

Abiyetik Asit, Betulin, Hidroksi Diizoforon ve Oleik Asitin Biyotransformasyon
Tepkimeleri ve Metabolitlerin *In Vitro* Biyolojik Aktiviteleri

Özge Özşen

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs 2017

Biotransformation Reactions of Abietic Acid, Betulin, Hydroxy Diisophorone and Oleic
Acid and *In Vitro* Biological Activities of Their Metabolites

Özge Özşen

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Chemistry

May 2017

Abiyetik Asit, Betulin, Hidroksi Diizoforon ve Oleik Asitin Biyotransformasyon
Tepkimeleri ve Metabolitlerin *In Vitro* Biyolojik Aktiviteleri

Özge Özşen

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

Danışman: Prof. Dr. İsmail KIRAN

Bu Tez TÜBİTAK tarafından “114Z480” nolu ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından “2014654” nolu projeler çerçevesinde
desteklenmiştir.

Mayıs 2017

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Özge Özşen’in DOKTORA tezi olarak hazırladığı “Abiyetik Asit, Betulin, Hidroksi Diizoforon ve Oleik Asitin Biyotransformasyon Tepkimeleri ve Metabolitlerin *In Vitro* Biyolojik Aktiviteleri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İsmail Kıran

İkinci Danışman : -

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. İsmail Kıran

Üye: Prof. Dr. Sevgi Kolaylı

Üye: Prof. Dr. Fatih Demirci

Üye: Doç. Dr. Kudret Yıldırım

Üye: Yrd. Doç. Dr. Müjgan Yaman

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. İsmail KIRAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Abiyetik Asit, Betulin, Hidroksi Diizoforon ve Oleik Asitin Biyotransformasyon Tepkimeleri ve Metabolitlerin *In Vitro* Biyolojik Aktiviteleri” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallarına göre sunduğumu beyan ederim. 04/05/2017

Özge Özşen

ÖZET

İlaç adayı moleküllerin belirlenmesine yönelik çalışmalar üç ana grupta toplanmaktadır. Bunlar, kara bitkileri, kara hayvanları, deniz organizmaları ve mikroorganizmaların metabolitlerinin oluşturduğu doğal kaynaklı bileşikler temel alan çalışmalar, enzim-substrat veya reseptör teorisine dayalı “kombinatoriyal kimya” teknolojisi ile üretilen ve sayıları milyonları bulan sentetik kimyasal maddeleri temel alan çalışmalar ve rekombinant teknolojileri ile üretilen biyoteknolojik ilaçlardır. Biyolojik etki gösteren bileşikler, doğrudan ilaç etken maddesi veya yarı sentezle değiştirilerek daha etkili ve daha az toksik moleküller haline dönüştürülmek suretiyle kullanılabilir.

Bu tez projesi çalışmasında farklı biyolojik aktivite gösterdiği bilinen abiyetik asit, betulin, hidroksi diizoforon ve oleik asit moleküllerinin biyotransformasyon tepkimeleri ile türevlerinin elde edilmesi ve biyolojik aktivitelerinin ortaya konması amaçlandı. Ön biyotransformasyon tepkimeleri için 28 farklı mikroorganizma kullanıldı. Betulin ile hidroksi diizoforon kullanılarak gerçekleştirilen ön biyotransformasyon tepkimelerinden yeni metabolit elde edilemedi. Abiyetik asitin *Mucor ramannianus* ve *Neurospora crassa* ile biyotransformasyon tepkimeleri sonucu monohidroksillenmiş üç farklı türevi olan [2α -, 7β - ile 1β -hidroksi dehidroabiyetik asit] sırasıyla %12.7, 15.5 ile 20.2 verimle elde edildi. Oleik asit biyotransformasyonu sonucu çok sayıda metabolit içeren karışımlar elde edildi. *In vitro* antimikrobiyal aktivite deneyleri broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 19 farklı patojen mikroorganizmaya karşı gerçekleştirildi. Abiyetik asit ve türevlerinin izolatlara karşı test edilen bütün derişimlerde önemli bir aktivite gözlemlenmedi ($>250 \mu\text{g/mL}$). A549 ve HepG2 kanser hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmaları sonucunda ise 7β -hidroksi dehidroabiyetik asit türevinin HepG2 ($\text{İK}_{50}=196.6 \mu\text{g/mL}$ ve $\text{SI}>187$) hücrelerine karşı en etkili ve seçici antikanser etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, biyolojik aktivite, biyoteknoloji, mikroorganizmalar, sitotoksosite.

SUMMARY

Studies aimed at determining a drug candidate molecule can be classified into three groups. These are; studies based on naturally occurring chemical substances obtained from land plants, land animals, sea organisms and microorganisms' metabolites, studies based on synthetic chemical compounds generated through combinatorial chemistry technology, approaching to millions numerically, by using enzyme-substrate interactions or reseptor theory and biotechnological medicines produced via recombinant technology. Naturally occurring compounds demonstrating biological activity can be used either directly as active ingredient for medicines or they are utilized after making them less toxic and more potent active ingredient by substituting them with their semi-synthesis.

In this study we aimed at obtaining derivatives of abietic acid, betulin, hydroxy diisophorone and oleic acid which are known to exhibit a variety of biological properties through bioconversion reactions and investigating the biological activities of the metabolites. 28 different microorganisms were used for pre-biotransformation experiments. No metabolites were obtained for betulin and hydroxy diisophorone biotransformations. However, biotransformation reactions of abietic acid by *Mucor ramannianus* and *Neurospora crassa* produced three monohydroxylated derivatives [2α , 7β and 1β -hydroxy dehydroabietic acid] with 12.7, 15.5 and 20.1% yields, respectively. Biotransformation reactions of oleic acid by fungi produced mixtures containing a large number of metabolites. *In vitro* antimicrobial activity studies were carried out against 19 different pathogen microorganisms via using the broth microdilution methods. No significant activity was observed for microorganisms at all tested concentrations of abietic acid and its derivatives ($>250 \mu\text{g/mL}$). According to cytotoxicity studies using A549 and HepG2 cancer cells, 7β -hydroxy dehydroabietic acid derivative was found to be the most effective and selective anticancer effect against HepG2 cell line ($\text{IC}_{50}=196,6 \mu\text{g/mL}$ and $\text{SI}>187$).

Key words: Biotransformation, biological activity, biotechnology, microorganisms, cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Akademik yaşımda çok önemli bir yere sahip olan, çalışmamı büyük bir titizlikle yönetip desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına yakın ilgi ve alaka gösteren, değerli fikirleriyle beni her zaman destekleyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç Dr. Özlem ATLI'ya,

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. İlknur DAĞ'a,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ceren ELMACI OTURANEL ve Gamze KAHRAMAN'a,

Son olarak hayatımın başlangıcından bu yana maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sonsuz hoşgörü ve özverileriyle beni destekleyen değerli aileme,

Tez çalışmamı 114Z380 nolu proje kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve 2014654 nolu proje kapsamında destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonuna

