

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***p*-SİNEFRİN ALKALOİDİNİN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU
İLE OLUŞAN YENİ METABOLİTLERİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE
TAYİNİ, İZOLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şükran DEMİR

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU

ŞUBAT 2021

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***p*-SİNEFRİN ALKALOİDİNİN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU
İLE OLUŞAN YENİ METABOLİTLERİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE
TAYİNİ, İZOLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Şükran DEMİR
(185313004)**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU

ŞUBAT 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 18531304 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Şükran DEMİR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı 'p-SİNEFRİN ALKALOİTİNİN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU İLE OLUŞAN YENİ METABOLİTLERİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ, İZOLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ' başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Pelin YÜKSEL MAYDA**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet BOĞA
Dicle Üniversitesi

Teslim Tarihi : 25 Mart 2021
Savunma Tarihi : 10 Şubat 2021

Bu çalışmayı üzerimde çok emekleri olan Aileme ithaf ediyorum.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve vizyonu bana örnek olan kıymetli ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Gerçekleştirmiş olduğum çalışmanın hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmamda laboratuvarının bütün imkanlarını kullanmamı sağlayan, çalışmanın her anında yanımda olan, hoşgörülü, danışman hocam Doç. Dr. Işıl Gazioğlu'na verdiği destekten ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde antidiyabetik aktivite testlerini yapabilmem için deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Belma Zengin Kurt'a teşekkürü borç bilirim.

Antifungal ve antimikrobiyal aktiviteleri çalışmalarındaki destekleri için mikrobiyoloji alanında deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Pelin Yüksel Mayda'ya ve teknik yardımlarından dolayı Arş. Gör. Harika Öykü Dinç'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında önerilerini ve desteklerini esirgemeyen ve beni motive eden Arş. Gör. Gizem Tırıs'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında laboratuvarda sevinçlerimizi ve üzüntülerimizi paylaştığımız, yanımda hep desteklerini hissettiğim laboratuvar çalışma arkadaşlarım Ecz. Ceylin Aslan'a, Ecz. Özge Sultan Zengin'e ve Ecz. Oğuz Erdoğan'a teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca hep yanımda olan, beni motive eden, desteklerini her zaman hissettiğim canım ablam Sabriye Demir'e, canım arkadaşım Sevda Terzi'ye ve canım arkadaşım Rabia Bakır'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi her konuda yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim canım babama, canım abilerime, canım ablalarım ve biricik anneme en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20200307

Şubat 2021

Şükran DEMİR
(Diyetisyen)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Şükran Demir

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Alkaloitler	3
2.2 Diyabet.....	9
2.2.1 Tip 1 diyabet	10
2.2.2 Tip 2 diyabet	10
2.2.3 Gestasyonel diyabet	11
2.3 Mikrobiyota	11
2.4 Mikrobiyota ve Diyabet İlişkisi	12
2.5 Mikrobiyal Biyotransformasyon.....	14
2.6 Alkaloitlerin Biyotransformasyon Çalışmaları.....	15
3. MATERYAL METOD.....	19
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	19
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Materyaller	20
3.3 <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ₄₃₅₆	21
3.4 Agar Besi Yerinin Hazırlanması.....	21
3.5 Sinefrin Metabolitlerinin Ekstraksiyonu.....	21
3.6 Kromatografik Yöntemler	23
3.6.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)	24
3.6.2 Kolon kromatografisi	25
3.6.3 Preparatif ince tabaka kromatografisi	26
3.6.4 Flaş kromatografisi	26
3.6.5 Sıvı kromatografi- kütle spektrometresi (OrbiTrap LC-MS).....	27
3.7 Sinefrin Metabolitlerinin Spektroskopik Yöntemler ile Yapılarının Tayini..	28
3.8 Aktivite Çalışmaları.....	29
3.8.1 Antidiyabetik aktivite tayini	29
3.8.2 Antibakteriyel aktivite tayini	30
3.8.3 Antifungal aktivite tayini	31
3.9 İstatistiksel Değerlendirme	32
4. BULGULAR	33

4.1 SLM-21-30-1 = Oktopamin.....	34
4.2 SLS-39-1 =Tiramin.....	38
4.3 α -Glukozidaz İnhibisyonu Sonuçları.....	42
4.4 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	42
4.5 Antifungal Aktivite Sonuçları.....	43
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ.....	53



KISALTMALAR

AF	: Aurantii Fruktus
AFI	: Aurantii Fruktus Immaturus
AKT	: Protein Kinaz B
APT	: Attached Proton Test
CD₃OD	: Dötorometanol
CRP	: Citri Reticulatae Pericarpium
CYP	: Cytochromes P450
DCM	: Diklorometan
DM	: <i>Diabetes mellitus</i>
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EA	: Etil Asetat
GSK-3	: Glikojen sentaz kinaz-3
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
H6H	: Hiyosiyamin 6β- hidroksilaz
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
LC-HRMS	: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi
UHPLC-MS	: Ultra Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
M⁺	: Moleküler iyon piki
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
Prep İTK	: Preparatif ince tabaka kromatografisi
MS	: Kütle spektroskopisi
RF	: Retansiyon faktörü
RT	: Retention time
TURDEP-II	: Türkiye, Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevelans Çalışması-I
UV	: Ultraviyole

SEMBOLLER

C	: Karbon
cm	: Santimetre
dk.	: Dakika
h	: Hacim
H	: Hidrojen
g	: Gram
mHz	: Megahertz
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
L	: Litre
pH	: Power of Hydrogen
ppm	: Milyonda bir birim
rpm	: Revolutions per Minute

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Amino asitlerin alkaloit sentezine katılım tablosu.....	4
Tablo 3.1 : HPLC için uygulanan çalışma şartları.	27
Tablo 3.2 : MS için uygulanan çalışma şartları.....	28
Tablo 4.1 : OrbiTrap LC-MS analiz sonuçlarına göre fraksiyon içerikleri.....	33
Tablo 4.2 : α -Glukozidaz inhibisyonu hesaplanabilen fraksiyonlar ve genisteinin IC ₅₀ değerleri.	42
Tablo 4.3 : Sinefrin biyotransformasyonu sonucunda elde edilen fraksiyon ve maddelerin <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> mikroorganizmalarına karşı hesaplanan MİK (μ g/mL) değerleri.	42

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Alkaloitlerin azot içirme durumuna göre sınıflandırılmasına örnekler. ..	3
Şekil 2.2	: Bütün alkaloit sınıflarının genel biyosentez şeması.	6
Şekil 2.3	: Sekonder metabolitlerden alkaloitin başlıca biyosentez metabolizması. .	7
Şekil 2.4	: Sinefrin.	8
Şekil 2.5	: Sinefrinin ve bazı alkaloitlerin öncü aminoasitlerinin biyosentez mekanizması.	8
Şekil 2.6	: Hiyosiyamin bileşiğinin H6H enzimi katalizörlüğünde biyotransformasyonu.	15
Şekil 2.7	: Kafeinin <i>Paecilomyces gunnii</i> ile biyotransformasyonu.	16
Şekil 2.8	: 4,5-dimetoksil-kantin-6-one'un biyotransformasyonu.	17
Şekil 2.9	: N-metiltiramin bileşiğinin enzimler katalizörlüğünde biyotransformasyonu.	18
Şekil 3.1	: Bakteri ekimi, sinefrin maddesinin biyotransformasyonu, santrifüj ve ekstraksiyon işlemi.	23
Şekil 3.2	: <i>Escherichia coli</i> için antibakteriyel tayin analizleri.	31
Şekil 3.3	: <i>Staphylococcus aureus</i> için yapılan antibakteriyel tayin analizleri.	31
Şekil 3.4	: <i>Candida albicans</i> mantarı ile antifungal aktivite tayin analizleri.	32
Şekil 4.1	: Oktopamin.	34
Şekil 4.2	: SLM-21-30 fraksiyonundan flaş kromatografi tekniğiyle elde edilen fraksiyonların İTK'sı.	35
Şekil 4.3	: SLM-21-30-1 fraksiyonunun preparatif İTK sonucunu gösteren plak...	35
Şekil 4.4	: SLM-21-30-1 maddesinin LC-HRMS kromatogram sonucu.	36
Şekil 4.5	: SLM-21-30-1 maddesinin pozitif HRMS spektromu.	36
Şekil 4.6	: SLM-21-30-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektromu (CD ₃ OD, 500 MHz).	37
Şekil 4.7	: SLM-21-30-1 bileşiğinin APT spektromu (CD ₃ OD, 125 MHz).	37
Şekil 4.8	: Tiramin.	38
Şekil 4.9	: SLS-39-1 maddesinin İTK analiz sonucu.	39
Şekil 4.10	: SLS-39-1 maddesinin LC-HRMS kromatogram sonucu.	39
Şekil 4.11	: SLS-39-1 maddesinin pozitif HRMS spektromu.	40
Şekil 4.12	: SLS-39-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektromu (CD ₃ OD, 500 MHz).	40
Şekil 4.13	: SLS-39-1 bileşiğinin APT spektromu (CD ₃ OD, 125 MHz).	41
Şekil 4.14	: Sinefrinin biyotransformasyon reaksiyonuyla bulunan metabolitler.	41

***p*-SİNEFRİN ALKALOİTİNİN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU İLE OLUŞAN YENİ METABOLİTLERİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ, İZOLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZET

Mikrobiyota gelişiminde, beslenme, fizyolojik ve hastalık durumu, antibiyotik kullanımı, hijyen koşulları gibi birtakım faktörler rol oynamaktadır. Epidemiyolojik ve metagenomik çalışmaların gözlemleri sonucunda ve farklı deneysel hayvan modellerinden elde edilen verilerle birlikte alerjik hastalıklar, kolorektal kanser, diyabet, obezite gibi yaygın hastalıkların gelişmesini bağırsak mikrobiyotasının değişimi ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir. *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türleri gibi probiyotiklerle 4-12 hafta süren tedaviler, bireylerde vücut yağ kitlesinde ve insülin duyarlılığında olumlu yönde ciddi gelişmeler olduğunu göstermiştir. Çevre dostu olan mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları ile yüksek stereospesifiklik ve regioseçicilik gibi fizikokimyasal özelliklere sahip kimyasal türevler elde etmek mümkündür. Biyotransformasyonda bakteri ile etkin özellik gösterebilecek *Citrus aurantium* var. Amara'da bulunan ve genelde diyet takviyelerinde kullanılan bir alkaloid olan *p*-sinefrin bileşiği kullanılmıştır. Alkaloidlerin biyotransformasyonları ile ilgili çalışmalara bakıldığında çok fazla bilimsel veriye rastlanmamaktadır. 2016 yılında Çin'de yapılmış bir çalışmada, 4,5-dimetoksi-kantin-6-on alkaloid tipli bileşik, *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3,970 mantarı aracılığıyla biyotransformasyona tabi tutulmuş ve 1'i yeni olmak üzere toplam 6 tane bileşik elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *p*-sinefrin alkaloidinin *in vitro* mikrobiyal biyotransformasyonu *Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆ bakteri suşu kullanılarak ilk kez gerçekleştirildi. Biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen bütanol ve sulu faz ekstraktları kromatografik analizlerle ayırma işlemlerine tabi tutuldu. Ardından elde edilen saf maddelerin yapı tayinleri ¹H-NMR, APT ve MS gibi spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıları aydınlatıldı. Böylece sinefrinden yola çıkarak tiramin ve oktopamin maddeleri elde edilmiş oldu. Elde edilen bileşiklerin antidiyabetik aktiviteleri incelendiğinde tiramin (SLS-39-1) bileşiğinin IC₅₀ değeri 484,909 µg/mL, oktopamin (SLM-21-30-1) bileşiğinin IC₅₀ değeri >500 µg/mL ve SLS-1-22 (tiramin, sinefrin) fraksiyonunun IC₅₀ değeri 109,7 µg/mL bulundu. Böylelikle biyotransformasyon sonucunda elde edilen maddelerin α-glukozidaz inhibisyon aktiviteleri araştırılmış oldu. Tiramin (SLS-39-1) en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterdi.

Bu tez çalışması ile, sinefrin alkaloidinin biyotransformasyonu ile, moleküllere yeni biyolojik aktiviteler kazandırılabilmesinin yanı sıra, yeni bileşiklerin oluşmasına, tek bir maddeden yola çıkarak yeni metabolitlerin (HPLC ve OrbiTRAP LC/MS gibi metotlar desteği ile) elde edilmesine ve elde edilen bu metabolitlerin antidiyabetik ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesine olanak sağlandı.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus acidophilus* *p*-sinefrin, biyotransformasyon, alkaloit, izolasyon, oktopamin, tiramin, antidiyabetik aktivite, antifungal aktivite, kromatografi, spektroskopi



THE MICROBIAL BIOTRANSFORMATION OF *p*-SYNEPHRINE AND ISOLATION OF ITS METABOLITES BY USING ANALYTICAL METHODS WITH THEIR ANTIDIABETIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

SUMMARY

A number of factors such as nutrition, physiological and disease status, antibiotic use and hygiene conditions play a role in the development of microbiota. As a result of the observations of epidemiological and metagenomic studies and with the data obtained from different experimental animal models, it has been shown that the development of common diseases such as allergic diseases, colorectal cancer, diabetes, obesity is associated with the change of intestinal microbiota. Treatment with probiotics such as *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* species lasting 4-12 weeks has shown significant improvements in body fat mass and insulin sensitivity in individuals. It is possible to obtain chemical derivatives with physicochemical properties such as high stereospecificity and regioselectivity with environmentally friendly microbial biotransformation reactions. *p*-Synephrine, which is an alkaloid found in *Citrus aurantium* var. Amara, can show effective properties with bacteria in biotransorption and is generally used in dietary supplements. When we look at the studies on the biotransformation of alkaloids, there is not much scientific data. In a study conducted in China in 2016, 4,5-dimethoxy-canthen-6-one alkaloid type compound was biotransformed by *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3,970 mushroom and a total of 6 compounds were obtained, 1 of which was new.

In this thesis, *in vitro* microbial biotransformation of *p*-synephrine was performed for the first time using *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacterial strain. The butanol and aqueous phase extracts obtained and they were subjected to separation processes by chromatographic analysis. Then, the structures of the pure compounds obtained were clarified using spectroscopic methods such as ¹H-NMR, APT and MS. Thus, tyramine and octopamine substances were obtained based on synephrine. Antidiabetic activities of the compounds were investigated and the IC₅₀ value of the tyramine (SLS-39-1) was found to be 484,909 µg/mL, the IC₅₀ value of the octopamine (SLM-21-30-1) was found to be > 500 µg/mL and the IC₅₀ value of SLS-1-22 (tyramine, synephrine) fraction was found to be 109,7 µg/mL. The α-glucosidase inhibition activities of biotransformed compounds were investigated. Tyramine (SLS-39-1) showed the highest antimicrobial activity.

With this thesis, besides the biotransformation of the synephrine, new biological activities can be brought to the molecules, the formation of new compounds, the production of new metabolites based on a single substance (with the support of methods such as HPLC and OrbiTRAP L/MS) and the anti-diabetic properties of these metabolites. Activities were enabled to be evaluated.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* *p*-synephrine, biotransformation, alkaloid, isolation, octopamine, tyramine, antidiabetic activity, antifungal activity, chromatography, spectroscopy

1. GİRİŞ

Hastalıklar yüzyıllar boyunca insanlık için tehlike oluşturmuş ve insanlar hastalıklarla baş etmenin yollarını araştırmışlardır. Hastalıkları tedavi etmek amacıyla başvurulmuş ilk kaynaklar ise insanların kolay şekilde ulaşabilecekleri doğal kaynaklı ürünler olmuştur. Doğal kaynaklı ürünler arasında yer alan bitkilerin alternatif ve tamamlayıcı tıpta tedavi amaçlı kullanıldığını insanlığın varoluşundan bu yana görmek mümkündür.

Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler olan alkaloidler birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. 21,000 bitki türünden 27,000'den fazla farklı yapıdaki alkaloid karakterize edilmiştir. Tıpta alkaloidlerin kullanımı yaygın olup alkaloid türlerinin antidiyabetik, antifungal, antimikrobiyal gibi biyolojik etkileri mevcuttur [1].

Diabetes mellitus (diyabet)'un tedavisinde olumlu etkileri olan alkaloid türleri (berberin, hordenin, efedrin, vb.) mevcuttur [2]. Bu hastalığın tedavisinde sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz ve fiziksel aktivite, ilaç ve insülin gibi tedavi yöntemleri yer almaktadır. Yüzyıllar boyu hastalığının etkisinin azaltılması için ilaç, insülin gibi birçok tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Diyabet hastalığı için geliştirilen bu ilaçların bir kısmı sentetik ilaç olarak tedavide yer almaktadır. Ancak sentetik ilaçlarla tedavi maliyetlidir ve sentetik ilaç kullanımının yan etki gösterme olasılığı yüksektir.

Çalışmalarda, diyabete ve diyabete bağlı komplikasyonlara karşı etkili olan ve doğal olarak oluşan alkaloidler hakkında birçok araştırma yapılmıştır. 2019 yılında 800 kadar tıbbi bitki türünün antidiyabetik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Alkaloidlerin de yer aldığı bitkilerden elde edilen aktif bileşenlerin bazılarının diyabete karşı etkili olduğu raporda bildirilmiştir [2]. Yapılan bir *in vivo* çalışmada, diyabet olan farelere tedavi yöntemi olarak hordenin ve insülin birlikte verilmiştir. Hordenin ve insülinin birlikte verildiği tedavi sonrasında farelerde diyabete bağlı yüksek olan açlık kan şekeri ve tokluk kan şekeri seviyelerinin önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmiştir [3].

Sentetik ilaç üretiminin gerçekleştirilmesi için oldukça ciddi bir bütçe gerekmektedir. İlaç üretimi için bütçe kısıtlamasının yapılabildiği ve daha az kimyasalın kullanıldığı biyotransformasyon yöntemi son zamanlarda tercih edilen bir yöntemdir. Biyotransformasyon belirli bir bileşiğin, mantarlar, bakteriler gibi mikroorganizmaları içeren biyolojik katalizörlerin kullanılmasıyla, yapısal benzerliği olan farklı bir ürüne dönüşümü olarak tanımlanmaktadır [4].

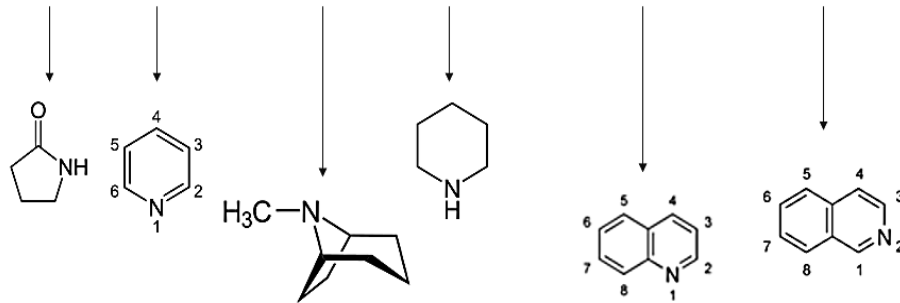
Bu tez çalışmasında sinefrin bileşiğinin biyotransformasyonu, moleküllere yeni biyolojik aktiviteler kazandırılabilmesinin yanı sıra, yeni bileşiklerin oluşmasına, tek bir maddeden yola çıkarak yeni metabolitlerin elde edilmesi ve elde edilen bu metabolitlerin antidiyabetik ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alkaloitler

Alkaloitler bitkiler, hayvanlar, bakteriler ve mantarlar gibi doğal kaynaklardan elde edilen ve doğal yollarla oluşan sekonder metabolitlerdir [2]. Temelde bir veya daha fazla azot atomu içeren siklik yapıda organik bileşiklerdir. Genellikle insan ve hayvanların sinir sisteminde uyarıcı etkiye sahip özellikleri ile bilinmektedirler [5]. Alkaloitler genellikle bitkisel kaynaklı olup ortak kimyasal özellikler göstermektedirler. Alkaloitler çok az dozlarda dahi önemli derecede farmakodinamik aktiviteye sahip olan organik bileşiklerdir. Apocynaceae, Rutaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Solanaceae, Lauraceae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Boraginaceae familyaları alkaloitlerce zengin familyalardır. Alkaloitler genellikle azot içeren yapının çeşidine göre sınıflandırılır (Şekil 2.1, örn. Pirolidin, piperidin, kinolin, izokinolin). Biyosentetik esasa göre sınıflandırılan alkaloitler ise bitkilerin sekonder metabolitleri üretirken kullandığı başlangıç maddesine (amino asitlere) göre yapılmaktadır. Ornitinden türeyenlere tropan alkaloitleri denilmesi bu duruma örnek verilebilir [1].

