *: Ketakanazol ($\mu\text{g/mL}$); **: Amfoterisin B ($\mu\text{g/mL}$)

4.5.5. Biyofilm aktivite çalışması

Biyofilm, mikroorganizmaların birbirine ve buldukları canlı ya da cansız bir katı yüzeye yapışarak oluşturdukları topluluğu ifade etmektedir. *S. pneumoniae* *H. influenza*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi birçok sinüzit etkeni patojen sinüslerde biyofilm oluşturarak hastalığa neden olurlar ve buldukları ortamdan uzaklaştırılmaları tek yaşayan mikroorganizmalara nazaran daha zordur ve bu nedenle direnç faktörüdürler (Fastenberg vd., 2016).

Bu kapsamda *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ile biyofilm çalışması gerçekleştirildi. Antimikrobiyal aktiviteleri yüksek olan ve aynı dönüşüm ekstresinden elde edilen hesperetin ve naringenin bileşikleri çalışma için seçildi. Ayrıca hesperidin metabolitleri olduğu için çalışmada hesperidin de bulunmaktadır. Bu üç bileşiğin MİK ve MBİK değerleri Tablo 4.16'da yer almaktadır.

Tablo 4.16. Hesperidin, hesperetin ve naringenin MİK ve MBİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)

Mikroorganizmalar	MİK/MBİK değerleri	Hesperidin	Hesperetin	Naringenin
<i>Staphylococcus aureus</i>	MİK	125	62.5	31.25
	MBİK	500	250	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MİK	500	500	500
	MBİK	>500	>500	>500

Biyofilm ve antibakteriyal aktivite çalışması sonucunda hesperetin ve naringenin hesperidin'den daha etkili bulundu. Literatürde naringenin'in daha önce *Vibrio harveyi* ve *Escherichia coli* suşları ile yapılmış biyofilm çalışması bulunmaktadır (Vikram vd., 2010).

Diğer bir çalışmada naringenin, yağ asidi salgısını azaltarak biyofilm oluşumunu azaltıp *S. aureus* MRSA mutantları üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu tespit edilmiştir. Ayrıca hem antibakteriyel aktivite hem de biyofilm inhibisyonu için antibiyotik olarak tedavide kullanılan oksasilin ile yüksek sinerjik aktivite gözlemlenmiştir (Song vd., 2020).

Naringenin çalışılan diğer bir suş *S. mutans*'tır. Bu suş kullanılarak oluşturulan biyofilm ikinci (bakteriyel yapışma) ve üçüncü aşamalarının da (biyofilm olgunlaşması)

baskılamaktadır. Bu çalışma sonucu naringenin'in diş kliniğinde uygun konsantrasyonda güvenli bir çürük önleyici ajan olarak kullanılabilmesi ön görülmektedir (Yue vd., 2018).

Hesperidin ve hesperetin bileşikleri ile yapılan biyofilm çalışmasında *S. aureus* RN4220 ve *S. aureus* SA1199B suşlarına karşı hesperetin daha aktif bulundu. Bu çalışmada glikozit ve aglikon formunda farklı bileşikler karşılaştırılmış olup aglikon yapısındaki flavonoidlerin glikozit formlarından daha etkili olduğu kanısına ulaşıldı (Lopes vd., 2017).

4.5.6. Dama tahtası yöntemi ile sinerjik aktivite çalışması

Naringenin ve hesperetin bileşikleri ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) biyofilm yapısı oluşturulduktan sonra dama tahtası yöntemindeki konsantrasyonlarla çalışma gerçekleştirildi. Çalışma sonucu FİKİ değeri 'FİKİ = FİK X+FİK Y' formülüne göre hesaplanmıştır. X değeri hesperetin (FİKX: 0.25), Y değeri ise naringenin'e (FİKY: 0.0625) aittir.

$\sum FİK = 0.3125$ olarak bulundu. Deneysel çalışma sonucunda elde edilen sonuç 'FİKİ ≤ 0.5 = Sinerjik etki' aralığında yer almaktadır. Hesperetin ile naringenin arasında biyofilm aktivite çalışmasında sinerjik etkiye sahip olduğu bulundu.

Literatürde naringenin ve hesperetin'in *S. aureus* ATCC 12598 suşu ile sinerjik aktivite çalışması yapılmış olup FİKİ değeri 1.063 bulundu. Bulunan FİKİ değeri '1<FİKİ<4 =Bağımsız etki' aralığında yer almaktadır. Sinerjik etki olarak bağımsız etkiye sahip iken; tez kapsamında yapılan biyofilm tabakalama üzerinde sinerjik etkiye sahip olduğu bulundu (Han vd., 1992).

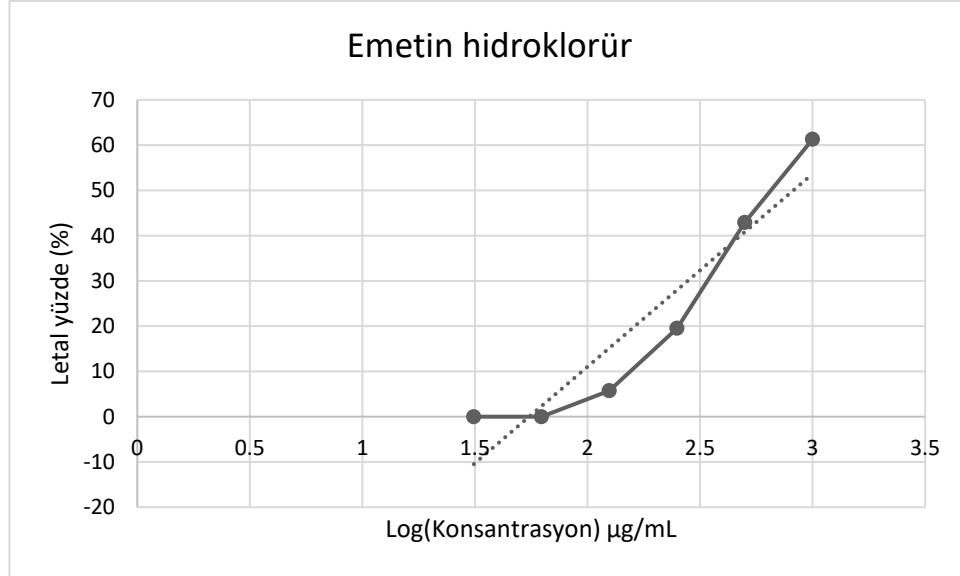
B-laktam antibiyotiklerin varlığında büyüyen bakteriler için flavonoidler, B-laktamaz enzimleri ve PBP-2' seviyeleri üzerinde hiçbir etki göstermedi. Bu çalışmada etki mekanizmasını çözümlenebilmek için elektron mikroskopisi çalışması bulunmaktadır. Sonuç olarak alt inhibitör konsantrasyonlarda flavonoidlerle tedavi edilen bakterilerde anormal morfoloji gözlemlenmektedir (Denny vd., 2008).

4.5.7. Brine Shrimp toksisite çalışmaları

Artemia, aşırı tuzluluğa iyi uyum sağlayabilmesi nedeniyle bataklıklar ve göller gibi farklı yaşam koşullarında varlığını sürdürebilen zooplantonik kabuklu canlılardır. Bu canlılar filter feeder oldukları için toksik maddelere karşı aşırı hassasiyet göstermelerinden dolayı toksisite deneylerinde kullanılmaktadırlar. *Artemia* yumurtaları ile yapılan bu çalışmalar *in vivo* hayvan alternatifi model olarak kabul edilmektedir.

Deneysel çalışma sürecinde *Artemia* yumurtalarının besiyeri ile büyümelerinin aktive edilmesi sağlanıp nauplii (instar I, II ve III) adı verilen larva evrelerindeki canlılarla çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Gajardo ve Beardmore, 2012; Khabib vd., 2022).

Çalışma kapsamında standart madde olarak emetin hidroklorür kullanıldı (Solis vd., 1993). Pozitif kontrole ait doz-etki grafiği Şekil 4. 74'te almaktadır.



Şekil 4. 74. Emetin hidroklorür toksik etkisi

Substrat ve metabolitlerin 62.50 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen letal yüzde sonuçları Tablo 4.17'de bulunmaktadır.

Tablo 4.17. Substratların ve metabolitlerin akut toksisite sonuçları

	Letal yüzde (%)
Hesperidin	-
Resveratrol	13.350±3.87
M5	-
M6	-
Kersetin	-
Hesperetin	8.010±0.45
Naringenin	4.550±6.43

-: Etki gözlemlenmedi

Brine Shrimp deneyinde LC₅₀ değerlerine göre toksisite dört sınıfa ayrılmaktadır. Bu toksisite dereceleri güçlü toksik (LC₅₀ değeri: <100 µg/mL), orta dereceli toksik (LC₅₀ değeri: 100-500 µg/mL), zayıf toksik (LC₅₀ değeri: 500-1000 µg/mL) ve toksik değil (LC₅₀

değeri: >1000 µg/mL) şeklindedir (Khabib vd., 2022). Derecelendirme göz önüne alındığında substrat olarak kullanılan hesperidin ve kersetin toksik değildir. Aktivite çalışmaları gerçekleştirilen metabolitlerden lakkaz enzim metabolitleri M5 ve M6, naringenin ve hesperetin'in de toksik olmadığı bulundu. Hesperidin, hesperetin, naringenin ve kersetinin daha önce literatürde yer alan toksisite çalışmaları ile de sonuçlar desteklenmektedir. Hesperidin bileşiğinin daha önce toksisite *in vivo* hayvan modellemesi ve *in vivo* hayvan alternatifi diğer modellerle çalışmaları bulunmasına rağmen Brine Shrimp yöntemi ile çalışmaya literatürde rastlanılmamakta olup literatürdeki sonuçlarla korelasyon bulunmaktadır (Al-Rikabi vd., 2020; Carević vd., 2022; Isnaini vd., 2019; Liu vd., 2019; Nachammai vd., 2021).

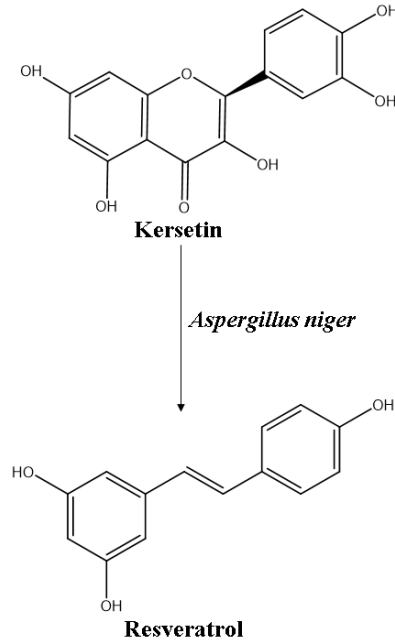
500 µg/mL konsantrasyonda toksik aktivitede maksimum letal yüzde tespit edildi. Deneysel kapsamında 24 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra numuneler arasında en yüksek akut toksisite gösteren resveratrol olarak hesaplandı. Literatürde yer alan *in vitro* çalışmalar ve *in vivo* hayvan alternatifi diğer yöntemlerle yapılmış olan çalışmaların sonuçları da deneysel çalışmamızı desteklemektedir. Resveratrol'ün rutin ve rosmarinik asit gibi diğer polifenolik bileşiklerden oldukça yüksek toksisiteye sahip olduğu aynı deney metodu ile yapılmış bir çalışmada gösterilmiştir (Berardi vd., 2009; Cantürk vd., 2016; Cavalcante vd., 2017).

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Kersetin mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmaları sonucunda çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak 6 metabolitin varlığı belirlenmiş olup 5 metabolitin yapısı aydınlatıldı.

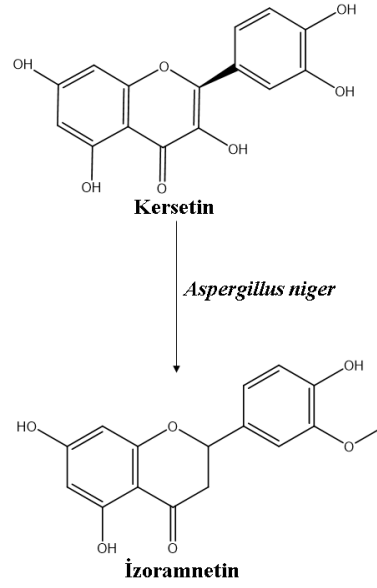
A. flavus mikrobiyal dönüşümü sonucu M1 (resveratrol) ve M2 (izoramnetin) metabolitlerinden M1 kromon halka yapının parçalanması sonucu stilben yapısında bir bileşiğin elde edildiğini gösterirken; M2 kersetin'e 7. konumdan metil grubu bağlanması ile metoksi yapında bir flavonoit oluştuğunu göstermektedir.