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Özge ÖZŞEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Biyotransformasyon Tepkimeleri	2
2.2. Biyotransformasyon Teknikleri.....	4
2.2.1. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon.....	4
2.2.2. İzole enzimler ile biyotransformasyon	4
2.2.3. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon	5
2.2.4. Sporlar ile biyotransformasyon	5
2.2.5. Stasyonere (durağan) hücreler ile biyotransformasyon.....	5
2.2.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon.....	5
2.3. Biyotransformasyon Tepkimelerinin Kullanım Alanları.....	6
2.4. Biyotransformasyon Tepkimelerinin İlaç Geliştirmedeki Önemi	8
2.6. Çalışmada Kullanılan Substratların Biyotransformasyon Tepkimeleri Literatür Çalışmaları.....	13
2.6.1. Abiyetik asit ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri.....	13
2.6.2. Betulin ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri.....	13
2.6.3. Hidroksi diizoforon ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri.....	15
2.6.4. Oleik asit ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7. Çalışmada Kullanılan Substratların Biyolojik Etkileri Literatür Çalışmaları	16
2.7.1. Abiyetik asitin biyolojik etkileri.....	16
2.7.2. Betulinin biyolojik etkileri	18
2.7.3. Hidroksi diizoforonun biyolojik etkileri.....	20
2.7.4. Oleik asitin biyolojik etkileri.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Genel Deneysel Yöntemler.....	23
3.2. Biyotransformasyon Tepkimeleri Çalışmaları.....	25
3.2.1. Mikroorganizmaların kullanımı.....	25
3.2.2. Mikroorganizmaların üretilmesi için kullanılan besiyeri bileşenleri.....	25
3.2.3. Substrat hazırlanması ve ilavesi	27
3.2.4. Metabolitlerin ekstraksiyonu	27
3.2.5. Metabolitlerin kromatografisi.....	28
3.2.6. Metabolitlerin tanımlanması.....	28
3.3. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	28
3.3.1. Kontamine gıda testi çalışmaları	29
3.3.2. Agar difüzyon yöntemi çalışmaları	30
3.3.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yöntemi çalışmaları	32
3.4. İn Vitro Sitotoksiste Çalışmaları	33
3.4.1. Hücrelerin hazırlanması.....	33
3.4.2. Hücrelere XTT sitotoksiste testinin uygulanması	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Abiyetik Asit Çalışmaları	37
4.1.1. Biyotransformasyon tepkimeleri	37
4.1.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	47
4.1.3. Sitotoksiste çalışmaları.....	51
4.2. Betulin Çalışmaları	53

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.1. Biyotransformasyon tepkimeleri	54
4.2.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	54
4.2.3. Sitotoksosite çalışmaları	55
4.3. Hidroksi Diizoforon Çalışmaları	56
4.3.1. Biyotransformasyon tepkimeleri	57
4.3.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	57
4.4. Oleik Asit Çalışmaları	59
4.4.1. Biyotransformasyon tepkimeleri	59
4.4.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	63
4.4.3. Sitotoksosite çalışmaları	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
5.1. Biyotransformasyon Tepkimeleri Sonuçları	71
5.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	72
5.3. Sitotoksosite Sonuçları	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74
EK AÇIKLAMALAR.....	94
Ek Açıklamalar-A: Abiyetik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları	94
Ek Açıklamalar-B: Betulin molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları	96
Ek Açıklamalar-C: Hidroksi diizoforon molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları	98
Ek Açıklamalar-D: Oleik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları	100
Ek Açıklamalar-E: Tez Çalışmasından Üretilen ve Sunulan Makale ve Bildiriler	102
Ek Açıklamalar-F: Tez Çalışmamı Destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri	103

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ.....	104
---------------	-----



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 11 α -Hidroksi progesteron sentezi.....	3
2.2. Taksol türevinin sentezi.....	9
2.3. Penisilin türevlerinin enzimatik sentezi.....	10
2.4. Sefalosporin türevlerinin enzimatik sentezi	10
2.5. Epibatidin ara ürünlerinin sentezi.....	10
2.6. Piperazin-2-karboksilik asit sentezi.....	11
2.7. Ester grubunun seçimli olarak Bacillus esteraz tarafından hidrolizi	12
2.8. Bazı redoks reaksiyonları ve bu reaksiyonları katalizleyen sistemler	12
3.1. Biyotransformasyon aşamaları ve metabolit izolasyonu çalışma şeması.....	24
4.1. Abiyetik asidin <i>M. ramannianus</i> ile biyotransformasyon tepkimesi.....	38
4.2. Abiyetik asidin <i>N. crassa</i> ile biyotransformasyon tepkimesi	38
4.3. 2 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu	39
4.4. 3 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu	40
4.5. 4 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu	40
4.6. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait ¹ H-NMR spektrumları	40
4.7. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait ¹³ C-NMR spektrumları	41
4.8. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait HMBC spektrumları	41
4.9. 2 Nolu metabolite ait COSY spektrumu.....	42
4.10. Abiyetik asit ve 3 nolu metabolite ait ¹ H-NMR spektrumları	42
4.11. Abiyetik asit ve 3 nolu metabolite ait ¹³ C-NMR spektrumları.....	43
4.12. Abiyetik asit (1) ve 3 nolu metabolite ait HMBC spektrumları	43
4.13. Abiyetik asit ve 4 nolu metabolite ait ¹ H-NMR spektrumları	44
4.14. Abiyetik asit ve 4 nolu metabolite ait ¹³ C-NMR spektrumları.....	44
4.15. Abiyetik asit (1) ve 4 nolu metabolite ait HMBC spektrumları	45
4.16. Betulin molekülünün yapısı.....	53
4.17. Diizoforon molekülünden hidroksi diizoforon sentezi	56
4.18. E4 Numunesinin ¹ H-NMR Spektrumu	60
4.19. E5 Numunesinin ¹ H-NMR Spektrumu	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.20. E6 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu	61
4.21. E7 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu	62
4.22. E8 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu	62
4.23. E9 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu	63
4.24. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının <i>C. cassiicola</i> DSM 62475 ile antifungal aktivite resimleri; (a) E5, E8, E7 ekstraktları, (b) E6, E8, E4 ekstraktları, (c) Amfoterisin B inhibisyon zonları	64
4.25. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının <i>A. alternata</i> ile antifungal aktivite resimleri; (a) E5, E8, E7 ekstraktları, (b) Amfoterisin B inhibisyon zonları.....	64
4.26. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antibakteriyel MİK resimleri.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Abiyetik asitin biyotransformasyon tepkimeleri	13
2.2. Betulinin biyotransformasyon tepkimeleri	14
2.3. Oleik asitin biyotransformasyon tepkimeleri	15
2.4. Abiyetik asitin biyolojik etkileri.....	17
2.5. Betulinin biyolojik etkileri	18
2.6. Oleik asitin biyolojik etkileri.....	22
3.1. Taze yatık agar besiyeri bileşenleri	25
3.2. Mueller hinton agar besiyeri bileşenleri	26
3.3. Mueller hinton broth besiyeri bileşenleri.....	26
3.4. α -Medium besiyeri bileşenleri.....	26
3.5. Kontamine gıda testinde kullanılan besiyeri bileşenleri.....	29
3.6. Kontamine gıda testi şeması	30
3.7. Nutrient agar besiyeri bileşenleri.....	30
3.8. Patates dekstroz agar besiyeri bileşenleri	31
3.9. Sabouraud %4 dekstroz agar besiyeri bileşenleri	31
3.10. RPMI-1640 besiyeri bileşenleri.....	31
4.1. Abiyetik asit metabolitlerinin (2-4) IR verileri.....	45
4.2. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) ^1H -NMR spektroskopisine ait veriler.....	45
4.3. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) ^{13}C -NMR spektroskopisine ait veriler.....	46
4.4. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) inhibisyon zonları.....	49
4.5. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) antimikrobiyal aktivite MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$).....	50
4.6. 1-4 Bileşiklerine ait İK_{50} ve SI değerleri	53
4.7. Betulin molekülüne ait antimikrobiyal aktivite MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	55
4.8. Betulin bileşiğine ait İK_{50} ve SI değerleri	56
4.9. Kontamine gıda testi çalışması sonuç tablosu	58
4.10. Amfoterisin B standardının fungal inhibisyon zonları	66
4.11. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının fungal inhibisyon zonları.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**Çizelge****Sayfa**