Pirolidin, Piridin, tropan, piperidin, kinolin, izokinolin



Şekil 2.1 : Alkaloitlerin azot içerme durumuna göre sınıflandırılmasına örnekler.

Alkaloitler için ayrıca gerçek alkaloitler, protoalkaloitler ve psödoalkaloitler şeklinde biyogenetik sınıflandırma da yapılmaktadır. Protoalkaloitlerin ve gerçek alkaloitlerin

öncü maddeleri direkt olarak aminoasitlerdir ve her iki gruptaki alkaloit de esas olarak aromatik amino asit olan fenilalanin, tirozin (izokinolin alkaloitler) ve triptofan (indol alkaloitler) aminoasitlerinden sentezlenir. Gerçek olmayan (psödoalkaloitler) alkaloitler, çoğunlukla gerçek alkaloitlerin karakteristik özelliklerini taşımaktadır. Kısaca alkaloitlerin kimyası doğrudan veya farklı yollarla protein aminoasitleri, aminoasitlerin öncü maddeleri veya onlara bağlı oluşan son maddeler ile bağlantılıdır (Tablo 2.1) [6].

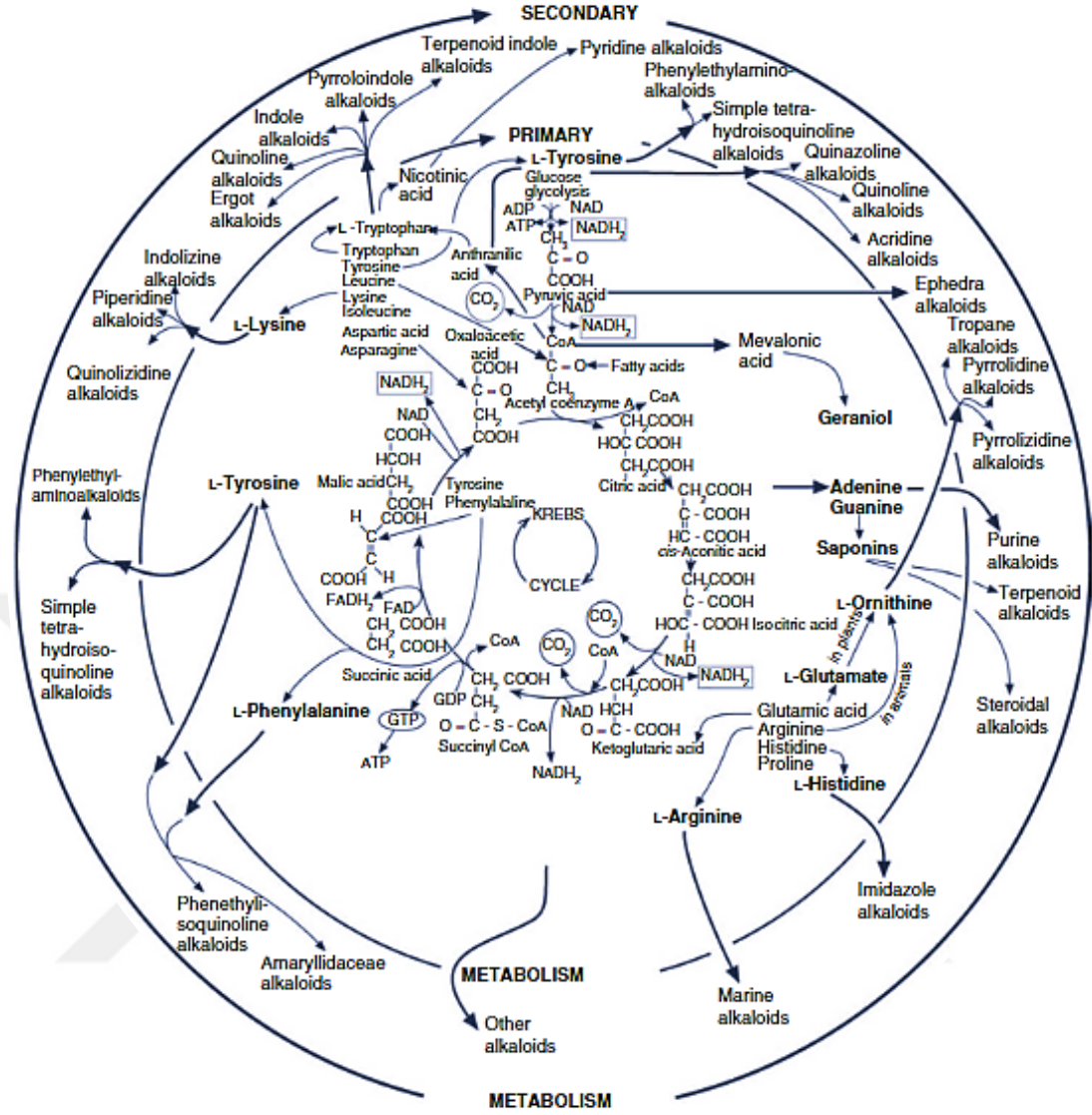
Tablo 2.1 : Amino asitlerin alkaloit sentezine katılım tablosu.

Amino Asitler Grupları / Amino asitler	Alkaloit Türü	Alkaloit sentezine katılımı
Protein amino asitleri		
L-alanin	Arginin türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler Deniz alkaloitleri
L-arginin		
L-asparagin		
L-sistein		
L-glutamin		
L-glutamik asit		
L-glisin		
L-histidin	Histidin türevi alkaloitler	İmidazol alkaloitleri Manzamin alkaloitleri
L-izolösin	Lizin türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler Piperidin alkaloitler Kinolizdin alkaloitler İndolizidin alkaloitler
L-lösin		
L-lizin		
L-metiyonin		
L-fenilalanin	Fenilalaninden türetilmiş alkaloitler	Gerçek alkaloitler Feniletıl Amino alkaloitler Fenil İzokinolin alkaloitler Amaryllidaceae alkaloitleri
L-prolin	Triptofan türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler İndol alkaloitleri Kinolin alkaloitleri Pirolindol alkaloitleri Ergot alkaloitleri İboga alkaloitleri Corynanthe alkaloitleri Aspidosperma alkaloitleri Protoalkaloitler Terpenoid indol alkaloitleri
L-serin		
L-treonin		
L-triptofan		

Tablo 2.1 (devam) : Amino asitlerin alkaloit sentezine katılım tablosu.

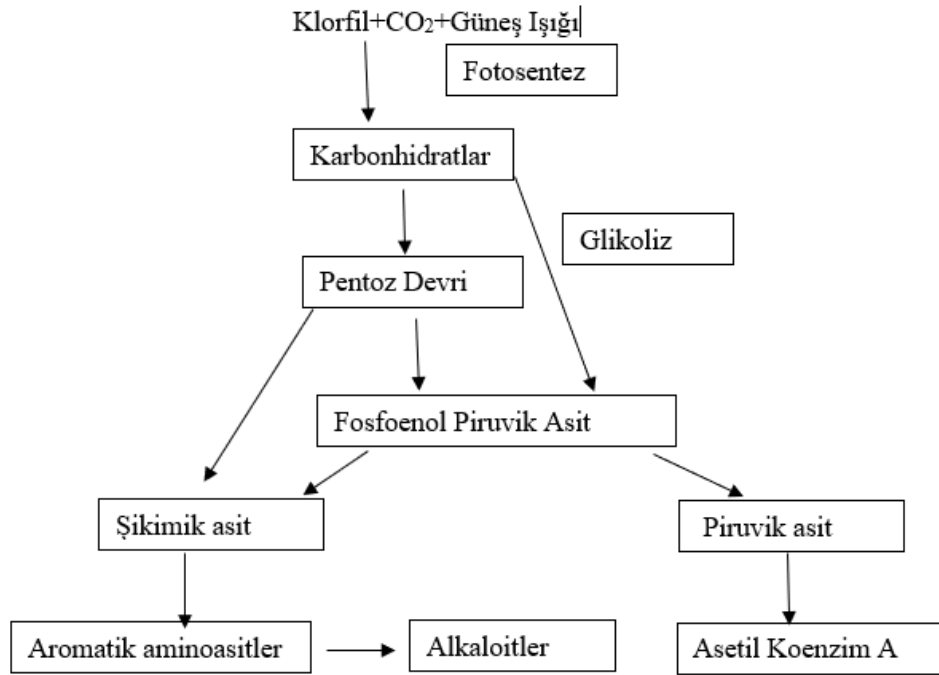
Amino Asitler Grupları / Amino asitler	Alkaloit Türü	Alkaloit sentezine katılması
L-tirosin	Tirosinden türetilmiş alkaloitler	Gerçek alkaloitler Feniletilamino alkaloitleri Basit tetrahidrhidroiso Kinolin alkaloitleri
L-valin Protein olmayan aminoasitler		
L-ornitin	Ornitin türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler Pirolidin alkaloitleri Tropan alkaloitler Pirrolizidin alkaloitleri
Antranilik asit	Antranilik asid türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler Kinazolin alkaloitleri Kinolin alkaloitleri Akridin alkaloitleri
Nikotinik asit	Nikotik-asid türevi alkaloitler	Gerçek alkaloitler Piridin alkaloitleri Sekiterpen piridin alkaloitler

Bir başka kimyasal sınıflandırma ise alkaloitlerde aromatik halkada azot taşıma durumuna göre heterosiklik olmayan alkaloitler ve heterosiklik yapıdaki alkaloitler şeklinde yapılmaktadır. Halka yapısında karbon dışında atom bulunduran aromatik moleküllere heterosiklik adı verilmektedir. Heterosiklik olmayan alkaloitlerin halka yapısında heterosiklik halka yoktur. Hordenin, efedrin, kolşisin, sinefrin, oktopamin gibi protoalkaloitler (aminoalkaloitler) halka dışında azot taşırlar. Heterosiklik yapıdaki alkaloitlere ise örnek olarak tropan alkaloitlerinden hiyosiyamin; pridin grubundan nikotin, izokinolin alkaloitlerden papaverin, kodein, morfin, berberin gibi aromatik halka yapısında nitrojen atomu bulunduran alkaloit türleri verilebilir. Farklı yapıdaki alkaloitlerin farklı sekonder metabolit metabolizmasından veya farklı bir biyosentez mekanizmasından türeyebileceği, isim ve yapı olarak farklı adlandırılabilirdiği Şekil 2.2’de gösterilmiştir [6].



Şekil 2.2 : Bütün alkaloit sınıflarının genel biyosentez şeması.

Şikimat biyosentezi insanlarda ve hayvanlarda doğal olarak gerçekleşen bir biyosentetik evre değildir. Şikimat biyosentezi mantarlar, bitkiler ve diğer mikroorganizmaların yanı sıra aromatik amino asitler (L-fenilalanin, L-tirozin ve L-triptofan) için önemli bir biyosentezdir. Şikimat biyosentezi sonucu oluşan aminoasitler (Şekil 2.3, tirozin, triptofan gibi) insanlar için esansiyel aminoasit sınıfında yer almaktadır [1]. Özetle sekonder metabolit grubunda yer alan alkaloitlerin bazılarının (sinefrin gibi) sentezi şikimat biyosentezi üzerinden gerçekleşmektedir. [6].



Şekil 2.3 : Sekonder metabolitlerden alkaloitin başlıca biyosentez metabolizması.

---Sinefrin

Sinefrin veya *p*-sinefrin, *Citrus aurantium*'da bulunan ve genelde diyet ürünlerinde veya spor takviyelerinde sporcu performansını yükseltmek veya kilo kaybına yardımcı olmak için kullanılan bir alkaloittir [7-9]. *Citrus aurantium* ekstresi, genel olarak acı, olgunlaşmamış (yeşil) meyvelerden “Sevilla portakalı” olarak adlandırılan turunçlardan elde edilir [10]. Stewart ve arkadaşları tarafından turunçgillerde sinefrin varlığı ilk olarak 1964'te rapor edilmiştir [11, 12]. Ayrıca sinefrin (oksedrin) adrenerjik bir agonisttir ve orto, meta, para izomerik yapıları olabilmektedir. Sinefrin molekülü (Şekil 2.4), benzen halkası üzerindeki para pozisyonunda hidroksil grubu ile bir feniletilamin türevidir [10]. Sinefrinin kimyasal formülü $C_9H_{13}NO_2$ olup kimyasal ismi ise 1-[4-hidroksifenil]-2-metil-aminoetanoldür. Sinefrin maddesinin molekül ağırlığı ise 167.21g/mol'dür [9]. Sinefrinin ve bazı alkaloitlerin öncü aminoasitlerinin biyosentez mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

Turunçtan elde edilen ekstreler ile *p*-sinefrin de genelde kilo kontrolü ve spor performansında kullanımının yanı sıra, açlığı bastırmak ve bazal metabolizmayı hızlandırmak için kullanılan ürünler arasındadır [13]. *p*-Sinefrin turunçgillerden en çok mandalina, klementin mandalina, portakal gibi diğer turunç türlerinin de yer aldığı

CN(Cc1ccccc1O)O

Metabolic pathway diagram showing the conversion of Glukoz-6-Fosfat (Glucose-6-phosphate) to various amino acids:

- Glukoz-6-Fosfat is converted to Pirüvik Asit (Pyruvate) via **GLIKOLİZ**.
- Pirüvik Asit is converted to Fenilalanin (Phenylalanine) via **FOTOSENTEZ**.
- Pirüvik Asit is also converted to Eritroz-4-Fosfat (Erythrose-4-phosphate) and then to Fosfoenolpiruvat (Phosphoenolpyruvate).
- Fosfoenolpiruvat is converted to Tyrosin (Tyrosine) and then to Triptofan (Tryptophan).
- Glukoz-6-Fosfat is also converted to Eritroz-4-Fosfat and then to Fosfoenolpiruvat.

The diagram includes chemical structures for Pirüvik Asit, Eritroz-4-Fosfat, Fosfoenolpiruvat, Tyrosin, and Triptofan.

8

---Sinefrinin adipogenezis ile ilişkisi ve diyabet üzerinde oluşabilecek etkileri

Sinefrinin vücut yağ kitlesi üzerindeki etkileri çalışmalarda mevcuttur. *p*-Sinefrin β -3 adrenoreseptörlerine bağlanır ve aktive ederse, termojenez ile lipolizde bir artış beklenir ve bunun sonucunda vücut yağ kitlesinde azalmaya sebep olabilmektedir. Çeşitli hayvan çalışmaları *p*-sinefrinin ağızdan veya acı portakal özü şeklinde uygulanmasının, kilo kaybı veya azalmış ağırlık artışı ile sonuçlandığını göstermiştir [8, 15, 16]. *Citrus* ekstrelerinin antidiyabetik aktivite gösterdiğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır ve antidiyabetik aktivite etkisinin sinefrinden ileri gelebileceği düşünülmektedir [17]. Yapılan bir başka çalışmada *p*-sinefrinin, akt (protein kinaz B), sinyal biyosentezinin düzenlenmesi ve adipogenez ile ilgili proteinlerin baskılanması yoluyla antiadipojenik etkili olduğu ve GSK-3 β aktivitesinin aynı zamanda *p*-sinefrin tarafından da inhibe edildiği gözlemlenmiştir [18]. Serin/treonin kinaz familyasından olan akt, hücre içerisinde düzenleyici etkide sinyallerin iletiminde görev alır ve glikoz metabolizmasına da etkisinin mevcut olduğu literatürde yer almaktadır [19]. Öte yandan GSK-3 (glikojen sentaz kinaz-3) inhibitörlerinin etkin olduğu hastalıkların başında tip-2 diyabet ve nörolojik hastalıklar yer almaktadır [18, 19]. Ayrıca birçok çalışmada GSK-3' ün aşırı aktif olması tip-2 diyabet ve obezite gibi metabolik kökenli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [20].

2.2 Diyabet

Diyabet pankreas beta hücreleri tarafından salgılanan insülin hormonunun hiç salgılanmaması veya kısmen azalması durumunda glikozun kanda yükselme durumu (hiperglisemi) ile ilişkili endokrin bir hastalıktır. Kısaca insülin salınımındaki yetersizlik veya insülinin olmaması durumudur [21]. Diyabet hastalığının küresel prevalansının 2030 yılında %7,7'ye yükselmesi beklenmektedir. TURDEP-II'ye göre Türkiye'de erişkin toplumda diyabet hastalığının oranı %13,7'ye ulaşmıştır [21-23].

---Diyabet hastalığının sınıflandırılması

- (1) Tip 1 Diyabet
- (2) Tip 2 Diyabet
- (3) Gestasyonel Diyabet
- (4) Diğer Spesifik Tipler

- β hücre fonksiyonunda genetik defektler
- İnsülin fonksiyonunda genetik defektler
- Egzokrin pankreas hastalıkları
- Enfeksiyonlar
- Nadir görülen immün durumlar
- Endokrinopatiler
- İlaç ve kimyasal maddeler gibi nedenlerin sebep olduğu diyabet tipleri

2.2.1 Tip 1 diyabet

Vücudun bağışıklık sisteminin pankreasta yer alan beta hücrelerini yok etmesine veya zedelemesine bağlı olarak insülin eksikliği ile sonuçlanan diyabet türüdür. Pankreastaki beta hücrelerinin yokluğunda ise insülin üretimi mümkün olamamaktadır [21].

30 yaşın altında bu diyabet tipinde otoimmün bozukluk, hızlı kilo kaybı ve insülin eksikliği sık görülen durumlar arasında yer almaktadır. Bu durumlara bağlı olarak yaşam boyunca insüline bağımlı bir tedavi uygulanmaktadır.

2.2.2 Tip 2 diyabet

Pankreastaki beta hücre metabolizmasında oluşan bozukluğa bağlı insülin salınımında azalma ve buna bağlı oluşan insülin direnci ile belirtilen diyabet tipidir. Aşırı ağırlık artışı, genetik faktörler, yaşanan travmalar, ilaç kullanımı (diüretik ilaçlar, kortikosteroid vb.), pankreasta oluşabilen anormallikler tip 2 DM'nin oluşumunda başlıca etmenler arasında yer almaktadır. Tip 2 diyabette obezite daha çok insülin direncine sebep olurken, zayıf bireylerde ise bu durum yetersiz insülin salınımı şeklinde görülmektedir [21].

