

Benzoin'in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* fungal kültürleri ile Biyotransformasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi

Yeliz Kazak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ocak 2008

**Investigation of the Biotransformation Reactions of Benzoin by the Fungi
Aspergillus niger, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* and *Neurospora crassa***

Yeliz Kazak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

January 2008

Benzoin'in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* fungal kültürleri ile Biyotransformasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi

Yeliz Kazak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. İsmail Kıran

Ocak 2008

Yeliz Kazak'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Benzoin'in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* fungal kültürleri ile biyotransformasyon reaksiyonlarının incelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye: Doç. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Doç. Dr. Fatih DEMİRÇİ

Üye : Doç. Dr. Tamer AKAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

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

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada Benzoin'in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* fungal kültürleri ile biyotransformasyon reaksiyonları incelendi. Bu amaçla Benzoin molekülü, oda sıcaklığında 7 gün boyunca dairesel sallayıcı üzerinde *A. niger*, *B. cinerea*, *F. solani* ve *N. crassa* fungal kültürler ile inkübe edildi. Elde edilen çözeltideki metabolit varlığı ince tabaka kromatografisi kullanılarak araştırıldı. Buna göre; *A. niger* ve *N. crassa* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu Benzoin'in yeni metabolitlere dönüştüğü, *B. cinerea* ve *F. solani* ile yapılan biyotransformasyonda ise herhangi bir metabolitin oluşmadığı tespit edildi.

Benzoin'in *A. niger* ile biyotransformasyonu sonucunda oluşan metabolitler, kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırmaya çalışıldı, fakat başarı sağlanamadığından yapıları aydınlatılamadı.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Sekonder Metabolit, Fitoaleksin, Benzoin, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Neurospora crassa*

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the biotransformation reaction of benzoin by *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Neurospora crassa*. For this purpose, benzoin molecule was incubated with *A. niger*, *B. cinerea*, *F. solani* and *N. crassa* for 7 days on an orbital shaker at 120 rpm and room temperature. The result of these biotransformation reactions were followed by thin layer chromatography (TLC), showing that biotransformation of benzoin with *A. niger* and *N. crassa* yielded complex mixture of polar metabolites whereas biotransformation with *B. cinerea* and *F. solani* yielded starting material only, but no metabolites.

Large scale biotransformation of benzoin with *A. niger* was carried out, but none of the metabolites was successfully purified by column chromatography.

Keywords: Biotransformation, secondary metabolites, phytoalexins, benzoin, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Neurospora crassa*

TEŞEKKÜR

“Benzoin’in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonlarının incelenmesi” konulu bu alıŐma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Doç. Dr. İsmail KIRAN’ın danıŐmanlıĐında yürütülmüŐtür.

Tez çalışmaların süresince göstermiŐ olduğu destek ve yardımlarından dolayı tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. İsmail KIRAN’a teŐekkürü bir borç bilirim.

Son olarak çalıŐmalarım sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem ve babama,

Sonsuz TeŐekkürlerimi Sunarım.

Yeliz KAZAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii

BÖLÜM-1: GİRİŞ

1. Giriş ve Amaç	2
1.1.İlaç ve Biyoteknoloji	3
1.2. Sekonder metabolit.....	5
1.2.1.Sekonder metabolitin tanımı	5
1.2.2. Endüstriyel kaynaklı sekonder metabolitler.....	6
1.3...Fitoaleksin	8
1.4. Fitoaleksinlere örnekler	11
1.4.1.Patates fitoaleksinleri.....	11
1.4.2. Lahana, karnabahar, turp, brokkoli fitoaleksinleri	12
1.4.3.Legume (Baklagiller familyasından bitkiler) fitoaleksinleri.....	13
1.5. Stilbenler	14
1.6. <i>Aspergillus Niger</i> İle Gerçekleşen Biyotransformasyon Reaksiyonları	16
1.7. <i>Fusarium Solani</i> İle Gerçekleşen Biyotransformasyon Reaksiyonları.....	18
1.8. <i>Neurospora Crass</i> İle Gerçekleşen Biyotransformasyon Reaksiyonları	19

BÖLÜM-2: MATERYAL, METOD VE DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2. Biyotransformasyon Çalışmaları.....	21
2.1.Genel deneysel bilgiler	21
2.2.Mikroorganizmaların temini ve saklanması.....	21
2.3. Kullanılan sıvı besi yeri yerlerinin hazırlanması.....	21
2.4. Mikroorganizmanın hazırlanması.....	22

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5. Substratın ilavesi	22
2.6. Metabolitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	23

BÖLÜM-3 : DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Substrat molekülü ve özellikleri.....	26
3.2. Yapılan ön deneme çalışmalarının değerlendirilmesi	26
3.3. Benzoin'in <i>Aspergillus niger</i> ile biyotransformasyonu	27

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ	30
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. α -Tamotin'in <i>B. cinerea</i> , <i>S. lycopersici</i> ve <i>F. oxsporium</i> tarafında etkisizleştirilmesi	9
1.2. Rishitin, reservatrol, pisatin ve gossypol'ün molekül yapıları.....	10
1.3. Patates fitoaleksinleri.....	11
1.4. Rishitin ve lubimin'in <i>Gibberella pulicaris</i> tarafından detoksifikasyonu.....	11
1.5. Lahana, Karnıbahar, Turp, Brokkoli Fitoaleksinleri	12
1.6. Legume fitoaleksinleri ve etkisizleştirme reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler.....	13
1.7. <i>trans</i> -resveratrol'ün molekül yapısı	15
1.8. Rasemik diizoforonun <i>A. niger</i> ile biyotransformasyon reaksiyonu	16
1.9. (1R)-(+)- α -Pinene'in <i>A. niger</i> ile biyotransformasyonu	17
1.10. Resibufogenin, bufalin ve cinobufagin'in <i>F. solani</i> ile biyotransformasyonu..	18
1.11.a. Karyofillen oksit'in <i>Neurospora crassa</i> ile biyotransformasyonu	19
1.11.b. Rasemik diizoforon'un <i>Neurospora crassa</i> ile biyotransformasyonu.....	19
1.11.c. Sedrolün <i>Neurospora crassa</i> ile biyotransformasyonu.....	19
2.1. Biyotransformasyon aşamaları.	24
3.1. Benzoin'in molekül yapısı ve genel özellikleri.....	26
3.2. Yapılan ön denemelerin sonuçları	27
3.3. Benzoin'in <i>A. niger</i> ile biyotransformasyon reaksiyonu	28

BÖLÜM-1: GİRİŞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde mikroorganizmalar tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümler olarak adlandırılan mikrobiyal biyotransformasyon, biyoteknolojinin en önemli çalışma konularından biridir. Mikrobiyal biyotransformasyonlar önemli biyolojik aktivite gösteren birçok bileşiğin sentezlenmesinde veya türevlerinin elde edilmesinde, kimyasal yöntemlere iyi bir alternatif oluşturmaktadır (Roberts, 1992; Hanson, 1995; Roberts, et.al., 1995; Telefoncu, 1995).

Bahsedilen bileşiklerin önemli bir grubu da fitoaleksindir. Fitoaleksini terimi birçok bitkinin fungal saldırı ve stres koşullarda biyokimyasal savunma mekanizmalarının bir parçası olarak ürettiği ve anti-fungal etki gösteren ikincil metabolit grubuna ait bileşiklerdir. Dolayısıyla da, anti-fungal ilaçların gelişiminde model olarak kullanılabilirler (Morrissey and Osbourne, 1999).

Bu çalışmamızdaki amacımız; stilben grubu bir fitoaleksini olan *trans*-resveratrol molekülüne yapısal benzerlik gösteren benzoin bileşiğinin türevlerinin; *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* fungal kültürleri ile biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirerek türevlerini elde etmektir.

1.1. İlaç ve Biyoteknoloji

Bilimsel bir veriden ilaca uzanan aşamalardan ilki "ilaç keşfi" olarak adlandırılan ilaç etkinliği gösteren madde adaylarının saptanmasıdır. "Hedefe yönelik ilaç aday keşfi" olarak tanımlanan çalışmalarda, önce ilacın hedefleneceği gen veya gen ürünleri belirlenir. Bu belirleme çalışmaları iki şekilde yapılabilir. Çalışmalar; hastalıkların moleküler patojenezi konusuna yoğunlaşan temel araştırmalar ve mevcut ilgili bilimsel yayınlara ulaşarak ve/veya uluslar arası veri bankaları aracılığı ile elde edilebilen güncel bilgilerden yola çıkılmak suretiyle gerçekleştirilir. Hedef molekülün seçiminden sonra, ilaç adayı arayış stratejisi belirlenir. Bu bağlamda ilaç adayı tarama ve ilaç adayı tasarımı yaklaşımları yoğun olarak kullanılmaktadır (www.kultur.k12.tr/biyosemp/pdf/03__biyoteknoloji_2007.pdf).