4.12. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının maya inhibisyon zonları	68
4.13. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının bakteriyel inhibisyon zonları.....	68
4.14 Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antifungal aktivite MİK değerleri.....	69
4.15. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antifungal aktivite MİK değerleri.....	69
4.16. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antibakteriyel aktivite MİK değerleri.....	69
4.17. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının sitotoksosite değerleri	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

$[\alpha]_D^{20}$	20°C’de ölçülen sodyumun D çizgisindeki spesifik çevirme açısı
°C	Santigrad derece
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
RT	Alıkonma süresi
Ppb	Bir litre çözeltideki çözünen maddenin mikrogram cinsinden değeri
Ppm	Bir litre çözeltideki çözünen maddenin milyonda bir cinsinden değeri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
μL	Mikrolitre

Kisaltmalar

Açıklama

AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu
A549	İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi
CDCl ₃	Dötero kloroform
CO ₂	Karbondioksit
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standart Enstitüsü
COSY	Korelasyon spektroskopisi
¹³ C-NMR	Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
DEPT	Polarizasyon transferi ile distorsiyonsuz iyileştirme spektroskopisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco’nun minimum temel besi ortamı
EtOH	Etil alkol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMEM	Eagle’ın minimum esansiyel besi ortamı
FBS	Fötal buzağı serumu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GK/KS	Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi
HepG2	İnsan hepatoselüler karaciğer karsinoma hücre dizisi
HMBC	Çoklu bağ korelasyon spektroskopisi
¹ H-NMR	Proton nükleer manyetik spektroskopisi
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi
IR	Kızılötesi spektroskopisi
İK ₅₀	İnhibitör derişim 50
İTK	İnce tabaka kromatografisi
MeOH	Metanol
MHA	Mueller hinton agar (katı) besi ortamı
MHB	Mueller hinton broth (sıvı) besi ortamı
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid
NA	Nutrient agar (katı) besi ortamı
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
OD	Optik yoğunluk
NIH/3T3	Fare embriyonik hücre dizisi
SGM	Sabouraud %4 Glukoz katı besi ortamı
SI	Selektivite indeksi
THF	Tetrahidrofur
XTT	2,3-Bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolum-5-karboksianilit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni ilaçların geliştirilmesinde, yapı ile etki arasındaki ilişkinin incelenmesi önemli bir rol oynar. İlaçların istenmeyen yan etkileri, ilaç kullanım sorunlarından yalnızca biridir ve ilaç geliştirme süreci ile ilacın klinik kullanımı aşamasında önemli bir yer tutmaktadır. Bunun sonucu olarak da, yeni ilaç moleküllerin tespiti ve geliştirilmesinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Harvey, 2008; Anonim, 2016; Dimitri ve Lio, 2017). Bu yaklaşımlardan bir tanesi biyolojik etkinliği bilinen bir molekülden yola çıkılarak türevlendirme ile daha yüksek biyolojik aktiviteye ve daha az yan etkiye sahip ilaçların elde edilmesidir. Son yıllarda doğal kaynaklardan ilaç elde edilmesine ilgi hızla artmaktadır. Doğal kaynaklı bileşikler model bileşik veya sentez başlangıç maddesi olarak da kullanılır. İlaç etken maddelerinin organik sentezindeki en önemli dezavantajları; çok aşamalı tepkime içermeleri, her aşama sonucu elde edilen verimlerde düşme olması nedeniyle toplam verimin istenildiği düzeyde gerçekleşmemesi ve istenilen stereokimyanın elde edilememesidir. İlaç etken maddelerin stereokimyası, ilacın biyolojik etkinlik göstermesi açısından hayati önem taşımaktadır. Bu durum, maliyetlerin çok yüksek olmasına ve istenilen etken moleküllerin doğru stereokimya ile sentez edilememesine neden olmaktadır. Bu problemin aşılabilmesi için son dönemlerde ilaç keşfi çalışmaları; doğada mevcut veya sentezi kolay olan ucuz moleküllerden yola çıkılarak birkaç adımlık türevlendirme sonucu yeni moleküllerin eldesi veya doğada mevcut mikroorganizmaların ürettiği metabolit yapıların saflaştırılması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi sonucunda yeni biyoaktif moleküllerin eldesine yönelmiştir. Tam organik sentez tepkimeleriyle yeni ilaç moleküllerinin keşfi çalışmaları, gün geçtikçe önemini kaybetmektedir (Phillipson, 2001; Tübitak, 2004; Süzer, 2005; Rishton, 2008; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010; Anonim, 2016).

Bu çalışmada farklı biyolojik aktivite gösterdiği bilinen ve ticari olarak temin edilen abiyetik asit, betulin, hidroksi diizoforon ve oleik asit moleküllerinin biyoteknolojik yöntemlerle türevlerinin elde edilmesi ve elde edilen türevlerin *in vitro* antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Biyotransformasyon Tepkimeleri

Mikroorganizmalar, bitki ve izole enzimlerin katalizörlüğü ile gerçekleştirilen kimyasal dönüşümlere denir. Bu tepkimeler, *in vivo* şartlarda hücreye giren yabancı maddelerin enzimler yardımıyla zararsız (detoksifikasyon) hale getirmek için gerçekleşen tepkimeler olarak da tanımlanabilir. Biyotransformasyon, biyoteknoloji çalışmalarının en önemli basamağını oluşturur ve önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Geniş bir çeşitliliğe sahip olan bu tepkimelerin en önemli özelliği, sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek tepkimelere olanak sağlamasıdır (Davies vd., 1989; Martin, 1991; Roberts vd., 1995; Tramper, 1996; Faber, 2011; Zafar vd., 2016).

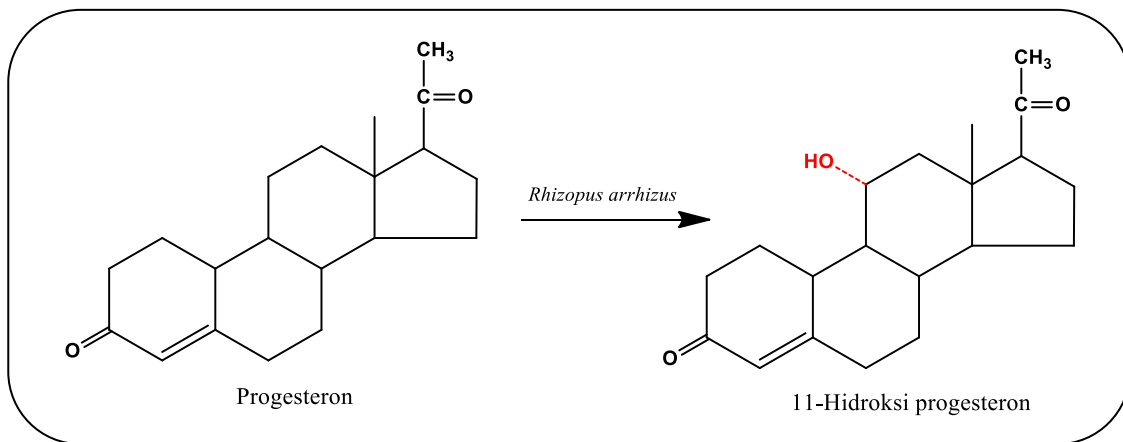
Bütün hücre sistemleri içerisinde biyotransformasyon tepkimeleri için en çok tercih edilenler mikrobiyal hücrelerdir (Oreste ve Hans-Peter, 2010). Bu hücreler bitki hücreleri ile karşılaştırıldığında, mikroorganizmalar daha kolay gelişir. Hızlı büyüme oranları, fizyolojik kontrol ve genlerin manipülasyonu ile mikrobiyal hücreler biyotransformasyon tepkimeleri için en uygun katalizör olarak kabul edilmektedir (Omeliński, 1923). Ayrıca bitki ve hayvan hücrelerinde sahip oldukları enzim çeşitliliği sebebiyle gerçekleşen tepkime kontrolünün zorluğu yanı sıra düşük verim eldesi sebebiyle tercih edilmemektedirler. Bu hücrelerin dezavantajlarının aksine mikrobiyal hücreler, ılımlı tepkime koşulları altında farklı substratları metabolize edebilmektedirler. Mikroorganizmalar bu metabolik aktiviteleri sonucu kısa sürede faydalı ürünler oluşturmaları sebebi ile de oldukça önemlidir (Loughlin, 2000; Donadio vd., 2002; Berger, 2007).