---Obezite- İnsülin Direnci

Karaciğer insülin klirensinin düşmesinde temel sebeplerden biri plazmada serbest yağ asitlerinin artışıdır. Karın bölgesinde oluşan yağ kitlesi lipolitik etkinliğe fazla eğilim göstermektedir. Lipolitik etkinliğin artması plazmada bulunan serbest yağ asitlerinin artışına sebep olmaktadır. Plazmada artan yağ asitleri kas dokuda glikoz oksidasyon bozukluğuna neden olup buna bağlı lipid oksidasyonu da anormal bir şekilde

düşmektedir. Sonuç olarak insülin hassasiyetinde azalma ve kan insülin düzeyinde artışa bağlı insülin direnci oluşmaktadır [21].

2.2.3 Gestasyonel diyabet

Gestasyonel diyabet gebelik esnasında teşhis edilen diyabet tipidir. Anne ve bebek için sağlık riski taşıyan ve insülin tedavisi gerektirebilen bir tiptir. Genelde doğum sonrası bu durum ortadan kalkmaktadır. Ancak hem anne hem de bebek için ilerleyen zamanlarda özellikle de dikkat edilmediğinde Tip 2 diyabet riski oluşmaktadır [21].

---*Diyabet tedavisinde başlıca etmenler*

- Sağlıklı beslenme
- Egzersiz-Fiziksel aktivite
- Düzenli kontrol
- İlaç / İnsülin
- Multidisipliner çalışma ekibi

2.3 Mikrobiyota

İnsan vücudunda çoğunluğunun kolonda yer aldığı ve vücudun hem dış kısmında hem de iç kısmında hayat süren mikroorganizmaların tamamı mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Yetişkin bir insan bağırsağında yaklaşık olarak 10-100 trilyon kadar mikroorganizma bulunmaktadır. Mikrobiyotanın çoğunluğunu bakteriler oluştururken düşük oranda virüs, mantar ve ökaryot hücreler de oluşturmaktadır [24]. Son yıllarda yapılan birçok çalışma alerjik hastalıklar, kolorektal kanser, aterosklerosis, diyabet, obezite gibi yaygın hastalıkların gelişmesini bağırsak mikrobiyotasının değişimi ile ilişkilendirmiştir [24, 25].

Doğduğumuz andan itibaren mikroorganizmaların vücudumuzda kolonize bir şekilde bulunduğu bilinmektedir. Vücudumuzda yaşayan ve insan hücresi olmayan, bedenimizi konak olarak kullanan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların (bakteri, virüs, mantar, protozoa) oluşturduğu bu ekolojik topluluğa mikrobiyota, bu çevrede yaşayan mikroorganizmaların toplam genomuna ise mikrobiyom denilmektedir. Mikrobiyota gelişiminde beslenme, fizyolojik ve hastalık

durumu, çevresel ve kültürel faktörler, antibiyotik kullanımı, hijyen koşulları gibi bir takım faktörler rol oynamaktadır [26].

İntestinal ekosistemde trilyonlarca mikroorganizma ve 1000'e yakın mikroorganizma türü mevcuttur. Bu mikroorganizmaların çoğunluğunu bakteriler oluştururken, bu bakterilerin de %90'lık kısmını anaerobik bakteriler oluşturmaktadır. Bifidobakteriler, bağırsak mikrobiyotasında en fazla bulunan mikroorganizma gruplarından biri olup, dışkıda bulunan hücre sayıları, mikrobiyotada yoğun bulunan diğer bir bakteri olan laktobasillere oranla 3-4 log daha yüksektir. Bunların dışında daha az oranlarda gram negatif ve gram pozitif basiller bulunmaktadır. Normal şartlarda dengede olan bu mikroorganizmalar beslenme ve çevresel etkilerle değişim göstermektedir ve beslenme bu dengeyi etkileyen en önemli faktördür. Sağlığımız, davranışlarımız ve ruh halimiz sadece ne yediğimize veya ne yaptığımıza değil, aynı zamanda neye konak olduğumuza da bağlıdır [27]. Epidemiyolojik ve metagenomik çalışmaların gözlemleri sonucunda ve farklı deneysel hayvan modellerinden elde edilen verilerle birlikte alerjik hastalıklar, kolorektal kanser, aterosklerosis, diyabet, obezite gibi yaygın hastalıkların gelişmesini bağırsak mikrobiyotasının değişimi ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir [28].

2.4 Mikrobiyota ve Diyabet İlişkisi

Bağırsak mikrobiyotasının miktarının ve çeşitliliğinin değişim göstermesinin birçok metabolik bozukluğa önemli derecede sebep olduğu bilinmektedir. İnsan bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriyel bozulma (disbiyoz) obezite ve diyabet ile de ilişkilidir [29]. Çin'de yapılmış bir çalışmada 345 kişinin tip-2 diyabet ile ilişkili parametrelerine ve mikrobiyata bakterilerinin miktarlarına bakılarak bir değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmeler sonrasında tip-2 diyabet hastası olan bireylerde mikrobiyotanın olumsuz bir şekilde değiştiği ve butirat üreten *Roseburia* türleri gibi bakterilerin azaldığı görülmüştür [30]. Başka bir çalışma, obezitenin bağırsak mikrobiyotasının özellikle *Bacteroidetes* türünde azalma gibi değişimler ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Kilo kontrolünde ise *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinin ciddi roller aldığı çalışmalarda raporlanmıştır [31]. Ayrıca bağırsak mikrobiyota profilinin yaşamın farklı aşamalarında değişiklik göstermesi yaş, beslenme alışkanlığı, çevresel faktörler ve ilaç gibi faktörlere de bağlıdır. Hayvansal kaynaklı gıdalardan zengin bir diyetle beslenen kişilerde *Bacteriodes* cinsi, bitkisel içeriği zengin gıdalar ile beslenen

kişilerde ise *Prevotella* bakterilerinin daha yaygın olarak bağırsaklarında bulunduğu gözlemlenmiştir [30]. Günümüzde probiyotik özelliklere sahip *Lactobacillus* suşları (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. lactis* vb.) sıklıkla diyet ve sağlıkla ilişkili ürünlerde, ayrıca probiyotik yoğurt yapımında da kullanılmaktadır [32, 33]. *Lactobacillus* cinsi bakteriler, günlük yaşamda geniş bir alan kaplayan ve birçok çalışmada yer almış bakterilerdir. Bu bakteri cinsinin tümü gram pozitif, çoğunluğu fakültatif anaerobik, sitokrom içermeyen ve katalaz negatif özellikte olup neredeyse bütün türlerinin çubuk ve kok şeklinde olduğu bakterilerdir. Bağırsak mikrobiyotasında, çürümüş olan bitkilerde, süt ve süt ürünlerinde kısacası gündelik yaşamda denk gelebileceğimiz probiyotik etkide mikroorganizmalardır [34]. Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasının dengesini olumlu yönde geliştiren aktif mikroorganizmalardır [32]. Sağlık için yarar sağlayan önemli probiyotik cinslerin ikisi *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleridir. Tip-2 diyabet ile ilişkilendirilmiş bağırsak florasındaki bakteri değişimi Firmicutes bakteri türlerinin prevalansının düşmesi ve *Bacteroidetes* ile *Proteobakterilerinin* ortamda zenginleşmesi olarak değerlendirilmiş ve bu bakteri değerlerinin normal değerlere gelmesi için probiyotik bakteri tedavisinin etkinliği çalışılmış ve çalışmada *Bifidobacterium* ile *Lactobacillus* cinslerinden bazılarının bağırsak florası dengesini düzelteren majör bakteriler olduğu belirtilmiştir [35]. Başka bir çalışmada, mikrobiyota transferi üzerine çalışılmış ve kilolu olmayan (yağ oranı düşük) bir bireyden metabolik sendromu olan bir bireye bağırsak mikrobiyota transfer edildiğinde, alıcının insülin duyarlılığı hem periferik dokularda hem de hepatik dokularda anlamlı şekilde artmıştır. Metabolik sendromlu bu kişilerde bağırsak mikrobiyomunun otolog transferi yapıldığında insülin duyarlılıklarında bir değişikliğe rastlanılmamıştır [36]. Probiyotik bakterilerin antimikrobiyal etkinliklerde çalışmalarda mevcuttur. Yapılan bir *in vitro* çalışmasında yara enfeksiyonlarının önlenmesinde mikrobiyotada bulunan bakterilerin probiyotik bir karışımla (*Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ve *Lactobacillus paracasei* IMC 502) olan etkinliği değerlendirilmiş ve sonuç olarak probiyotiklerin çok iyi antimikrobiyal etki gösterdiği ayrıca kronik ülseratif lezyonların iyileştirilmesinde alternatif tedavi olarak kullanılabilme şansı verdiğine dair sonuçlar gösterilmiştir [35].

Mikroorganizmaların göz ardı edilmeyecek bir yüzeye sahip olduğu ve yaşamımızda önemli hastalıklarda bu mikroorganizmaların da yer aldığı yapılan araştırmalarda mevcuttur. Ek olarak insan bağırsak mikrobiyotasının yaş, çevresel faktör ilaç gibi

birçok etmene bağı olarak değışebileceğı ve değışen bu mikrobiyotanın tip-2 diyabet ve tip-2 diyabetle ilişkilendirilebilen obezite ve metabolik sendrom üzerinde etkili olduğı birçok çalışmada yer almaktadır [34-36].

2.5 Mikrobiyal Biyotransformasyon

Mikrobiyal biyotransformasyon tekniğı, bir molekülün bakteri ya da funguslar tarafından başka bir moleküle dönüştürülmesidir. Bu teknik hem yeni moleküllerin keşfi hem de biyolojik aktivitesi yüksek bileşiklerin oluşumu için önemli bir tekniktir. Biyotransformasyon reaksiyonları ile yüksek stereospesifiklik ve regioseçicilik gibi fizikokimyasal özelliklere sahip kimyasal türevler elde etmek mümkündür [37]. Mikrobiyal dönüşmede reaksiyonlar genellikle oksidasyon, redüksiyon, hidroliz, karbon-karbon bağı oluşumu, eliminasyon, glikoz transferi, halojenizasyon ya da dehalojenizasyon üzerinden gerçekleşir. Mikroorganizmalar, yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik çok sayıdaki farklı substrat üzerinde birçok farklı kimyasal reaksiyonu gerçekleştirebilir [38].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik kimyasal metotlara göre, çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir. Pek çok mikrobiyal biyotransformasyon oda sıcaklığında ve 1 atmosfer basınç altında gerçekleşmektedir. Klasik kimyasal metotlara göre daha ucuza mal olur ve daha kısa sürede gerçekleştirilir. Hedef bileşikler daha kısa süreler içerisinde ve genellikle daha yüksek verimlerde, kimyasal reaktiflere göre çok ucuza mal edilen besi yeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilmektedir [39].

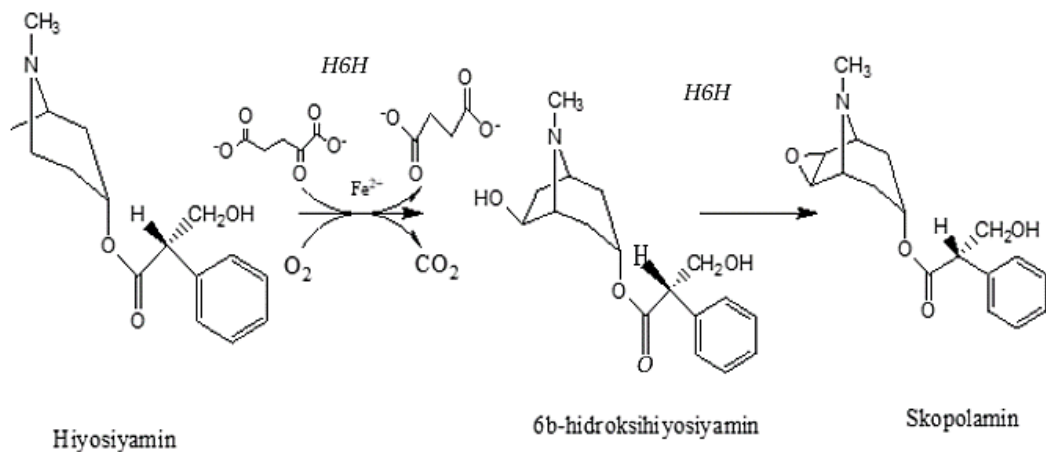
Mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostudur. Klasik kimyasal sentez metotlarında kullanılan çoğı reaktif, çevreye çok büyük zararlar vermektedir. Reaksiyonları enantioseçicidir. Klasik kimyasal sentez yöntemleri ile genel olarak hedef moleküller, ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar olarak elde edilmektedir. Özellikle ilaç etkin maddelerinin sentezinde tek enantiyomer üretmek oldukça önemlidir. Tek enantiyomerin seçimli üretimi için mikroorganizmaların kullanılmaları günümüzde gittikçe yaygınlaşmıştır [40].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğ er fonksiyonel grupların korunması gerekmez. Bu üstünlük enzimlerin bölgesel seçicilikleri sebebi ile ortaya çıkar.[37].

2.6 Alkaloitlerin Biotransformasyon Çalışmaları

Alkaloitlerin biyotransformasyonları, çok çeşitli substrat ve enzimlerle yapılmaktadır. Yeni alkaloit biyosentezleri ve katabolik biyosentezlerin aydınlatılması, sentetik organik kimyacılar için yeni biyokatalizörler elde edilmesine imkân sağlamaktadır. Ayrıca, metabolik biyosentezlerin genetik ve biyokimyasal temelini daha iyi anlaşılması, terapötik olarak önemli alkaloitlerin üretimi için mümkündür. Artan ticari ilgi ve moleküler biyolojideki ilerlemeler, alkaloit bazlı terapötik maddelerin üretimi için ön şart olan biyokatalizörlerin eldesini kolaylaştıracaktır.

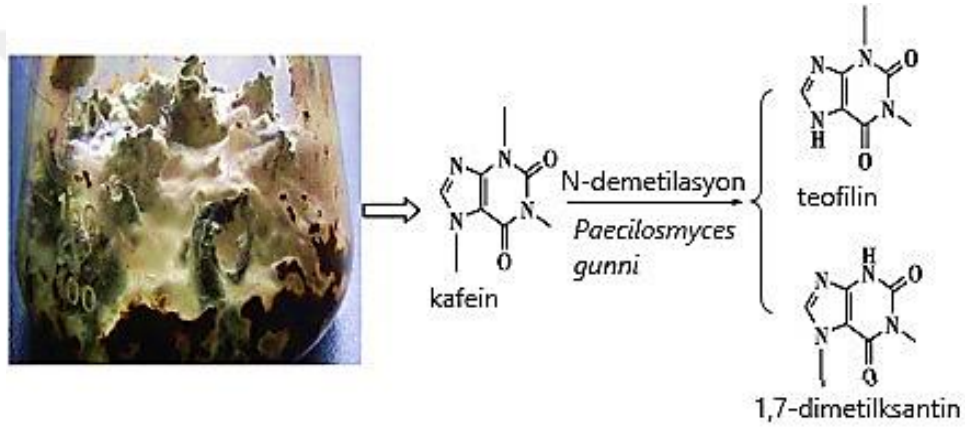
Alkaloitlerin biyotransformasyonları ile ilgili çalışmalara bakıldığında çok fazla bilimsel veriye rastlanmamaktadır. 2019 yılında yapılan bir çalışmada, erkek SD sıçan modeli kullanılarak temsili prolizidin N-oksitlerin hem gastrointestinal kanaldaki hem de karaciğerdeki ilgili prolizidin alkaloitlere biyotransformasyonunu ve tüm biyolojik numunelerdeki prolizidin alkaloit ve prolizidin alkaloit N-oksitlerin farmakokinetiği UHPLC-MS analizi ile araştırılmıştır. Bu araştırma sonuçlarına göre prolizidin alkaloit N-oksitlerin prolizidin alkaloitlere biyotransformasyonuna öncelikle bağırsak mikrobiyotasının ve ayrıca hepatik CYP'lerin aracılık ettiğini göstermiştir [41]. 2017 yılında Cardillo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hiyosiyamin alkaloit bileşiği hiyosiyamin 6β- hidroksilaz (H6H) enzimi biyokatalizöründe *Escherichia coli* bakterisi kullanılarak biyotransformasyona uğratılmış, 6β-hidroksihiyosiyamin ve skopolamin bileşikler elde edilmiştir (Şekil 2.6) [42].



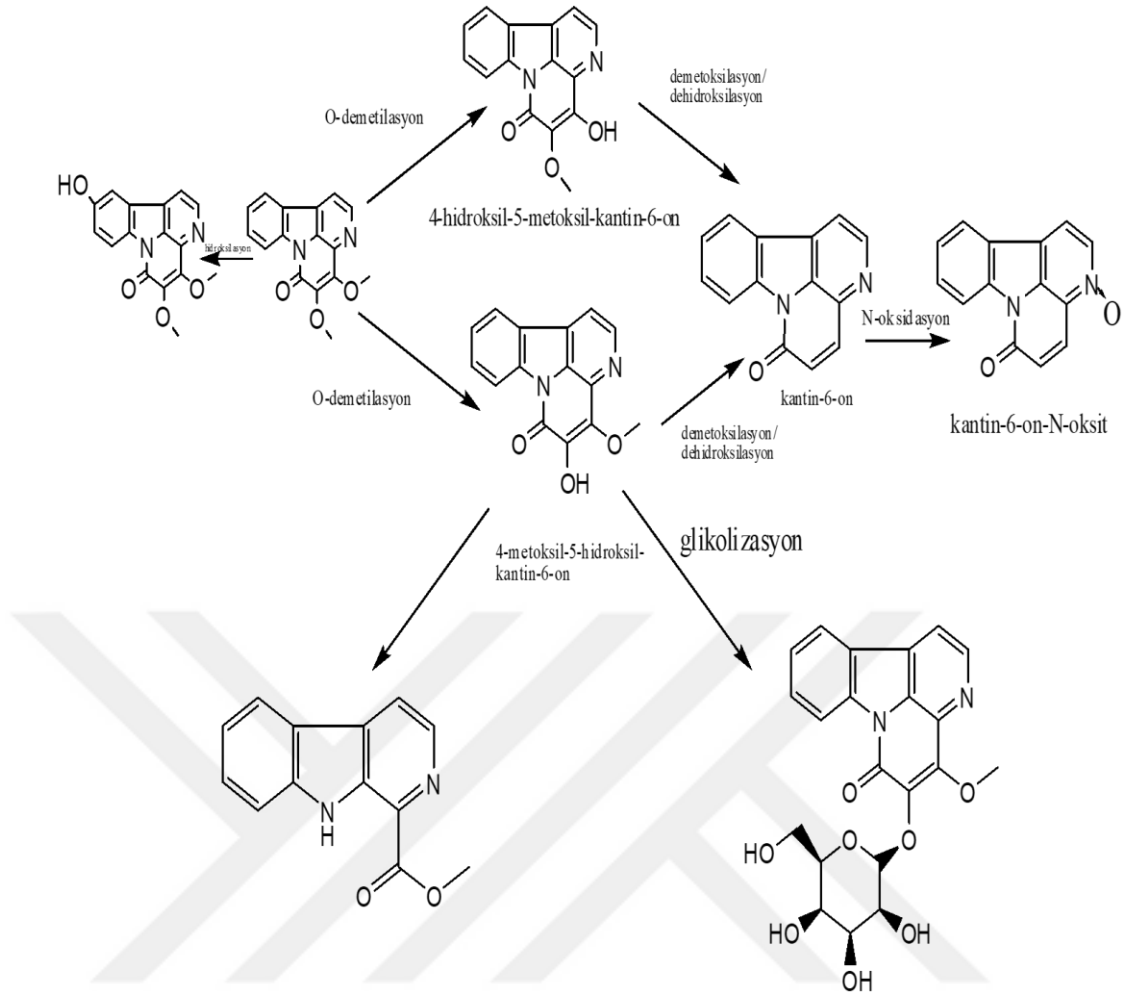
Şekil 2.6 : Hiyosiyamin bileşiğinin H6H enzimi katalizörlüğünde biyotransformasyonu.