"İlaç adayı tarama" çalışmaları genellikle yüksek ölçekli aday taraması, ön adayların belirlenmesi, deney hayvanlarında *in vivo* etkinlik ve toksisite çalışmaları evrelerinden oluşmaktadır. Aday taramalarında, sayıları yüz binleri bulan doğal kaynaklı kimyasal maddeler içeren ve "kombinatoryal kimya" teknolojisi ile üretilen ve sayıları milyonları bulan sentetik kimyasal maddeleri içinde barındıran etken madde kütüphaneleri kullanılır (www.kultur.k12.tr/biyosemp/pdf/03_biyoteknoloji_2007.pdf)

Halen en verimli sonuç sağlayan etken maddeler grubunu; kara bitkileri, kara hayvanları, deniz organizmaları ve mikroorganizmaların metabolitlerinin oluşturduğu doğal kaynaklı olanlar oluşturmaktadır. Dünyada karada yetişen bitkilerinin en az 250.000 olduğu ve bitkilerin sistematik olarak taranan kısmının ise bu rakamın sadece %10-15'ini teşkil ettiği tahmin edilmektedir. Ülkemiz, bulunduğu coğrafi konumu, jeolojik ve jeomorfolojik yapısı, değişik anakara tiplerine sahip oluşu ve farklı iklim kuşaklarının etkisi altında bulunmasından dolayı sahip olduğu zengin bitki örtüsünden ötürü, bu alanda önemli bir avantaja sahiptir. Ülkemiz bitki örtüsünde bu rakam 11.000'e yaklaşmıştır ve her gün bulunan yeni türler bu sayıyı artırmaktadır. Mikroorganizmaların sayıları on binlerle ifade edilmektedir ve son 20-30 yılda deniz organizmaları, yoğun bir şekilde araştırılan çok zengin bir doğal kaynak durumundadır. 1981-2002 yılları arasında tüm ülkelerde ruhsatlandırılmış ilaçların %44'ü doğal kaynaklı bileşiklerden, %10'u biyoteknoloji ürünleri, %1'i aşılardan ve geri kalan %45'lik

oranı ise sentetik ilaçlar oluşturmaktadır. Sadece antibiyotikler dikkate alındığında, %95'inin doğal kaynaklı veya doğal kaynaklı bir molekülden hareketle elde edildikleri göze çarpmaktadır. Dolayısıyla, mikroorganizmalar doğal kaynak olarak, mayalanma teknolojisi ise biyoteknolojik bir yöntem olarak, bu alanda önemli bir yer tutmaktadır. 1981–2003 yılları arasında yeni ruhsatlandırılmış olan anti kanser bileşikler arasında; doğal kaynaklı bileşikler, biyolojikler ve doğal kaynaklı bir molekül temel alınarak üretilen ilaçlar, toplam anti kanser ilaçların %57'sini oluşturmaktadır (www.kultur.k12/tr/biyosempodf/03_biyoteknoloji_2007.pdf).

Doğal kaynaklı bileşikler; doğrudan ilaç etken maddesi veya yarı sentezle değiştirilerek daha etkili ve daha az toksik moleküller haline dönüştürülmek suretiyle kullanılabilirler. Ayrıca, bu bileşikler model bileşik veya sentez başlangıç maddesi olarak da kullanılabilirler. Bu nedenle, farmakognozi ve farmasötik kimya bilimleri, yeni ilaç molekülü bulma, tasarlama ve geliştirme konularında büyük önem kazanmıştır. Doğa, yukarıdaki örneklerden de görüleceği gibi, yeni ilaç moleküllerinin keşfinde oldukça cömert davranmakta, fakat verim her zaman istenilen düzeyde olamamaktadır. Bu sorun, günümüzde biyoteknolojik yöntemler kullanılarak ve organik sentez kimyası ile aşılabilmektedir (www.kultur.k12/tr/biyosempodf/03_biyoteknoloji_2007.pdf).

"İlaç aday tasarımı" araştırmaları, genellikle molekül yapısı bilinen moleküller üzerinde yoğunlaşmıştır. Buradaki amaç; biyoinformatik ve işlemsel biyoloji gibi bilgisayar yöntemlerini kullanarak, hedef protein veya diğer moleküllerin aktif veya işlevsel bölgelerine karşı uyum gösterecek moleküllerin bilgisayar ortamında tasarımı yapılarak tespit edilmesidir. Bu yöntem "Rasyonel ilaç tasarımı" olarak adlandırılır. Bu yaklaşım, aynı zamanda tedavi edici özelliği olan yeni etkin maddelerin bulunmasını hızlandıran yöntemleri de içermektedir. Bu şekilde, bilgisayar destekli tasarım ve moleküler modelleme kullanılarak yeni bileşiklerin tasarlanması mümkündür. İlaç aday tasarımı çalışmaları sonucunda seçilmiş olan kimyasal moleküllerin sentezlenmesi, etkinlik derecelerinin belirlenmesi ve etkinliği saptanan moleküllerin daha ileri çalışmalar yapılarak ilaç olarak kullanılabilmesi, ilaç geliştirmedeki diğer aşamaları oluşturmaktadır (www.kultur.k12/tr/biyosempodf/03_biyoteknoloji_2007.pdf).

İlaç adayı tanımlamaya kadar uzanan "ilaç keşfi" faaliyet alanı açısından bakıldığında; ülkemizdeki münferit çalışmaların maddi olarak iyi desteklenen merkez veya merkezlerde toplanması ile ulusal floradan hareketle zengin bir "Doğal Kaynaklı Kimyasal Bankaları" kurmamız kısa sürede mümkün olabilir. Bu durum, diğer ülkelerle kıyaslandığında, ülkemize büyük rekabet avantajı sağlayacak, bulunacak ilaç adayları büyük ilaç firmalarına yüksek değerlerde pazarlanabilecek ve en önemlisi yerli ilaç sanayi tarafından ilaç geliştirme çalışmalarında da kullanılabilir (www.kultur.k12/tr/biyosempodf/03_biyoteknoloji_2007.pdf)

1.2. Sekonder Metabolit

1.2.1. Sekonder metabolitin tanımı

Sekonder metabolitler organizmaların temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler kadar önemli maddelerdir. Sekonder metabolitler bitkilerin, çevresel koşullara uyum sağlama, savunma, korunma, hayatta kalma, neslini sürdürme ve ekosistemle ilişkilerini düzenlemelerinde yardımcı olurlar (Bailey and Mansfield, 1982).

Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır (Vining, 1990).

Buna rağmen organizma için önemli olan; atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme gibi birtakım fonksiyonları üstlenirler. Bu görevler dışında sekonder metabolitler; antibiyotik, kemoterapötik, pestisid ve immünsüpresif ajanlar gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiplerdir. Bu etkileri nedeniyle endüstride yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Fonksiyonlarındaki çeşitliliğe benzer şekilde, bu bileşikler kimyasal yapıları bakımından da çok büyük çeşitlilik gösterirler (Topal vd., 2000).

Sekonder metabolitler, aşağıda özetlendiği gibi iki kaynaktan elde edilmektedir.

Doğadan Toplama:

- Az miktarlarda ve belli gelişim evrelerinde üretilirler
- Bazı türlerin zamanla soylarının tükenmesi tehlikesi vardır
- Bazı bitkilerin toplanması çok güçtür ve maliyeti yüksektir

Doku Kültürü:

- İstenilen zamanda, istenilen kadar üretim
- Türlerin kaybolma tehlikesi yok
- Standart kalitede ve bol miktarda üretim
- İstenildiği kadar bitkinin elde edilme kolaylığı

Pek çok kallus ve süspansiyon kültüründe hücreler, sekonder metabolitleri üretmezler. Bunların nedenleri (Üstün, 1991; Üstün vd., 1996; Üstün, vd., 1998);

- ✓ Belirli öncül kimyasalların primer metabolizmaya yönelmesi,
- ✓ Kilit enzimlerin baskılanması ya da azalması,
- ✓ Uygun depo organlarının bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

1.2.2. Endüstriyel kaynaklı sekonder metabolitler

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle, ihtiyaç duyulan birçok üretim alanı için mikroorganizmalar alternatif olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu mikroorganizma grupları arasında küfler, önemli bir yer tutmakta ve endüstriyel açıdan önemli bir kaynak oluşturmaktadırlar. Kontrollü koşullar oluşturulduğunda, üretim daha da teşvik edilebilmektedir. Endüstriyel üretim açısından mikroorganizmalar; enzimlerinin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajlar sunmaktadır. Filamentli küfler, saprofit veya patojen türleriyle önemli zararlara neden olmaktadır. Bunun yanında geri kazanımlı ekosistemde çok etkin rollere de sahiptirler. Primer metabolizma

ürünleri hem anabolik, hem de katabolik biyokimyasal reaksiyonları kapsamaktadır. Burada; proteinler ve DNA benzeri makromoleküller temel olup, ara ürünler ve enerji sentezi bir arada gerçekleşmektedir (Paterson and Bridge, 1994)

Sekonder metabolitlerin üretim mekanizması ile bir tek kimyasal yapı grubu sentezlenemez. Bu bakımdan her bir sekonder metabolit üretiminde farklı bir metabolik döngü söz konusudur. Sekonder metabolitler ile primer metabolitler arasındaki temel fark; sekonder metabolitlerin biyosentezi bazı mikrobiyal gruplar, türler ve hatta suşlar ile sınırlı iken; primer metabolit ürünleri aerop, anaerop, fototrof ve organotrof olma durumları ile etkilenmekle beraber, daha genel ve temel ortak özellikler gösterebilmektedirler (Topal vd., 2000).

Mevcut endüstriyel enzim pazarı dünya genelinde 1,4 milyar USD dolayında iken, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel enzim üretiminin %75'i, gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri tarafından kullanılmaktadır. Proteaz, amilaz, lipaz, selülaz ve pektinaz gibi hidroliz amaçlı kullanılan enzimler, en yaygın kullanılan enzimlerdir. Bu enzimlerin sentezleri %60 oranında rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmektedir. Bu durum aynı zamanda endüstriyel gelişmenin göstergesi olarak da kabul edilmektedir. Bu alanla ilgili her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (Topal vd., 2000).

Üretilen enzimlerin %50'si sadece gıda endüstrisi tarafından kullanılmakta ve küflerin enzim üretim yetenekleri önemli endüstriyel avantajlar sağlamaktadır. Gıda endüstrisinde önemli olan bazı enzimlerin adları ve yaygın olarak kullanıldıkları alanlar aşağıda özetlenmiştir.