M1 (resveratrol) C halka yapısının bozulması sonucunda elde edilmektedir. Kersetin'in resveratrol'e dönüşüm tepkimesi Şekil 5.1'de yer almaktadır. Literatürde kersetin'in *Aspergillus flavus* kersetinaz enzimi aracılığıyla yaptığı transformasyon çalışmasında kromon halkasının parçalanıp karbonmonoksit ve protokateşuoilfloroglusinolkarboksilik asit bileşiklerinin oluşumu gözlemlendi (Das ve Rosazza, 2006; Kostrzewa-Susłow vd., 2008).



Şekil 5.1. Kersetin'in *A. niger* ile ikinci dönüşüm tepkimesi

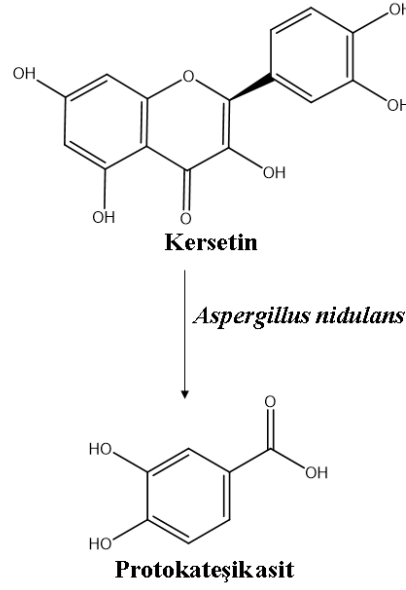
Aspergillus cinsinde yer alan suşlarla yapılan çalışmalarda flavonoit yapısının B halkasına metoksil grubu bağladığı gözlemlendi (Kostrzewa-Susłow ve Janeczko, 2021). Bu durum M2 metabolitin oluşumunu desteklemektedir. Kersetin'in izoramnetin'e dönüşüm tepkimesi Şekil 5.2' de yer almaktadır.



Şekil 5.2. Kersetin'in *A. niger* ile dönüşüm tepkimesi

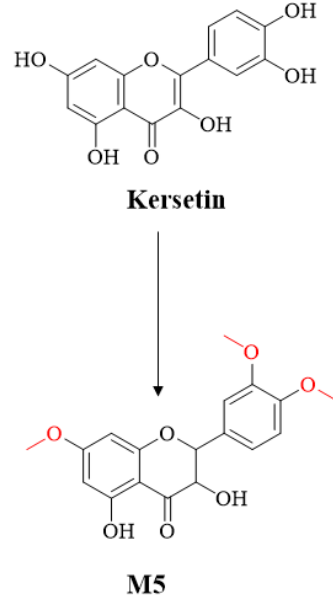
M3 ve M4 metabolitleri düşük miktarlarda dönüşümü gözlemlenmiş olup preparatif ölçekli yapılan çalışmalarda yapı tayini için yeteri miktarda elde edilemedi. Yapılan İTK ve SK/KS-KS ile elde edilen sonuçlar literatürdeki veriler ile desteklendi. M3 metaboliti kütle fragmentleri tutarlı olmasına rağmen literatürde de bileşiğin yapısı aydınlatılmadığı belirtilmektedir (Kang vd., 2016).

M4 metaboliti protokateşik asit olarak tanımlanmış olup daha önce *Rhizobium loti* NZP2042 ve *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) suşları kullanılarak kersetin mikrobiyal transformasyonu çalışmasında tespit edilmiştir (Rao vd., 1991). Kersetin'in protokateşik aside dönüşüm tepkimesi Şekil 5.3'te yer almaktadır.



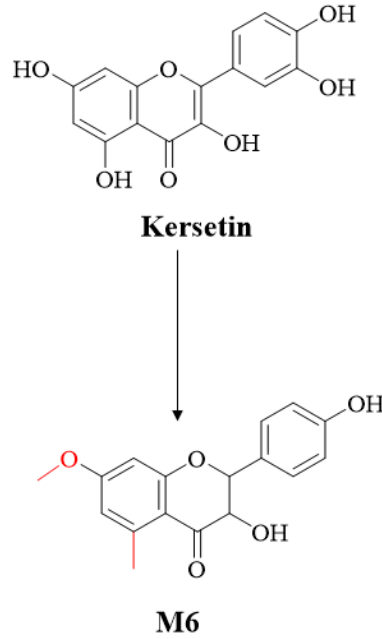
Şekil 5.3. Kersetin'in *A. nidulans* ile dönüşüm tepkimesi

M5 ve M6 metabolitleri enzimatik transformasyon ürünleri olup lakkaz enzimi ile gerçekleşti. Kersetin'in M5 ve M6 dönüşüm tepkimeleri sırasıyla Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te yer almaktadır. Lakkaz oksijen oksidoredüktaz enzim ailesinde yer almaktadır (Madhavi ve Lele, 2009). Transformasyon sonucu elde edilen metabolitlerinde hidroksil gruplarının metoksi gruplarına dönüştüğü gözlemlenmektedir. Hem enzimin yapısında hem de ortamda metanol bulunmasından dolayı biyokimyasal tepkimenin gerçekleşmesi mümkündür. Puranik ve Srivastava tarafından 2017 yılında yazılan makale kersetin moleküler yapısının aydınlatılmasında referans alındı. Çalışmamız literatürde yer alan pikler ile uyumluluk göstermektedir (Puranik ve Srivastava, 2017).



Şekil 5.4. Kersetin'in lakkaz ile M5 metabolitine dönüşüm tepkimesi

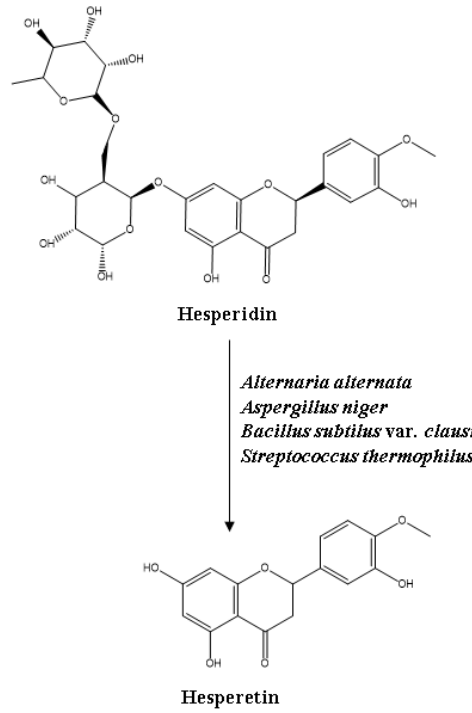
M6 metabolitinde yer alan metil grubu proton NMR ile gösterilmiş olup aynı zamanda da özellikle *Citrus* türlerinde daha önce gözlemlenen metilat flavonoiti olarak bitkilerde karbona bağlı metil grubu olan metilat flavanoitleri olarak biyolojik dönüşümle üretilebileceği gözlemlendi. Bu çalışmada 5. konuma bağlı hidroksi grubunun metil grubu olarak değişmesinin mümkün olduğunu göstermektedir (Wen vd., 2017).



Şekil 5.5. Kersetin'in lakkaz ile M6 metabolitine dönüşüm tepkimesi

Hesperidin mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmaları sonucunda çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak 8 metabolitin varlığı belirlenmiş olup altı metabolitin yapısı aydınlatıldı.

M7 (Hesperetin) hesperidin yapısında yer alan şeker gruplarının koparılmış aglikon yapısıdır. Bu çalışmada bağırsak florasında yer alan izole *Bacillus subtilis* var. *clausii* bakterisinde dönüşüm gözlemlendi. Bu kapsamda kullanılan *B. coagulans*, *B. subtilis* var. *notto*, *Lactobacillus fermentum* ve *L. rhomnosus* suşlarında da ön deneme çalışmalarında hesperetin oluşumu gözlemlenmiş olup en büyük oranda metabolit oluşumu *B. subtilis* var. *clausii* suşunda gerçekleşti. *Lactobacillus* suşlarının yüksek β -glikozidaz aktivitesine sahip olması da bu dönüşümü desteklemektedir (Hu vd., 2022). Hesperidin'in farklı mikroorganizmalarla mikrobiyal transformasyon tepkimesi Şekil 5.6'da yer almaktadır.

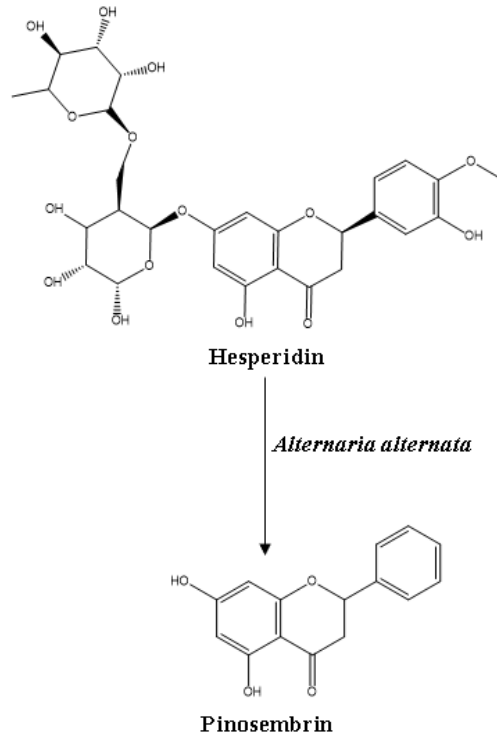


Şekil 5.6. Hesperidin'in farklı suşlar ile mikrobiyal dönüşüm tepkimesi

Genellikle mikrobiyal transformasyon çalışmalarında olması beklenen bir durumdur. Literatürde *Aspergillus* ve *Cunninghamella* cinsleri, *Rhizopus stolonifer*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces variotii*, *Streptomyces griseus* mikrobiyotadan izole *Pichia kluyverii* insan feçes florası kullanılarak hesperidin'den hesperetin dönüşümleri gözlemlendi (Cheng vd., 2015; Dodda vd., 2012; Escudero-Lopez vd., 2016; Kim vd., 1998; Madeira vd., 2014;

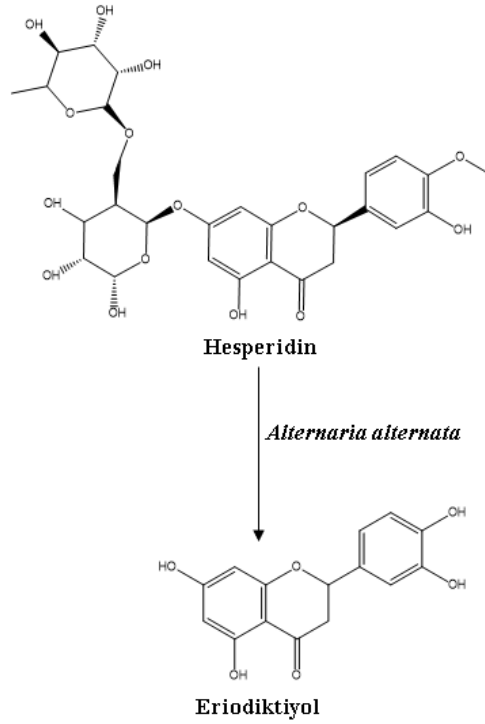
Nakajima vd., 2016; Nakajima vd., 2017; Sordon vd., 2016; Wang vd., 2005). M7 metaboliti aynı zamanda tez kapsamında *Alternaria alternata* mikrobiyal transformasyon çalışmasında da tespit edildi.

M8 (pinosembrin) *A. alternata* ile kersetinden mikrobiyal transformasyonu ilk kez gerçekleştirildi. Hesperedin'in *A. altarnata* ile dönüşüm tepkimesi Şekil 5.7'de yer almaktadır. Pinosembrin flavonoiti daha önce ağaç kabuğundan izole edilen endofitik fungus *Annulohyoxylon elevatidiscus* BCRC 34014'ten izole edilmiştir (Cheng vd., 2015). Bununla birlikte fenilpropanoit yolak enzimlerini eksprese eden rekombinant *S. cerevisiae* suşu ile de pinosembrin oluşumu gözlemlenmiştir (Das ve Rosazza, 2006).



Şekil 5.7. Hesperidin'in *A. altarnata* ile dönüşüm tepkimesi

M9 metaboliti literatürde daha önce eriodiktiyol olarak adlandırıldı. M9 metabolitinin dönüşümü *A. alternata* ile gerçekleşti. Dönüşüm tepkimesi Şekil 5.8'te yer almaktadır. Bu metabolitin oluşumu hesperidin biyosentez yolağında eriodiktiyol'den sonra hesperetin ve hesperidin oluşması olarak gösterilmiştir (Karim vd., 2021). *A. alternata* mikrobiyal transformasyonunda tanımlanan diğer bir metabolitin hesperetin olması bu durumu desteklemektedir.