2016 yılında yapılan bir diğer çalışmada, entomojen fungus olan *Paecilomyces gunnii*, Çin Oolong çay ortamında kültürlenerek kafeini teofiline ve 1,7-dimetilksantinlere indirgemek için N-demetilasyon mekanizması üzerinden bir biyoreaksiyon gerçekleştirilmiş ve oluşan metabolitler ince tabaka kromatografisi (İTK) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi teknikleri ile tayin edilmişlerdir. Oluşan reaksiyon Şekil 2.7’de gösterilmektedir [43].

2016 yılında Çin’de yapılmış bir başka çalışmada, 4,5-dimetoksil-kantin-6-on alkaloid tipli bileşik, *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3,970 mantarı aracılığıyla biyotransformasyona tabi tutulmuş ve 1’i yeni olmak üzere toplam 6 tane bileşik elde edilmiştir (Şekil 2.8) [44].



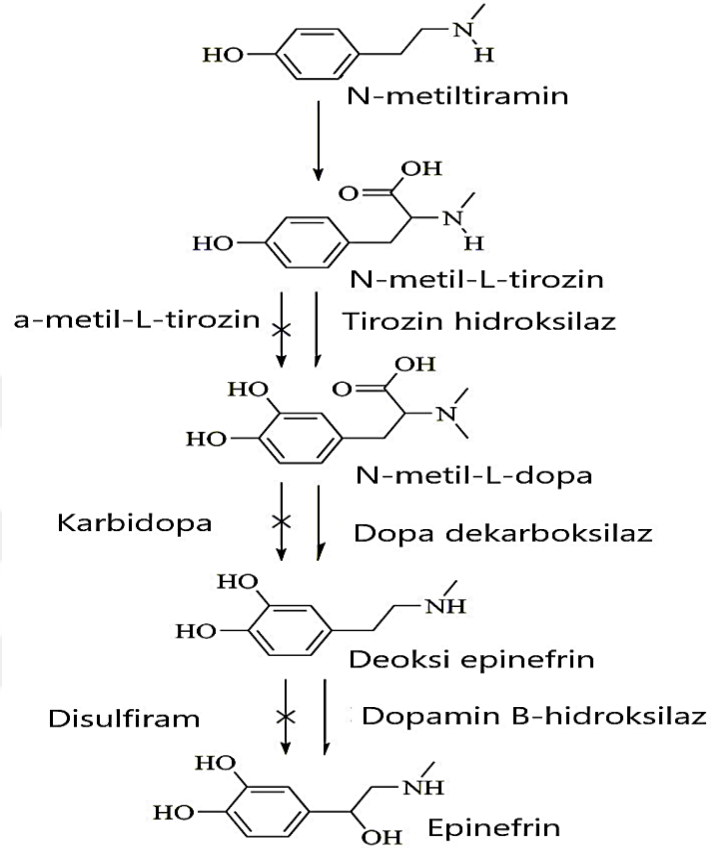
Şekil 2.7 : Kafeinin *Paecilomyces gunnii* ile biyotransformasyonu.



Şekil 2.8 : 4,5-dimetoksil-kantin-6-one'un biyotransformasyonu.

Literatürde *p*-sinefrinin biyotransformasyonu ile ilgili yapılmış olan tek çalışma, 2016 yılında Silva-Pereira ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadır. Ancak bu çalışma, *in vitro* mikrobiyal biyotransformasyon çalışması değildir. *p*-sinefrinin mide-bağırsak mikro florası tarafından metabolize edilebildiğine ilişkin yapılmış *in vivo* bir çalışmadır. Silva-Pereira'nın çalışmasında, sinefrinin biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin tayini, perfüzyonlu karaciğerden izole edilerek yapılmıştır [45] 3-feniletilamin türevi adrenerjik reseptörler (AR) (N-metiltiramin, sinefrin ve hordenin) *Citri Reticulatae Pericarpium* (CRP), *Aurantii Fructus immaturus* (AFI) ve *Aurantii fructus* (AF) türlerinden karakterize edilerek yapılan bir çalışmada; CRP, AFI ve AF'nin aktif bileşenlerini ve etki mekanizmalarını AR'lere bağlı gastrointestinal bozuklukların tedavisinde belirlemesi amaçlamış ve enzimler ile biyotransformasyonları incelenmiştir. Sonuç olarak N-metiltiraminin epinefrin sentezini düzenlediği öngörülmüş ve biyotransformasyon sonucu benzer yapıların birbirlerine dönüşebildiği görülmüştür. Bu dönüşüm esnasında da bu CRP, AFI ve

AF'nin gastrointestinal bozukluklarının tedavi edilmesinin etkisinin AR'lerin düzenlenmesi yoluyla N-metiltiramin ile ilişkili olduğu ve N-metiltiraminin etki mekanizmasının epinefrin sentezinin bir dizi enzim kataliz reaksiyonu aracılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. (Şekil 2.9) [46].



Şekil 2.9 : N-metiltiramin bileşiğinin enzimler katalizörlüğünde biyotransformasyonu.

3. MATERYAL METOD

Bu tez çalışması, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

(+/-) Sinefrin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya)

Sorbent C18, 100 G (Macherey Nagel, Chromab)

Brain Heart Broth, For Microbiology (Sigma Aldrich)

Brain Heart Agar, For Microbiology (Merck, Darmstadt, Almanya)

1. 07734, Silika jel 60 (0,063-0,200mm), Kolon Kromatografisi için, 70-230 MESH (Merck, Darmstadt, Almanya)

1.05554.0001 İTK Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Almanya)

n-Bütanol $\geq 99,5\%$ (Tekim, Bursa, Türkiye)

Asetik Asit (Glacial) 100% (Merck, Darmstadt, Almanya)

25% Amonyak (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH₂PO₄) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Metanol $\geq 99,9\%$ (Isolab Kimyasallar, Eschau, Almanya)

Etanol $\geq 99,9\%$ (Isolab Kimyasallar, Wertheim, Almanya)

Diklorometan $\geq 99,8\%$ (Merck, Darmstadt, Almanya)

Etil Asetat $\geq 99,5\%$ (Isolab Kimyasallar, Wertheim, Almanya)

Döterometanol (CD₃OD) (Eurisotop)

Döterodimetilsulfoksit (Eurisotop)

Sitrik Asit (Sigma Aldrich, St. Louis, ABD)

Potasyum İyodür (Merck, Darmstadt, Almanya)

α -Glukozidaz (pNGP, Sigma, N1377)

> 98%, Ninhidrin (Fluka)

Staphylococcus aureus ATCC₂₅₉₂₃

Escherichia coli ATCC₃₅₂₁₈ *Candida albicans* ATCC₉₀₀₂₈

Lactobacillus acidophilus ATCC₄₃₅₆

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Materyaller

UV Kabin (0,40-2000) (Camag UV)

Ultrasonik Su Banyosu (VWR mmx1000)

Vorteks ZX Vorteks (Velp Scientifica)

İTK Tankı (Camag)

Hassas Terazi (Ohaus Adventurer-Pro ve Shimadzu AUW220D)

Döner Buharlaştırıcı, BFC S2500 Pompalı Vakum Filtre Seti, (Stuart RE300 DB Evaporatör)

Çalkalamalı İnkübatör (N-Biotek, US)

Flash Kromatografisi (Buchi, İsviçre, Reveleris X2)

pH-metre (Mettler Toledo, Seven Compact)

HPLC (SHIMADZU, CTO-10-AS VP)

Güvenlik Kabini (Microtest, Class2A2)

Santrifüj (Nüve, NF800R)

Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (Gen Biotek)

BioTek, ABD, Synergy H1 Ölçüm cihazı

Ultra Saf su Cihazı (Human Corporation)

Novatek, Etüv-Sterilizatör (Binder redLINE RF Serisi)

LC-MS Cihazı (Thermo Scientific Qexactive-1007SL)

NMR Cihazı (Bruker Biospin AGZ115311/MS100022)

3.3 *Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆

Yaptığımız çalışmada sinefrinin biyotransformasyonu için *Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆ suşu ticari olarak temin edilmiştir. Biyotransformasyon tekniğinde bu bakterilerin seçilmesinin ve kullanılmasının nedeni vücutta sinefrinin metabolize edildiği yer olan gastrointestinal sistemimizde bulunan bakteriler olmaları ve bu bakterilerin patojenitelerinin düşük oluşu, bulundukları çevreye adaptasyonlarının iyi olması, kültür ortamında çok rahat üreyebilmeleridir.

3.4 Agar Besi Yerinin Hazırlanması

Beyin kalp infüzyonu [Brain Heart Infusion (BHI)] agar medya tartılarak 150 mL saf su içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Hazırlanan besi yeri soğumadan 15 adet 22 mL'lik patolojik cam şişelerin yarılarına kadar ilave edilip ve otoklav içerisinde 120 °C'de 60 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisindeki besi yerleri, 45°C'lik açıyla bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besi yerleri elde edildi.

Stok bakteri kültüründeki bakterilerin bir kısmı yatık agar besi yerlerinin 3 tanesine steril şartlarda aktarılıp oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakıldı. Çoğalan bakteriler hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinden ayda 1 kez 3 yeni yatık agar besi yerine steril şartlarda aktarıldı. Bu aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki bakteriler biyotransformasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.5 Sinefrin Metabolitlerinin Ekstraksiyonu

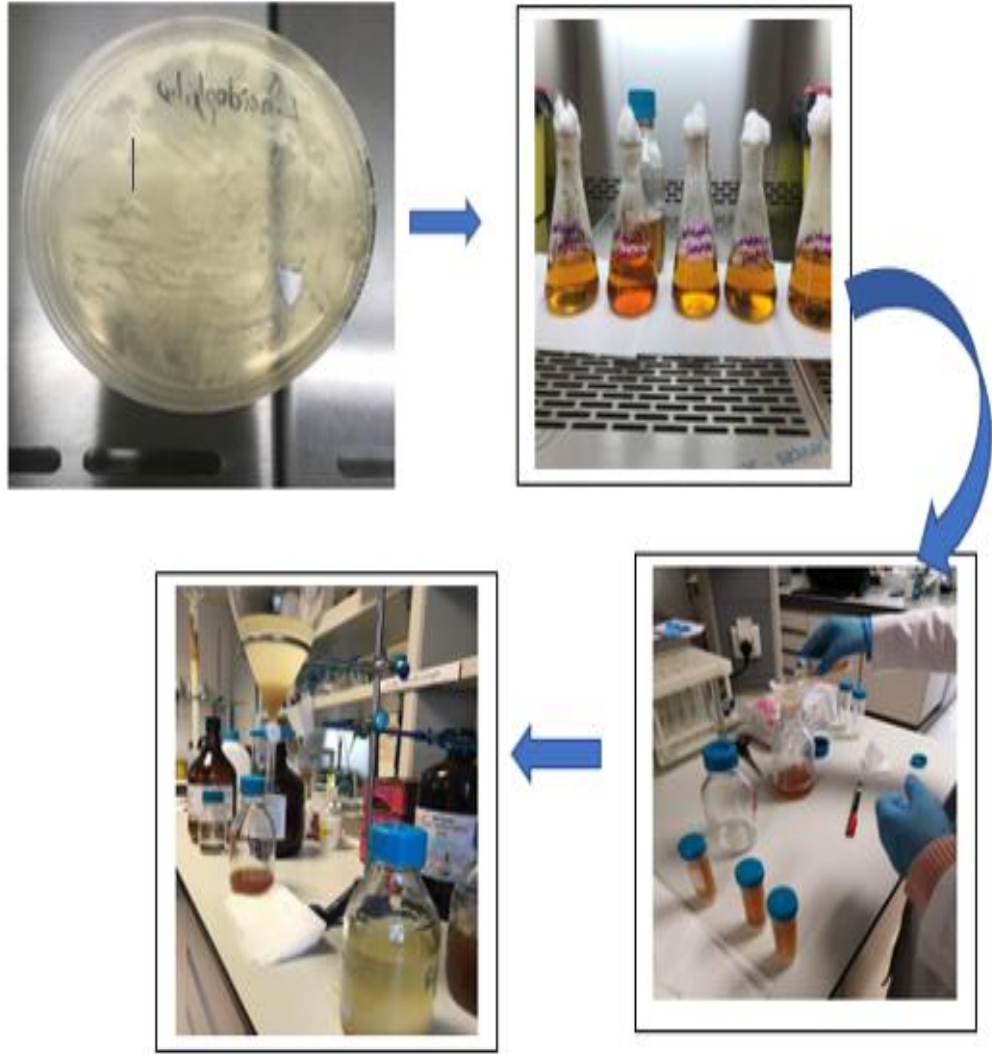
Sinefrinin biyotransformasyon ortamı için besi yeri hazırlandı. 7 adet erlen ve 3 adet cam şişe sterilizasyonu için otoklavda 120°C'de 60 dk. kadar bekletildikten sonra kontaminasyonu önlemek için güvenlik kabinine (Microtest, Class2A2) bırakıldı. Toz halinde satın alınan Brain Heart Infusion Broth ((Merck, Darmstadt) medya 37 g tartılarak 1,5 L distile suda çözüldü. Hazırlanan 1,5 L besi yeri, 500 mL lik 3 adet cam şişeye paylaştırıldıktan sonra otoklavda 120°C'de 60 dk. sterilize edildi. Daha sonra otoklavdan alınan sıvı besi yerler (3 cam şişe) güvenlik kabininde erlenlere 200 mL olacak şekilde dağıtıldı. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki bakteriler (*Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆), erlenlerden her birine steril şartlar altında

inokule edilmek için hazırlandı. Bu erlenlerde yeterli miktarda bakteri üreyebilmesi için 3 gün boyunca 37°C’de çalkalamalı inkübatörde (N-Biotek, US) inkübasyona (200 rpm) bırakıldı. Her bir erlen için (1 erlen kontrol amaçlı bırakıldı) 100 mg sinefrin (Sigma Aldrich, Darmstadf, Almanya), 1µL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözünerek yeterli miktarda bakteri içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave ettikten sonra 3 gün süresince 37°C’ de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (200 rpm) bırakıldı.

Kontrol grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- Grup-1: besi yeri + sinefrin
- Grup-2: besi yeri + bakteri
- Grup-2: besi yeri + bakteri + sinefrin

Biyotransformasyon çalışmasının kontrolü için sadece steril besi yeri ve substratı içeren bir erlen, steril besi yeri ve bakteriyi içeren başka bir erlen ve besi yeri, bakteri, sinefrin içeren erlen aynı şartlarda 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, bakteriyi, besi yerini ve sinefrin maddesini içeren erlenler falkon tüplerine alınıp 5 dakika boyunca 25°C’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra besi yeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutulup besi yeri bakteri kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan ürünler (sulu faz) için n-bütanol kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapıldı. Filtre edilen besi yeri her seferinde 1 L n-bütanol (Tekim, Bursa, Türkiye) kullanılarak 4 ayrı ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlar n-bütanol ve sulu faz ekstraktları döner buharlaştırıcıda çözücülerinden uzaklaştırıldı. Şekil 3.1’de bakteri ekimi, sinefrin maddesinin biyotransformasyonu, santrifüj ve ekstraksiyon işlemlerinin uygulanması esnasında çekilmiş görseller mevcuttur.



Şekil 3.1 : Bakteri ekimi, sinefrin maddesinin biyotransformasyonu, santrifüj ve ekstraksiyon işlemi.

3.6 Kromatografik Yöntemler

Sekonder metabolitlerin aydınlatılmasını ve karakterizasyonunu kolaylaştırmak için metabolitlerin ve/veya bileşenlerin izole edilmesi gerekmektedir. İzolasyon için en uygun ve en çok tercih edilen yöntemler ise kromatografi teknikleridir. Düşük moleküler ağırlıklı bileşikler için en verimli kromatografik teknikler; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) analitik teknikleridir. GC analitik tekniği için helyum gibi inert gazlar kullanılırken, HPLC’de mobil faz olarak sıvı bir çözücü kullanılmaktadır [5].

Bu çalışmada preparatif ince tabaka kromatografisi, ince tabaka kromatografi (İTK) ve kolon kromatografisi teknikleri madde izolasyonu için tercih edilmiştir.

Sinefrin maddesinin biyotransformasyon reaksiyonundan elde edilen kuru ekstrenin, reaksiyon ürünlerini saflaştırmak ve ayırmak için adsorban olarak silikajel 60 (Merck. 1. 07734) içeren kolon kromatografisi tekniği gerçekleştirilip toplanan fraksiyonların içerikleri ince tabaka kromatografisi ile incelendi [47].

3.6.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi tekniği, numuneden alınan maddeleri saflaştırmak ve maddelerin yapısını aydınlatmak için sıklıkla tercih edilen bir analitik adsorpsiyon kromatografisi tekniğidir. İnce tabaka kromatografisinde sabit faz ve hareketli faz bulunmaktadır. Sabit fazda genelde plaklar (alüminyum plak gibi) üzerinde katı adsorbanlar (silika jel, Al_2O_3 , selüloz tozu, magnezyum silikat, poliamid tozu vb.) bulunmaktadır. Bu çalışmada adsorban olarak silika jel kullanılmıştır. Hareketli faz ise sıvı çözücü veya çözücülerden oluşmaktadır.

İzolasyon işlemi yapılan bir madde, maddenin polaritesine yakın bir çözücüde çözündürüldükten sonra 10 μ L pipetler veya kapiler tüpler yardımıyla İTK plağına tatbik edilmektedir. Tatbik işlemi tamamlanan İTK plağı, içerisinde hareketli fazın bulunduğu İTK tankına bırakılıp hareketli fazın adsorban üzerinde ilerlemesi beklenmektedir. Hareketli faz yardımıyla ilerleyen maddelerin yer aldığı İTK plak tanktan çıkarıldıktan sonra plaklar üzerindeki lekeler Ultraviyole (UV) ışık altında çizilip maddeye uygun belirteçlerin kullanımıyla değerlendirilmektedir.

İnce tabaka kromatografisine tatbik edilmiş olan bileşiğin veya maddenin kullanılan çözücünün polaritesine göre ilerlediği mesafe göz önüne alınarak R_f (Retansiyon faktörü) değeri hesaplanmaktadır (3.1) [48].

$$R_f = \frac{\text{Tatbik noktasının çözücü sınırına olan mesafesi}}{\text{Maddenin tatbik noktasından sürüklendiği yere mesafesi}} \quad (3.1)$$

İzolasyon için analiz edilen maddenin R_f değeri, aynı koşullarda kromatografi yapılan standart maddelerin R_f değerleri ile karşılaştırılmaktadır. Farklı çözücü sistemlerinde aynı R_f değeri hesaplanan ve üst üste uygulandıklarında tek bir leke şeklinde yürüyen

veya yan yana tatbik edildiğinde aynı R_f değeri hesaplanan maddelerin aynı madde oldukları üzerinde durulmaktadır.

Bu tez çalışması sırasında benzer fraksiyonları birleştirmek ve saf maddeleri elde etmek için ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır.

---İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç

---Ninhidrin belirtecinin hazırlanması

0,2 gram ninhidrin, 100 mL n-bütanol içerisinde çözündürüldü. Daha sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılıp 2 saat bekletildikten sonra İTK plaklarında belirteç olarak bu tez çalışmasında kullanıldı. İTK analizlerinde sinefrin ve metabolitleri ninhidrinle pembe-mor renk verdi.