Mikroorganizmaların hücre yüzey alanlarının hücre hacmine oranı yüksek olduğundan besinleri hızla içine alabilir, böylece hızlı büyüebilir ve kısa sürede bol miktarda ürün oluşturabilirler. Mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite çeşitliliği oldukça yüksektir ve farklı çevresel ortamlara çok çabuk adaptasyon sağlayabilirler. Ayrıca bileşiklerin aktif ve inaktif formlarının karışık olarak elde edildiği kimyasal sentezlerin aksine mikroorganizmaların biyosentezle oluşturdıkları bileşikler aktif

formdadır. Mikroorganizmaların hücreleri ve genleri değiştirildiğinde daha fazla ürün verme kapasiteleri de oldukça artmaktadır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

Biyotransformasyon tepkimelerinde en verimli ve bilinen dönüşümler özellikle yükseltgenme, indirgenme, dekarboksilleme, esterleşme, izomerleşme, fosforilleme, C-C bağlarının koparılması ve hidroliz (oksidoredüktaz ve hidrolazların katalizlediği) gibi tepkimelerdir. Biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda genellikle polaritesi yüksek, organizmadan atılımı kolay, inaktif moleküller meydana gelmektedir. Bu tepkimelerin mikroorganizmalar aracılığı ile yapısı bilinen substrat ile laboratuvar koşullarında yeni metabolitlerin sentezlenmesine “mikrobiyal biyotransformasyon tepkimesi” denir (Kieslich, 1976; Crueger ve Crueger, 1990; Loughlin, 2000; Faber, 2011).

En önemli biyotransformasyon tepkimeleri steroid dönüşümleridir. Steroidler farmasötik endüstri için oldukça önemli ürünlerdir. Bu maddeleri hayvansal kaynaklardan elde etmek ya da kimyasal sentezini gerçekleştirmek oldukça güçtür. Steroidlerle yapılan ilk çalışmaların en iyi örneği Mamoli ve Vercellone’nin (1937) mayaları kullanarak androstenedionu testesterona indirgemesidir (Mamoli ve Vercellone, 1937). Sonrasında Peterson ve Murray (1952) *Rhizopus arrhizus* fungusunu kullanarak progesteron molekülüne 11 α -pozisyonuna (Şekil 2.1) hidroksil grubu ilavesi gerçekleştirmiştir (Peterson ve Murray, 1952). Böylece progesteron hem hidroksillenmiş hem de küfün rasemik seçiciliği gösterilmiştir (Kieslich, 1976; Crueger ve Crueger, 1990; Dordick vd., 1998).



Şekil 2.1. 11 α -Hidroksi progesteron sentezi

Biyotransformasyon tepkimeleri fermantasyon yöntemine ilaveten, çok basamaklı enzimatik tepkimeleri içeren çeşitli mikroorganizmalar belli bir bileşiği stereospesifik olarak kendisine yakın ancak başka bir bileşiğe dönüştürme kapasitesine sahiptirler. Pratikte her tip kimyasal tepkimeyi gerçekleştirebilen mikroorganizmalar bulunmaktadır. Biyotransformasyon tepkimelerinin, klasik metotlara göre üstünlükleri vardır. Geniş bir çeşitliliğe sahip olan bu tepkimelerin en önemli özelliği; sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek tepkimelere olanak sağlamasıdır (Roberts vd., 1995; Demain, 2000; Tübitak, 2004; Zafar vd., 2016). Bir diğer önemli özelliği de rasemik seçiciliğidir. Böylece rasemik karışımdaki enantiyomerlerden birini dönüştürerek ayrılabilir. Bu sayede klasik kimyasal tepkimelerle gerçekleşmeyen tepkimeler biyotransformasyon tepkimeleriyle kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (Krings ve Berger, 1998; Giri vd., 2001; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyon tepkimeleri bütün hücre sistemlerinin veya izole enzim sistemlerinin kullanılması gibi çeşitli şekillerde gerçekleştirilebilir. Yöntemleri altı ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

2.2.1. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar ürünlerin ve substratların geçişine olanak sağlayacak şekilde bir matrikste immobilize hale getirilmesi ile gerçekleştirilir. Hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir. Bu teknik sayesinde sürekli biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirilebilir (Armstrong ve Yamazaki, 1986; Rajaguru vd., 2000; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.2. İzole enzimler ile biyotransformasyon

Çoğunluğu sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemleri oluşturur. Steroid hormonların hidrosillenmesi reaksiyonlarını kapsamaları sebebiyle önemi oldukça yüksektir. *Fusarium moniliforme*'den 7 α -hidroksilaz, *Penicillium raistracki*'den 15 β -

hidroksilaz vb. funguslardan izole edilen steroid hidroksilazlara örnek olarak verilebilir (Flickinger ve Drew, 1999; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.3. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyonda immobilize hücrelerin kullanılması ekonomik açıdan avantajlı olmasına rağmen, içerdiği enzim sistemleri sebebi ile istenmeyen tepkimelere ve yan ürünlerin oluşumuna sebep olurlar. Dolayısı ile tek tip enzim içeren saf enzim sistemlerinin kullanılması bu sorunu ortadan kaldırmaktadır. İzole enzim sistemleri yerine daha uygun fiyatlı immobilize enzim sistemlerin kullanılması son dönemlerde ekonomik açıdan büyük avantaj sağlamaktadır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.4. Sporlar ile biyotransformasyon

Bu teknikte mikroorganizmaların sporları kullanılmaktadır. Uygun koşullarda üretilen sporlar misellerden ayrılarak soğuk ortamda kolayca depolanır. Yöntemin en iyi avantajı istenilen zamanda ve tekrar tekrar kullanılabilmesidir (Rajaguru vd., 2000; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.5. Stasyonel (durağan) hücreler ile biyotransformasyon

Bu teknikte büyüme ve dönüşüm farklı ortamlarda gerçekleşir. İlk aşamada mikroorganizma uygun besi ortamında üretildikten sonra çeşitli fiziksel yöntemler ile (santrifüjleme ve filtrasyon) ayrılan mikroorganizmalar ikinci aşamada substrat ilavesiyle biyotransformasyon ortamına dağıtılır. Hücrelerin canlılığı için gerekli glukoz ortama eklenir. Yöntemin en büyük avantajı biyotransformasyon süresince ortamdaki hücre sayısının sabit kalması ve ürün izolasyonunun kolaylığıdır (Rajaguru vd., 2000; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Çalkalamalı sistemde ideal olan besiyerinde geliştirilen hücrelere, ön-testlerde belirlenen derişimde dönüşüme uğrıtılacak madde ilave edilir. Düzenli aralıklarla

ortamdan numune alınır ve çeşitli kromatografik yöntemlerle takip edilerek dönüşüm olup olmadığı incelenir. Yüksek verim elde edilme olasılığı basit olan bu tekniğin en önemli yanısıdır (Roberts vd., 1995; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.3. Biyotransformasyon Tepkimelerinin Kullanım Alanları