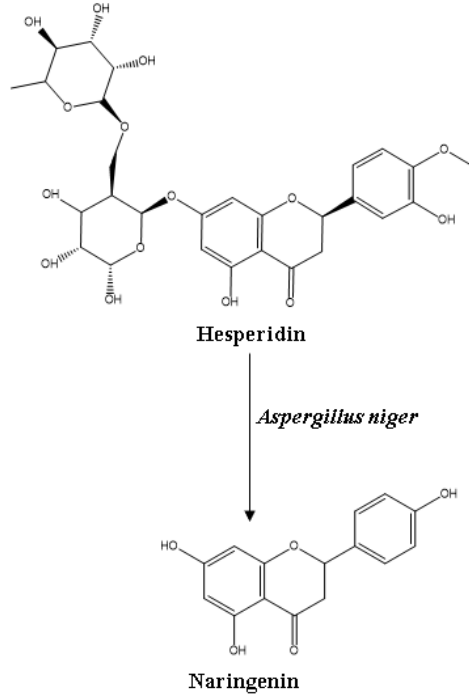


Şekil 5.8. Hesperidin'in *A. alternata* ile Eriodiktiyole dönüşüm tepkimesi

M10 metaboliti *A. alternata* mikrobiyal transformasyonundan elde edilen bir diğer metabolit olup NMR verileri kalkon yapısında olduğunu göstermektedir. Bu dönüşüm bitkilerde ve mikroorganizmadaki biyosentez yolağı göz önünde bulundurulduğunda gerçekleşmesi mümkündür.

M11 *Sporobolomyces pararoseus* ve M12 *Rhizopus stolonifer* dönüşüm metabolitleri eser miktarda oluştukları için yapı tayini yapılamadı.

M13 metaboliti *A. niger* ile mikrobiyal transformasyon sonucunda hesperetin'le elde edildi. Hesperidin'in naringenin'e dönüşüm tepkimesi Şekil 5.9'da yer almaktadır. Yapı elimizde bulunan standart ile doğrulanmış olup zamana bağlı değişim grafiğine sonucunda en yüksek verim 8. gün sonunda gözlemlendi. Literatürde naringenin substrat olarak kullanıldığı çalışmalar olmasına rağmen metabolit olarak bulunduğu çalışma fenilpropanoit yolak enzimlerini eksprese eden rekombinant *S. cerevisiae* suşu kullanılmaktadır. Metabolit olarak pinosembren ile naringenin metabolitlerinin oluşumu gözlemlenmiştir (Das ve Rosazza, 2006).



Şekil 5.9. Hesperidin'in *A. niger* ile dönüşüm tepkimesi

Hesperidin'in suda çözünme problemi olması ve mikrobiyal transformasyonda besiyerinin sulu olmasından dolayı hesperidin β -siklodekstrin ile kaplanarak çalışma gerçekleştirilerek de metabolitlerin dönüşümü gözlemlenmiş olup β -siklodekstrin kaplanması ile metabolit veriminde anlamlı bir değişim gözlemlenmedi.

M14 metaboliti lakkaz enziminin aktivasyonu sonucunda elde edildi. Dönüşüm ekstresi analiz edildiğinde eser miktarda bulundu. Elde edilen kütle bilgisinden yola çıkılarak Chemdraw uygulamasında modifiye edilmiş olup metoksi grubunun kopmuş olduğunu gözlenmektedir. Bu bilgi ışığında literatürdeki bilgiler yardımıyla SK/KS-KS kütle fragmentleri M14 metabolitinin naringenin olduğunu göstermektedir.

Biyolojik aktivite çalışmaları substrat olarak kullanılan kersetin ve hesperidin, kersetin'in dört dönüşüm ekstresi ve hesperidin'in sekiz dönüşüm ekstresi ile gerçekleştirildi. Aynı çalışmalar metabolitlerden M1(resveratrol), M5, M6, M7 (hesperetin) ve M13 (naringenin) ile de gerçekleştirildi. Bu çalışmalar kapsamında metabolitler ve substratların *in-vitro* antioksidan, 5-LOX enzim inhibisyonu ve antimikrobiyal aktiviteleri gerçekleştirildi.

In-vitro DPPH' antioksidan aktivite sonucunda *Aspergillus flavus* dönüşüm ekstresinde (E2) ise kersetin'den daha yüksek antioksidan aktivite gözlemlenmektedir. E2

ekstresinde daha önce yapılan analizlerde metabolit olarak resveratrol ve izoramnetin tanımlandı. Aynı durum hesperidin *A. niger* dönüşüm ekstresinde (E10) de geçerli oldu. *A. niger* dönüşüm metabolitleri naringenin ve hesperetin olarak tespit edildi. Ekstrelerin aktiviteleri metabolit aktivitelerinden daha yüksek bulundu. Bu durum E2 dönüşüm ekstresinde metabolitlerin ve içeriğinde bulunan kersetin'in sinerjik etkiye sahip olduğunu yorumunu yaptırmaktadır.

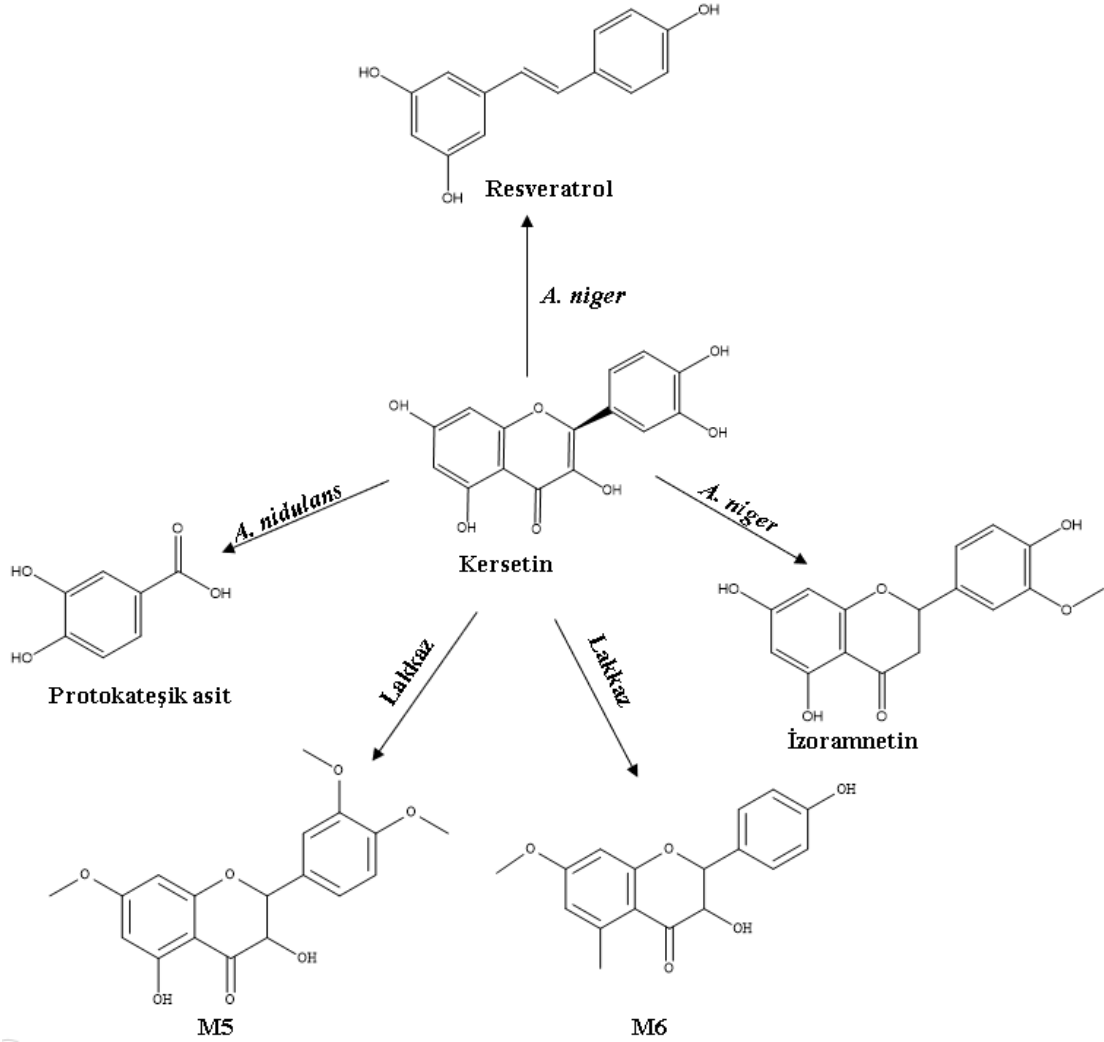
Anti-enflamatuvar aktivite çalışmasında soya 5-LOX enzimi kullanıldı. Hesperidin dönüşüm ekstrelerinden E3 (IC₅₀: 25.93±0.36 µg/mL) ve kersetin dönüşüm ekstrelerinden E10 (IC₅₀: 24.99±1.41 µg/mL) değerleri hesaplandı. hesperidin *A. flavus* dönüşüm ekstresi hem antioksidan aktivite hem de anti-enflamatuvar aktivite açısından aktif bulundu. Elde edilen bu çalışma sonuçları bizlere *Aspergillus* suşları ile yapılan çalışmada elde edilen yeni metaboliterin antioksidan ve anti-enflamatuvar aktivite yönünden daha kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kapsamında 10 mikroorganizma seçildi. Bu mikroorganizmalardan 6 tanesi bakteri (*Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378) 2 maya (*Saccharomyces boulardii* REFLOR® ve *S. cerevisiae* ATCC 9763) ve 2 fungus (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus nidulans* Abraham) bulunmaktadır. Antimikrobiyal aktivite çalışması yüksek verimle elde edilen metabolitlere ve substratlara uygulandı. Hesperidin metabolitleri M15 (hesperetin) ve M13 (naringenin) her ikisinin de *S. aureus* suşuna karşı göstermiş oldukları etki hesperidin'den daha yüksektir. Bu sonuç cilt patojenlerine karşı daha etkili metabolitler elde edildiğini göstermektedir. Kersetin metabolitlerinden M1 *S. typhimurium* (62.5 µg/mL) ve *B. licheniformis* (62.5 µg/mL) suşlarına karşı kersetin'den daha etkili bulundu.

In vivo hayvan alternatifi yöntemlerinden birisi olan Brine Shrimp yöntemi ile substrat ve diğer aktivite çalışmaları yapılan metabolitlerin aynı konsantrasyonlarda akut toksisite değerleri hesaplandı. Resveratrol (M1) metabolitinin Brine Shrimp'lerin üzerinde diğer metabolitlerden daha yüksek akut toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde belirtilen toksisite değerlendirme aralıklarına göre substratlar ve metabolitler toksik değildir.

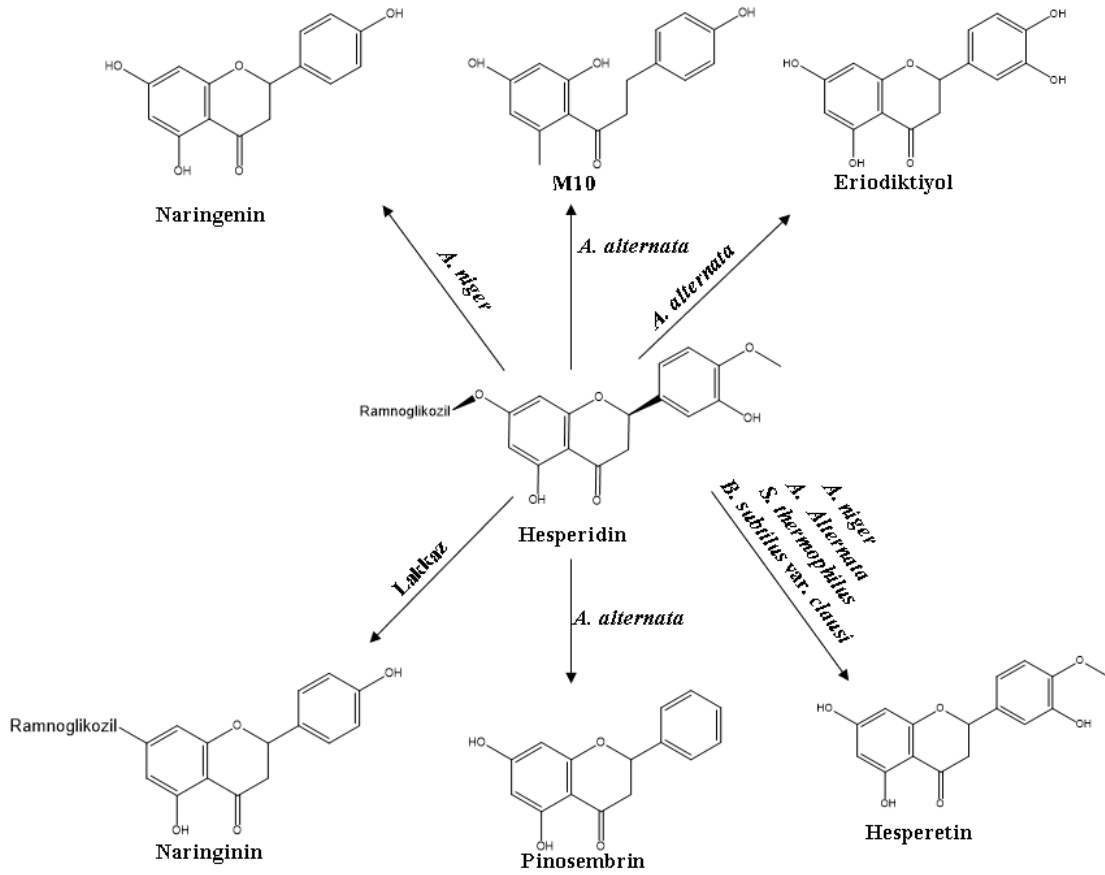
Tez kapsamında bitkisel gıda atığı olarak *Citrus* meyvelerinde içeriğinde bulunan ayrıca göstermiş oldukları güçlü biyolojik aktivitelerinden dolayı da gıda takviyesi olarak kullanım alanları olan kersetin ve hesperidin'den hareketle 25 farklı mikroorganizma ile mikrobiyal ve lakkaz ile enzimatik transformasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışma

ile kersetin ve hesperidin'e oranla doğada daha az bulunan bileşiklerin dönüşümü gerçekleştirildi. Resveratrol, izoramnetin, M5 ve M6 metabolitleri ilk kez kersetin'in mikrobiyal ve enzimatik transformasyonu ile elde edildi. Kersetin'in mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmaları sonucunda yapısı aydınlatılan metabolitler Şekil 5.10'da yer almaktadır.