3.6.2 Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi karışım halinde bulunan maddelerin ayrılması için yapılan yaygın bir analitik kromatografi tekniğidir. Kolon kromatografisinde sabit faz olarak silika jel, Al_2O_3 , poliamit tozu, magnezyum silikat gibi bir adsorban madde, kolona doldurulmaktadır. Kolona adsorban madde ekleme işlemini müteakiben karışım halindeki maddeleri içeren numune kolonda sabit faz üzerinden hareketli fazın (metanol, aseton, kloroform vb.) elüe edilme işlemiyle ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir [48].

Bu tez çalışmasında hazırlanmış olan ekstrelerin fraksiyonlandırılması için kolon kromatografisi tekniği kullanılmıştır.

Ekstraksiyon sonucu elde edilen sulu ekstre ve bütanol ekstresi sırasıyla büyüklükleri farklı cam kolonlar vasıtasıyla ve uygun çözücüler (metanol, etil asetat (EA), diklorometan (DCM) vs.) kullanılarak ayırma işlemi yapıldı. Ayırma için uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir:

Ekstre az miktarda metanol içinde çözülerek yeterli miktarda silikajel 60 (Merck. 1, 07734) ile karıştırılıp çeker ocakta kurumaya bırakıldı.

Çözücünün tamamen buharlaştırıldığı kuru silikajel içerikli ekstre çeker ocaktan alındı. Kolona silika jel (Merck. 1, 07734) doldurulduktan sonra son olarak kuru ekstre tatbik edildi. N-bütanol ekstresinin ayrılması için mobil faz olarak %100 kloroform ile başlanıp, kloroformun yüzdesi düşürülüp %100 asetona doğru, daha sonra da aynı

şekilde aseton yüzdesi düşürölüp %100 metanole doğru çözöcö oramları değıştirilip kromatografi işlemleri sonlandırıldı.

Sulu faz ekstresi ise kolon kromatografisinde %50-%50 DCM: EA ile başlatılıp EA yüzdesi artırılarak daha polar hale getirilerek devam ettirilip %100 metanol ile kromatografi işlemleri sonlandırıldı.

Ekstreler için kolon kromatografisinde kullanılan çözöcölerin yüzdesi, kolonda yer alan ekstrenin kullanılan çözöcölerde çözölüp ilerlemesi ile yapılan ince tabaka kromatografi tekniğı (Merk, 1,05554,0001) sonuçlarına bağılı olarak değıştirildi. Kolondan 100 mL'lik balonlar yardımıyla toplanan fraksiyonlar döner buharlaştırıcı (Stuart RE300 DB Evaporatör) ile çözöcö ve çözöcö karışımının uçurulması sağlandı.

Toplanan fraksiyonlar İTK plağına tatbik edilip maddeler incelendikten sonra, lekelerin plak üzerindeki yerleri UV kabin altında ve ninhidrin belirteçler yardımıyla belirlendi. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonlar birleştirilip preparatif ince tabaka kromatografisi ve/veya flaş kromatografisi teknikleri ile saflaştırılma işlemleri sürdürölldü.

3.6.3 Preparatif ince tabaka kromatografisi

Preparatif ince tabaka kromatografisi tekniğı için 20X20 cm boyutunda alüminyum kaplı silika jel 60 F₂₅₄ (Merk, 1,05554,0001) plaklar kullanıldı. Fraksiyonların plaklarda ayrılması için plağın başlangıç noktasından 1-2 cm kadar yukarısında başlangıç çizgisi boyunca tatbik edildikten sonra mobil faz olarak amonyak, kloroform, metanol gibi çözöcölerin kullanıldığı İTK tanklarında yürütme işlemleri tamamlandı. Farklı polaritelerde gelen maddeler UV ışık altında gözlemlenip ve plakların bir kısmına ninhidrin belirteci püskürtölüp ısıtıcıda yakılması sonrasında belirlenen maddeler çizilip benzer R_f değeriinde olan maddeler toplandı.

3.6.4 Flaş kromatografisi

SLM 21-30 fraksiyonunun (667,8 mg) ayrılması için flaş kolon kromatografisi kullanıldı (Buchi, İsviçre, Reveleris X2). Sistem asetonitril: H₂O (2:98, h / h) gradient sistemi ile başlatıldı ve asetonitril, 7:3'ten 3:7'ye düşörlölen yüzde ile maddeler oktadesilsilanize silika jel (ODS) (Buchi, İsviçre, Reveleris C18 Ters-Faz 24g kartuş

ile) üzerinde ilerletildi. 30 dk. süren ayırma işlemi sonrasında toplanan fraksiyonlar döner buharlaştırıcıda uçurulup İTK plakta incelendi.

3.6.5 Sıvı kromatografi- kütle spektrometresi (OrbiTrap LC-MS)

Kütle spektrometresi kromatografik sistemlerle birlikte kullanılan, aynı zamanda hem atomik hem de moleküler türlerin kütlelerinin belirlenmesi ve ayrılmış olan maddelerin teşhisi için tercih edilen spektroskopik, analitik bir tekniktir [48, 49]. Analiz edilecek maddeye (atomik tür veya moleküler tür) göre atomik veya molekül kütle spektroskopisi olarak adlandırılabilir. Bu spektroskopi sistemleri detektör için kullanılacak olan sistemlerin ismini almaktadır [İndüktatif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi veya Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)].

Bu tez çalışmasında LC-MS, organik yapı karakterizasyonu için tercih edilmiştir. Organik yapıda ve saf olduğu düşünülen maddelerin yapısını tayin etmek için ¹H-NMR, APT gibi NMR spektrumlarının kayıt işleminden sonra kütle spektrumundaki sinyaller incelenerek yapı tayini yapılmıştır. Yapı tayini için moleküler pikin (M⁺) değerlendirilmesi yapı karakterizasyonunda en önemli faktördür [48].

Bu çalışmada moleküler bir kütle spektroskopi cihazı olan OrbiTrap LC-MS kullanılmıştır. Biyotransformasyon reaksiyonlarıyla elde edilen su (SLS) ve n-bütanol ekstraktları (SLM), OrbiTrap LC-MS cihazı ile içerik analizine tabi tutulmuştur. Çalışmada yer alan maddeler için uygulanan OrbiTrap LC-MS çalışma şartları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 : HPLC için uygulanan çalışma şartları.

Mobil Faz A	%1 Formik Asit- H ₂ O		
Mobil Faz B	%1 Formik Asit- MeOH		
Kolon	Troyasil C18 HS – 150 x 3 mm 5 µL		
Gradient	Zamanı	Akış (mL/dk.)	% B
	0,00	0,35	50
	1,00	0,35	50
	3,00	0,35	100
	6,00	0,35	100
	7,00	0,35	50
	15,00	0,35	50

Tablo 3.2 : MS için uygulanan çalışma şartları.

Sistem	Thermo ORBITRAP Q-EXACTIVE
İyon Kaynağı	ESI
Kütle Tarama Aralığı	100-250 <i>m/z</i>
Sheath gaz akış hızı	45
Aux gaz akış hızı	10
Sprey voltajı (kV)	3,80
Kapiler sıcaklık (°C)	320
Aux gaz ısıtıcı sıcaklığı (°C)	320
S-lens RF level	50,0
Tanımlamalar	İLMER Kütüphanesi
Çevre Şartları	
Sıcaklık	(22.0 ± 5.0) °C
Bağıl Nem	(50 ± 15) % rh

3.7 Sinefrin Metabolitlerinin Spektroskopik Yöntemler ile Yapılarının Tayini

Elde edilen saf bileşiklerin yapıları NMR (nükleer manyetik rezonans) ve kütle spektroskopisi teknikleriyle incelenerek belirlenmiştir. [50].

---NMR Spektroskopisi

NMR spektroskopisi, kalitatif amaç için kullanılan, manyetik bir alana yerleştirilen moleküle ait atom çekirdeklerinin radyo dalgaları ile elektromanyetik ışınları absorplaması tekniğine bağlı kurulmuş yapı karakterizasyon tekniğidir. NMR spektroskopisi molekülü parçalayan bir teknik olmayıp, molekül iskeleti hakkında bilgi veren spektrumları içeren maliyetli bir tekniktir. NMR tekniğinin maliyetli olmasının bir başka sebebi ise manyetik alanın soğutulması için sıvı azot kullanılmasıdır [48].

NMR tabanlı spektroskopiler yapı tayini için önemli bir role sahiptir. Çünkü aynı zamanda, belirli bileşik sınıflarına karşı yüksek analitik hassasiyetle geniş bir

metabolit yelpazeyle "yüksek verimli" spektroskopik / yapısal veriler elde edilebilmektedir [51].

Bu çalışmada saflaştırılan fraksiyon sonuçları Bezmialem Vakıf Üniversitesi, İlaç Uygulama Araştırma Merkezindeki Laboratuvarında Bruker Biospin AGZ115311/MS100022 NMR Cihazı ile analiz edilmiştir.

3.8 Aktivite Çalışmaları

3.8.1 Antidiyabetik aktivite tayini

Günümüzde akarboz gibi antidiyabetik ilaçlar, potansiyel olarak karın ağrısı, ishal ve şişkinlik gibi gastrointestinal yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle, α -glukozidaz ve α -amilaz gibi karbolitik enzimlerin aktivitelerinin inhibe edilmesi dahil olmak üzere antidiyabetik özelliklere sahip diyet bitkilerinden gelen doğal inhibitörler özellikle de günlük diyetle katılırlarsa, ticari ilaçlara göre minimum yan etkilerle daha kabul edilebilir alternatifler olabilmektedir [52]. Sinefrin gibi doğal bir bileşikten elde edilecek metabolitlerin de antidiyabetik aktivitelerinin yüksek olması, minimum yan etkili antidiyabetik olarak kullanılabilmelerine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

--- α -Glukozidaz İnhibisyonu aktivitesi

Elde edilen saf madde ve fraksiyonların α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri, Avcı ve arkadaşlarının çalışmasına bağlı küçük değişiklikler yapılarak belirlendi [53]. Bu amaçla maddelerin 1000 μ g/mL konsantrasyonundaki stok çözeltileri metanol ile hazırlandı. Her bir madde yarı yarıya seyreltilerek, metanol ile 1000 mL'ye tamamlanıp 8 ayrı konsantrasyon oluşturuldu. Enzim olarak α -glukozidaz substrat olarakta, p-nitrofenil- α -D-glikopiranosid (pNGP, Sigma, N1377) substratı kullanıldı. Standart ilaç olarak genistein kullanıldı. Enzim ve substrat fosfat tamponu içerisinde çözüldü (0,05 M, pH 6,8). Enzimatik reaksiyon karışımı α -glukozidaz (0,02 U, 20 μ L), substrat (1,25 mM, 30 μ L), test edilecek madde bileşikleri (10 μ L) ve pH: 6,8 tamponundan (140 μ L) oluşmuş olup 37° C'de 30 dk. inkübe edildi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra absorbans değerleri 405 nm'de 96 kuyucuklu mikro plaka okuyucu olan Synergy H1 (BioTek, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü. Deney işleminde okuma süreci 3 kez tekrarlanıp kaydedildi. α -Glukozidaz inhibisyonu = $[(A_k - A_s) / A_k] \times 100$ formülü ile hesaplandı. Burada A_k , kontrolün absorbanı ve A_s

örneğin absorbansdır. IC₅₀ değerlerinin hesaplanması Graphpad Yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

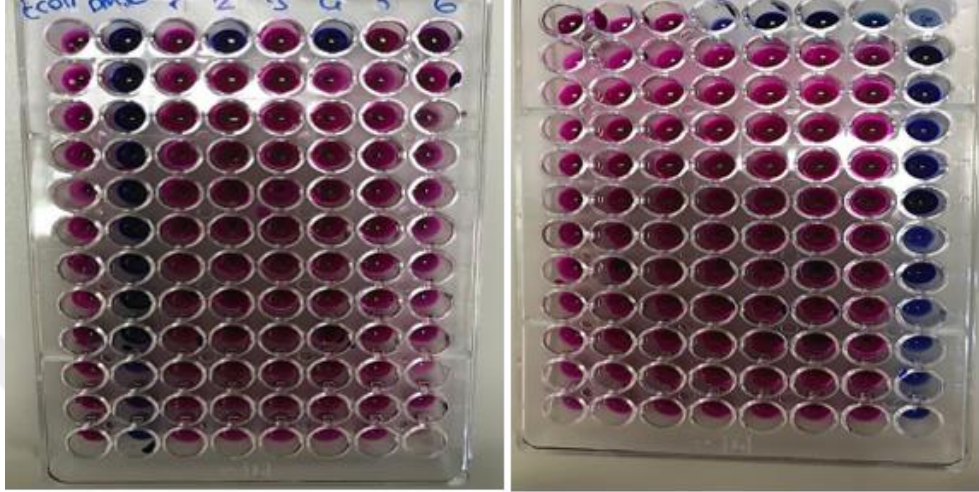
---Fosfat tamponunun hazırlanması

0,1M Na₂HPO₄.2H₂O ve 0,1M NaH₂PO₄.2H₂O çözeltileri ana stok olarak hazırlandı. Daha sonra pH:6,8 tamponunu hazırlamak için Na₂HPO₄'ten 6,1mL, NaH₂PO₄'ten 3,9 mL alınıp karıştırılarak hacim 20 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon çözeltisi pH metre ile kontrol edilip, gerekli görüldüğünde NaH₂PO₄ eklenerek pH'ın 6,8'e ayarlandı.

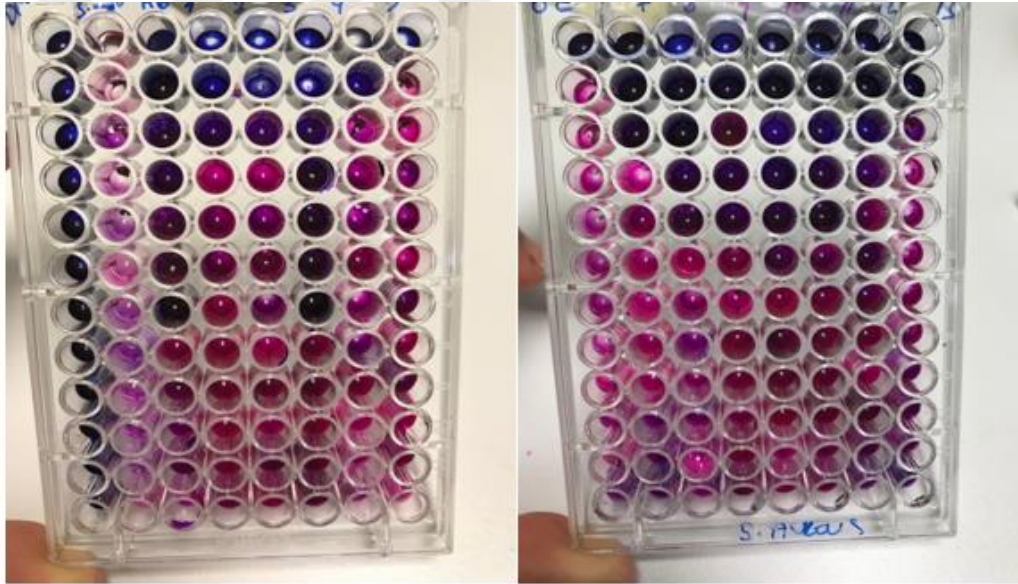
3.8.2 Antibakteriyel aktivite tayini

Elde edilen saf maddelerin ve fraksiyonların *Staphylococcus aureus* ATCC₂₅₉₂₃, *Escherichia coli* ATCC₃₅₂₁₈ standart kökenlerine karşı antibakteriyel aktivitelerinin ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde rezasurin (7-hidroksi-3H- fenoksazin -3-bir-10-oksit) mikropalak yöntemi kullanıldı. Aktivite tayini iki tekrar olacak şekilde belirlendi. Standart ilaçlar olarak *S. aureus* için vankomisin ve *E. coli* için seftazidim kullanıldı. Bileşiklerin 1000 µg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltileri yüzde 0,1'lik DMSO ile hazırlandı ve 0,22 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edildi. İlk olarak her bir kuyucuğa 50 µL Müller Hinton Broth besi yeri eklendi. Hazırlanan çözeltilerin seyreltilme işlemleri 96 kuyulu mikro plakların ilk kuyucuğuna 1000 µg/mL ilave edilerek yapıldı (bileşiklerin MİK değer aralığı 0,48 –1000 µg/mL). Standart ilaçların (vankomisin ve seftazidim) son konsantrasyonları 30 µg/mL olarak aralanıp ilk kuyucuğa 50 µL ilave edilerek seyreltilmeleri yapıldı. Plagın bir kolonuna negatif kontrol olarak sadece %0,1'lik DMSO bir kolonuna da pozitif kontrol olarak sadece standart bakteriler 50'şer µL konulup seyreltilme işlemleri yapıldı. Bakterilerin 1-2 günlük kolonilerinden McFarland 0,5 bulanıklık değerinde süspansiyonu hazırlandı ve daha sonra 1:100 oranında seyreltildi. Bu hazırlanan son süspansiyonlardan 10 µL plak kuyularına ilave edildi. Plaklar parafilm ile kapatılarak 37 °C'de normal atmosferde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bütün kuyulara 5 ml distile suda çözödürölen 33,75 mg rezasurin' den ve %20'lik Tween 80'den 10'ar µL ilave edildi ve plaklar 2-4 saat inkübasyona bırakılarak sonuçlar görsel olarak değöerlendirildi. MİK değeri, maviden

pembeye renk değişimini engelleyen en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlendi. Antibakteriyel aktivite için kullanılan 12 farklı fraksiyon ve içerdikleri maddeler Tablo 4.3’de gösterilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC₂₅₉₂₃, *Escherichia coli* ATCC₃₅₂₁₈ standartları ile yapılan analiz tayinleri Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’te gösterilmiştir.



Şekil 3.2 : *Escherichia coli* için antibakteriyel tayin analizleri.

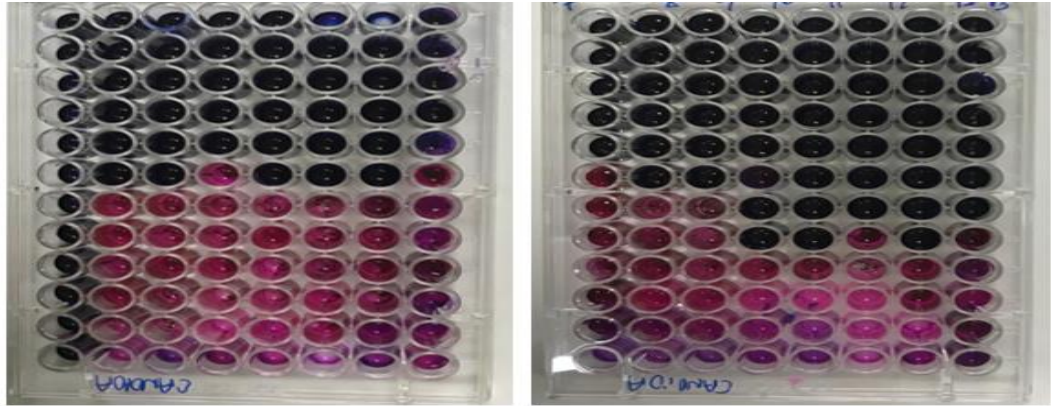


Şekil 3.3 : *Staphylococcus aureus* için yapılan antibakteriyel tayin analizleri.