Biyotransformasyon tepkimeleri ilaç, gıda, kozmetik, koku ve aroma maddeleri üretiminin yanı sıra, toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi alanlarda da tercih edilmektedir (Liese ve Filho, 1999; Berger, 2007). Ayrıca biyotransformasyon tepkimeleri sonucu oluşan ürünlerin “doğal” kabul edilmesi bu tepkimelerin önemini daha da arttırmaktadır. Kimyasal sentez ise yaygın kullanılabilecek iyi bir alternatif olmakla birlikte kimyasal ürünlerin insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmesi ve tüketicilerin pahalı olmasına rağmen doğal ürünleri tercih etmeleri, bu tekniğin kullanımını azaltmaktadır. Bu durum çevreye uyumlu ve doğal ürün üretimine yönelik talebi artırmış ve son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı önem kazanmıştır (Janssens vd., 1992; Soares vd., 2000).

Kimyasal madde üretimi söz konusu olduğunda en önemli problem elde edilecek ürünün verimidir. Gerçekleştirilen her tepkimede çıkış bileşiklerinin tamamen ürüne dönüşmesi sağlanamamakta ve verim düşük olarak gerçekleşebilmektedir. Stereospesifiklik, tepkime koşullarının ılımlı (düşük sıcaklık ve basınç) ve ekonomik olması, endüstriyel ölçekte üretim için mühendislik kullanılması, düşük maliyet ve çevre dostu teknoloji olması biyotransformasyon tepkimelerini kimyasal senteze göre daha alternatif bir yöntem haline getirmektedir (Özcengiz, 2002; Tübitak, 2004; Xu vd., 2007).

Hızlı nüfus artışı ve endüstrileşme (jeokimyasal ve biyolojik prosesler) sonucu oluşan organik maddelerin hemen hemen hepsi doğada yapısal olarak parçalanarak çevre kirliliğine neden olmakta ve zamanla doğadaki derişimleri yükselerek insanlar ve diğer canlılar için ciddi tehditler oluşturmaktadırlar. Ksenobiyotik olarak tanımlanan kimyasal kirleticiler sadece belirli mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılır ve parçalanabilirler. Mikroorganizmaların bu potansiyelleri kullanılarak gelişmiş ülkelerde biyoremediasyon endüstrisini oluşturmuştur. Gen teknolojisi sayesinde bu mikroorganizmaların fizyolojisine dair bilgiler ile Rekombinant DNA teknolojisi ile bu

biyotransformasyon süreçlerinin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Ayrıca son yıllarda rekombinant mikroorganizmaların çevresel toksisite biyosensörleri olarak, çevrede toksik kimyasal kontrolü ve belirlenmesinde yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (Özcengiz, 2002).

Son yıllarda bir biyoteknoloji ürünü olan mikrobiyal kökenli polisakkaritler de (selüloz, agar, pektin, ksantan vb.) ticari önem kazanmıştır. Bunlardan en önemlisi olan, gıda, boya ve tekstil endüstrisinde kullanılan ksantan yılda 30.000 ton üretilmektedir. Günümüzde mevcut olan gen teknolojisi ile ksantanın kimyasal yapısı düzenlenebilmektedir (Özcengiz, 2002). Antibiyotik aktiviteye sahip ilaçlardan olan biyoherbisitler ve biyoinsektisitler, bitki ve hayvan büyümesini teşvik eden ajanlar ve alkaloidleri içeren antibiyotikler ziraat ve veterinerlikte de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Krings ve Berger, 1998; Xu vd., 2007).

Gıda üretim ve koruma alanlarında da fermantasyon teknikleri yüzyıllardır kullanılmaktadır. Her toplumun beslenme kültürünü oluşturan fermante süt ve et ürünlerinin (peynir, yoğurt, tereyağ, salam, sosis vb.) yapımında kullanılan mikroorganizmalar fermante olacak ham üründe istenilen metabolik değişikliğin gerçekleşmesini biyotransformasyon tepkimeleri ile sağlarlar. Mayalanmak olarak ifade edilen bu işlemlerde aslında mayalar değil bakteri kültürleri kullanılmaktadır. Kullanılan kültürler aracılığıyla üretilen metabolitler sayesinde besinin olgunlaşmasını, ona özel koku ve tat oluşumunu sağlar. Günümüzde biyotransformasyon tepkimelerini kapsayan gen teknolojileri, bu tip mikroorganizmaların genetik yapılarını modifiye ederek teknolojik ve hijyen uygunluklarının artırılması ile daha sağlıklı, lezzetli ve yüksek kaliteli ürünlerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Özcengiz, 2002; İşcan, 2009).

Mikrobiyal biyoteknoloji günümüzde, gen teknolojisini de içeren uygulamalar sayesinde başta sağlık olmak üzere, gıda ve kimya gibi endüstrinin en önemli parçalarından birisini oluşturmaktadır. Son yıllarda gen teknolojisinin sahip olduğu alanlarda kaydedilen gelişmeler, gelecekte bu teknolojiyi insan tarihinin en büyük endüstrilerinden bir haline dönüştürecektir (Özcengiz, 2002; Bayraç, 2011).

Geleneksel mikrobiyal biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve genom bilimi (gen teknolojileri) özellikle birinci dünya savaşından sonra (1976 yılı sonrasında), kurulan Genentech isimli şirketin bir insan proteinini bir mikroorganizmanın üretmesini sağladıklarını rapor etmesi ile modern biyoteknoloji oluşmuştur. Bu yöntemlerin gelişmesi ile mikroorganizmaların ekonomik önemi daha da artmıştır. 1980'li yıllarda binlerce biyoteknolojik şirketi kurularak Rekombinant DNA teknolojisi ile tıp alanında kullanılması amacıyla protein yapımına başlanmış ve genetiği değiştirilmiş *Eschericia coli* bakterisi tarafından üretilen insan insülini FDA tarafından onaylanan ilk ürün olmuştur (Steinberg ve Raso, 1998).

2.4. Biyotransformasyon Tepkimelerinin İlaç Geliştirmedeki Önemi

Biyotransformasyon tepkimeleri; terapötik bileşiklerin ve ticari olarak avantajlı fitomoleküllerin elde edilmesinde en etkili biyoteknolojik yöntemlerden biri olarak görülmektedir. Bu tepkimeler sayesinde kimyasal sentezde kullanılan tehlikeli kimyasalların kullanımını azalması nedeniyle yeşil kimyaya katkı sağladığından büyük ilgi görmektedir (Banerjee vd., 2012).

Son yıllarda biyotransformasyon tepkimeleri, önemli terapötik bileşikleri (doğada henüz bulunmayan) oluşturmak için bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Liu ve Yu, 2010). Genomik (organizmadaki tüm genlerin incelenmesi) ve proteomik (organizmaların protein profillerinin sistematik analizi) gibi yeni gelişen disiplinlerle, ilaç geliştirilmesine önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Yöntem olarak, sağlam ve hastalıklı hücre genomları ve proteomları karşılaştırılarak öncelikle buna dayalı hedef protein ve genlerin belirlenmesi gerçekleştirilmektedir. Sonrasındaki aşama hedef odaklı ilaç molekülünün bulunmasıdır. Bu tür ilaçlar biyoteknolojik ilaçlar olarak tanımlanır (Yemşen vd., 2013). Günümüzdeki gelişim gösteren bu ilaçlar, kanser, diyabet, kalp hastalıkları ve bulaşıcı hastalıklar gibi önemli hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesi neticesinde daha etkin ve daha az yan etkili ilaçların eldesi sağlanmaktadır.