Proteaz:

- ✓ Unlu ürünlerde (ekmekçilikte) geleneksel fermente ürünlerde
- ✓ Biranın soğukta olgunlaştırılmasında
- ✓ Peynir endüstrisinde koagülasyon amacıyla
- ✓ Et olgunlaştırmada
- ✓ Klinikte (sindirim kolaylaştırıcı olarak, tanıda, v.b.)
- ✓ Biyokimyada (hücrel materyal saflaştırılmasında, peptid analiz ve sentezinde v.b.)

Amilaz:

- ✓ Biracılıkta ve damıtık içki üretiminde
- ✓ Tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisinde

Fungal α -amilazlar *Aspergillus oryzae*'nin kontrollü fermentasyonu ile üretilmekte ve yaygın olarak unlu ürünler endüstrisinde kullanılmaktadırlar. *A. oryzae* aynı zamanda proteaz üreticisi olarak da bilinmektedir. Bu enzimlerden proteaz, lipaz, pektinaz, selüloz, amilaz ve izomeraz; gıdaların özellikle görünüş, aroma durumlarını etkilemekte ve işlenmiş ürünlerin besleyici değerleri gibi pek çok özelliklerini de yönlendirmede önem taşımaktadır (Topal vd., 2000).

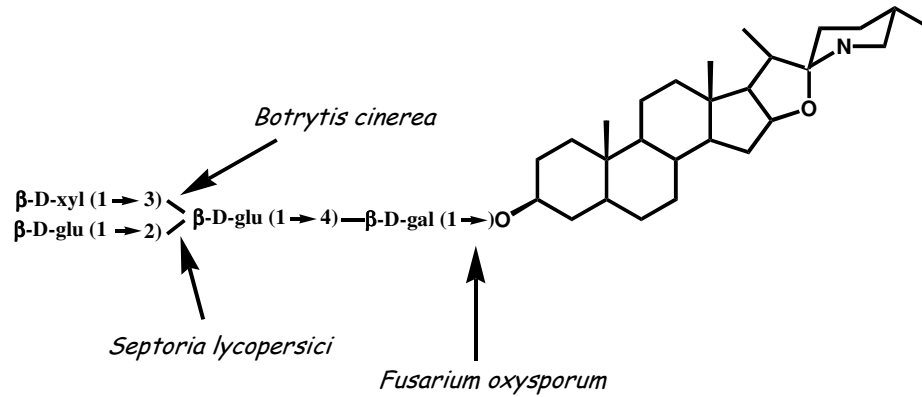
1.3. Fitoaleksinler

Fitoaleksinler, birçok bitki tarafından üretilen ve sekonder metabolit grubuna ait bileşiklerdir. Bu bileşikler fungus, bakteri ve nematodlar gibi çeşitli organizmaların büyümesini engelleyebilmektedir. Fitoaleksinler ve bunlardan meydana gelen türevler aynı zamanda pestisit ve fungisit olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Bitki dokularına fitoaleksin sentezini uyaran bazı abiyotik ve biyotik uyarıcıların *in vivo* kullanımları sonucunda bu maddelerin bitki bünyesinde sentezlendiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin ne amaçla (i ve ii) ve hangi koşullarda (iii ve iv) üretildikleri, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir (Grayer and Harborne, 1994).

- (i) Büyüme ve gelişimlerinin bir parçası olarak
- (ii) Kimyasal ve biyokimyasal savunma mekanizmalarında kullanılmaları
- (iii) Fungal saldırı sonucu ve(ya) stres koşulları altında
- (iv) Anti-fungal etkiye sahip

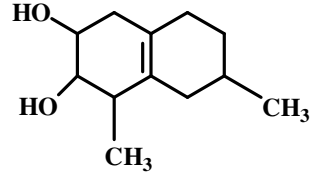
Fitoaleksinler, lipofilik yapıya sahip ve genelde sağlıklı bitki dokusunda mevcut değildirler. Patogen saldırı veya stres koşullarında tepki olarak bitkiler tarafından üretilirler. Fitoaleksin birikmesi, bitkinin hastalık direnciyle savunmasını temsil eder (Prusky et.al., 1996).

Fitoaleksin bileşiklerinin antimikrobiyal etkinliklerinin mekanizmaları tam anlamıyla açıklanmamış olsada, bir fitoaleksin olan α -tamotin'in patojenik mantarlar olan *Botrytis cinerea*, *Septoria lycopersici* ve *Fusarium oxysporum* tarafından etkisizleştirme mekanizması Şekil 1.1.' de sunulmuştur (Quidde et.al., 1998)

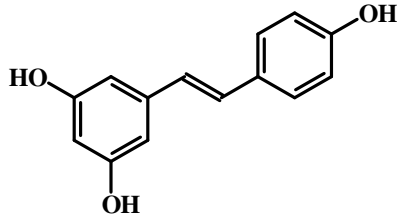


Şekil 1.1. α -Tamotin'in *B. cinerea*, *S. lycopersici* ve *F. oxysporum* tarafından etkisizleştirilmesi

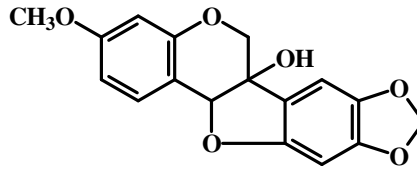
Bitkiler tarafından üretilen bazı fitoaleksin moleküllerinin (pisatin, risitin, gossipol ve reserovatrol) yapıları ise Şekil 1.2' de verilmiştir.



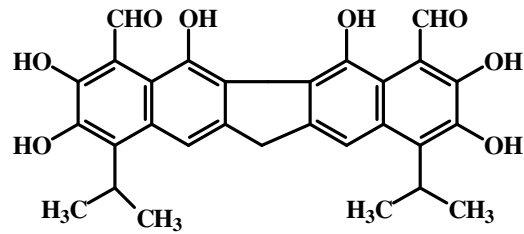
Rishitin



Reserovatrol



Pisatin



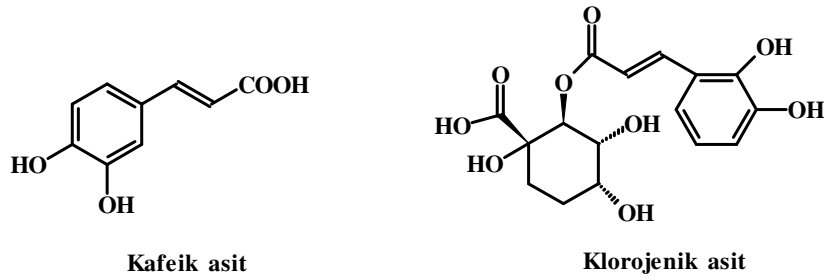
Gossypol

Şekil 1.2. Risitin, reserovatrol, pisatin ve gossipol'ün molekül yapıları

1.4. Fitoaleksinlere Örnekler

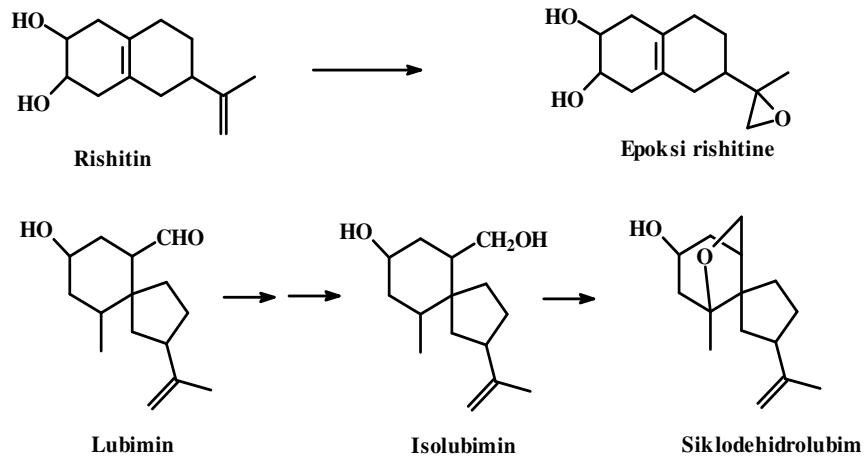
1.4.1. Patates fitoaleksinleri (Desjardins et.al., 1995)

Patates yumru köklerinin hastalığı esnasında fitoaleksin molekülleri olarak klorojenik ve kafeik asit ile risitin ve lubimin molekülleri üretilir. Molekül yapıları aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.3. Patates fitoaleksinleri

Bazı funguslar, fitoaleksinleri etkisiz hale getirme özelliklerine sahiptir ve bu durum detoksifikasyon reaksiyonları olarak adlandırılır. Reaksiyon sonucu oluşan metabolitler, artık mikroorganizmalara karşı herhangi bir etkinlik gösteremez. Risitin ve lubimin molekülleri, detoksifikasyon sonucu 11,12-epoksi risitin ve siklodehidrolubimin moleküllerine dönüşür (Kuc et.al., 1982).