Şekil 5.10. Kersetin biyodönüşüm çalışmaları sonucu elde edilen metabolitler

Flavonoit yapısındaki pinosembrin, eriodiktiyol ve naringenin ilk kez hesperidin'in mikrobiyal transformasyonu ile elde edildi. Bu çalışma bitkilerdeki biyosentez yolağı ile de desteklendi. Hesperidin'in mikrobiyal ve enzimatik transformasyon çalışmaları sonucunda yapısı aydınlatılan metabolitler Şekil 5.11'de yer almaktadır.



Şekil 5. 11. Hesperidin biyodönüştürme çalışmaları sonucu elde edilen metabolitler

Hesperidin'in aglikon hali olan hesperetin metaboliti *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Bacillus subtilis* var. *clausii* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarında gözlemlenmiştir. Hesperidin'in *A. alternata* ve *S. thermophilus* ile dönüşümü ilk defa gerçekleşti.

Hesperidin metabolitlerinin tez kapsamında yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında hesperidin'den daha aktif olduğu gözlemlendi. Hesperetin ve naringenin metabolitlerinin biyofilme karşı sinerjik etkisi ilk kez tespit edildi. Bu metabolitlerin gözlemlenmiş olan sinerjik etkisinden dolayı kombinasyon halinde biyofilm tabakaya karşı etkili bir kullanım alanı olabileceği gösterildi.

Gerçekleştirilen biyofilm dama tahtası yöntemi ilk kez yapılmış olma özelliği taşımaktadır. Yapılan çalışmanın tekrarlanabilir ve kendi içerisinde tutarlı sonuçlarının olması metodun ümit vaat edici olduğunu göstermektedir.

İlerleyen dönemlerde literatüre kazandırılan bu yöntem ile tekli kullanımda antibiyofilm etkisi olan bileşiklerin kombinasyon halinde biyofilm tabakaya etkilerinin araştırılmasıyla literatüre katkı sağlanması hedeflenmektedir. Ayrıca dönüşüm

metabolitlerinin verimlerinin arttırılması amacıyla deneysel parametrelerde değişiklikler yapılarak bilgisayar yazılımları destekli optimizasyon çalışmaları hedeflenmektedir. evre dostu biyoteknolojik yöntemler ile hammadde üretimine yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abd-Elhakim, Y.M., Ghoneim, M.H., Ebraheim, L.L., Imam, T.S. (2020). Taurine and hesperidin rescues carbon tetrachloride-triggered testicular and kidney damage in rats via modulating oxidative stress and inflammation. *Life Sci.*, 254, 117782.
- Abolaji, A.O., Omozokpia, M.U., Oluwamuyide, O.J., Akintola, T.E., Farombi, E.O. (2020). Rescue role of hesperidin in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced toxicity in the brain, ovary and uterus of wistar rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 31 (2).
- Adefegha, S.A., Bottari, N.B., Leal, D.B., de Andrade, C.M., Schetinger, M.R. (2020). Interferon gamma/interleukin-4 modulation, anti-inflammatory and antioxidant effects of hesperidin in complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis model of rats. *Immunopharm. Immunot.*, 42 (5), 509-520.
- Afzal, S.M., Vafa, A., Rashid, S., Barnwal, P., Shahid, A., Shree, A., Islam, J., Ali, N., Sultana, S. (2021). Protective effect of hesperidin against N, N'-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation, and apoptotic response in the colon of Wistar rats. *Environ. Toxicol.*, 36 (4), 642-653.
- Agrawal, N.K. ve Kant, S. (2014). Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. *World J. Diabetes*, 5 (5), 697.
- Ahmad, N.S., Farman, M., Najmi, M.H., Mian, K.B., Hasan, A. (2008). Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. *J. Ethnopharmacol.*, 117 (3), 478-482.
- Al-Rikabi, R., Al-Shmgani, H., Dewir, Y.H., El-Hendawy, S. (2020). In vivo and in vitro evaluation of the protective effects of hesperidin in lipopolysaccharide-induced inflammation and cytotoxicity of cell. *Molecules*, 25 (3), 478.
- Alam, M.A., Subhan, N., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Reza, H.M., Sarker, S.D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr.*, 5 (4), 404-417.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., Quartieri, A., Rossi, M. (2015). Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. *Nutrients*, 7 (4), 2788-2800.
- Asha, S. ve Vidyavathi, M. (2009). Cunninghamella—a microbial model for drug metabolism studies—a review. *Biotechnol. Adv.*, 27 (1), 16-29.

- Askari, G., Ghiasvand, R., Feizi, A., Ghanadian, S.M., Karimian, J. (2012). The effect of quercetin supplementation on selected markers of inflammation and oxidative stress. *J. Res. Med. Sci.*, 17 (7), 637-641.
- Attia, G.H., Marrez, D.A., Mohammed, M.A., Albarqi, H.A., Ibrahim, A.M., Raey, M.A.E. (2021). Synergistic effect of mandarin peels and hesperidin with sodium nitrite against some food pathogen microbes. *Molecules*, 26 (11), 3186.
- Bai, Y., Peng, W., Yang, C., Zou, W., Liu, M., Wu, H., Fan, L., Li, P., Zeng, X., Su, W. (2020). Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans, and the differences between species. *Front Pharmacol.*, 11, 364.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99 (1), 191-203.
- Baylac, S. ve Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int. J. Aromather.*, 13 (2-3), 138-142.
- Bazzucchi, I., Patrizio, F., Ceci, R., Duranti, G., Sabatini, S., Sgrò, P., Di Luigi, L., Sacchetti, M. (2020). Quercetin supplementation improves neuromuscular function recovery from muscle damage. *Nutrients*, 12 (9), 2850.
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C.R., Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microb.*, 72 (8), 5670-5672.
- Berardi, V., Ricci, F., Castelli, M., Galati, G., Risuleo, G. (2009). Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. *J. Exp. Clin. Canc. Res.*, 28 (1), 1-7.
- Berger, R.G. (2007): *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- Bhargava, P., Verma, V.K., Malik, S., Khan, S.I., Bhatia, J., Arya, D.S. (2019). Hesperidin regresses cardiac hypertrophy by virtue of PPAR- γ agonistic, anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant properties. *J. Biochem. Mol. Toxic*, 33 (5), e22283.
- Blamey, J.M., Fischer, F., Meyer, H.-P., Sarmiento, F., Zinn, M. (2017). Enzymatic biocatalysis in chemical transformations: a promising and emerging field in green chemistry practice, *Biotechnology of microbial enzymes* içinde (s. 347-403). Elsevier.

- Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A.E., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., Döring, F., Wolffram, S., Rimbach, G. (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J. Nutr. Biochem.*, 22 (3), 293-299.
- Bossolani, G.D.P., Silva, B.T., Perles, J.V.C.M., Lima, M.M., Frez, F.C.V., de Souza, S.R.G., Sehaber-Sierakowski, C.C., Bersani-Amado, C.A., Zanoni, J.N. (2019). Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. *Life Sci.*, 238, 116956.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56 (11), 317-333.
- Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F.G., Serra, S. (2011). Biocatalytic methods for the synthesis of enantioenriched odor active compounds. *Chem. Rev.*, 111 (7), 4036-4072.
- Brull, V., Burak, C., Stoffel-Wagner, B., Wolffram, S., Nickenig, G., Müller, C., Langguth, P., Alteheld, B., Fimmers, R., Naaf, S., Zimmermann, B.F., Stehle, P., Egert, S. (2015). Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br. J. Nutr.*, 114 (8), 1263-1277.
- Brull, V., Burak, C., Stoffel-Wagner, B., Wolffram, S., Nickenig, G., Müller, C., Langguth, P., Alteheld, B., Fimmers, R., Stehle, P. (2017). No effects of quercetin from onion skin extract on serum leptin and adiponectin concentrations in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *Eur. J. Nutr.*, 56 (7), 2265-2275.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E., Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (11), 3337-3340.
- Cano-Flores, A., Gómez, J., Escalona-Torres, I.S., Velasco-Bejarano, B. (2020). Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources, *Microorganisms* içinde (s.275) IntechOpen.
- Canturk, Z., Dikmen, M., Artagan, O., Ozarda, M.G., Ozturk, N. (2016). Cytotoxic effects of resveratrol, rutin and rosmarinic acid on ARH-77 human (multiple myeloma) cell line. *Nat. Prod. Commun.*, 11 (10), 1934578X1601101007.

- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol. Adv.*, 33 (1), 214-223.
- Carević, T., Kostić, M., Nikolić, B., Stojković, D., Soković, M., Ivanov, M. (2022). Hesperetin—between the ability to diminish mono- and polymicrobial biofilms and toxicity. *Molecules*, 27 (20), 6806.
- Cavalcante, A.K., Lopes-Ferreira, M., Rogero, S.O., Rogero, J.R. (2017). Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 12 (1), 133-139.
- Chakroun, H., Bouaziz, M., Dhouib, A., Sayadi, S. (2012). Enzymatic oxidative transformation of phenols by *Trametes trogii* laccases. *Environ. Technol.*, 33 (17), 1977-1985.
- Charisiadis, P., Kontogianni, V.G., Tsiafoulis, C.G., Tzakos, A.G., Siskos, M., Gerothanassis, I.P. (2014). ¹H-NMR as a structural and analytical tool of intra-and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds. *Molecules*, 19 (9), 13643-13682.
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Ghoul, M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochem.*, 41 (11), 2237-2251.
- Chen, R., Qi, Q.-L., Wang, M.-T., Li, Q.-Y. (2016). Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm. Biol.*, 54 (12), 3203-3210.
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Cheng, Y.-C., Chen, J.-J., Hsieh, S.-Y., Yuan, G.-F., Su, Y.-S. (2015). Metabolites isolated from an endophytic fungus of annulohyphylon elevatidiscus. *Chem. Nat. Compd.*, 51 (1), 67-70.
- Cheng, S.-C., Wu, Y.-H., Huang, W.-C., Pang, J.-H.S., Huang, T.-H., Cheng, C.-Y. (2019). Anti-inflammatory property of quercetin through downregulation of ICAM-1 and MMP-9 in TNF- α -activated retinal pigment epithelial cells. *Cytokine*, 116, 48-60.
- Cheraghpour, M., Imani, H., Ommi, S., Alavian, S.M., Karimi-Shahrbabak, E., Hedayati, M., Yari, Z., Hekmatdoost, A. (2019). Hesperidin improves hepatic steatosis, hepatic enzymes, and metabolic and inflammatory parameters in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Phytother. Res.*, 33 (8), 2118-2125.
- Choi, G.N., Kim, J.H., Kwak, J.H., Jeong, C.-H., Jeong, H.R., Lee, U., Heo, H.J. (2012). Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem.*, 132 (2), 1019-1024.