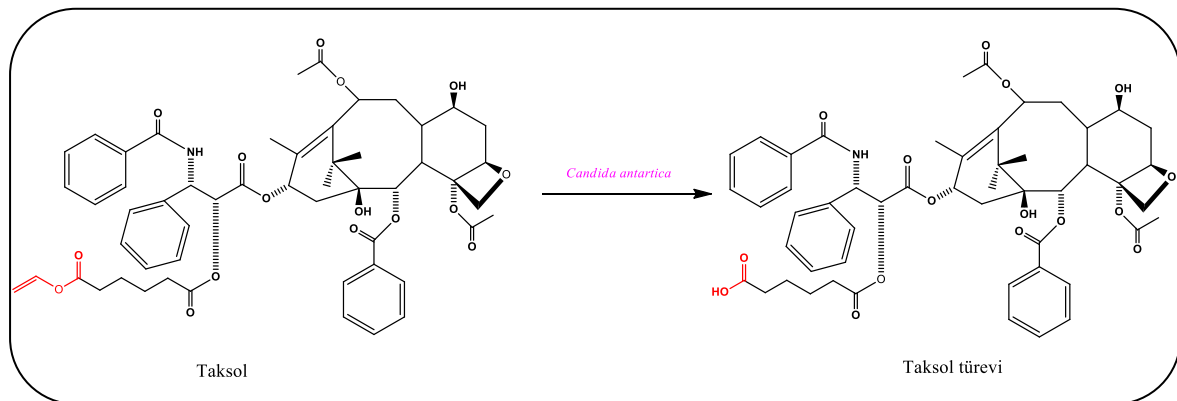
Antibiyotik aktiviteye sahip ilaçlardan olan kolesterol düşürücü ajanlar, antikanser ajanlar içeren antibiyotikler enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu ilaçlar pazar payındaki büyüklüğü açısından da mikrobiyal

biyoteknolojinin en önemli ürünlerinden sayılabilirler. Bugüne kadar keşfedilmiş antibiyotik sayısı oldukça fazla olmasına karşın kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştiren patojenlerin de sürekli oluşmasından dolayı yeni antibiyotik araştırma çalışmaları yoğun bir şekilde sürmektedir (Özcengiz, 2002; Küfrelioğlu ve Keha, 2012; Merey, 2016).

Klinik araştırmalarda kullanılan bazı kimyasal maddeleri sentezlemek oldukça güçtür. Örneğin iltihaplanma tedavilerinde etkili olan kortizonun kimyasal sentezi 31 tepkime basamağını içerir. Bu basamaklardan dokuzu sterolün 11. pozisyonunda bulunan karbonun spesifik olarak hidroksillenerek 11 α -pozisyonunda hidroksil grubu içeren 11 α -hidroksi progesterona dönüşmesini içerir. Bu dönüşüm mikroorganizmalar tarafından tek bir basamakta gerçekleştirilmektedir (Peterson ve Murray, 1952). Ayrıca bu teknoloji sayesinde tek bir enzimin mayada klonlamasını içeren tek bir değişiklik ile malik asitin fumarik asite dönüşümü gerçekleştirilebilmektedir. Dolayısı ile biyotransformasyon tepkimeleri ile hem zaman tasarrufu hem de spesifik olarak ürün eldesi gerçekleşmektedir (Özcengiz, 2002).

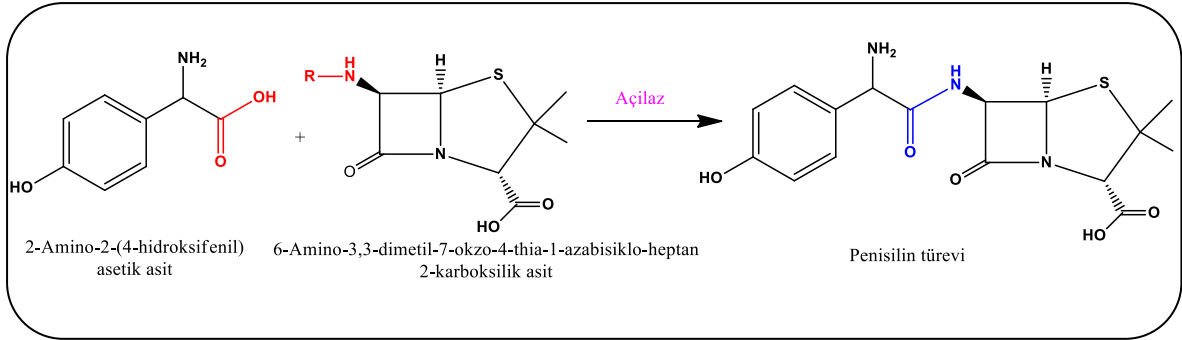
Biyolojik aktivite gösteren bazı bileşiklerin biyoteknolojik yöntemler ile üretimlerine yönelik bazı örnekler aşağıda sunulmuştur:

Taksol türevlerinin sentezi: Taksol, Pasifik porsuk ağacından üretilen bir bileşiktir ve ökaryotik hücre bölünmesinde mitozu durdurur. Bu bileşik yumurtalık kanseri ve meme kanseri tedavilerinde kullanılır (Şekil 2.2).

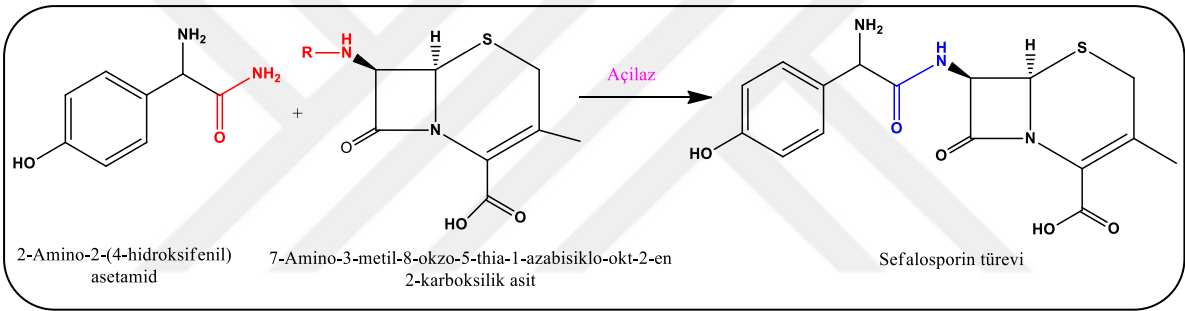


Şekil 2.2. Taksol türevinin sentezi

Penisilin ve Sefalosporin türevlerinin enzimatik sentezi: Penisilin ve türevleri, antibakteriyal ajan olarak kullanılırlar. Penisilinler faranjite neden olan *Streptococcus pyogenes* bakterisi gibi pek çok bakteriye karşı etki gösterirler (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).