3.8.3 Antifungal aktivite tayini

Candida albicans ATCC₉₀₀₂₈ standart kökenine karşı antifungal aktivitelerinin ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde rezasurin (7-hidroksi-3H- fenoksazin -3-bir-10-oksit) mikropalak yöntemi kullanıldı. Standart ilaç

olarak flukanazol kullanıldı. Bileşiklerin 1000 µg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltileri %0,1'lik DMSO ile hazırlandı ve 0,22 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edildi. İlk olarak her bir kuyucuğa 50 µL Müller Hinton Broth besi yeri eklendi. Hazırlanan çözeltilerin seyreltilme işlemleri 96 kuyulu mikro plakların ilk kuyucuğuna 1000 µg/mL ilave edilerek yapıldı (bileşiklerin MİK değer aralığı 0,48 –1000 µg/mL). Standart ilacın son konsantrasyonu 30 µg/mL olarak aralanıp ilk kuyucuğa 50 µL ilave edilerek seyreltilmeleri yapıldı. Plağın bir kolonuna negatif kontrol olarak sadece %0,1'lik DMSO bir kolonuna da pozitif kontrol olarak sadece standart köken 50'şer µL konulup seyreltilme işlemleri yapıldı. Taze *C. albicans* kolonilerinden McFarland 0,5 bulanıklık değerinde süspansiyonu hazırlandı ve daha sonra 1:100 oranında seyreltilti. Bu hazırlanan son süspansiyonlardan 10 µL plak kuyularına ilave edildi. Plaklar parafilm ile kapatılarak 37 °C'de normal atmosferde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bütün kuyulara 5 ml distile suda çözdürülen 33,75 mg rezasurin' den ve %20'lik Tween 80'den 10'ar µL ilave edildi ve plaklar 12-24 saat inkübasyona bırakılarak sonuçlar görsel olarak değerlendirildi. MİK değeri, maviden pembeye renk değişimini engelleyen en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlendi. Antifungal aktivite için kullanılan 12 farklı fraksiyon ve içerdikleri maddeler Tablo 4.'de gösterilmiştir. *Candida albicans* mantarı ile antifungal aktivite tayin analizleri Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4 : *Candida albicans* mantarı ile antifungal aktivite tayin analizleri.

3.9 İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirmeler Grahpad Prism 5 istatistik analiz programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

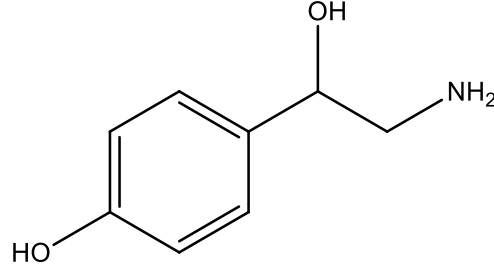
Yapılan OrbiTrap LC-MS analizleri sonucunda bazı fraksiyonların saf oldukları bazılarının ise karışım halinde oldukları tespit edildi. Kromatogram ve spektrumlar değerlendirildiğinde, analizi yapılan fraksiyonların içerdikleri maddeler Tablo 4.1’te verildi.

Tablo 4.1 : OrbiTrap LC-MS analiz sonuçlarına göre fraksiyon içerikleri.

Aktivite çalışmalarında yer alan fraksiyonların kodlamaları		
1	SLM-21-30-1	Oktopamin
2	SLS-1-22	Sinefrin, Tiramin
3	SLS- 23-26	Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar
4	SLS-31-38	Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar
5	SLS-39-1	Tiramin
6	SLS-40-46	Sinefrin, Oktopamin
7	SLS-47-50	Tiramin, Oktopamin
8	SLS-55-60	Tiramin, Oktopamin+ Safsızlıklar
9	SLS-61-68	Sinefrin, Oktopamin + Safsızlıklar
10	SLS-69-73	Tiramin+ Safsızlıklar
11	SLS-51-54	Sinefrin, Oktopamin + Safsızlıklar
12	Substrat	Sinefrin

Sinefrin bileşiğinin *Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆ bakterisi ile mikrobiyal biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler, analitik yöntemlerle saflaştırıldıktan sonra yapı tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen bileşikler aşağıda gösterilmektedir.

4.1 SLM-21-30-1 = Oktopamin

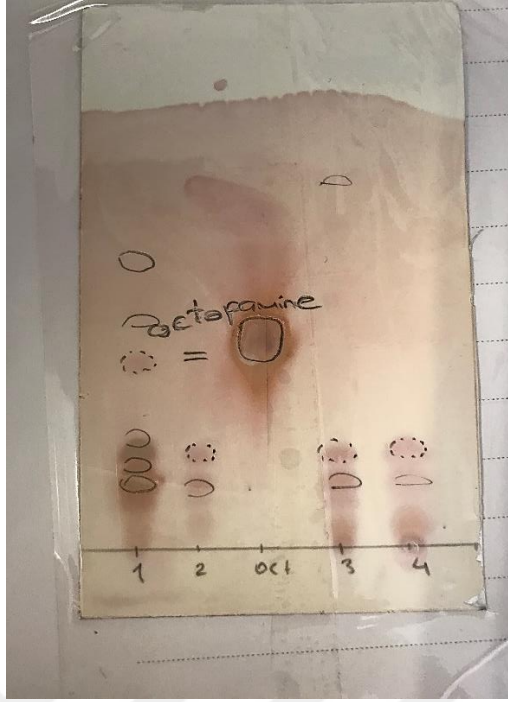


Şekil 4.1 : Oktopamin.

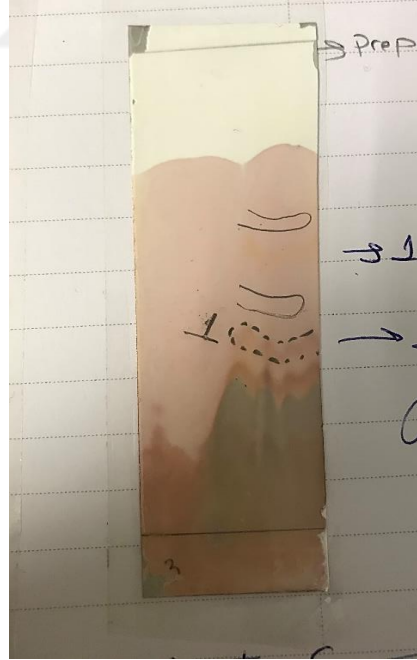
Bütanol ekstresinin (SLM) kolonundan elde edilen fraksiyonlardan benzer olanlar birleştirildi ve SLM-21-30 kodlu fraksiyon flaş kromatografi tekniği ile saflaştırıldı. Flaş kromatografisinde asetonitril: H₂O (2:98, h/h) gradient sistemi ile oktadesilsilanize silika jel kullanılan sistem ile ayırma işlemi sürdürüldü. Flaş kromatografi tekniği ile elde edilen SLM-21-30-1 maddesi 145:3:42:25; kloroform:n-bütanol:metanol:amonyak ile hazırlanan çözeltide; saf madde olan sinefrin ile birlikte 1000 µL metanolde ayrı ayrı çözündürülerek İTK plağa tatbik edilip yürütüldü (Şekil 4.2) [54]. Ninhidrin belirteci püskürtülüp 100 °C'de ısıtıcıda yakılan plaklarda Keller ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak fraksiyonda sinefrin ve sinefrine benzer yapıların olabileceği anlaşıldı ve aynı mobil faz sisteminde prep. İTK uygulandı (Şekil 4.2-4.3) [54].

Maddenin dötrometanolda alınan ¹H-NMR spektrumunda, aromatik halka protonları, 6,81 (d,2H, J=8,5 Hz) ve 7,27 ppm'de (d,2H, J=9 Hz) izlendi. 4,80-4,90 ppm aralığında NH₂ ve CH protonları ve 4,81'de -OH protonu izlendi. NH₂'ye bağlı -CH₂ protonları 3,00 ve 3,15 ppm'lerde triplet olarak izlendi. Bileşiğin APT spektrumunda, 115 ve 127 ppm'lerde aromatik halka karbonları, 131 ppm'de katerner karbon, 157 ppm'de aromatik halkadaki OH'ın bağlı olduğu karbon, 70 ppm'de -CH karbonu ve 46 ppm'de -CH₂ karbonu pikleri izlendi. Bileşiğin kütle spektrumunda [M+ H⁺] 154,085 ve [M-H₂O] 136,075 pikleri izlendi.

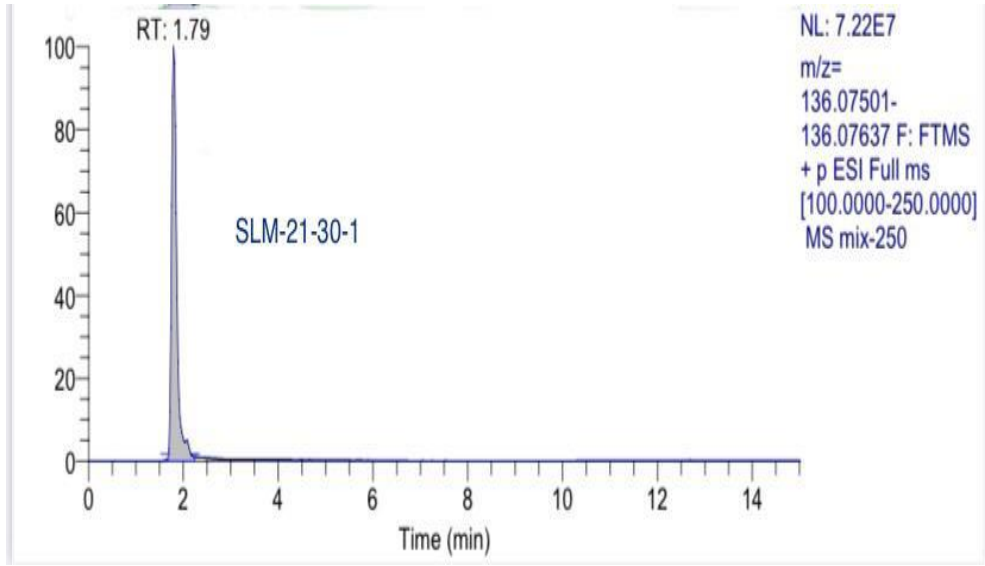
Saflaştırılan maddenin ¹H-NMR, APT ve MS spektrumları değerlendirildiğinde maddenin C₈H₁₁NO₂ kapalı formülüne sahip oktopamin bileşiği olduğu anlaşıldı (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3,Şekil 4.4, Şekil 4.5,Şekil 4.6, Şekil 4.7).



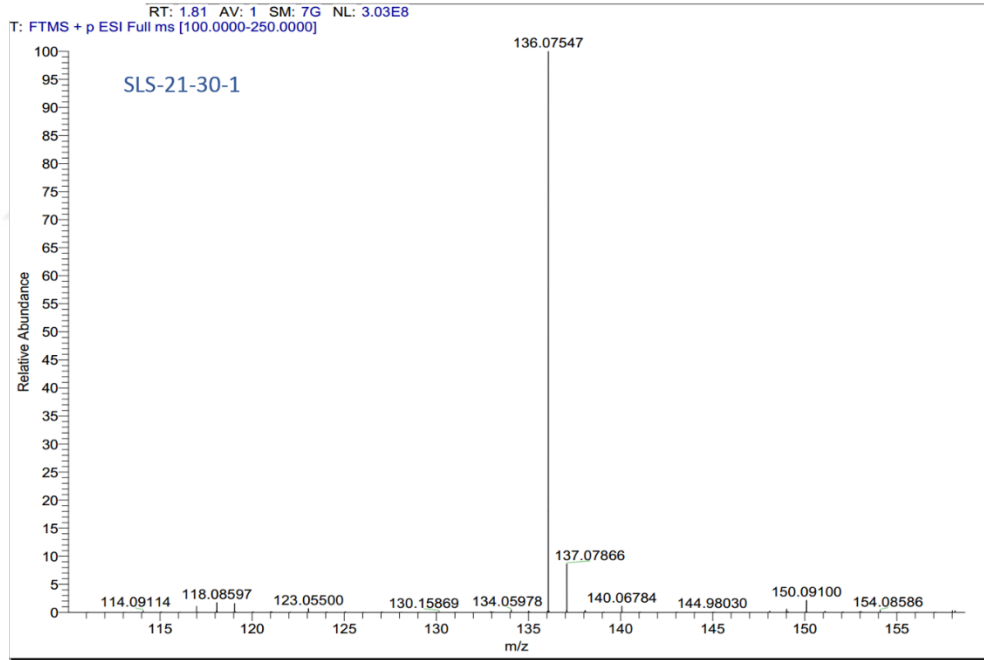
Şekil 4.2 : SLM-21-30 fraksiyonundan flaş kromatografi tekniğiyle elde edilen fraksiyonların İTK'sı.



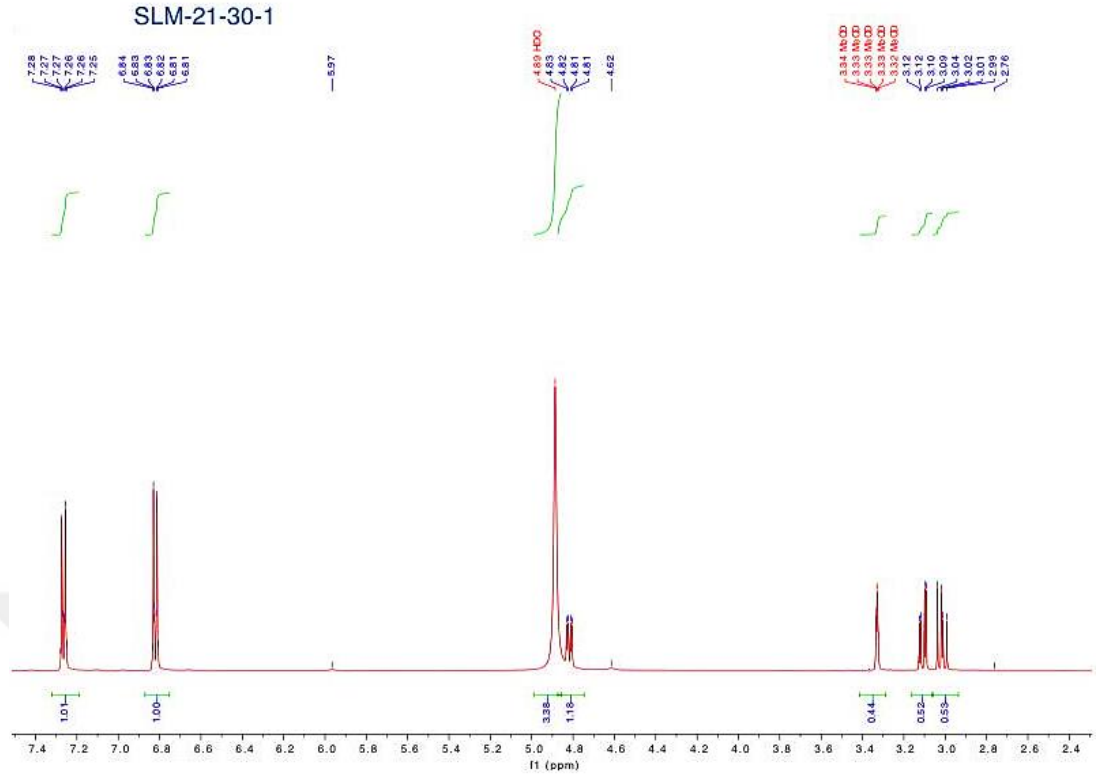
Şekil 4.3 : SLM-21-30-1 fraksiyonunun preparatif İTK sonucunu gösteren plak.



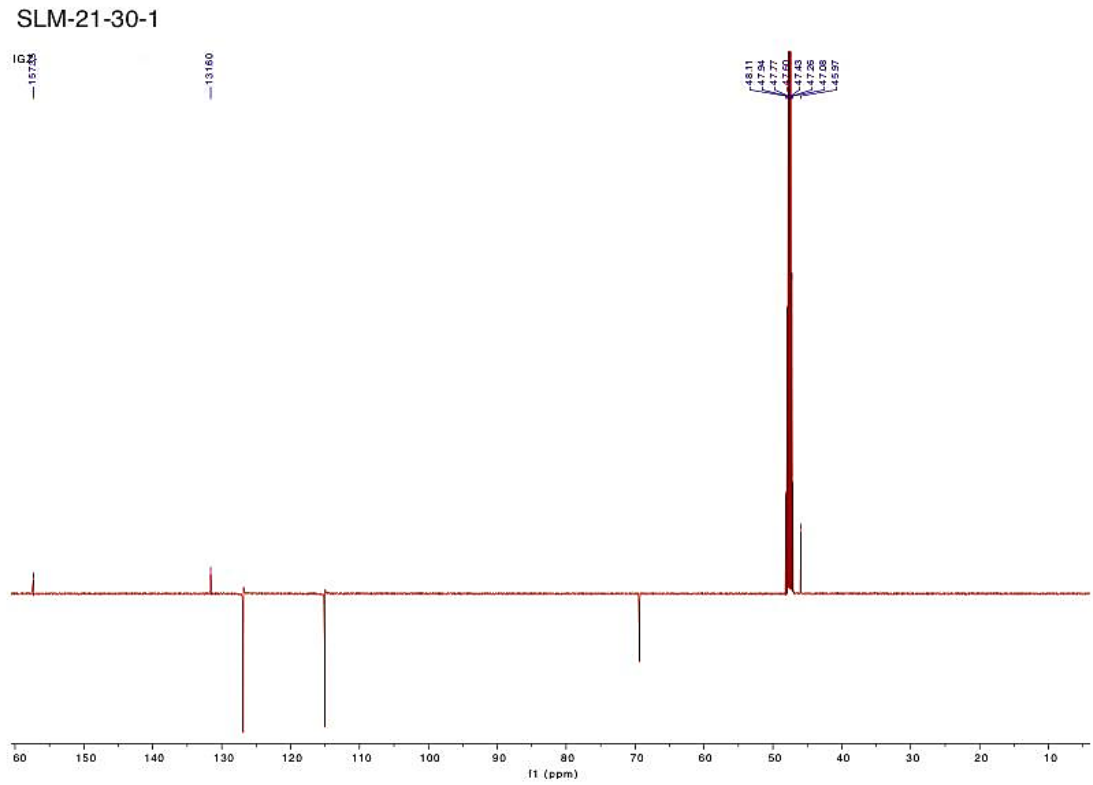
Şekil 4.4 : SLM-21-30-1 maddesinin LC-HRMS kromatogram sonucu.



Şekil 4.5 : SLM-21-30-1 maddesinin pozitif HRMS spektromu.

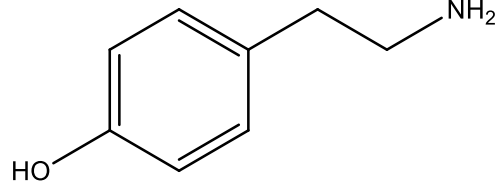


Şekil 4.6 : SLM-21-30-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (CD_3OD , 500 MHz).



Şekil 4.7 : SLM-21-30-1 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3OD , 125 MHz).

4.2 SLS-39-1 =Tiramin



Şekil 4.8 : Tiramin.