- Choi, I.-Y., Kim, S.-J., Jeong, H.-J., Park, S.-H., Song, Y.-S., Lee, J.-H., Kang, T.-H., Park, J.-H., Hwang, G.-S., Lee, E.-J. (2007). Hesperidin inhibits expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and inflammatory cytokine production from mast cells. *Mol Cell Biochem.*, 305 (1), 153-161.
- Choi, J.M., Han, S.S. ve Kim, H.S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.*, 33 (7), 1443-1454.
- Chung, J.E., Kurisawa, M., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant property of gelatin-catechin conjugates. *Biotechnol. Lett.*, 25 (23), 1993-1997.
- Cialdella-Kam, L., Nieman, D.C., Knab, A.M., Shanely, R.A., Meaney, M.P., Jin, F., Sha, W., Ghosh, S. (2016). A mixed flavonoid-fish oil supplement induces immune-enhancing and anti-inflammatory transcriptomic changes in adult obese and overweight women—A randomized controlled trial. *Nutrients*, 8 (5), 277.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Munoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J. Ethnopharmacol.*, 112 (3), 585-589.
- CLSI (2006): Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Pennsylvania, pp. CLSI M7-A7.
- Costa, I.M., Lima, F.O., Fernandes, L.C., Norrara, B., Neta, F.I., Alves, R.D., Cavalcanti, J.R., Lucena, E.E., Cavalcante, J.S., Rego, A. (2019). Astragaloside IV supplementation promotes a neuroprotective effect in experimental models of neurological disorders: a systematic review. *Curr. Neuropharmacol.*, 17 (7), 648-665.
- Črnivec, I.G.O., Skrt, M., Šeremet, D., Sterniša, M., Farčnik, D., Štrumbelj, E., Poljanšek, A., Cebin, N., Pogačnik, L., Možina, S.S. (2021). Waste streams in onion production: Bioactive compounds, quercetin and use of antimicrobial and antioxidative properties. *Waste Manage.*, 126, 476-486.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A.A., Stewart, A.J., Rabiasz, H.S., Jenkins, G.I., Edwards, C.A., Lean, M.E. (2000). Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol. Res.*, 33 (2), 79-88.
- Cushnie, T.T. ve Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 26 (5), 343-356.
- D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256-271.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanita*, 43 (4), 348-361.
- Das, S. ve Rosazza, J.P. (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J. Nat. Prod.*, 69 (3), 499-508.
- David, A.V.A., Arulmoli, R. ve Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10 (20), 84.
- De Carvalho, C.C. (2011). Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.*, 29 (1), 75-83.
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E.R., Dehez, F., Maigret, B., Ghoul, M., Engasser, J.-M. (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1-3), 96-105.
- Denaro, M., Smeriglio, A. ve Trombetta, D. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory activity of citrus flavanones mix and its stability after *in vitro* simulated digestion. *Antioxidants*, 10 (2), 140.
- Deng, Z., Hassan, S., Rafiq, M., Li, H., He, Y., Cai, Y., Kang, X., Liu, Z., Yan, T. (2020). Pharmacological activity of eriodictyol: the major natural polyphenolic flavanone. *Evid-Based Compl. Alt.*, 2020.
- Denny, S., West, P. ve Mathew, T. (2008). Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and β -lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Biomed. Sci.*, 65 (3), 145-147.
- Dhanya, R., Arya, A., Nisha, P., Jayamurthy, P. (2017). Quercetin, a lead compound against type 2 diabetes ameliorates glucose uptake via AMPK pathway in skeletal muscle cell line. *Front Pharmacol.*, 8, 336.
- Dimkić, I., Ristivojević, P., Janakiev, T., Berić, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Stanković, S. (2016). Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. *Ind. Crop. Prod.*, 94, 856-871.
- Dodda, S., Bandlapalli, S. ve Vidyavathi, M. (2012). Biotransformation of hesperidine to hesperitine by *Cunninghamella elegans*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 5 (suppl 2)

- Dong, Y.-s., Wang, J.-l., Feng, D.-y., Qin, H.-z., Wen, H., Yin, Z.-m., Gao, G.-d., Li, C. (2014). Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. *Int. J. Med. Sci.*, 11 (3), 282.
- Du, G., Lin, H., Yang, Y., Zhang, S., Wu, X., Wang, M., Ji, L., Lu, L., Yu, L., Han, G. (2010). Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *Int. Immunopharmacol.*, 10 (7), 819-826.
- Eghtesadi, S., Mohammadi, M., Vafa, M., Heidari, I., Salehi, M., Khadem, H.H., Amiri, F., Alipour, R., Eghtesadi, M. (2016). Effects of hesperidin supplementation on glycemic control, lipid profile and inflammatory factors in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Endocrine Abstracts*. BioScientifica.
- El-Marasy, S.A., Abdallah, H.M., El-Shenawy, S.M., El-Khatib, A.S., El-Shabrawy, O.A., Kenawy, S.A. (2014). Anti-depressant effect of hesperidin in diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharm.*, 92 (11), 945-952.
- Elkhatib, W.F., Khairalla, A.S. ve Ashour, H.M. (2014). Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol.*, 9 (6), 725-735.
- Endale, M., Park, S.-C., Kim, S., Kim, S.-H., Yang, Y., Cho, J.Y., Rhee, M.H. (2013). Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*, 218 (12), 1452-1467.
- Escudero-Lopez, B., Cerrillo, I., Gil-Izquierdo, A., Hornero-Mendez, D., Herrero-Martin, G., Berna, G., Medina, S., Ferreres, F., Martin, F., Fernandez-Pachon, M.S. (2016). Effect of thermal processing on the profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of fermented orange juice. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 67 (7), 779-788.
- Escudero-Lopez, B., Cerrillo, I., Herrero-Martin, G., Hornero-Mendez, D., Gil-Izquierdo, A., Medina, S., Ferreres, F., Berna, G., Martin, F., Fernandez-Pachon, M.S. (2013). Fermented orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents. *J. Agric. Food Chem.*, 61 (37), 8773-8782.
- Faber, K. (2011). Biotransformations in organic chemistry. 423.

- Fastenberg, J.H., Hsueh, W.D., Mustafa, A., Akbar, N.A., Abuzeid, W.M. (2016). Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. *World J. Otorhinolaryngol. Head Neck. Surg.*, 2 (4), 219-229.
- Ferreira, L.R., Macedo, J.A., Ribeiro, M.L., Macedo, G.A. (2013). Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. *Food Res. Int.*, 51 (2), 526-535.
- Flamini, R. (2013). Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. *Int. Sch. Res. Notices*, 2013
- Fletcher, J.N. (2011). Isolation, Identification, and biological evaluation of potential flavor modulatory flavonoids from *Eriodictyon californicum*. The Ohio State University.
- Fu, Z., Chen, Z., Xie, Q., Lei, H., Xiang, S. (2018). Hesperidin protects against IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes. *Exp. Ther. Med.*, 16 (4), 3721-3727.
- Gajardo, G.M. ve Beardmore, J.A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. *Front Physiol.*, 185.
- Gandhi, G.R., Vasconcelos, A.B.S., Wu, D.-T., Li, H.-B., Antony, P.J., Li, H., Geng, F., Gurgel, R.Q., Narain, N., Gan, R.-Y. (2020). Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Nutrients*, 12 (10), 2907.
- Garcia-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P.S., Esteller, A., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J., Gonzalez-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 557 (2-3), 221-229.
- Gardi, C., Bauerova, K., Stringa, B., Kuncirova, V., Slovak, L., Ponist, S., Drafi, F., Bezakova, L., Tedesco, I., Acquaviva, A. (2015). Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 583, 150-157.
- Gong, X., Li, X., Bo, A., Shi, R.Y., Li, Q.Y., Lei, L.J., Zhang, L., Li, M.H. (2020). The Interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional chinese medicines: A review. *Pharmacol. Res.*, 104824.

- Göger, G., Karaca, N., Altınbaşak, B., Demirci, B., Demirci, F. (2020). *In vitro* antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory evaluation of *Eucalyptus globulus* essential oil. *NVEO*, 7 (3), 1-11.
- Guan, C.J., Ji, Y.J., Hu, J.L., Hu, C.N., Yang, F., Yang, G.E. (2017). Biotransformation of Rutin Using Crude Enzyme from *Rhodopseudomonas palustris*. *Curr. Microbiol.*, 74 (4), 431-436.
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., Pelzer, L.E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco.*, 56 (9), 683-687.
- Guazelli, C.F., Fattori, V., Ferraz, C.R., Borghi, S.M., Casagrande, R., Baracat, M.M., Verri Jr, W.A. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. *Chem-Biol. Interact.*, 333, 109315.
- Guo, Y. ve Bruno, R.S. (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J. Nutr. Biochem.*, 26 (3), 201-210.
- Guo, Y. ve Jauregi, P. (2018). Protective effect of β -lactoglobulin against heat induced loss of antioxidant activity of resveratrol. *Food Chem.*, 266, 101-109.
- Gutierrez-Zetina, S.M., Gonzalez-Manzano, S., Perez-Alonso, J.J., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga, C. (2019). Preparation and characterization of protocatechuic acid sulfates. *Molecules*, 24 (2), 307.
- Güran, M., Şanlıtürk, G., Kerküklü, N.R., Altundağ, E.M., Yalçın, A.S. (2019). Combined effects of quercetin and curcumin on anti-inflammatory and antimicrobial parameters *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 859, 172486.
- Haddad, A.Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S.J., Fleshner, N.E., Klotz, L.H. (2006). Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 9 (1), 68-76.
- Haidari, F., Heybar, H., Jalali, M., Ahmadi Engali, K., Helli, B., Shirbeigi, E. (2015). Hesperidin supplementation modulates inflammatory responses following myocardial infarction. *J. Am. Coll. Nutr.*, 34 (3), 205-211.
- Haleagrahara, N., Siew, C.J. ve Ponnusamy, K. (2013). Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *J. Toxicol. Sci.*, 38 (1), 25-33.

- Hameed, A.S.S., Rawat, P.S., Meng, X., Liu, W. (2020). Biotransformation of dietary phytoestrogens by gut microbes: A review on bidirectional interaction between phytoestrogen metabolism and gut microbiota. *Biotechnol. Adv.*, 107576.
- Han, S.-S., Lee, C.-K. ve Kim, Y.-S. (1992). Antimicrobial effects of naringenin alone and in combination with related flavonoids. *Yakhak Hoeji*, 36 (5), 407-411.
- Hanedan, B., Ozkaraca, M., Kirbas, A., Kandemir, F.M., Aktas, M.S., Kılıç, K., Comakli, S., Kucukler, S., Bilgili, A. (2018). Investigation of the effects of hesperidin and chrysin on renal injury induced by colistin in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 108, 1607-1616.
- Hao, Y., Wei, Z., Wang, Z., Li, G., Yao, Y., Dun, B. (2021). Biotransformation of flavonoids improves antimicrobial and anti-breast cancer activities *in vitro*. *Foods*, 10 (10), 2367.
- Harikumar, K.B. ve Aggarwal, B.B. (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7 (8), 1020-1035.
- Hasbal, G., Yilmaz-Ozden, T. ve Can, A. (2015). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Sorbus torminalis* (L.) crantz (wild service tree) fruits. *J. Food Drug Anal.*, 23 (1), 57-62.
- Heinz, S.A., Henson, D.A., Nieman, D.C., Austin, M.D., Jin, F. (2010). A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. *Brit. J. Nutr.*, 104 (6), 849-857.
- Heo, S.-D., Kim, J., Choi, Y., Ekanayake, P., Ahn, M., Shin, T. (2020). Hesperidin improves motor disability in rat spinal cord injury through anti-inflammatory and antioxidant mechanism via Nrf-2/HO-1 pathway. *Neurosci. Lett.*, 715, 134619.
- Homayouni, F., Haidari, F., Hedayati, M., Zakerkish, M., Ahmadi, K. (2018). Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. *Phytother. Res.*, 32 (6), 1073-1079.
- Hong, Y. ve An, Z. (2018). Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF- κ B signaling. *Arch. Pharm. Res.*, 41 (6), 655-663.
- Hou, D.-D., Zhang, W., Gao, Y.-L., Sun, Y.-z., Wang, H.-X., Qi, R.-Q., Chen, H.-D., Gao, X.-H. (2019). Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis. *Int. Immunopharmacol.*, 74, 105676.