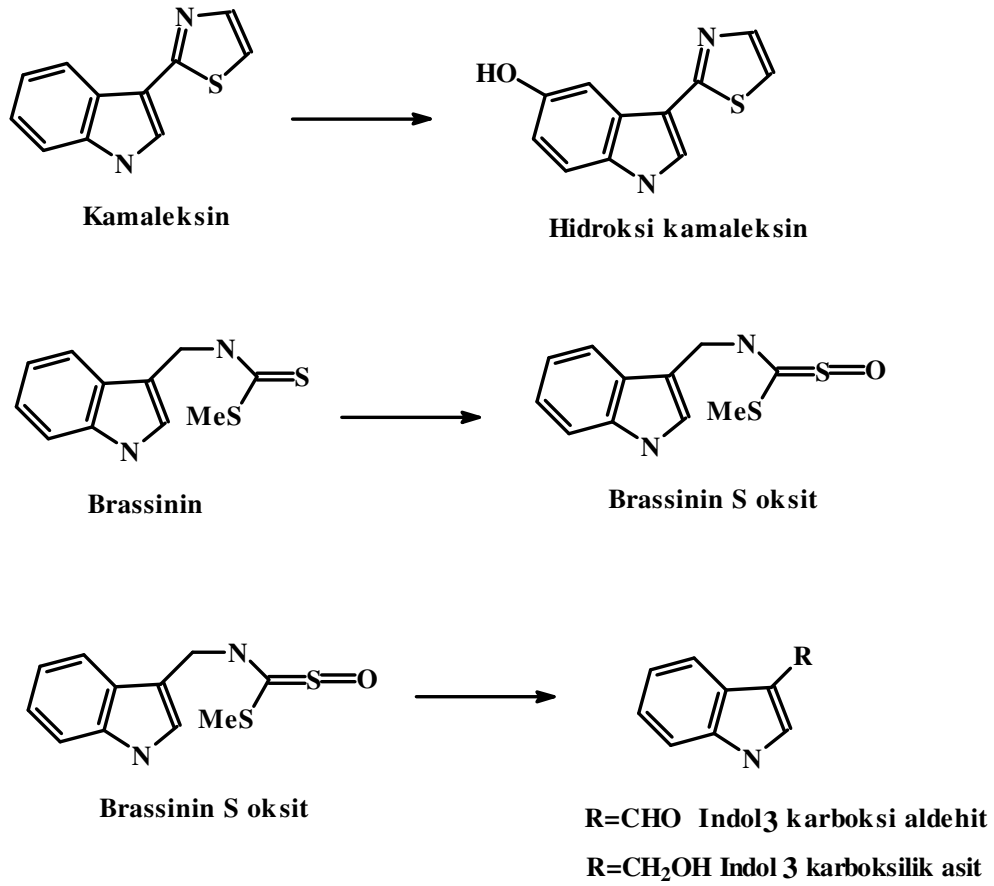


Şekil 1.4. Rishitin ve lubimin'in *Gibberella pulicaris* tarafından detoksifikasyonu

1.4.2. Lahana, karnıbahar, turp, brokkoli fitoaleksinleri

Kamaleksin (camalexin) ve brassinin, bu bitkiler tarafından yaygın olarak üretilen fitoaleksin molekülleridir ve yapıları aşağıda sunulmuştur. (Conn et.al., 1988)

Etkisizleştirildiklerinde hidroksi veya oksitlenmiş türevleri elde edilir. Molekül yapıları ve etkisizleştirme sonucu oluşan bileşikler aşağıda verilmiştir (Conn et.al., 1994).

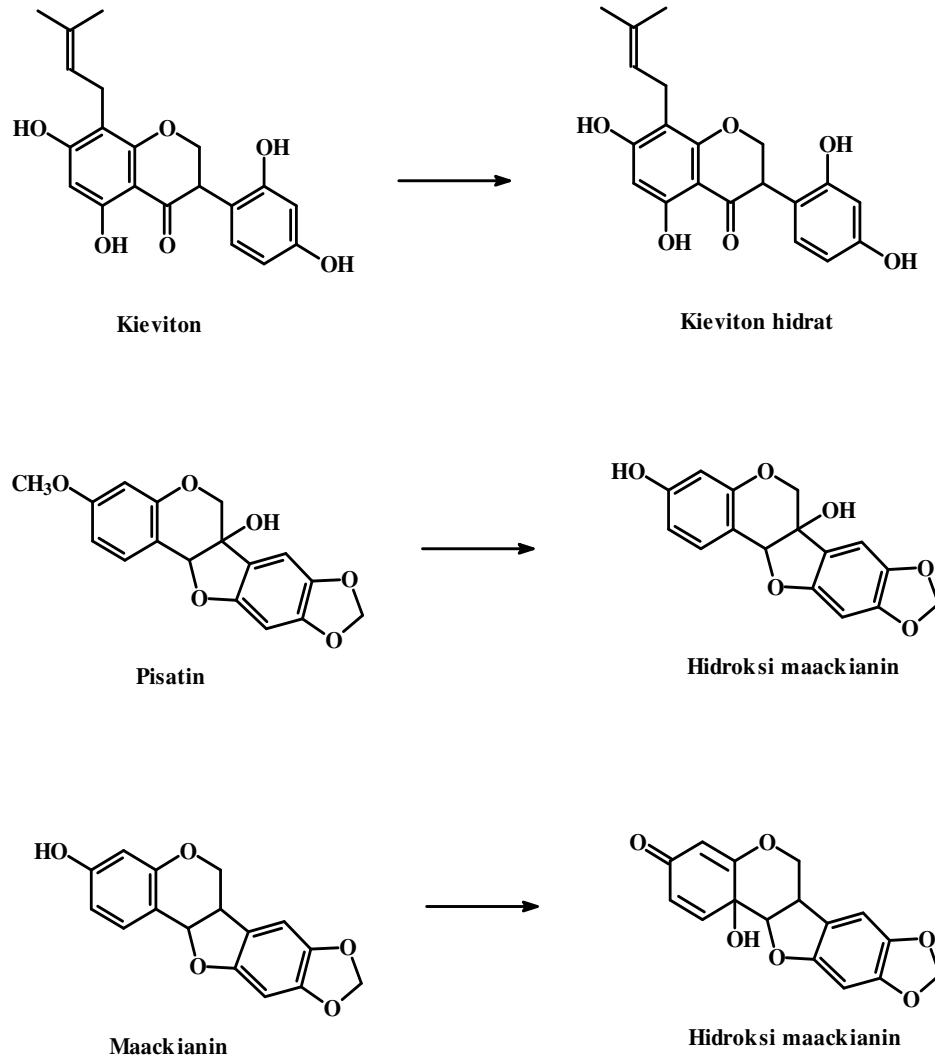


Şekil 1.5. Lahana, Karnıbahar, Turp, Brokkoli Fitoaleksinleri

1.4.3. Legume (baklagiller familyasından bitkiler) fitoaleksinleri

Kievitone, pisatin ve maackianin molekülleri baklagiller familyasından olan bitkiler tarafından üretilen ve isoflavonoid yapısına sahip fitoaleksin molekülleridir. (Zhang and Smith 1993)

Detoksife edildiklerinde, genellikle alil grubuna bağlı isoflavonoid kısmından hidroksillemeye veya yapıdaki metoksi grubunun hidrolizine uğrarlar ve hidroksillenmiş türevlere dönüşürler (Smith et.al., 1981).



Şekil 1.6. Legume fitoaleksinleri ve etkisizleştirme reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler

1.5. Stilbenler

Asma yaprakları ve meyveleri, fungal hastalıklara ve abiotik davranışına yanıt olarak fenolik grup içeren bileşikleri sentezlerler. Bu tür moleküllere stilbenler adı verilir (Adrian et.al., 1997).

Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroksi stilben) stilben grubuna ait bir bileşik olup, bitkilerin büyüme ve gelişme aşamalarının herhangi bir döneminde stres altında kaldıklarında veya bir patojen saldırısına uğradıklarında, bitki savunma mekanizmasının oluşturulması amacıyla üretilir. Resveratrol, fitoaleksinin grubuna ait bir sekonder bitki metabolitidir. (Langrake, 1981)

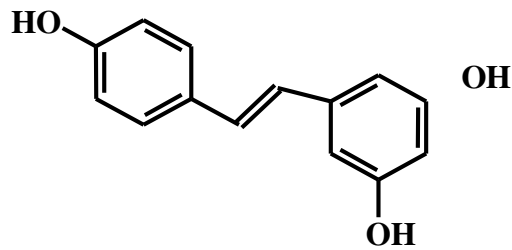
Çin ve Japon halklarının geleneksel olarak kullandıkları ve kojokon olarak adlandırılan bir ilacın, resveratrol içerdiği günümüzde bilinmektedir. Bu ilaç *Polygonium cuspidatum* (sivri uçlu çobandeğneği) bitki kökünün kurutulup toz haline getirilmesiyle elde edilir. Damar tıkanıklığı başta olmak üzere cilt iltihabı ve alerji gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Resveratrol'un kimyasal yapısının tanımlanması sonucu gerçekleştirilen bazı biyolojik etki çalışmalarında, kanserden korunmaya yönelik etkileri açığa çıkarılmıştır (Jeandet et.al., 1995).

Özellikle çevresel faktörler ve kültürel uygulamalar, resveratrol üretimini doğrudan etkiler. Serin ortamlarda yetiştirilen şaraplık üzümlerde resveratrol düzeyinin, iyi güneşlenen ortamlarda yetişenlerden daha yüksek olduğu kabul edilmektedir. Bitkilerde fitoaleksinin sentezi, fungal hastalıklar ve hava kirlilik etmenleri gibi bitkilerde stres yaratan faktörlerin bitkilere aynı düzeyde yansımaları mümkün olmadığından, her zaman aynı miktarda olamayacaktır. Bu nedenle, resveratrolün kontrollü koşullarda elde edilmesi üzerinde çalışılmakta ve çeşitli teknikler kullanılarak yılın her döneminde ürün elde edilmesinin yolları araştırılmaktadır. Söz konusu teknikler arasında kallus ve hücre süspansiyon kültürlerini kullanma yer almaktadır. Bunun nedeni, morfolojik olarak farklılaşma eğilimindeki hücre ve hücre gruplarında potansiyel olarak fitoaleksinin üretim olanağının daha fazla olmasıdır (Sarig et.al., 1997).