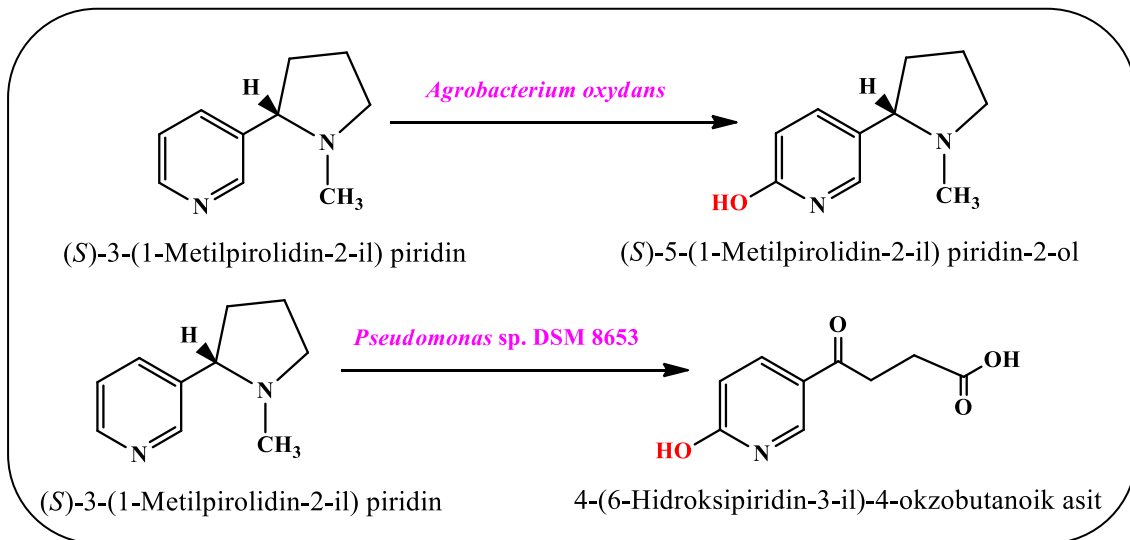


Şekil 2.3. Penisilin türevlerinin enzimatik sentezi



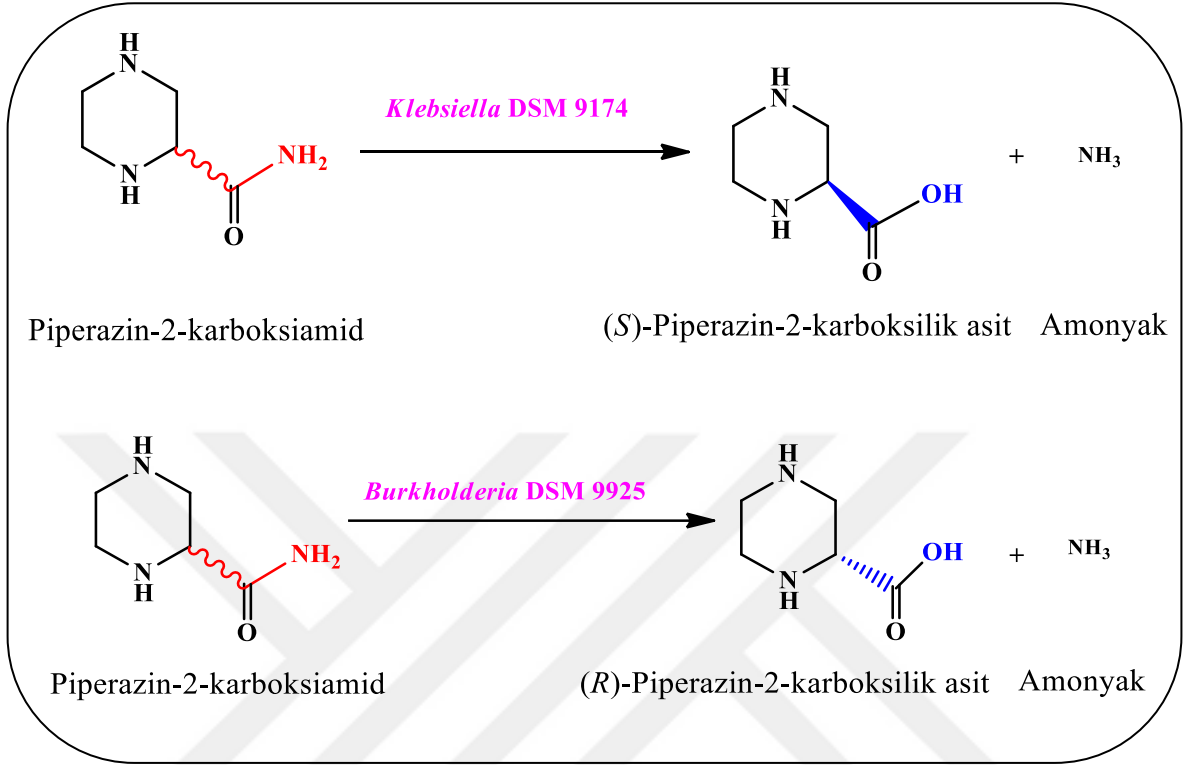
Şekil 2.4. Sefalosporin türevlerinin enzimatik sentezi

Epibatidin ara ürünlerinin sentezi: (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Epibatidin ara ürünlerinin sentezi

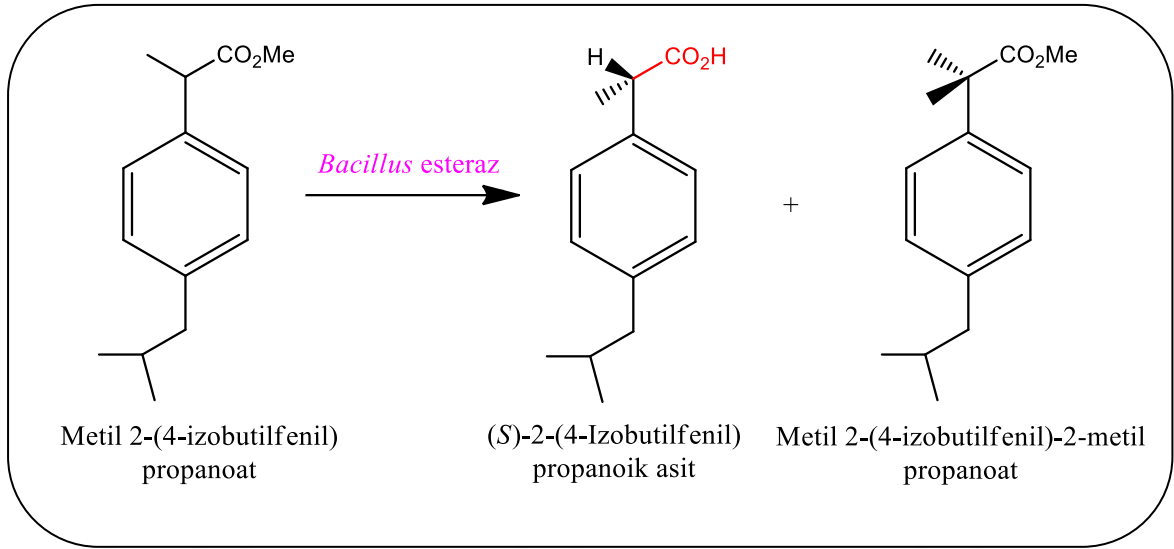
Piperazin-2-karboksilik asit sentezi: AIDS tedavisinde kullanılan ilaçlardan bir tanesi olan Cirixiran sentezinde ara üründür (Şekil 2.6).