Sinefrinin biyotransformasyon reaksiyonu sonrasında elde edilen sulu ekstreye (SLS) kolon kromatografisi uygulandı ve bu kolondan SLS-39 numaralı fraksiyon elde edildi. HPLC cihazında analize tabi tutulan SLS-39, mobil faz: sitrik asit (0,02 M), sodyum dihidroksi fosfat (0,02 M) (NaH_2PO_4), (7:3 h/h) distile su pH: 3,00) olarak ayarlanıp izokrotik sistemde analiz edildi. SLS-39 bileşiğinin HPLC analiz sonuçları Putzbach ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışma referans alınarak değerlendirildi [55]. HPLC analiz sonuçlarından elde edilen kromatogramlar ve kromatogramların alıkonma zamanları; tezde yer alan sinefrin ile kıyaslandığında maddelerin; oktopamin, *p*-sinefrin, tiramin gibi maddelerin olabileceği saptandı [55]. Maddelerin ayrılması için preparatif ince tabaka kromatografi uygulandığında (Şekil 4.9, mobil faz: DCM: EA: MeOH; 1:1:0.5) 2 farklı fraksiyon elde edildi. Preparatif İTK ile ayrılan maddeler SLS- 39-1 ve SLS 39-2 şeklinde adlandırılıp HPLC cihazında tekrar analize tabi tutuldu. SLS-39-1'in SLS-39-2'ye göre daha saf olduğu kromatogramlar incelenerek tespit edildi ve izolasyon ve yapı tayini işlemlerine SLS-39-1 bileşiği ile devam edildi. SLS-39-1 bileşiğinin daha detaylı yapı karakterizasyonu için LC-HRMS ve NMR spektrumları alındı.

Maddenin dötorometanolde alınan ^1H -NMR spektrumunda, aromatik halka protonları 6,75 (*d*, 2H, $J=8,5$ Hz) ve 7.10 ppm'de (*d* 2H, $J=9$ Hz), metilen pikleri 2.85-3.0 ppm'de izlendi. Bileşiğin APT spektrumunda, 115 ve 130 ppm'lerde aromatik halka karbonları, 126 ppm'de katerner karbon, 156 ppm'de aromatik halkadaki OH'ın bağlı olduğu karbon, 40 ppm ve 32 ppm'lerde $-\text{CH}_2$ karbon pikleri izlendi. Bileşiğin kütle spektrumunda $[\text{M}^+ \text{H}^+]$ 138,091'da izlendi.

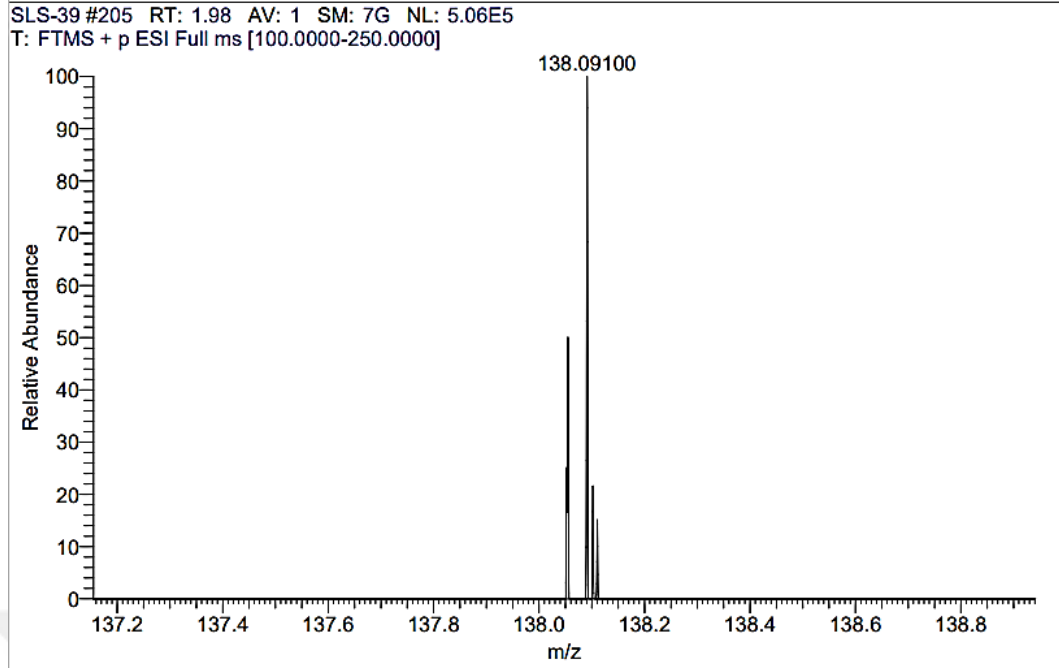
Saflaştırılmış maddenin $^1\text{H-NMR}$, APT ve MS spektrumları değerlendirildiğinde maddenin $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ kapalı formülüne sahip ve tiramin bileşiği olduğu anlaşıldı (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13).



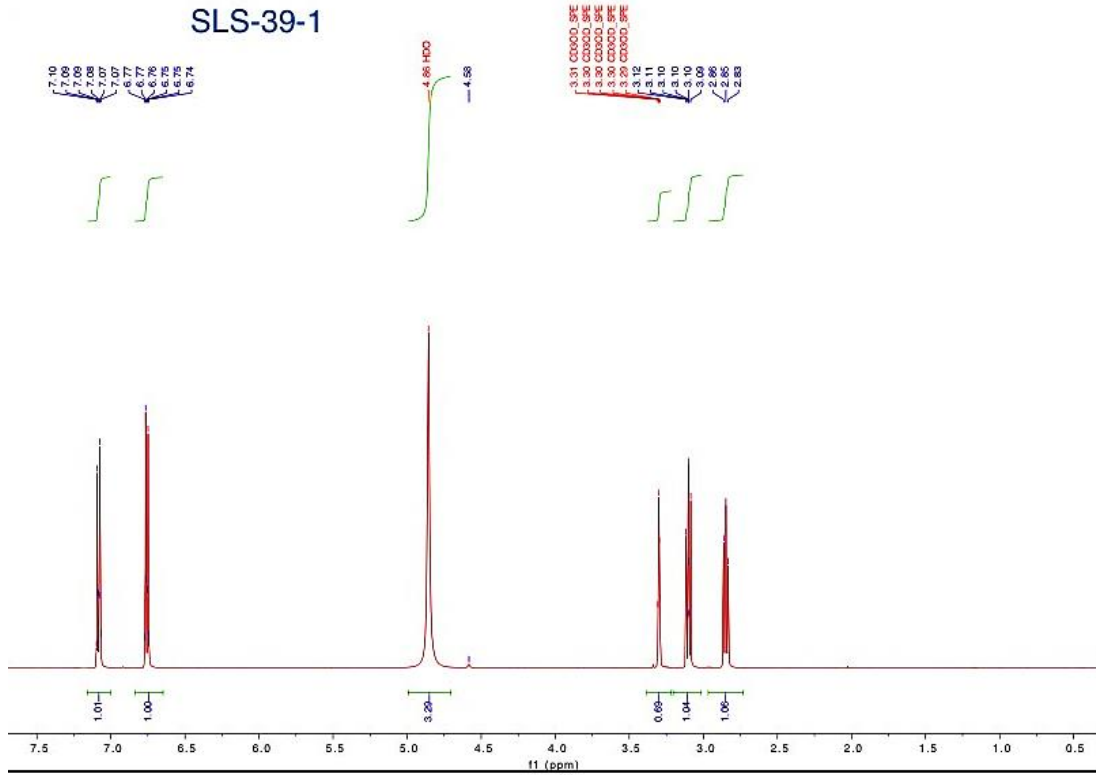
Şekil 4.9 : SLS-39-1 maddesinin İTK analiz sonucu.



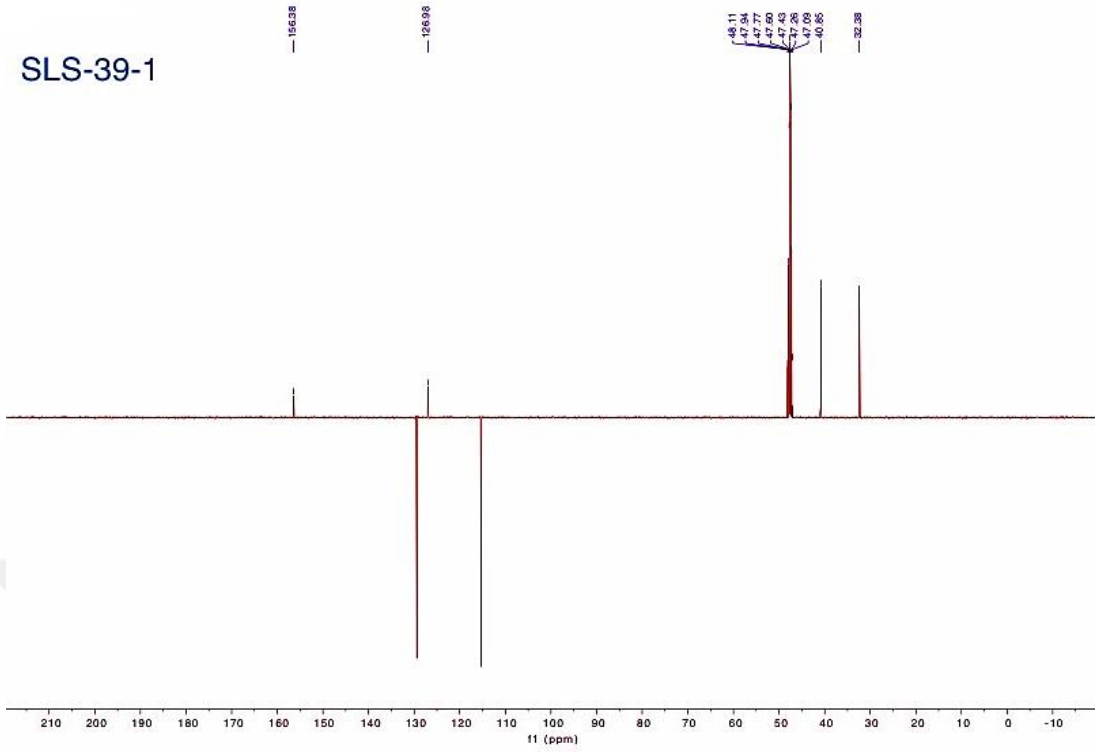
Şekil 4.10 : SLS-39-1 maddesinin LC-HRMS kromatogram sonucu.



Şekil 4.11 : SLS-39-1 maddesinin pozitif HRMS spektrumu.

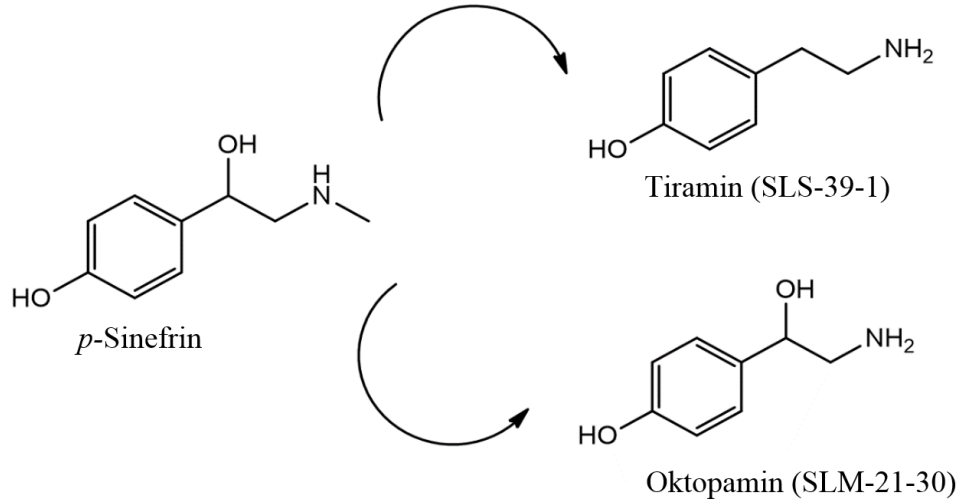


Şekil 4.12 : SLS-39-1 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (CD₃OD, 500 MHz).



Şekil 4.13 : SLS-39-1 bileşiğinin APT spektrumu (CD₃OD, 125 MHz).

Böylece sonuç olarak sinefrinin mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonuyla 2 farklı metabolit oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 : Sinefrinin biyotransformasyon reaksiyonuyla bulunan metabolitler.

4.3 α -Glukozidaz İnhibisyonu Sonuçları

Sinefrin biyotransformasyonundan elde edilen fraksiyon ve saf maddelerin α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri ölçüldü ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri ölçülebilen 3 madde ve genisteinin alfa-glukozidaz inhibisyon sonuçları Tablo 4.2’da gösterilmiştir.

Tablo 4.2 : α -Glukozidaz inhibisyonu hesaplanabilen fraksiyonlar ve genisteinin IC₅₀ değerleri.

Fraksiyonlar/Kontrol	IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)
Genistein	4,013 ± 0.02
SLS-1-22 (Sinefrin+ Tiramin)	109,7 ± 3.80
SLS-39-1 (Tiramin)	484,909 ± 9.43
SLM-21-30-1 (Oktopamin)	>500

Tabloda gösterilen sonuçlara göre SLS-1-22 (sinefrin+tiramin) ve SLS-39-1 (tiramin) bileşikleri orta-iyi derecede anti diyabetik aktivite göstermişlerdir. SLS-1-22 fraksiyonunun diğer fraksiyonlara göre α -glukozidaz enzimini daha iyi inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Fraksiyonların standart ilaç olarak kullanılan genisteine göre düşük inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.

4.4 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

S. aureus ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı etkin MİK değerleri Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3 : Sinefrin biyotransformasyonu sonucunda elde edilen fraksiyon ve maddelerin *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı hesaplanan MİK (µg/mL) değerleri.

		<i>S.aureus</i> ATCC ₂₅₉₂₃	<i>E.coli</i> ATCC ₃₅₂₁₈
1	SLM-21-30-1 (Oktopamin)	250	500
2	SLS-1-22 (Sinefrin, Tiramin)	250	1000
3	SLS-23-26 (Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar)	250	500
4	SLS--31-38 (Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar)	15,625	1000
5	SLS-39-1 (Tiramin)	31,25	500
6	SLS-40-46 (Sinefrin, Oktupamin)	1000	1000

Tablo 4.3 (devam) : Sinefrin biyotransformasyonu sonucunda elde edilen fraksiyon ve maddelerin *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı hesaplanan MİK ($\mu\text{g/mL}$) değerleri.

		<i>S.aureus</i> ATCC ₂₅₉₂₃	<i>E.coli</i> ATCC ₃₅₂₁₈
7	SLS-47-50 (Tiramin, Oktopamin)	1000	1000
8	SLS-55-60 (Tiramin, Oktopamin + 250 Safsızlıklar)	1000	1000
9	SLS-61-68 (Sinefrin, Oktopamin + 62,5 Safsızlıklar)	1000	1000
10	SLS-69-73 (Tiramin, Safsızlıklar)	62,5	1000
11	SLS-51-54 (Sinefrin, Oktopamin + 250 Safsızlıklar)	1000	1000
12	Sinefrin	31,25	500
Standart ilaç	Vankomisin	15,625	
	Seftazidim		<0,488

Elde edilen sonuçlara göre; SLM-21-30-1, SLS-23-26, SLS-39-1 ve sinefrin maddelerinin *E. coli* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarının 500 $\mu\text{g/mL}$ ve üzeri; SLS 1-22, SLS-31-38, SLS-40-46, SLS-47-50, SLS-55-60, SLS-61-68, SLS-69-73 ve SLS-51-54 maddelerinin ise *E. coli* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları 1000 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

SLS-31-38, SLS-39-1, sinefrin, *S. aureus* mikroorganizmasına karşı oldukça etkin sonuç göstermiştir. SLS-61-68, SLS-69-73 fraksiyonları *S. aureus* 'a karşı iyi derecede etkin bulunmuştur. SLM 21-30-1, SLS 1-22, SLS-23-26, SLS-55-60, SLS-51-54, *S. aureus* mikroorganizmasına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları 250 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

SLS-40-46, SLS-47-50, *S. aureus* mikroorganizmasına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları 1000 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

4.5 Antifungal Aktivite Sonuçları

Sinefrinin biyotransformasyonu sonucu elde edilen fraksiyon ve saf maddelerin *C. albicans* mikroorganizmasına karşı etkin MİK değerleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4 : Sinefrin biyotransformasyonu sonucunda elde edilen fraksiyon ve maddelerin antifungal aktivite sonuçları

<i>C.albicans</i> ATCC ₉₀₀₂₈ ---- $\mu\text{g/mL}$.		
1	SLM-21-30-1 (Oktopamin)	3,906
2	SLS-1-22 (Sinefrin, Tiramin)	15,625
3	SLS-23-26 (Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar)	31,25
4	SLS--31-38 (Sinefrin, Tiramin+ Safsızlıklar)	15,625
5	SLS-39-1 (Tiramin)	3,906
6	SLS-40-46 (Sinefrin, Oktopamin)	15,625
7	SLS-47-50 (Tiramin, Oktopamin)	31,25
8	SLS-55-60 (Tiramin, Oktopamin + Safsızlıklar)	31,25
9	SLS-61-68 (Sinefrin, Oktopamin + Safsızlıklar)	15,625
10	SLS-69-73 (Tiramin, Safsızlıklar)	15,625
11	SLS-51-54 (Sinefrin, Oktopamin + Safsızlıklar)	0,488
12	Sinefrin	7,81
Standart ilaç	Flukanozol	3,906

Antifungal aktivite sonuçlarına göre SLM-21-30-1 (3,906 $\mu\text{g/mL}$), SLS-39-1 (15,625 $\mu\text{g/mL}$), SLS-51-54 (0,488 $\mu\text{g/mL}$) ve sinefrin *C. albicans*'a karşı oldukça aktif bulunmuştur. SLS-1-22 (15,625 $\mu\text{g/mL}$), SLS-23-26 (31,25 $\mu\text{g/mL}$), SLS-31-38 (15,625 $\mu\text{g/mL}$), SLS-40-46 (15,625 $\mu\text{g/mL}$), SLS-47-50 (31,25 $\mu\text{g/mL}$), SLS-55-60 (31,25 $\mu\text{g/mL}$), SLS-61-68 (15,625 $\mu\text{g/mL}$), SLS-69-73 (15,625 $\mu\text{g/mL}$) fraksiyonları da *C. albicans* 'a karşı iyi derecede aktif sonuç göstermiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, p-sinefrin alkaloidinin *Lactobacillus acidophilus* ATCC₄₃₅₆ türü ile *in vitro* mikrobiyal biyotransformasyonu ilk kez gerçekleştirildi. Biyotransformasyon sonucu elde edilen karışım bütanol ile ekstre edildi. Ekstraksiyon sonrasında bütanol ekstresi ve sulu ekstre elde edilip kromatografik teknikler ile izolasyon, spektroskopik teknikler ile de yapı tayinleri yapıldı.

p-Sinefrinin *Lactobacillus acidophilus* biyotransformasyon sonrası elde edilen sulu ekstreden tiramin bileşiği (SLS-39-1); bütanol ekstresinden ise oktopamin bileşiği (SLS-21-30), mikrobiyal biyotransformasyon yöntemi ile saf olarak elde edildi.

Sinefrin metabolitinin biyotransformasyonu sonucu elde edilen saf maddeler ve iki farklı ekstreden elde edilen fraksiyonların antibakteriyel, antifungal ve antidiyabetik aktivite testleri yapıldı.