Hücre süspansiyon kültürleri bir doku kültürü tekniği olarak tanımlanır ve hücre veya hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım göstermesinden oluşur. Kallus, morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tanımlanır ve ana bitkiden kesilen doku parçasının, steril ve yapay besin ortamında büyütülmesi sonucu oluşur (Keskin ve Marasalı, 2005).

Biyomühendislik uygulamalarından bir tanesi de resveratrol'ün bitki dokuları aracılığı ile (kallus ve hücre kültürleri) üretilmesidir. Ses ötesi dalgalar yardımıyla, üzümünden resveratrol üretilmesi, bu alanda oldukça yeni bir çalışmadır. Bilindiği üzere, ses ötesi dalgaların uygulandığı ortamlarda OH, H, X, C ve CN gibi serbest radikaller oluşmakta ve bu radikaller kimya endüstrisinde, tepkimelerde başlatıcı olarak görev yapması, üretim verimini artırması, tepkime süresini kısaltması ve tepkime yol izini değiştirerek farklı ürünlerin elde edilmesini sağlamaktadır (Keskin ve Marasalı, 2005).

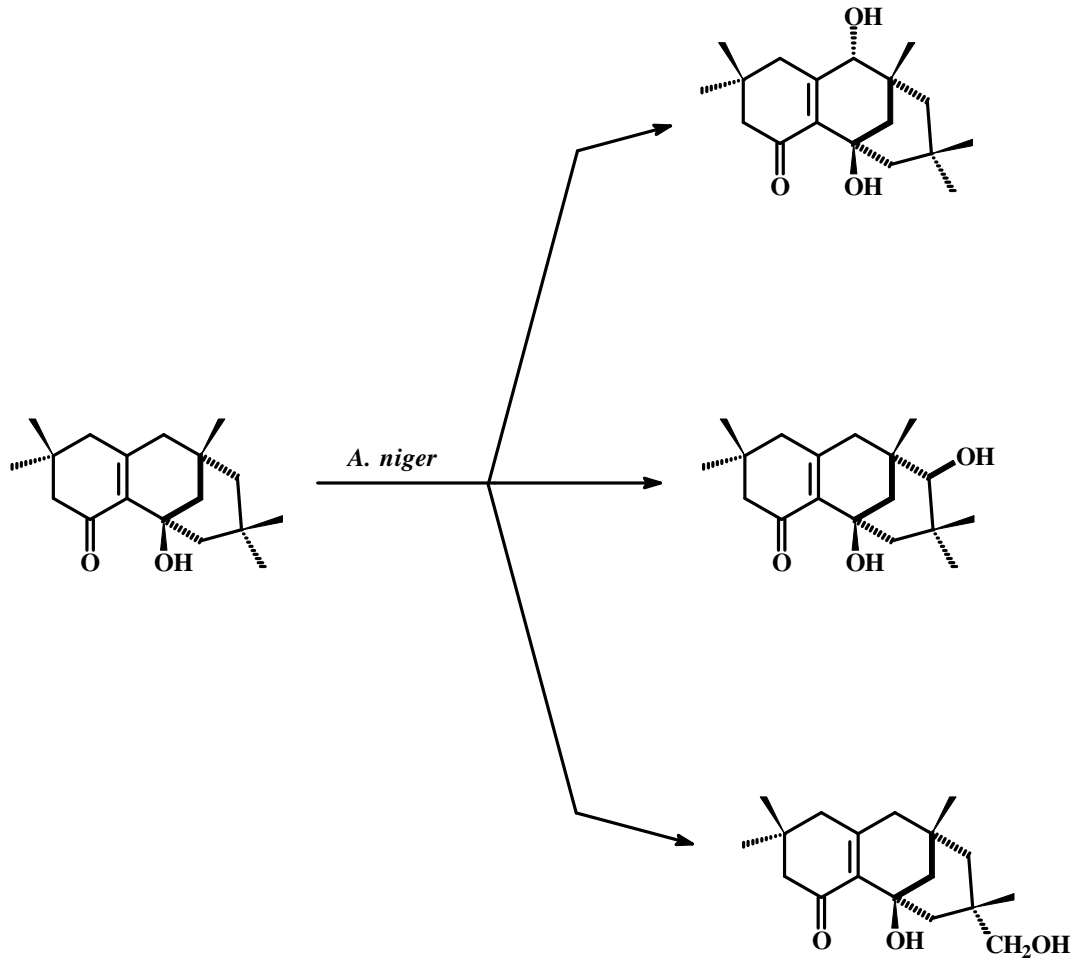
Resveratrol'ün hidroksil (-OH) iyonlarını içeren polifenolik yapıya sahip bir bileşik olduğundan, ses ötesi dalgaları kullanımıyla üretiminden daha yüksek verim alınabileceği tahmin edilmektedir (Kunter ve Keskin, 2006)



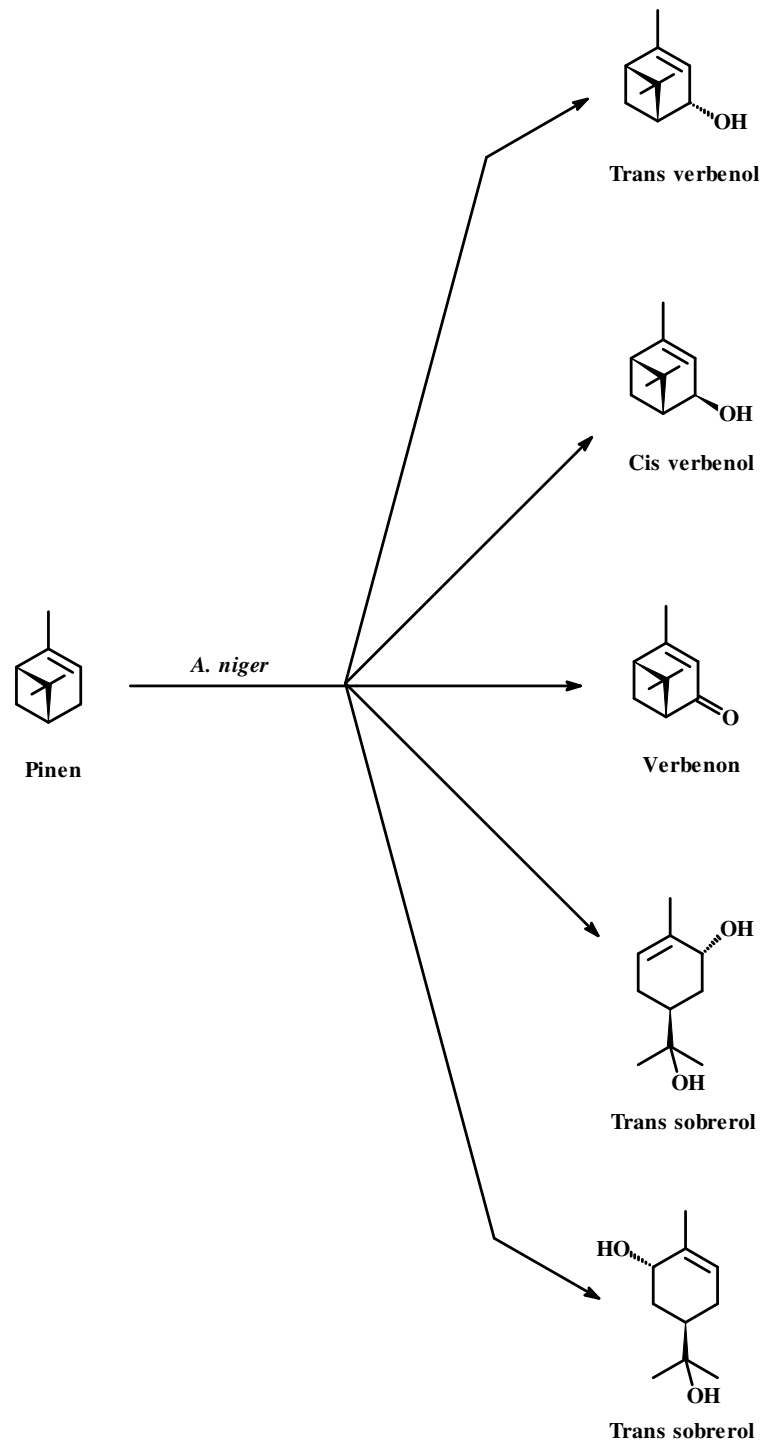
Şekil 1.7. *trans*-resveratrol'ün molekül yapısı

1.6. *Aspergillus niger* ile Gerçekleşen Biyotransformasyon Reaksiyonları

Aspergillus niger'in endüstriyel kullanım alanlarından bir tanesi de, biyolojik hidrosilleme ajanı olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu tür reaksiyonlara literatürde bol miktarda rastlanmaktadır. Ayrıca *A. niger* ile ilgili çalışma grubumuzca yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır (Kiran vd., 2004; Yildirim, 2004). Bazı örnek biyotransformasyon reaksiyonları aşağıda sunulmuştur.