- Hu, D.-D., Han, Q.-B., Zhong, L.L.-D., Li, Y.-H., Lin, C.-Y., Ho, H.-M., Zhang, M., Lin, S.-H., Zhao, L., Huang, T. (2015). Simultaneous determination of ten compounds in rat plasma by UPLC-MS/MS: application in the pharmacokinetic study of Ma-Zi-Ren-Wan. *J. Chromatogr. B*, 1000, 136-146.
- Hu, K., Zhao, H., Kang, X., Ge, X., Zheng, M., Hu, Z., Tao, Y. (2022). Fruity aroma modifications in Merlot wines during simultaneous alcoholic and malolactic fermentations through mixed culture of *S. cerevisiae*, *P. fermentans*, and *L. brevis*. *LWT*, 154, 112711.
- Huang, R.-Y., Yu, Y.-L., Cheng, W.-C., OuYang, C.-N., Fu, E., Chu, C.-L. (2010). Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *J. Immun.*, 184 (12), 6815-6821.
- Ignat, I., Volf, I. ve Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 126 (4), 1821-1835.
- Ihara, N., Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S. (2005). Enzymatic synthesis of a catechin conjugate of polyhedral oligomeric silsesquioxane and evaluation of its antioxidant activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66 (4), 430-433.
- Iranshahi, M., Rezaee, R., Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F. (2015). Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci.*, 137, 125-132.
- Islam, A., Islam, M.S., Rahman, M.K., Uddin, M.N., Akanda, M.R. (2020). The pharmacological and biological roles of eriodictyol. *Arch. Pharm. Res.*, 43 (6), 582-592.
- Isnaini, I., Yasmina, A. ve Nur'amin, H.W. (2019). Antioxidant and cytotoxicity activities of Karamunting (*Melastoma malabathricum* L.) fruit ethanolic extract and quercetin. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 20 (2), 639.
- Jacobsson, E., Peigneur, S., Andersson, H.S., Laborde, Q., Strand, M., Tytgat, J., Goransson, U. (2021). Functional characterization of the nemertide α family of peptide toxins. *J. Nat. Prod.*, 84 (8), 2121-2128.
- Jadeja, Y.S., Kapadiya, K.M., Jebaliya, H.J., Shah, A.K., Khunt, R.C. (2017). Dihedral angle study in hesperidin using NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, 55 (6), 589-594.
- Jan, A.T., Kamli, M.R., Murtaza, I., Singh, J.B., Ali, A., Haq, Q. (2010). Dietary flavonoid quercetin and associated health benefits—an overview. *Food Rev. Int.*, 26 (3), 302-317.

- Javadi, F., Ahmadzadeh, A., Egtesadi, S., Aryaeian, N., Zabihyeganeh, M., Rahimi Foroushani, A., Jazayeri, S. (2017). The effect of quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized controlled trial. *J. Am. Coll. Nutr.*, 36 (1), 9-15.
- Jembrek, M.J., Gašparović, A.Č., Vuković, L., Vlainić, J., Žarković, N., Oršolić, N. (2012). Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 385 (12), 1185-1197.
- Jugran, A.K., Rawat, S., Devkota, H.P., Bhatt, I.D., Rawal, R.S. (2021). Diabetes and plant-derived natural products: From ethnopharmacological approaches to their potential for modern drug discovery and development. *Phytother. Res.*, 35 (1), 223-245.
- Jung, J.-H., Kang, J.-I., Kim, H.-S. (2012). Effect of quercetin on impaired immune function in mice exposed to irradiation. *Nutr. Res. Pract.*, 6 (4), 301.
- Justesen, U. (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. Chromatogr. A*, 902 (2), 369-379.
- Kakkar, S. ve Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *Int. Sch. Res. Notices*, 2014, 1-9.
- Kandakumar, S. ve Manju, D. (2017). Pharmacological applications of isorhamnetin: A short review. *Int. J. Trend Sci. Res. Dev.*, 1, 672-678.
- Kang, J., Price, W.E., Ashton, J., Tapsell, L.C., Johnson, S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chem.*, 211, 215-226.
- Karim, N., Shishir, M.R.I., Gowd, V., Chen, W. (2021). Hesperidin-an emerging bioactive compound against metabolic diseases and its potential biosynthesis pathway in microorganism. *Food Rev. Int.*, 1-23.
- Kasai, F., Ishihara, K., Shimoda, K., Nakajima, N., Hamada, H. (2007). Biotransformation of taxifolin and quercetin by plant cultured cells of *Eucalyptus perfiniana*. *J. Mol. Catal. B-Enzym*, 48 (3-4), 116-116.
- Kempuraj, D., Madhappan, B., Christodoulou, S., Boucher, W., Cao, J., Papadopoulou, N., Cetrulo, C.L., Theoharides, T.C. (2005). Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 145 (7), 934-944.

- Khabib, M.N.H., Sivasanku, Y., Lee, H.B., Kumar, S., Kue, C.S. (2022). Alternative animal models in predictive toxicology. *Toxicology*, 465, 153053.
- Khairallah, J., Sadeghi Ekbatan, S., Sabally, K., Iskandar, M.M., Hussain, R., Nassar, A., Sleno, L., Rodes, L., Prakash, S., Donnelly, D.J., Kubow, S. (2018). Microbial biotransformation of a polyphenol-rich potato extract affects antioxidant capacity in a simulated gastrointestinal model. *Antioxidants (Basel)*, 7 (3)
- Kılıç, K., Sakat, M.S., Yıldırım, S., Kandemir, F.M., Gozeler, M.S., Dortbudak, M.B., Kucukler, S. (2019). The amendatory effect of hesperidin and thymol in allergic rhinitis: An ovalbumin-induced rat model. *Eur. Arch. Oto-Rhino-L.*, 276 (2), 407-415.
- Kim, D.-H., Yu, K.-U., Bae, E.-A., Han, M.J. (1998). Metabolism of puerarin and daidzin by human intestinal bacteria and their relation to *in vitro* cytotoxicity. *Biol. Pharm. Bull.*, 21 (6), 628-630.
- Kim, U.Y., Han, S.B., Kwon, O.S., Yoo, H.H. (2011). Identification of phase I and phase II metabolites of hesperetin in rat liver microsomes by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom. Lett.*, 2(1), 20-23.
- Kobori, M., Takahashi, Y., Sakurai, M., Akimoto, Y., Tsushida, T., Oike, H., Ippoushi, K. (2016). Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 60 (2), 300-312.
- Koopman, F., Beekwilder, J., Crimi, B., van Houwelingen, A., Hall, R.D., Bosch, D., van Maris, A.J., Pronk, J.T., Daran, J.-M. (2012). De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.*, 11 (1), 1-15.
- Kostrzewa-Susłow, E., Dmochowska-Gładysz, J., Białońska, A., Ciunik, Z. (2008). Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 52, 34-39.
- Kostrzewa-Susłow, E. ve Janeczko, T. (2021). Microbial transformations of 5-hydroxy-and 5-methoxyflavone in *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures. *J. Microbiol., Biotechnol. Food Sci.*, 2021, 448-452.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 4 (5), 1394-1399.

- Kutil, Z., Kvasnicova, M., Temml, V., Schuster, D., Marsik, P., Cusimamani, E.F., Lou, J.-D., Vanek, T., Landa, P. (2015). Effect of dietary stilbenes on 5-lipoxygenase and cyclooxygenases activities in vitro. *Int. J. Food Prop.*, 18 (7), 1471-1477.
- Kuzu, M., Kandemir, F.M., Yıldırım, S., Çağlayan, C., Küçükler, S. (2021). Attenuation of sodium arsenite-induced cardiotoxicity and neurotoxicity with the antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects of hesperidin. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 28 (9), 10818-10831.
- Kwon, E.-Y. ve Choi, M.-S. (2019). Dietary eriodictyol alleviates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obese mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (5), 1227.
- Lan, X., Wang, W., Li, Q., Wang, J. (2016). The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications. *Mol. Neurobiol.*, 53 (3), 1794-1801.
- Larson, A.J., Symons, J.D. ve Jalili, T. (2012). Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv. Nutr.*, 3 (1), 39-46.
- Lather, A., Sharma, S. ve Khatkar, A. (2020). Naringenin derivatives as glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors: synthesis, antioxidants, antimicrobial, preservative efficacy, molecular docking and in silico ADMET analysis. *BMC Chemistry*, 14 (1), 1-15.
- Lee, J.H. ve Kim, G.H. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J. Food Sci.*, 75 (7), H212-H217.
- Lee, K.M., Hwang, M.K., Lee, D.E., Lee, K.W., Lee, H.J. (2010). Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (9), 5815-5820.
- Leelavinothan, P. ve Kalist, S. (2011). Beneficial effect of hesperetin on cadmium induced oxidative stress in rats: An *in vivo* and *in vitro* study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 15 (9), 992-1002.
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Foods*, 40, 68-75.
- Ley, J.P., Krammer, G., Reinders, G., Gatfield, I.L., Bertram, H.-J. (2005). Evaluation of bitter masking flavanones from Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H. & A.) Torr., Hydrophyllaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 53 (15), 6061-6066.

- Li, C. ve Schluesener, H. (2017). Health-promoting effects of the *Citrus* flavanone hesperidin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57 (3), 613-631.
- Li, S., Qin, Q., Luo, D., Pan, W., Wei, Y., Xu, Y., Zhu, J., Shang, L. (2020). Hesperidin ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via activation of the Akt pathway. *Mol. Med. Rep.*, 22 (6), 4519-4530.
- Li, Y.-S., Zhang, J., Tian, G.-H., Shang, H.-C., Tang, H.-B. (2021). Kirenol, darutoside and hesperidin contribute to the anti-inflammatory and analgesic activities of *Siegesbeckia pubescens makino* by inhibiting COX-2 expression and inflammatory cell infiltration. *J. Ethnopharmacol.*, 268, 113547.
- Liu, H., Zhang, L. ve Lu, S. (2012). Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, 17 (4), 4281-4291.
- Liu, L.-J., Hu, X.-H., Guo, L.-N., Wang, R.-F., Zhao, Q.-T. (2018). Anti-inflammatory effect of the compounds from the flowers of *Trollius chinensis*. *Pak. J. Pharm. Sci*, 31 (5), 1951-1957.
- Liu, W., Shiue, Y.-L., Lin, Y.-R., Lin, H.Y.-H., Liang, S.-S. (2015). A Derivative method with free radical oxidation to predict resveratrol metabolites by tandem mass spectrometry. *Curr. Anal. Chem.*, 11 (4), 300-306.
- Liu, X., Li, M. ve Feng, X. (2019). The citrus flavonoids hesperidin and naringin alleviate alcohol-induced behavioural alterations and developmental defects in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.*, 73, 22-30.
- Lopes, L.A.A., dos Santos Rodrigues, J.B., Magnani, M., de Souza, E.L., de Siqueira-Júnior, J.P. (2017). Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microb. Pathogenesis*, 107, 193-197.
- Lorzadeh, E., Ramezani-Jolfaie, N., Mohammadi, M., Khoshbakht, Y., Salehi-Abargouei, A. (2019). The effect of hesperidin supplementation on inflammatory markers in human adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Chem-Biol. Interact.*, 307, 8-15.
- Ma, B., Zeng, J., Shao, L. ve Zhan, J. (2013). Efficient bioconversion of quercetin into a novel glycoside by *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. *J. Biosci. Bioeng.*, 115 (1), 24-26.
- Maalik, A., Khan, F.A., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., Karim, S., Altaf, Y., Tariq, I. (2014). Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 13 (9), 1561-1566.

- Maciej, J., Schäff, C., Kanitz, E., Tuchscherer, A., Bruckmaier, R., Wolfram, S., Hammon, H. (2016). Effects of oral flavonoid supplementation on the metabolic and antioxidative status of newborn dairy calves. *J. Dairy Sci.*, 99 (1), 805-811.
- Madeira, J.V., Jr. ve Macedo, G.A. (2015). Simultaneous extraction and biotransformation process to obtain high bioactivity phenolic compounds from Brazilian citrus residues. *Biotechnol. Prog.*, 31 (5), 1273-1279.
- Madeira, J.V., Nakajima, V.M., Macedo, J.A., Macedo, G.A. (2014). Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian *Citrus* residues. *Chem. Eng. Res. Des.*, 92 (10), 1802-1810.
- Madhavi, V. ve Lele, S. (2009). Laccase: properties and applications. *Bioresources*, 4 (4), 1694-1717.
- Mamani-Matsuda, M., Kauss, T., Al-Kharrat, A., Rambert, J., Fawaz, F., Thiolat, D., Moynet, D., Coves, S., Malvy, D., Mossalayi, M.D. (2006). Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem. Pharmacol.*, 72 (10), 1304-1310.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Kirby, A.R., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Waldron, K.W., Faulds, C.B. (2006). Enzymatic hydrolysis of flavonoids and pectic oligosaccharides from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (21), 8307-8313.
- Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R.M., Carnero-Varo, M., Fernandez-Crehuet, J. (2009). Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biot.*, 82 (4), 773-783.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Diaz-Sanchez, A.G., Rosa, L.A., Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, A.E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *In vitro* non-covalent interactions. *Molecules*, 22 (4), 669.
- Mateus, P.G., Wolf, V.G., Borges, M.S., Ximenes, V.F. (2018). Quercetin: prooxidant effect and apoptosis in cancer, *Studies in natural products chemistry* içinde (s. 265-288). Elsevier.
- Melaku, Y., Worku, T., Tadesse, Y., Mekonnen, Y., Schmidt, J., Arnold, N., Dagne, E. (2017). Antiplasmodial compounds from leaves of *Dodonaea angustifolia*. *Curr. Bioact. Compd.*, 13 (3), 268-273.