2015 yılında *Limonium caspium* bitkisinden izole edilen ve aralarında tiraminin de yer aldığı metabolitlerin antibakteriyel (*Staphylococcus aureus*) ve antifungal (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, ve *Aspergillus fumigatus*) aktivite testleri yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda çalışmada tiraminin antifungal ve antibakteriyel aktivite göstermediği raporlanmıştır [56]. Bu tez çalışmasında ise yapılan antibakteriyel aktivite test sonuçlarında saf olarak elde edilen tiramin bileşiği *S. aureus* bakteri türüne karşı oldukça aktif bulunmuştur. Diğer metabolit olan oktopamin için *in vivo* ve *in vitro* antimikrobiyal ve antifungal testleri yapılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde oktopaminin yer aldığı *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri ile yapılan bir *in vitro* aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında saf olarak elde edilen oktopamin maddesinin *S. aureus* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 250 µg/mL bulundu. Aktivite testine tabi tutulan sinefrin ve SLS-31-38 fraksiyonunun tiramin ile aynı MİK değerine sahip olduğu anlaşıldı ve *S. aureus* mikroorganizmasına karşı oldukça aktif bulundu. Sinefrinin sitrus ekstreleri ile yer aldığı antibakteriyel aktivite araştırmalarında anlamlı sonuçlar bulunmuştur [57, 58]. Ancak sinefrinin *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmaları ile yapılmış bir aktivite çalışmasına literatürde

rastlanmamıştır. Bu çalışmada SLS-61-68 ve SLS-69-73 fraksiyonlarının *S. aureus* 'a karşı iyi derecede aktif olduğu gözlenmiştir. SLS 1-22, SLS-55-60 ve SLS-51-54 *S. aureus* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 250 µg/mL ve üzeri bulundu. SLS-40-46, SLS-47-50'un *S. aureus* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 1000 µg/mL bulundu. *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite testinde bütün maddeler ve fraksiyonlar için iyi derecede bir etkinlik bulunamamıştır. Ancak saf maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri diğer fraksiyonlara göre *E. coli* bakterisine karşı daha etkin bulundu. Oktopamin, tiramin, sinefrin ile SLS-23-26 maddelerinin *E. coli* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları 500 µg/mL; SLS 1-22, SLS-31-38, SLS-40-46, SLS-47-50, SLS-55-60, SLS-61-68, SLS-69-73 ve SLS-51-54 maddelerinin ise *E. coli* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları 1000 µg/mL bulundu.

Yapılan antifungal aktivite testleri sonucunda saf madde olarak elde edilen oktopamin ve tiramin ile birlikte ana madde olan sinefrin de *C. albicans* mikroorganizmasına karşı oldukça etkin bulundu. İçerisinde saflaştırılamayan maddelerin yanı sıra saf maddelerinde yer aldığı SLS-51-54 fraksiyonunda minimum konsantrasyon değerleri saf maddeler kadar *C. albicans*'a karşı etkin değerde bulundu. SLS-1-22, SLS-23-26, SLS--31-38, SLS-40-46, SLS-47-50, SLS-55-60, SLS-61-68, SLS-69-73 fraksiyonları da *C. albicans* 'a karşı oldukça yüksek antifungal etkili bulundu.

Literatürde bu çalışmada saf olarak elde edilen tiramin ve oktopamin maddelerinin α -glukozidaz enzimi ile yapılmış bir *in vitro* inhibisyon çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak tiramin türevi olan hidroksisinnamik asit aminler ile α -glukozidaz enzimi ile *in vitro* inhibisyon çalışmaları mevcuttur. Zhou ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yayımlanan bir çalışmada tiraminin türevi olan hidroksisinnamik asit aminlerden N-trans-p kumaroil tiramin ve N-trans-feruloiltramin pozitif kontrol deoksinojirimisine göre daha güçlü α -glukozidaz inhibitörüne sahip oldukları bulunmuştur. Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan α -glukozidaz inhibisyon aktivitesinde kullanılan α -glukozidaz enzim kaynağı *Saccharomyces cerevisiae*'dir. [59]. Song ve arkadaşları tarafından α -glukozidaz enzimi ile yapılan bir *in vitro* inhibisyon çalışmasında da N-trans kumaroiltramin, N-trans-kafeoiltramin ve N-trans-feruloiltramin gibi tiraminin türevi olan hidroksisinnamik asit aminlerin pozitif kontrole göre yüksek inhibisyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. [60]. Bu çalışmada, antidiyabetik aktivite sonuçlarına göre tiramin (SLS-39-1) bileşiğinin IC₅₀ değeri 484,909 µg/mL, oktopamin (SLM-21-

30-1) bileşiminin IC_{50} değeri $>500 \mu\text{g/mL}$ ve SLS-1-22 (tiramin, sinefrin) fraksiyonunun IC_{50} değeri $109,7 \mu\text{g/mL}$ bulundu. Bu sonuçtan yola çıkarak antidiyabetik aktiviteyi sağlamak için sinefrin ve tiraminin birlikte kullanıldığı kombinasyonlar önerilebilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, antidiyabetik ve antifungal aktivite göstermeyen bir bileşikten, bu aktivitelere sahip yeni bileşikler elde edilerek, biyotransformasyon tekniğinin avantajı ve önemi kanıtlanmış oldu. *In vitro* deneyler sonucu alınan bu sonuçların *in vivo* çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] **Dewick, P.M.** (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, John Wiley & Sons.
- [2] **Kumar, A., Aswal, S., Semwal, R.B., Chauhan, A., Joshi, S.K., Semwal, D.K.** (2019). Role of plant-derived alkaloids against diabetes and diabetes-related complications: a mechanism-based approach, *Phytochem. Rev.* 18(5) 1277-1298.
- [3] **Su, S.H., Cao, M., Wu, G.Y., Long, Z., Cheng, X.D., Fan, J.S., Xu, Z.R., Su, H.F., Hao, Y.M., Li, G., Peng, J., Li, S., Wang, X.** (2018) Hordenine protects against hyperglycemia-associated renal complications in streptozotocin-induced diabetic mice, *Biomed. Pharmacother.* 104 315-324.
- [4] **Pervaiz, I., Ahmad, S., Madni, M., Ahmad, H., Khaliq, F.J.A.b., microbiology,** (2013). Microbial biotransformation: a tool for drug designing, 49(5) 437-450.
- [5] **Hansson, D.** (2013). *Structure and biosynthesis of fungal secondary metabolites*.
- [6] **Aniszewski, T.**(2007). *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier.
- [7] **Rossato, L.G., de Pinho, P.G., Silva, R., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos Mde, L., Costa, V.M., Remiao, F.** (2010). Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of para and meta-synephrine in biological samples, *J Pharm Biomed Anal* 52(5) 721-6.
- [8] **Pellati, F., Benvenuti, S., Melegari, M.** (2004). High-performance liquid chromatography methods for the analysis of adrenergic amines and flavanones in *Citrus aurantium* L. var. amara, *Phytochem. Anal.* 15(4) 220-225.
- [9] **Bakhiya, N., Ziegenhagen, R., Hirsch-Ernst, K.I., Dusemund, B., Richter, K., Schultrich, K., Pevny, S., Schafer, B., Lampen, A.** (2017). Phytochemical compounds in sport nutrition: Synephrine and hydroxycitric acid (HCA) as examples for evaluation of possible health risks, *Mol. Nutr. Food Res.* 61(6) 17.
- [10] **Stohs, S.J., Preuss, H.G., Shara, M.** (2012). A review of the human clinical studies involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid p-synephrine, *Int J Med Sci* 9(7) 527-38.
- [11] **Stewart, I., Newhall, W.F., Edwards, G.J.J.J.o.B.C.** (1964). The isolation and identification of l-synephrine in the leaves and fruit of citrus, 239(3) 930-932.
- [12] **Bartley, G.E., Breksa III, A.P., Ishida, B.K.J.N.b.** (2010). PCR amplification and cloning of tyrosine decarboxylase involved in synephrine biosynthesis in *Citrus*, 27(4) 308-316.
- [13] **Nelson, B.C., Putzbach, K., Sharpless, K.E., Sander, L.C.** (2007). Mass spectrometric determination of the predominant adrenergic protoalkaloids in bitter orange (*Citrus aurantium*), *J. Agric. Food Chem.* 55(24) 9769-9775.

- [14] **Shan, Y.** (2016). *Comprehensive utilization of citrus by-products*, Academic Press.
- [15] **Arbo, M.D., Schmitt, G.C., Limberger, M.F., Charao, M.F., Moro, A.M., Ribeiro, G.L., Dallegrave, E., Garcia, S.C., Leal, M.B., Limberger, R.P.** (2009). Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and p-synephrine in mice, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54(2) 114-117.
- [16] **Dwyer, J.T., Allison, D.B., Coates, P.M.** (2005). Dietary supplements in weight reduction, *J. Am. Diet. Assoc.* 105(5) S80-S86.
- [17] **Uddin, N., Hasan, M.R., Hossain, M.M., Sarker, A., Hasan, A.H., Islam, A.F., Chowdhury, M.M., Rana, M.S.** (2014). In vitro alpha-amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. fruit, *Asian Pac J Trop Biomed* 4(6) 473-9.
- [18] **Guo, L.X., Chen, G., Yin, Z.Y., Zhang, Y.H., Zheng, X.X.** (2019). p-Synephrine exhibits anti-adipogenic activity by activating the Akt/GSK3 beta signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes, *J. Food Biochem.* 43(11) 9.
- [19] **Şahin, C., Ünal, G., Arıcıoğlu, F.** (2014). Akt-GSK-3 ilişkisi: İki ayrı yolak iki ayrı hastalık.
- [20] **Yen, C.L., Chao, W.C., Wu, C.H., Huang, Y.F., Chang, C.S., Tsai, Y.S., Lin, C.F., Shieh, C.C.** (2015). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta in metabolically abnormal obesity affects immune stimulation-induced cytokine production, *Int. J. Obes.* 39(2) 270-278.
- [21] **Baysal, A., Aksoy, M., Besler, T., Bozkurt, N., Keçecioglu, S., Merdol, T., Pekcan, G., Mercanlıgil, S., Yıldız, E.J.A.H.Y.** (2014). Diyet El Kitabı. 8. baskı, s257-270.
- [22] **TURDEP, T.D.** (2017). TURDEP 2 sonuçlarının özeti.
- [23] **Malhan, S., Öksüz, E., Babineaux, S.M., Ertekin, A., Palmer, J.P.J.T.J.o.E. Metabolism,** (2014). Assessment of the Direct Medical Costs of Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications in Turkey, 18(2).
- [24] **Munoz-Garach, A., Diaz-Perdigones, C., Tinahones, F.J.** (2016). Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus, *Endocrinol. Nutr.* 63(10) 560-568.
- [25] **Gholizadeh, P., Mahallei, M., Pormohammad, A., Varshochi, M., Ganbarov, K., Zeinalzadeh, E., Yousefi, B., Bastami, M., Tanomand, A., Mahmood, S.S., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Kafil, H.S.** (2019). Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease, *Microb. Pathog.* 127 48-55.
- [26] **TÜBA.** (2017). <TÜBA-Mikrobiyota ve İnsan Sağlığı Sempozyumu Raporu-2017.pdf>.
- [27] **Çetinbaş, S., Kemeriz, F., Göker, G., Biçer, İ., Velioğlu, Y.S.** (2017). İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri, *Academic Food Journal/Akademik GIDA* 15(4).
- [28] **Simon, M.C., Strassburger, K., Nowotny, B., Kolb, H., Nowotny, P., Burkart, V., Zivehe, F., Hwang, J.H., Stehle, P., Pacini, G., Hartmann, B., Holst, J.J., MacKenzie, C., Bindels, L.B., Martinez, I., Walter, J., Henrich, B., Schloot, N.C., Roden, M.** (2015). Intake of *Lactobacillus reuteri* Improves Incretin and

Insulin Secretion in Glucose-Tolerant Humans: *A Proof of Concept*, *Diabetes Care* 38(10) 1827-1834.

- [29] **Sharma, S., Tripathi, P.** (2019). Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go?, *J. Nutr. Biochem.* 63 101-108.
- [30] **Upadhyaya, S., Banerjee, G.** (2015). Type 2 diabetes and gut microbiome: at the intersection of known and unknown, *Gut Microbes* 6(2) 85-92.
- [31] **Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B., Raoult, D.J.I.j.o.o.** (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*, 36(6) 817-825.
- [32] **Başığit, G., Kuleaşan, H., Karahan, A.G.** (2006). Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(9) 796-800.
- [33] **Duygu, A., ERTÜRKMEN, P.** (2017). Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 8(1) 108-113.
- [34] **Çon, A.H., Gökalp, H.Y.** (2000). Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Fiekilleri.
- [35] **Coman, M.M., Mazzotti, L., Silvi, S., Scalise, A., Orpianesi, C., Cresci, A., Verdenelli, M.C.** (2020). Antimicrobial activity of SYN BIO® probiotic formulation in pathogens isolated from chronic ulcerative lesions: in vitro studies, *Journal of Applied Microbiology* 128(2) 584-597.
- [36] **Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F.** (2013). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome (vol 143, pg 913, 2012), *Gastroenterology* 144(1) 250-250.
- [37] **Han, F., Lee, I.S.** (2016). Microbial transformation of bavachin by *Absidia coerulea*, *Phytochem. Lett.* 18 136-139.
- [38] **Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J.J.B.A.** (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids, 33(1) 214-223.
- [39] **Cull, S., Holbrey, J., Vargas-Mora, V., Seddon, K., Lye, G.** (2000). Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations, *Biotechnology and bioengineering* 69(2) 227-233.
- [40] **Bianchini, L.F., Arruda, M.F., Vieira, S.R., Campelo, P., Grégio, A.M., Rosa, E.A.** (2015). Microbial biotransformation to obtain new antifungals, *Front. Microbiol.* 6 1433.
- [41] **Lin, G., Yang, M.B.** (2019). Biotransformation of Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxide To Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloid, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 34(1) S58-S59.
- [42] **Cardillo, A.B., Perassolo, M., Sartuqui, M., Talou, J.R., Giulietti, A.M.** (2017). Production of tropane alkaloids by biotransformation using recombinant *Escherichia coli* whole cells, *Biochem. Eng. J.* 125 180-189.
- [43] **Zheng, Y.B., Xu, X.P., Zou, X.W.** (2016). Biotransformation of caffeine in oolong tea by *Paecilomyces gunnii*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 114 141-144.

- [44] **Fan, H.-X., Zhou, Z.-Q., Peng, J., Wu, B.-J., Chen, H.-R., Bao, X.-F., Mu, Z.-Q., Jiao, W.-H., Yao, X.-S., Gao, H.J.X.** (2017). A microbial model of mammalian metabolism: biotransformation of 4, 5-dimethoxyl-canthin-6-one using *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3.970, 47(4) 284-289.
- [45] **da Silva-Pereira, J.F., Bubna, G.A., Goncalves, G.D., Bracht, F., Peralta, R.M., Bracht, A.**, (2016) Fast hepatic biotransformation of p-syneprine and p-octopamine and implications for their oral intake, *Food Funct.* 7(3) 1483-1491.
- [46] **Ni, J.N., Guo, Y.Y., Chang, N.W., Cheng, D.D., Yan, M.L., Jiang, M., Bai, G.** (2019) Effect of N-methyltyramine on the regulation of adrenergic receptors via enzymatic epinephrine synthesis for the treatment of gastrointestinal disorders, *Biomed. Pharmacother.* 111 1393-1398.
- [47] **He, D.X., Shan, Y., Wu, Y.H., Liu, G.Z., Chen, B., Yao, S.Z.** (2011). Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS, *Food Chem.* 127(2) 880-885.
- [48] **Mutlutürk, Ö.G.E., Sevi, Ö.** (2020). Aletli Analiz Laboratuvarı.
- [49] **De Hoffmann, E.J.K.O.E.o.C.T.** (2000). Mass spectrometry.
- [50] **Hacibekiroglu, I., Kolak, U.** (2011). Antioxidant and Anticholinesterase Constituents from the Petroleum Ether and Chloroform Extracts of *Iris suaveolens*, *Phytother. Res.* 25(4) 522-529.
- [51] **Sobolev, A.P., Mannina, L., Proietti, N., Carradori, S., Daglia, M., Giusti, A.M., Antiochia, R., Capitani, D.** (2015). Untargeted NMR-Based Methodology in the Study of Fruit Metabolites, *Molecules* 20(3) 4088-4108.
- [52] **Mazlan, F.A., Annuar, M.S.M., Sharifuddin, Y.** (2015). Biotransformation of *Momordica charantia* fresh juice by *Lactobacillus plantarum* BET003 and its putative anti-diabetic potential, *PeerJ* 3 18.
- [53] **Avci, D., Alturk, S., Sonmez, F., Tamer, O., Basoglu, A., Atalay, Y., Kurt, B.Z., Dege, N.** (2020). Synthesis, spectral properties, in vitro alpha-glucosidase inhibitory activity and quantum chemical calculations of novel mixed-ligand M(II) complexes containing 1,10-phenanthroline, *Appl. Organomet. Chem.* 34(4) 14.
- [54] **Keller, W., McLaughlin, J., Brady, L.J.J.o.p.s.** (1973). Cactus alkaloids XV: β -phenethylamine derivatives from *coryphantha macromeris* var. *runyonii*, 62(3) 408-411.
- [55] **Putzbach, K., Rimmer, C.A., Sharpless, K.E., Wise, S.A., Sander, L.C.** (2007). Determination of bitter orange alkaloids in dietary supplement Standard Reference Materials by liquid chromatography with atmospheric-pressure ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 389(1) 197-205.
- [56] **Gadetskaya, A.V., Tarawneh, A.H., Zhusupova, G.E., Gemejiyeva, N.G., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., Ross, S.A.** (2015). Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation, *Fitoterapia* 104 80-85.
- [57] **Killiny, N., Valim, M.F., Jones, S.E., Omar, A.A., Hijaz, F., Gmitter, F.G., Grosser, J.W.** (2017). Metabolically speaking: Possible reasons behind the

tolerance of 'Sugar Belle' mandarin hybrid to huanglongbing, *Plant Physiol. Biochem.* 116 36-47.

- [58] **Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., Rastrelli, L.** (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2018 12.
- [59] **Zhou, X., Liang, J., Zhang, Y., Zhao, H., Guo, Y., Shi, S.** (2015). Separation and purification of α -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration–HPLC screening, *Journal of Chromatography B* 985 149-154.
- [60] **Song, Y.H., Kim, D.W., Curtis-Long, M.J., Park, C., Son, M., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Lee, K.W., Park, K.H.** (2016). Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition, *European journal of medicinal chemistry* 114 201-208.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Şükran Demir

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : Haziran, 2018, Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik (İngilizce) Bölümü

MESLEKİ DENEYİM:

- 07/2018-11/2018- Araştırma Asistanı, **King's College London/ Londra-İngiltere** (Effect of drinks containing fruit polyphenol extracts and fibre on postprandial glycaemia. The Glu-MIX study adlı çalışma ve The acute impact of interesterification of dietary fat on postprandial vascular responses” Inter-Cardio adlı çalışmada asistan) klinik deneyim (tartı, vücut analiz, ölçüm, mutfak, deney)
- 08/2017-10/2017- Araştırma Asistanı, **University of Reading/Reading-İngiltere** (“The effects of flaxseeds on bone and gut health on postmenopausal women.” Flax study) laboratuvarında aktif çalışma (kan, idrar feces analiz) diyet değerlendirmesi, gönüllülere kahvaltı hazırlama, vücut analiz vb. çalışmalarda)

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, POSTERLER

- **Demir Ş, Gazioğlu I, Zengin Kurt B**, 2020. Determination of New Metabolites by Microbial Biotransformation of p-Synephrine and Their Antidiabetic Activities, AOAC INTERNATIONAL 2020 Virtual Annual Meeting.