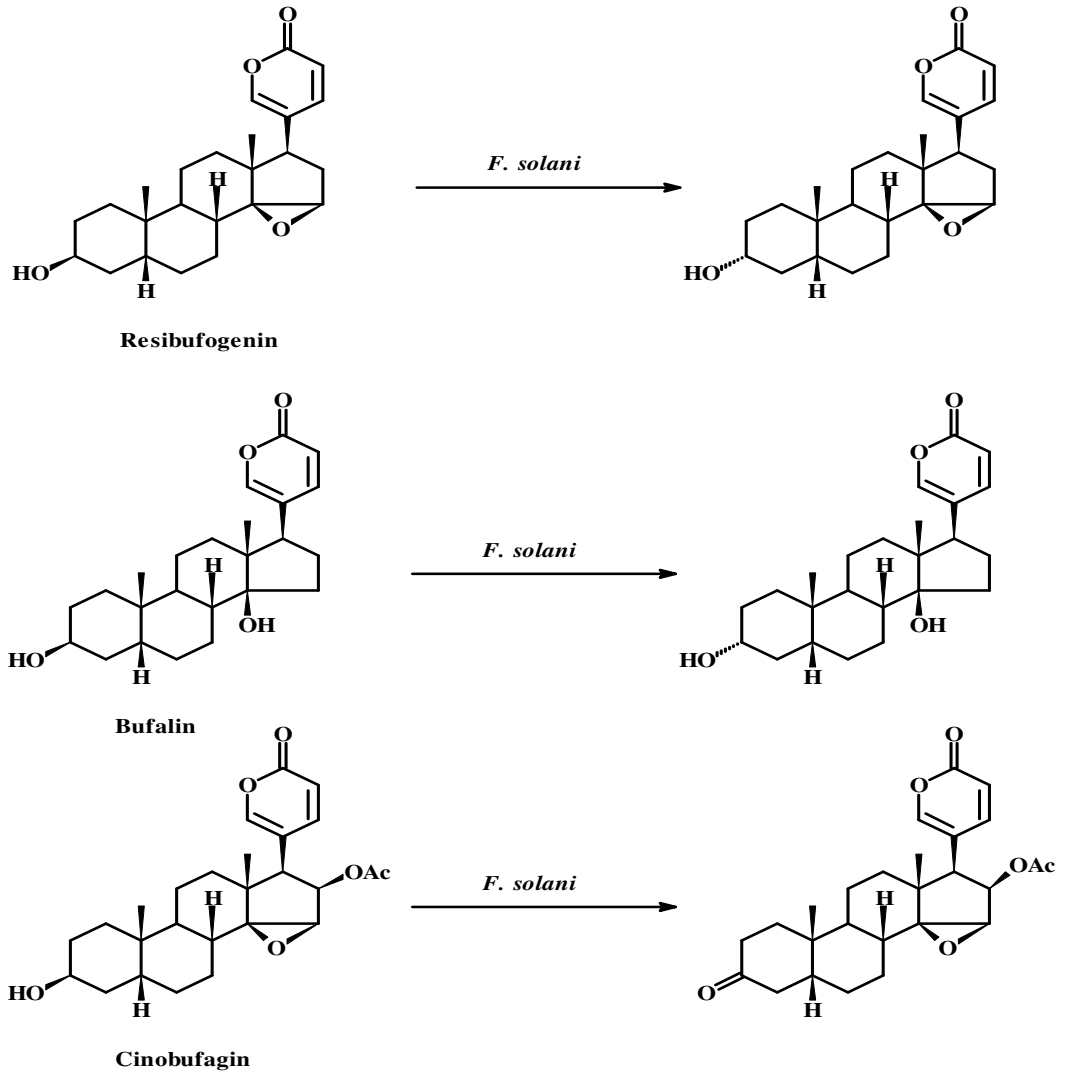
Şekil 1.8. Rasemik diizoforonun *A. niger* ile biyotransformasyon reaksiyonu



Şekil 1.9. (1R)-(+)- α -Pinene'in *A. niger* ile biyotransformasyonu (Lindmark et.al., 2003)

1.7. *Fusarium solani* ile Gerçekleşen Biyotransformasyonlar

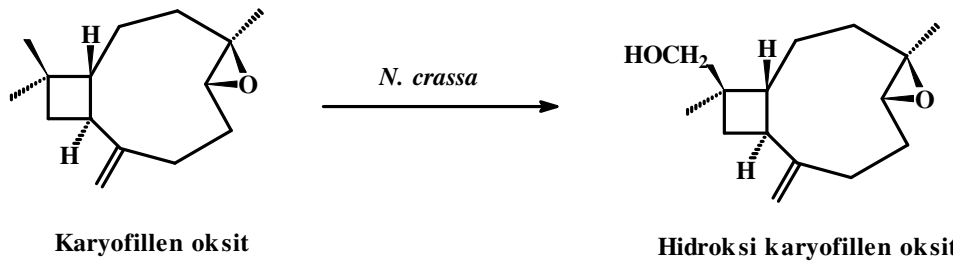
Fusarium solani (AS 3. 1829)'nin de bir diğer endüstriyel kullanım alanı ise, biyolojik hidroksilleme ajanı olarak kullanılabilir. Literatürde bu tür reaksiyonlara çok az rastlanılmaktadır. Örnek olarak bazı steroid hormon benzeri moleküllerin oksidasyonları ve izomerleşmeleri verilebilir (Mai et.al., 2007).



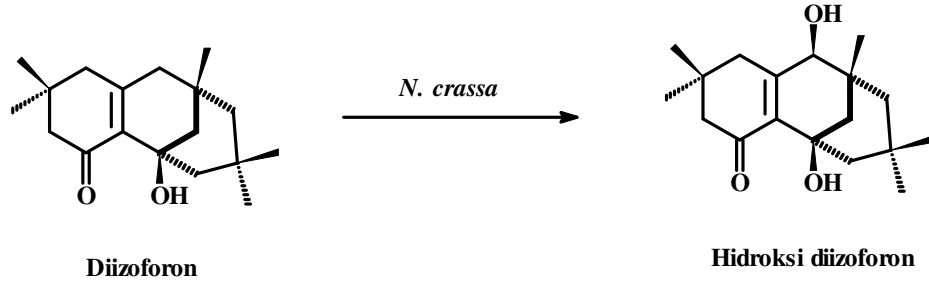
Şekil 1.10. Resibufogenin, bufalin ve cinobufagin'in *F. solani* ile biyotransformasyonu

1. 8. *Neurospora crassa* ile Gerçekleşen Biyotransformasyonlar

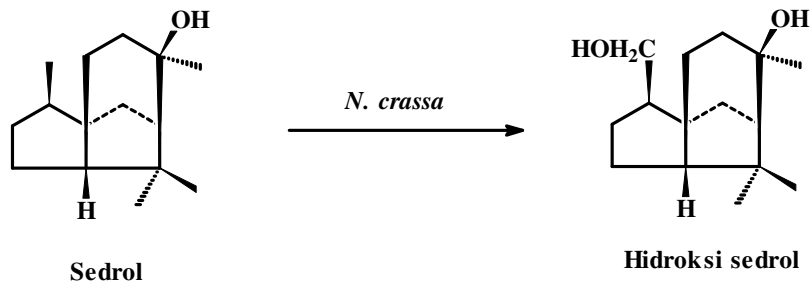
Rasemik diizoforon, karyofillen oksit, sedrol ve steroid hormonlar substrat olarak kullanılarak *N. crassa* ile gerçekleştirilmiş biyodönüşüm reaksiyonları mevcuttur (Maugras et.al., 1973a ve 1973b; Akar, 2005; Kiran vd., 2005; Durceylan, 2007). Bu reaksiyonlar sonucunda, mono- ve/veya di-hidroksillenmiş türevler elde edilmiştir. Bazı örnekler aşağıda sunulmuştur.



Şekil 1.11.a. Karyofillen oksit'in *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonu



Şekil 1.11.b. Rasemik diizoforon'un *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonu



Şekil 1.11.c. Sedrolün *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonu

BÖLÜM-2:MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARI

2.1. Genel Deneysel Bilgiler

Salaştırmada kolon kromatografisi kullanıldı. Kolon kromatografisi için 60 (Merck, 230–400 mesh) tipi silika jel kullanıldı. İnce tabaka kromatografisi, 0.25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF₂₅₄) üzerinde etil asetat-petrol eteri (60-80⁰C) (1:1) çözgen sistemiyle izlendi. Bileşiklerin spotları metanol-sülfirik asit çözeltisiyle renklendirildikten sonra ısıtılarak belirgin hale getirildi.

2. 2. Mikroorganizmaların Temini Ve Saklanması

Çalışmamızda kullanılan funguslar *Aspergillus niger* (ATCC 10549), *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa* (wild tipi) Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, *Fusarium solani* (yerel izolat) ESOGÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür koleksiyonlarından sağlanmış ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

2. 3. Kullanılan Sıvı Besi Yerlerinin Hazırlanışı

A. *niger* ve *N. crassa* üretimi için kullanılan sıvı besiyeri bileşenleri ve miktarları:

Glukoz	15 g
Sakkaroz	15g
KH ₂ PO ₄	1g
Pepton	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	500 mg
KCl	500 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg

B. *cinerea* ve *F. solani* üretimi için kullanılan sıvı besiyeri bileşenleri ve miktarları:

Glukoz	50 g
Yeast extract	1 g
KH ₂ PO ₄	5 g
NaNO ₃	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	500 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg

Yukarıda belirtilen besiyeri bileşenleri tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH 7,0 olacak şekilde 0,1 M HCl çözeltisi hazırlanarak ilave edilmiştir. 250 ml'lik erlenlerin her birine 100 ml besiyeri konularak erlenlerin ağızları pamukla kapatılıp pamuğun üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Besiyerleri, 120 °C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.4. Mikroorganizmaların Hazırlanması