- Men, W., Chen, Y., Li, Y., Yang, Q., Weng, X., Gong, Z. (2015). Research progress of biotransformation on effective ingredients of Chinese medicine via intestinal bacteria. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*, 21 (2), 229-234.
- Mendoza-Meza, D.L. ve España-Puccini, P. (2016). Cytotoxic and genotoxic activity of phenolic fractions from *Ulomoides dermestoides* Fairmaire, 1893 (Coleoptera, Tenebrionidae), in HaCat cells. *TIP*, 19 (2), 83-91.
- Meng, C., Guo, Z., Li, D., Li, H., He, J., Wen, D., Luo, B. (2018). Preventive effect of hesperidin modulates inflammatory responses and antioxidant status following acute myocardial infarction through the expression of PPAR- γ and Bcl-2 in model mice. *Mol. Med. Rep.*, 17 (1), 1261-1268.
- Milenković, M., Arsenović-Ranin, N., Stojić-Vukanić, Z., Bufan, B., Vučićević, D., Jančić, I. (2010). Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 13 (3), 311-319.
- Min, Y.-D., Choi, C.-H., Bark, H., Son, H.-Y., Park, H.-H., Lee, S., Park, J.-W., Park, E.-K., Shin, H.-I., Kim, S.-H. (2007). Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm. Res.*, 56 (5), 210-215.
- Minig, M., Mazzaferro, L.S., Erra-Balsells, R., Petroselli, G., Breccia, J.D. (2011). alpha-Rhamnosyl-beta-glucosidase-catalyzed reactions for analysis and biotransformations of plant-based foods. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (20), 11238-11243.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Front. Microbiol.*, 7, 592.
- Mizuno, M., Yamashita, S. ve Hashimoto, T. (2017). Enhancement of anti-inflammatory and anti-allergic activities with combination of luteolin and quercetin in *in vitro* co-culture system. *Food Sci. Technol. Res.*, 23 (6), 811-818.
- Mkhize, N.V.P., Qulu, L. ve Mabandla, M.V. (2017). The effect of quercetin on pro-and anti-inflammatory cytokines in a prenatally stressed rat model of febrile seizures. *J. Exp. Neurosci.*, 11, 1179069517704668.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., Morikawa, S. (2003). Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.*, 74 (6), 709-721.
- Murota, K. ve Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 417 (1), 12-17.

- Mutafova, B., Mutafov, S., Fernandes, P., Berkov, S. (2016). Microbial transformations of plant origin compounds as a step in preparation of highly valuable pharmaceuticals. *J. Drug Metab. Toxicol.*, 7 (2), 1000204.
- Nachammai, V., Jeyabalan, S. ve Muthusamy, S. (2021). Anxiolytic effects of silibinin and naringenin on zebrafish model: A preclinical study. *Indian J Pharmacol*, 53 (6), 457.
- Naczk, M. ve Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (5), 1523-1542.
- Nakajima, V.M., Madeira Jr, J.V., Macedo, G.A., Macedo, J.A. (2016). Biotransformation effects on anti lipogenic activity of *Citrus* extracts. *Food Chem.*, 197, 1046-1053.
- Nakajima, V.M., Moala, T., Caria, C., Moura, C.S., Amaya-Farfan, J., Gambero, A., Macedo, G.A., Macedo, J.A. (2017). Biotransformed citrus extract as a source of anti-inflammatory polyphenols: Effects in macrophages and adipocytes. *Food Res. Int.*, 97, 37-44.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Maxwell, K.R., Williams, A.S., McAnulty, S.R., Jin, F., Shanely, R.A., Lines, T.C. (2009). Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 41 (7), 1467-1475.
- Nikolic, D. ve van Breemen, R.B. (2004). New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 32 (4), 387-397.
- Nizamutdinova, I.T., Jeong, J.J., Xu, G.H., Lee, S.-H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Chang, K.C., Kim, H.J. (2008). Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int. Immunopharmacol.*, 8 (5), 670-678.
- Noguchi, A., Inohara-Ochiai, M., Ishibashi, N., Fukami, H., Nakayama, T., Nakao, M. (2008). A novel glucosylation enzyme: molecular cloning, expression, and characterization of *Trichoderma viride* JCM22452 α -amylase and enzymatic synthesis of some flavonoid monoglucosides and oligoglucosides. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (24), 12016-12024.
- Novozymes (2021): Proteases for biocatalysis for smarter chemical synthesis.
- Oktyabrsky, O.N., Bezmaternykh, K.V., Smirnova, G.V., Tyulenev, A.V. (2020). Effect of resveratrol and quercetin on the susceptibility of *Escherichia coli* to antibiotics. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (11), 1-14.

- Oliveira, T.T., Campos, K.M., Cerqueira-Lima, A.T., Carneiro, T.C.B., da Silva Velozo, E., Melo, I.C.A.R., Figueiredo, E.A., de Jesus Oliveira, E., de Vasconcelos, D.F.S.A., Pontes-de-Carvalho, L.C. (2015). Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *DARU J. Pharm. Sci.*, 23 (1), 1-12.
- Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M., Kuzuyama, T. (2009). NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot.*, 62 (7), 385-392.
- Özşen, Ö. (2017): Abiyetik asit, betulin, hidroksi diizoforon ve oleik asitin biyotransformasyon tepkimeleri ve metabolitlerin *in vitro* biyolojik aktiviteleri. Doctoral degree, Eskişehir Osmangazi University.
- Pal, A. ve Tripathi, A. (2020). Demonstration of bactericidal and synergistic activity of quercetin with meropenem among pathogenic carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathogenesis*, 143, 104120.
- Pannu, N. ve Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.*, 109, 2237-2251.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the *Citrus* flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother. Res.*, 29 (3), 323-331.
- Park, H.-H., Lee, S., Son, H.-Y., Park, S.-B., Kim, M.-S., Choi, E.-J., Singh, T.S., Ha, J.-H., Lee, M.-G., Kim, J.-E. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.*, 31 (10), 1303-1311.
- Park, H.-j., Lee, C.-M., Jung, I.D., Lee, J.S., Jeong, Y.-i., Chang, J.H., Chun, S.-H., Kim, M.-J., Choi, I.-W., Ahn, S.-C. (2009). Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int. Immunopharmacol.*, 9 (3), 261-267.
- Parra, A., Rivas, F., Garcia-Granados, A. ve Martinez, A. (2009). Microbial transformation of triterpenoids. *Mini-Rev. Org. Chem.*, 6 (4), 307-320.
- Patel, R.N. (2018). Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorg. Med. Chem.*, 26 (7), 1252-1274.

- Perche, O., Vergnaud-Gauduchon, J., Morand, C., Dubray, C., Mazur, A., Vasson, M.-P. (2014). Orange juice and its major polyphenol hesperidin consumption do not induce immunomodulation in healthy well-nourished humans. *Clin. Nutr.*, 33 (1), 130-135.
- Pereira-Caro, G., Fernandez-Quiros, B., Ludwig, I.A., Pradas, I., Crozier, A., Moreno-Rojas, J.M. (2018). Catabolism of *Citrus* flavanones by the probiotics *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Eur. J. Nutr.*, 57 (1), 231-242.
- Pérez-Torrado, R. ve Querol, A. (2016). Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A potential risk sold in food products. *Front Microbiol.*, 6, 1522.
- Pfeuffer, M., Auinger, A., Bley, U., Kraus-Stojanowic, I., Laue, C., Winkler, P., Rufer, C.E., Frank, J., Bosch-Saadatmandi, C., Rimbach, G., Schrezenmeir, J. (2013). Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammation in men with different APOE isoforms. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 23 (5), 403-409.
- Pinelo, M., Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M., Nicoli, M. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from byproducts. *Food Chem.*, 92 (1), 109-117.
- Pinto, M.d.C. ve Macias, P. (2005). Oxidation of dietary polyphenolics by hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (23), 9225-9230.
- Piñuel, L., Breccia, J.D., Guisán, J.M., López-Gallego, F. (2013). Production of hesperetin using a covalently multipoint immobilized diglycosidase from *Acremonium* sp. DSM24697. *J. Mol. Microb. Biotech.*, 23 (6), 410-417.
- Pollard, D.J. ve Woodley, J.M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.*, 25 (2), 66-73.
- Popa, V.I., Dumitru, M., Volf, I., Anghel, N. (2008). Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Ind. Crop. Prod.*, 27 (2), 144-149.
- Puranik, N.V. ve Srivastava, P. (2017). First synthesis of rugosaflavonoid and its derivatives and their activity against breast cancer. *Rsc. Adv.*, 7 (52), 33052-33060.
- Qureshi, A.A., Khan, D.A., Mahjabeen, W., Papasian, C.J., Qureshi, N. (2012). Suppression of nitric oxide production and cardiovascular risk factors in healthy seniors and hypercholesterolemic subjects by a combination of polyphenols and vitamins. *Exp. Clin. Cardiol.*, 008.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., Subburam, V. (2000). Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (2), 268-273.

- Rangel-Huerta, O.D., Aguilera, C.M., Martin, M.V., Soto, M.J., Rico, M.C., Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., Perez-de-la-Cruz, A.J., Gil, A., Mesa, M.D. (2015). Normal or high polyphenol concentration in orange juice affects antioxidant activity, blood pressure, and body weight in obese or overweight adults. *J. Nutr.*, 145 (8), 1808-1816.
- Rao, J.R., Sharma, N.D., Hamilton, J.T., Boyd, D.R., Cooper, J.E. (1991). Biotransformation of the pentahydroxy flavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* Strains (Lotus). *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (5), 1563-1565.
- Rao, K.V. ve Weisner, N.T. (1981). Microbial transformation of quercetin by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 (3), 450-452.
- Rasul, A., Millimouno, F.M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., Li, X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed. Res. Int.*, 2013
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Rezvan, N., Moini, A., Janani, L., Mohammad, K., Saedisomeolia, A., Nourbakhsh, M., Gorgani-Firuzjaee, S., Mazaherioun, M., Hosseinzadeh-Attar, M.J. (2017). Effects of quercetin on adiponectin-mediated insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized placebo-controlled double-blind clinical trial. *Horm. Metab. Res.*, 49 (2), 115-121.
- Riobo Servan, P. (2013). Obesity and diabetes. *Nutr Hosp*, 28 Suppl 5, 138-143.
- Rizza, S., Muniyappa, R., Iantorno, M., Kim, J.-a., Chen, H., Pullikotil, P., Senese, N., Tesauro, M., Lauro, D., Cardillo, C. (2011). *Citrus* polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocr.*, 96 (5), E782-E792.
- Rogério, A., Kanashiro, A., Fontanari, C., Da Silva, E., Lucisano-Valim, Y., Soares, E., Faccioli, L. (2007). Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm. Res.*, 56 (10), 402-408.
- Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2014). Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—A mini-review. *Life Sci.*, 113 (1-2), 1-6.

- Saiprasad, G., Chitra, P., Manikandan, R., Sudhandiran, G. (2013). Hesperidin alleviates oxidative stress and downregulates the expressions of proliferative and inflammatory markers in azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis in mice. *Inflamm. Res.*, 62 (4), 425-440.
- Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., Mori, H. (2003). Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett.*, 199 (2), 139-145.
- Salden, B.N., Troost, F.J., de Groot, E., Stevens, Y.R., Garcés-Rimón, M., Possemiers, S., Winkens, B., Masclee, A.A. (2016). Randomized clinical trial on the efficacy of hesperidin 2S on validated cardiovascular biomarkers in healthy overweight individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104 (6), 1523-1533.
- Salehi, B., Cruz-Martins, N., Butnariu, M., Sarac, I., Bagiu, I.-C., Ezzat, S.M., Wang, J., Koay, A., Sheridan, H., Adetunji, C.O. (2021). Hesperetin's health potential: moving from preclinical to clinical evidence and bioavailability issues, to upcoming strategies to overcome current limitations. *Crit. Rev. Food Sci.*, 1-16.
- Salehi, B., Fokou, P.V.T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, 12 (1), 11.
- Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N.A., Ahmad, S.A., Shukor, M.Y. (2014). Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 480258.
- Sang, H., Yuan, N., Yao, S., Li, F., Wang, J., Fang, Y., Qin, S. (2012). Inhibitory effect of the combination therapy of simvastatin and pinocembrin on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Lipids Health Dis.*, 11 (1), 1-9.
- Santangelo, R., Silvestrini, A. ve Mancuso, C. (2019). Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food Chem. Toxicol.*, 123, 42-49.
- Schrewe, M., Julsing, M.K., Buhler, B., Schmid, A. (2013). Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chem. Soc. Rev.*, 42 (15), 6346-6377.
- Schültke, E., Kamencic, H., Skihar, V., Griebel, R., Juurlink, B. (2010). Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: Correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord.*, 48 (2), 112-117.