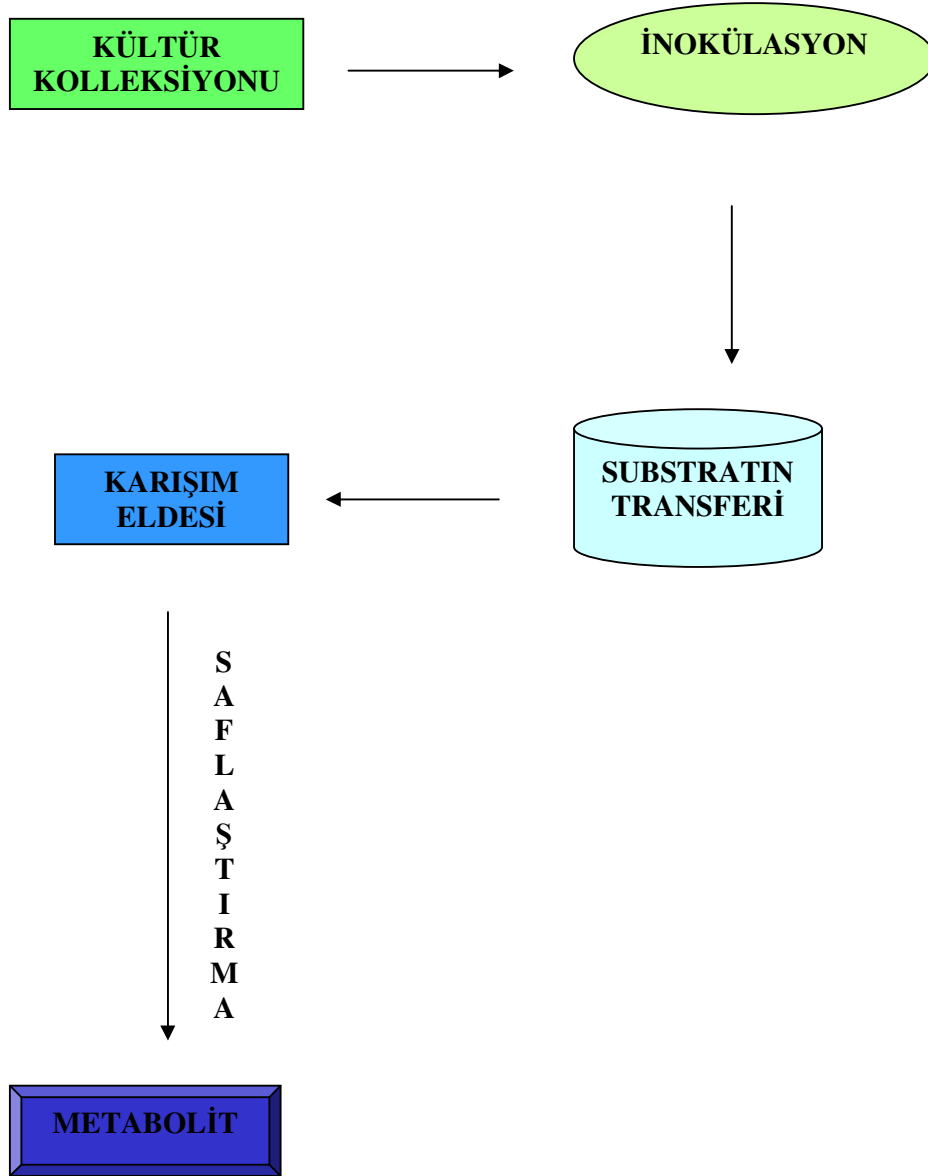
Oda sıcaklığında, katı besiyerinde bulunan mikroorganizmalar 250 ml'lik erlende bulunan 100 ml'lik sıvı besiyerine UV steril kabininde bir öze ucu dolusu miktarda ilave edilmiştir. Daha sonra çalkalamalı koşullarda (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmanın yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra (24–48 saat), eşit miktarda sıvı besiyeri içeren diğer erlenlere steril koşullarda aktarılmıştır. Sıvı besiyerlerine ekimi yapılan bu kültürler, dairesel sallayıcı üzerinde (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki aşamada ortama substrat eklenerek biyotransformasyon süreci başlatılmıştır.

2.5. Substratın İlavesi

20 mg benzoin, 2 ml asetonda çözüldükten sonra bölüm 2.1.4' de belirtildiği şekilde yetiştirilen fungus içeren çözeltiliye, inkübasyonun ikinci gününde ilave edilmiştir. İnkübasyon, oda sıcaklığında 120 rpm hızla çalıştırılan dairesel çalkalayıcı üzerinde, bir hafta boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç içerisinde biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve dönüşümlerin maksimuma ulaştığı nokta, İTK sistemi ile tespit edildi. Numuneler üzerine etil asetat (EtOAc) ilave edilerek mikroorganizmaların canlılığına son verildi ve biyotransformasyon reaksiyonu durduruldu. Daha sonraki aşamada ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarına geçildi.

2.6. Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besi yerlerine 1/4 oranında EtOAc ilave edildi. İyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden vakum altında süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstre edildi. Toplanan ekstreler susuz Na_2SO_4 'tan geçirilerek yoğunlaşmaya bırakıldı. Elde edilen ekstre kolon kromatografisi ile saflaştırılmaya çalışıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak etil asetat'ın polaritesi petrol eteri ile artırılarak gradient bir sistem kullanıldı. Ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlendi.

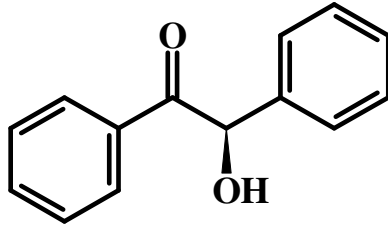


Şekil 2.1.Biyotransformasyon aşamaları

BÖLÜM-3: DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Substrat Molekülü ve Özellikleri

Biyotransformasyon ön deneme çalışmalarında kullanmış olduğumuz benzoin molekülü, Avocado firmasından satın alınmıştır. Molekülün yapısı şekil 3.1’de gösterilmiştir.

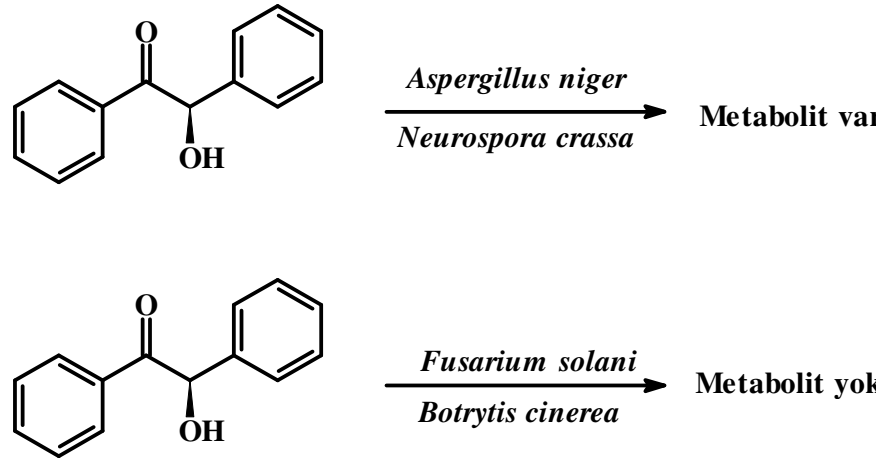


Genel Özellikleri	
Molekül Formülü	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Molekül Ağırlığı	212.25 g/mol
Yoğunluğu	1.31 g/cm ³
Erime Noktası	134-136 °C
Kaynama Noktası	334-344 °C

Şekil 3.1. Benzoin’ in moleküler yapısı ve genel özellikleri

3.2. Yapılan Ön Deneme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tezin amaç kısmında belirtildiği üzere benzoin molekülü *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *Fusarium solani* fungal kültürleri ile biyotransformasyon reaksiyonlarına tabi tutulmuştur. Sıvı besiyerinde büyütülen *A. niger*, *F. solani*, *N. crassa* ve *B. cinerea* fungal kültürleri, benzoin molekülü ile 7 gün boyunca dairesel çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen karışım, ince tabaka kromatografisi (İTK) yardımıyla analiz edildi. Yapılan ön denemelerde alınan sonuçlar aşağıda sunulmuştur.



Şekil 3.2. Yapılan ön denemelerin sonuçları

Yapılan ön denemelerde 20 mg benzoin molekülü kullanılmıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere, substrat molekülü, *A. niger* ve *N. crassa* fungal kültürleri ile biyotransformasyonları sonucu yeni metabolitlere dönüşmüş, fakat patojenik fungal kültürler olan *Botrytis cinerea* ve *Fusarium solani* ile ise herhangi bir metabolit vermemiştir. Bu aşamada olumlu sonuç alınan benzoin'in büyük ölçekte *A. niger* ile biyotransformasyon reaksiyonunun yapılmasına karar verilmiş ve oluşan ürünlerin yapısının aydınlatılması çalışmalarına başlanmıştır.

3.3. Benzoin'in *Aspergillus niger* ile Biotransformasyonu

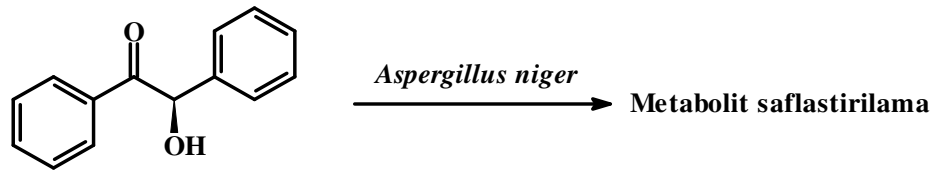
Benzoin bileşiğinin büyük ölçekte biyotransformasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonda substrat miktarı 500 mg olarak alındı. Sıvı besiyerinde büyütülen *A. niger* fungal kültürü, benzoin molekülü ile 7 gün boyunca dairesel çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen karışım, İTK yardımıyla analiz edildi ve sonuçta çözeltide başlangıç maddesi dışında birbirleri içerisine geçmiş ve başlangıç maddesinin polaritesinden daha yüksek polariteye sahip birçok polar metabolitin varlığı belirlendi. Bu karışım, daha sonra dolgu maddesi olarak

silika ve çözücü sistemi olarak değişik oranlarda petrol eteri-etil asetat karışımı kullanılan kolonda, kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmaya çalışıldı.