- Selma, M.V., Beltran, D., Luna, M.C., Romo-Vaquero, M., Garcia-Villalba, R., Mira, A., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. (2017). Isolation of human intestinal bacteria capable of producing the bioactive metabolite isourolithin a from ellagic acid. *Front Microbiol.*, 8, 1521.
- Seo, J., Kang, S.I., Kim, M., Han, J., Hur, H.G. (2011). Flavonoids biotransformation by bacterial non-heme dioxygenases, biphenyl and naphthalene dioxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 91 (2), 219-228.
- Sharma, A., Sharma, P., Tuli, H.S., Sharma, A.K. (2018). Phytochemical and pharmacological properties of flavonols. *eLS*, 1-12.
- Sharma, P., Kumar, V. ve Guleria, P. (2019). Naringin: Biosynthesis and pharmaceutical applications. *Indian J. Pharm. Sci.*, 81 (6), 988-999.
- Shen, J., Gao, P., Su, J., Wang, C.-S., Sun, Q.-L. (2010). Biotransformation of hesperidin to hesperetin by microorganisms. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 1, 035.
- Shen, X., Liu, Y., Luo, X., Yang, Z. (2019). Advances in biosynthesis, pharmacology, and pharmacokinetics of pinocembrin, a promising natural small-molecule drug. *Molecules*, 24 (12), 2323.
- Shi, X., Liao, S., Mi, H., Guo, C., Qi, D., Li, F., Zhang, C., Yang, Z. (2012). Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules*, 17 (11), 12868-12881.
- Shi, Y. ve Williamson, G. (2016). Quercetin lowers plasma uric acid in pre-hyperuricaemic males: a randomised, double-blinded, placebo-controlled, cross-over trial. *Br. J. Nutr.*, 115 (5), 800-806.
- Shimoda, K., Hamada, H. ve Hamada, H. (2008). Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. *Phytochemistry*, 69 (5), 1135-1140.
- Shubina, V.S., Kozina, V.I. ve Shatalin, Y.V. (2021). Comparison of antioxidant properties of a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid and selected flavonoids. *Antioxidants*, 10 (8), 1262.
- Silva, L.A.L.d., Faqueti, L.G., Reginatto, F.H., Santos, A.D.C.d., Barison, A., Biavatti, M.W. (2015). Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25, 375-381.

- Singh, B., Mal, G., Sharma, D., Sharma, R., Antony, C.P., Kalra, R.S. (2020). Gastrointestinal biotransformation of phytochemicals: Towards futuristic dietary therapeutics and functional foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 106, 64-77.
- Smitha, M., Singh, S. ve Singh, R. (2017). Microbial biotransformation: A process for chemical alterations. *J. Bacteriol. Mycol.*, 4 (2), 00085.
- Solano, D.M., Hoyos, P., Hernáiz, M., Alcántara, A., Sánchez-Montero, J. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technol.*, 115, 196-207.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta medica*, 59 (03), 250-252.
- Song, H.-S., Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, T.-R., Kim, H.J., Park, Y.-L., Han, Y.-H., Park, J.Y., Lee, S.M., Park, S.L. (2020). Naringenin as an antibacterial reagent controlling of biofilm formation and fatty acid metabolism in MRSA. *bioRxiv*, 1-27.
- Sordon, S., Madej, A., Poplonski, J., Bartmanska, A., Tronina, T., Brzezowska, E., Juszczak, P., Huszcza, E. (2016). Regioselective ortho-hydroxylations of flavonoids by yeast. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (27), 5525-5530.
- Stanojević, D., Čomić, L., Stefanović, O., Solujić-Sukdolak, S. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Arch. Biol. Sci.*, 62 (1), 167-174.
- Straathof, A.J., Panke, S. ve Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13 (6), 548-556.
- Tacias-Pascacio, V.G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 165, 2143-2196.
- Tajaldini, M. ve Asadi, J. (2020). The use of bio-active compounds of *Citrus* fruits as chemopreventive agents and inhibitor of cancer cells viability. *Anti-Cancer Agent Me.*, 11, 1058-1068.
- Tejada, S., Pinya, S., Martorell, M., Capó, X., Tur, J.A., Pons, A., Sureda, A. (2018). Potential anti-inflammatory effects of hesperidin from the genus *Citrus*. *Curr. Med. Chem.*, 25 (37), 4929-4945.
- Telefoncu, A. ve Pazarlıoğlu, N. (2010). Biyoteknoloji: Temel prensipler ve uygulamalar. 605.

- Thapa, S.B., Pandey, R.P., Park, Y.I., Sohng, J.K. (2019). Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. *Molecules*, 24 (14), 2571.
- Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *S. Afr. J. Bot.*, 137, 257-264.
- Torella, M., Del Deo, F., Grimaldi, A., Iervolino, S., Pezzella, M., Tamaro, C., Gallo, P., Rappa, C., De Franciscis, P., Colacurci, N. (2016). Efficacy of an orally administered combination of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, curcumin and quercetin for the prevention of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Eur. J. Obstet. Gyn. R. B.*, 207, 125-128.
- Türk, E., Kandemir, F.M., Yildirim, S., Caglayan, C., Kucukler, S., Kuzu, M. (2019). Protective effect of hesperidin on sodium arsenite-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 189 (1), 95-108.
- Türkoglu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K., Turkoglu, H. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 (11), 1146-1150.
- Vabeiryureilai, M., Lalrinzuali, K. ve Jagetia, G.C. (2021). NF- κ B and COX-2 repression by topical application of hesperidin and naringin hydrogels augments repair and regeneration of deep dermal excision wound in mice. *Burns*, 132-145.
- Vakhlu, J. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron. J. Biotechnol.*, 9 (1), 0-0.
- Vestergaard, M. ve Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 53 (6), 716-723.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P., Pillai, S., Patil, B. (2010). Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by *Citrus* flavonoids. *J. Appl. Microbiol.*, 109 (2), 515-527.
- Vlase, L., Kiss, B., Leucuta, S. E., Gocan, S. (2009). A rapid method for determination of resveratrol in wines by HPLC-MS. *J. Liq. Chromatogr. Relat.*, 32(14), 2105-2121.
- Viskupičová, J., Šturdík, E. ve Ondrejovič, M. (2009). Enzymatic transformation of flavonoids. *Acta Chim. Slovaca*, 2 (1), 88-106.
- Wang, A., Zhang, F., Huang, L., Yin, X., Li, H., Wang, Q., Zeng, Z., Xie, T. (2010). New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *J. Med. Plants Res.*, 4 (10), 847-856.

- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Tech.*, 56, 21-38.
- Wang, Y.-y., Liu, J.-h. ve Yu, B.-y. (2005). Biotransformation of flavonoids by *Streptomyces griseus* ATCC 13273. *Pharm. Biotechnol. Beijing*, 12 (5), 308.
- Watts, K.T., Lee, P.C. ve Schmidt-Dannert, C. (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bmc Biotechnol.*, 6 (1), 1-12.
- Wei, D., Ci, X., Chu, X., Wei, M., Hua, S., Deng, X. (2012). Hesperidin suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model. *Inflammation*, 35 (1), 114-121.
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., Yang, B. (2017). Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 1398 (1), 120-129.
- Weng, Z., Zhang, B., Asadi, S., Sismanopoulos, N., Butcher, A., Fu, X., Katsarou-Katsari, A., Antoniou, C., Theoharides, T.C. (2012). Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *Plos One*, 7 (3), e33805.
- Wong, E.S.-W., Li, R.W.-S., Li, J., Li, R., Seto, S.-W., Lee, S.M.-Y., Leung, G.P.-H. (2021). Relaxation effect of narirutin on rat mesenteric arteries via nitric oxide release and activation of voltage-gated potassium channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 905, 174190.
- Wu, J., Zhou, T., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2014a). Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *Plos One*, 9 (7), e101492.
- Wu, X., He, W., Zhang, H., Li, Y., Liu, Z., He, Z. (2014b). Acteoside: a lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. *Food Chem.*, 142, 306-310.
- Xanthakis, E., Theodosiou, E., Magkouta, S., Stamatis, H., Loutrari, H., Roussos, C., Kolisis, F. (2010). Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: structural and functional diversity of the novel derivatives. *Pure Appl. Chem.*, 82 (1), 1-16.
- Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Zhao, J., Wei, X. (2009). Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (15), 6642-6648.
- Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., Deng, W. (2011). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *Plos One*, 6 (8), e22934.

- Xiao, Y.M., Wu, Q., Wu, W.B., Zhang, Q.Y., Lin, X.F. (2005). Controllable regioselective acylation of rutin catalyzed by enzymes in non-aqueous solvents. *Biotechnol. Lett.*, 27 (20), 1591-1595.
- Xie, L., Gu, Z., Liu, H., Jia, B., Wang, Y., Cao, M., Song, R., Zhang, Z., Bian, Y. (2020). The Anti-depressive effects of hesperidin and the relative mechanisms based on the NLRP3 inflammatory signaling pathway. *Front Pharmacol.*, 11, 1251.
- Xu, F., Liu, Y., Zhang, Z., Yang, C., Tian, Y. (2009). Quasi-MSⁿ identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chin. Med-Uk.*, 4 (1), 1-10.
- Xu, J.Q., Fan, N., Yu, B.Y., Wang, Q.Q., Zhang, J. (2017). Biotransformation of quercetin by *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. *Chin. J. Nat. Med.*, 15 (8), 615-624.
- Yamada, H. ve Shimizu, S. (1988). Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds [New Synthetic Methods (69)]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 27 (5), 622-642.
- Yan, Y., Kohli, A. ve Koffas, M.A. (2005). Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.*, 71 (9), 5610-5613.
- Yang, D., Liu, X., Liu, M., Chi, H., Liu, J., Han, H. (2015). Protective effects of quercetin and taraxasterol against H₂O₂-induced human umbilical vein endothelial cell injury *in vitro*. *Exp. Ther. Med.*, 10 (4), 1253-1260.
- Yang, Z.-H., Sun, X., Qi, Y., Mei, C., Sun, X.-B., Du, G.-H. (2012). Uptake characteristics of pinocembrin and its effect on *p*-glycoprotein at the blood–brain barrier in *in vitro* cell experiments. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 14 (1), 14-21.
- Yeh, C.-C., Kao, S.-J., Lin, C.-C., Wang, S.-D., Liu, C.-J., Kao, S.-T. (2007). The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.*, 80 (20), 1821-1831.
- Yu, H., Haskins, J.S., Su, C., Allum, A., Haskins, A.H., Salinas, V.A., Sunada, S., Inoue, T., Aizawa, Y., Uesaka, M. (2016). *In vitro* screening of radioprotective properties in the novel glucosylated flavonoids. *Int. J. Mol. Med.*, 38 (5), 1525-1530.
- Yuan, Y., Yang, Q.-Y., Tong, Y.-F., Chen, F., Qi, Y., Duan, Y.-B., Wu, S. (2008). Synthesis and enantiomeric resolution of (±)-pinocembrin. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10 (10), 999-1002.
- Yue, J., Yang, H., Liu, S., Song, F., Guo, J., Huang, C. (2018). Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J. Dent.*, 76, 24-31.

- Zafar, S., Ahmed, R. ve Khan, R. (2016). Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis. *Free Radic. Res.*, 50 (9), 939-948.
- Zhang, X., Han, L., Liu, J., Xu, Q., Guo, Y., Zheng, W., Wang, J., Huang, X., Ren, P. (2018). Pharmacokinetic study of 7 compounds following oral administration of *Fructus aurantii* to depressive rats. *Front Pharmacol.*, 9, 131.
- Zhang, Y.-Y., Thakur, K., Wei, C.-K., Wang, H., Zhang, J.-G., Wei, Z.-J. (2019). Evaluation of inhibitory activity of natural plant polyphenols on Soybean lipoxygenase by UFLC-mass spectrometry. *S. Afr. J. Bot.*, 120, 179-185.
- Zhang, Y., Zhang, R. ve Ni, H. (2020). Eriodictyol exerts potent anticancer activity against A549 human lung cancer cell line by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *AMS*, 16 (2), 446.
- Zheng, J., Wu, J., Chen, J., Liu, J., Lu, Y., Huang, C., Hu, G., Wang, X., Zeng, Y. (2016). Therapeutic effects of quercetin on early inflammation in hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis and its mechanism. *Pancreatology*, 16 (2), 200-210.
- Zheng, M., Lu, S. ve Xing, J. (2021). Enhanced antioxidant, anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities of citrus hesperidin by acid-catalyzed hydrolysis. *Food Chem.*, 336, 127539.
- Zhou, Z., Kandhare, A.D., Kandhare, A.A., Bodhankar, S.L. (2019). Hesperidin ameliorates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis via inhibition of TGF-beta1/Smad3/AMPK and IkappaBalpha/NF-kappaB pathways. *Excli J*, 18, 723.
- Zhu, G.F., Guo, H.J., Huang, Y., Wu, C.T., Zhang, X.F. (2015). Eriodictyol, a plant flavonoid, attenuates LPS-induced acute lung injury through its antioxidative and anti-inflammatory activity. *Exp. Ther. Med.*, 10 (6), 2259-2266.
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2014). Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.*, 80 (10), 3072-3080.
- Zi, J., Valiente, J., Zeng, J., Zhan, J. (2011). Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. *J. Biosci. Bioeng.*, 112 (4), 360-362.
- Zupančič, Š., Lavrič, Z. ve Kristl, J. (2015). Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 93, 196-204.