Kolondan ilk olarak % 10'luk petrol eteri-etil asetat karışımı kullanılmak suretiyle başlangıç maddesi (100 mg) izole edildi. Yapısı mevcut NMR spektrumları ile karşılaştırılarak aydınlatıldı.

Daha sonra kolondaki çözeltinin polaritesi kademeli olarak artırıldı. % 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ve 65'lik petrol eteri-etil asetat elusyonu kullanılarak mevcut metabolitler saflaştırılmaya çalışıldı. Saf olduğu düşünülen madelere ait olan elüsyonların tamamı toplandıktan sonra çözücü rotari-evaporatörde uçuruldu. Elde edilen maddenin saflık kontrolü İTK ile tespit edildi. Ön denemelerde elde edilen spota eşdeğer olduğu tespit edilen spotlardan hiçbir tanesi saf olarak elde edilemedi. Biyotransformasyon çalışması birkaç kez tekrarlanmasına rağmen olumlu sonuç alınmadı.

Oluşan metabolit İTK'da başlangıç maddesine oranla daha polar bir yapıya sahip ve büyük bir ihtimalle, başlangıç maddesinin mono veya di-hidroksillenmiş bir türevi olabileceği gibi, yapıda mevcut keton grubunun indirgenmesi sonucu rasemik karışım şeklinde hidroksi türevleri de elde edilmiş olabilir. Gerek keton grubunun indirgenmesi sonucu oluşan rasemik hidroksi türevleri, gerekse yapıya ilave edilmiş muhtemel mono hidroksillenmiş türevlerin polariteleri birbirlerine yakın olacağından, bu tür karışımların kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmaları oldukça güç ve başarılı olma şansının oldukça düşük olduğu kanaatine varıldı.



Şekil 3.3. Benzoin'in *A. niger* ile biyotransformasyon reaksiyonu

Elde edilen bu sonuçlar ışığında, benzoin molekülünün *A. niger* ve *N. crassa* ile gerçekleştirilen reaksiyonları sonucunda yeni benzoin türevlerin oluşmuş olabileceği, fakat benzoin'in *B. cinerea* ile *F. solani* fungal kültürleri için iyi bir substrat olmadığı ortaya konmuştur. Benzoin molekülü gibi aromatik halka içeren bileşiklerin biyotransformasyonları, literatürde çok sıklıkla çalışılmamış ve yapılan az sayıda çalışmalardan ise olumlu sonuç alınan çalışma sayısı oldukça sınırlı kalmıştır.

Safılaştırmada başarı sağlanamadığından, ön çalışmalarda olumlu sonuç alınan benzoin'in *N. crassa* ile biyotransformasyon reaksiyonu gerçekleştirilmemiştir.

BÖLÜM-4: KAYNAKLAR DİZİNİ

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akar, T., 2005, Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü , 101s.
- Adrian, M., Rajaei, H., Jeandet, P., Vcncau, J. and Bessis, R., 1998, Resvcratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia, *Phytopathology*, 88:472-476
- Bailey, J.A. and Mansfield, J.W., 1982, *Phytoalexins*, Blackie and Son L., Glasgow and London, p333.
- Conn, B., Tewari, J.P. and Aver, W.A., 1994, Resistance to *Rhizoctonia solani* and presence of antimicrobial compounds in *Camelina saliva* roots. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 3:125-130.
- Conn, B., Tewari, J.P. and Aver, W.A., 1988, Resistance to *Alternaria brassicae* and pytoalexin elicitation in rapeseed and other crucifers, *Plant Science*, 56:21-25
- Durceylan, Z., 2007, Karyofillen oksitin *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonunun incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. Fen Bilimleri, Enstitüsü., 47s.
- Desjardins, A. E., McCnrmick, S. P. and Corsini, D.L.,1995, Diversity of sesquiterpenes in 46 potato cultivars and breeding selections. *Journal of Agriculturel and Food Chemistry* 43:2267-2272.
- Grayer. R. J. and Harborne, J. J., 1994, A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37:19-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hanson, J.R., 1995, An introduction to biotransformations in organic chemistry, Oxford University Press, Oxford, 92p.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M. and Meunie, P., 1995, Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to Botrytis attack under natural conditions. Journal of Phytopathology, 143:135-139.
- Kıran, I., Akar, T., Görgülü, A. and Kazaz, C., 2005, Biotransformation of racemic diisophorone by *Cephalosporium aphidicola* and *Neurospora crassa*, Biotechnology Letters, 27:1007-1010.
- Kıran, I., Yildirim, H.N., Hanson, J.R. and Hitchcock, P.B., 2004, The antifungal activity and biotransformation of diisophorone by the fungus *Aspergillus niger*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79(12):1366-1370.
- Kuc, J., Bailey, A. and Mansfield, J.W., 1982, Phytoalexins from the Solanaceae, John&Wiley, New York, USA, p.81-105
- Keskin, N. ve Maraslı K., 2005, Asma fitoaleksinleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(1): 42-46
- Kunter, B. ve Keskin, N., 2006, Asmalarda vitis spp.fitoaleksin üretimini etkileyen faktörler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(1):79-87.
- Langrake, P., 1981, Disease resistance of vitis spp. and production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene physiology, Plant Pathology, 18:312-226.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lindmark-Henriksson, M., 2003, Biotransformations of Turpentine Constituents Oxgenation and Esterification, PhD Thesis, Royal Institute of Technology, Sweden, ISBN: 91-7283-476-5.
- Mai, Xiao-Chi, Zheng, J. and Guo, De-An, 2007, Highly selective isomerisation and dehydrogenation of three major bufadienolides at 3-OH by *Fusarium solani*, *Enzyme Microbial Technology*, 40:1585-1591.
- Maugras, M.M., Hartemann, D., Granger, P. and Lematre, J., 1973a, Microbiological transformation of estrogens. Transformation of equilenine into 12 β -dihydroequilenine by *Neurospora crassa* . *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences. D. Sciences Naturelles*, 277: 681-683.
- Maugras, M.M., Savigny, P. and Lematre, J., 1973b, Microbiological transformation of estrogens. 11 β -hydroxylation of estradiol by *Neurospora crassa*, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences. D. Sciences Naturelles*, 176: 3221-3223.
- Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E., 1999, Fungal resistance to plant Antibiotics as a mechanism of pathogenesis, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3):708-724.
- Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D., 1994, *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. Wallingford, US., IMI Technical Handbooks: No:1, International Mycological Institute (CAB International), 125p.
- Prusky, D., Wattad, C. and Kobiler, 1996, Effect of ethylene on the activation of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* in avacado fruits, *Moleculer Plant Microbe Interaction*, 9:864-868.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roberts, S.M., 1992, Preparative biotransformations: whole cell and isolated enzymes in organic synthesis, John Wiley&Sons, Chichester.
- Roberts, S.M., Turner, N.J., Willets, A.J. and Turner M.K., 1995, Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms, Cambridge University press, Cambridge, 195p.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Iisker, N. and BenArie, R., 1997, Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*, Physiology of Molecules and Plant Pathology, 50:337-347.
- Smith, D. A., Harrer, J. M. and Cleveland, T. E., 1981, Simultaneous detoxification of phytoalexins by *Fusarium solani* f.sp. phaseoli, Phytopatheology, 71:1212-1215.
- Quidde T., Osbourn A. and Tudzynski P.,1998, Detoxiflation of α -Tamotin by *B. cinerea*, Physiology of Moleculer Pathology, 52: 151-162 .
- Üstün, A.S., 1991, Bitkilerde uyarılan dayanıklılık ve fitoaleksinler, DOĞA-Turkish Journal of Biology, 15(3): 230- 239
- Üstün, A. S., Çökmüş, C. ve Saçılık, S.C., 1996, Bazı biyotik uyarıcılar ile inokule edilen biber (*Capsicum annuum* L.) meyvesinde kapsidiol birikimi, Turkish Journal of Agriculture and Foresty, 20: 431-438.
- Üstün, A.S., Ellialtıoğlu, Ş. ve Mehmetoğlu, Ü., 1998, Bazı uyarıcıların Biber (*Capsicum annuum* L.) hücre süspansiyon kültürlerinde kapsidiol üretimine etkisi. Türkiye VII.Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül, Ankara, 180-184.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Vining, L.C., 1990, Functions of secondary metabolites. Annual Review of Microbiology; 44:395-427

Telefoncu, A., 1995, Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No: 152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 356s.

Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M. ve Çeltik, Ö., 2000, Türkiye'nin tarımsal mikroflorasının endüstriyel öneme sahip bazı Enzimatik aktivitelerinin incelenmesi. Amilaz, proteaz, lipaz. Journal of Biology, 24:79-93.

Yıldırım, H.N., 2004, Diizoforon'un *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonunun ve antifungal aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen BilimleriEnstitüsü, 64s.

Zhang Y. and Smith D.A.,1993, Concurrent metabolism of the pytoalexins phaseollin, kievitone and phaseollinisoflavon by the *Fusarium solani*, Physiology of the Plant Pathology 23:89-100.

www.kultur.k12.tr/biyosemp/pdf/03__biyoteknoloji_2007.pdf