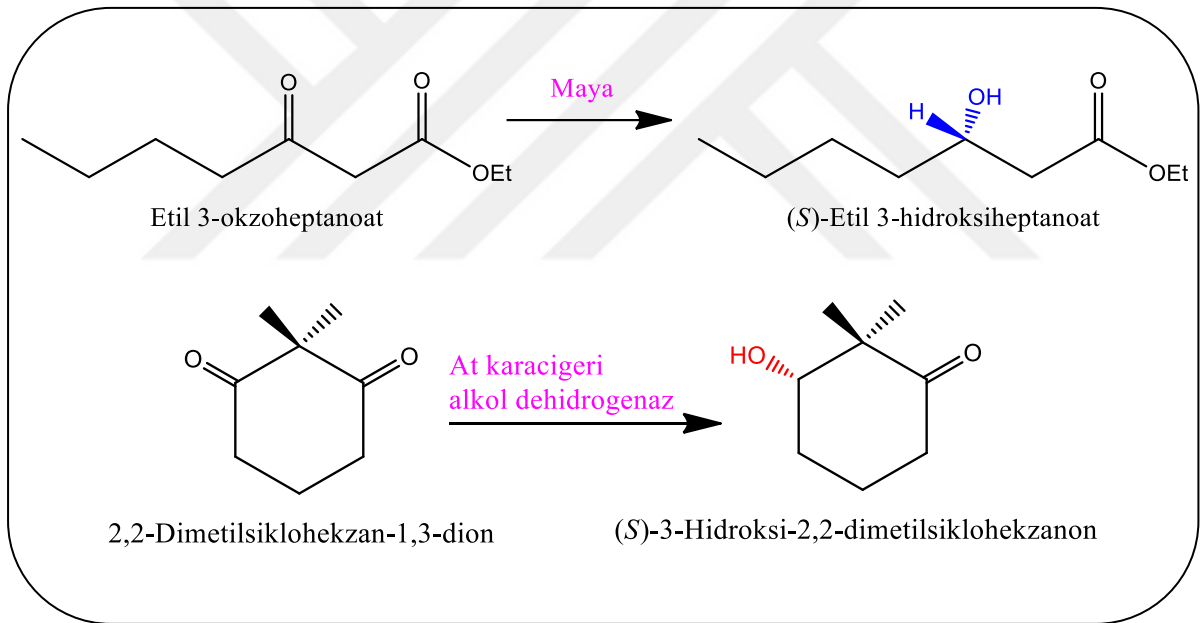
Şekil 2.6. Piperazin-2-karboksilik asit sentezi

İlaç etken maddelerinin organik sentezinde karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesi molekülde yer alan aynı gruplardan bir tanesinin seçimli olarak dönüşüme uğratılamamasıdır. Aşağıda verilen örneklerde görüleceği üzere biyotransformasyon tepkimeleri bu tür sorunlara da çözüm üretebilmektedir (bkz. Şekil 2.8).

En yaygın olarak kullanılan “esteraz ve lipaz” enzim sistemlerine α -kimotripsin, kolesterol esteraz, *Candida* lipaz, *Bacillus* karboksil esteraz vb. örnek olarak verilebilir (Hanson, 1995; Fessner, 1998) (bkz. Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ester grubunun seçimli olarak *Bacillus* esteraz tarafından hidrolizi



Şekil 2.8. Bazı redoks reaksiyonları ve bu reaksiyonları katalizleyen sistemler

2.6. Çalışmada Kullanılan Substratların Biyotransformasyon Tepkimeleri Literatür Çalışmaları

2.6.1. Abiyetik asit ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri

Abiyetik asit diterpen yapısında, geranil pirofosfattan (GPP) sentezlenen bir biyomoleküldür. Bileşik genellikle bitki ve mantar kaynaklıdır. Silvik asit (Çam asidi) olarak da bilinir (Gonzalez vd., 2009; Gonzalez vd., 2010; Geisler vd., 2016). Bu bileşik iğne yapraklı ağaçlarda, reçine asidinin ana bileşeni olan reçinede yaygın olarak bulunur. Literatürdeki abiyetik asit ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri Çizelge 2.1’de özetlendi.

Çizelge 2.1. Abiyetik asitin biyotransformasyon tepkimeleri

Metabolit	Katalizör	Kaynak
5 α -Hidroksiabiyetik asit	<i>Flavobacterium resinovorans</i> <i>Pseudomonas resinovorans</i>	(Cross ve Myers, 1968)
(-)-Dimetil abeita-7,13-dien-16,18-dioat	Tavşan	(Asakawa vd., 1986)
Metil abieitat	<i>Mycobacterium</i> MB 3683	(Orpizewski vd., 1990)
Abiyetik Asit ve Dehidroabiyetik Asit	Levrek	(Gravato ve Santos, 2002a)
2 α -Hidroksiabiyetik asit	<i>Mucor circinelloides</i>	(Mitsukura vd., 2005)
Abiyetik asit ve hidroksilasyon türevleri	<i>Mortiella isabellina</i>	(Doménech-Carbó vd., 2006)
7-Okzo-dehidroabiyetikasit	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	(Smith vd., 2007)
12 α - ve 12 β -hidroksiabiyetik asit	CYP106A2	(Bleif vd., 2011)
15-Hidroksiabiyetik asit	CYP105A1 (<i>Streptomyces griseolus</i>)	(Janocha vd., 2013)

2.6.2. Betulin ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri

Betulin, triterpen yapısına sahip (Şekil 4.23) bir bileşik olup, farklı huş ağaçlarının kabuklarından izole edilmektedir (Miura vd., 1999; Liu vd., 2011; Grishko vd., 2014).

Literatürdeki betulin ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri Çizelge 2.2’de özetlendi.

Çizelge 2.2. Betulinin biyotransformasyon tepkimeleri

Metabolit	Katalizör	Kaynak
4,28-Dihidroksi-3,4- <i>seco</i> -lup-20(29)-en-3-oik asit 4-Hidroksi-3,4- <i>seco</i> -lup-20(29)-ene-3,28-dioik asit 4,7 β ,17-Trihidroksi-3,4- <i>seco</i> -28-norlup-20(29)-en-3-oik asit 7 β ,15R-Dihidroksi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oik asit	<i>Chaetomium longirostre</i>	(Akihisa vd., 2002)
2 α ,7 β ,13(S)-Trihidroksistemodan 2 α ,3 β ,13(S)-16 α Tetrahidroksistemodan 6 α ,13(S)-Dihidroksistemodan-2-on 7 β ,17-Dihidroksistemod-12-en-2-on	<i>Stemodia maritima</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	(Martin vd., 2004)
Betulinik Asit	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Armillaria luteo-virens</i> , <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Aspergillus</i> sp. WZ, <i>Mucor</i> sp. ZJUQH, <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>	(Qi-he vd., 2009)
Betulinik Asit	<i>Armillaria luteo-virens</i>	(Liu vd., 2011)
Betulon	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	(Mao vd., 2012)
Betulinik Asit	<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	(Feng vd., 2013)
Betulinik Asit	<i>Microsporum canis trichophyton tonsurans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. niger</i> NIAB-280, <i>Penicillium</i> spp.	(Qazi vd., 2013)
Betulon	<i>Rhodococcus actinobacteria</i>	(Grishko vd., 2013)
Betulon	<i>Dothideomycete</i> sp.	(Liu vd., 2013)
Betulinik Asit	<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	(Feng vd., 2013)
Betulon	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> IEGM 66	(Grishko vd., 2014)
Betulon	<i>R. rhodochrous</i> IEGM 66	(Tarasova vd., 2015)
Betulon	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BT78	(Ten vd., 2016)
Betulon	<i>R. rhodochrous</i> IEGM 66	(Tarasova vd., 2017)

2.6.3. Hidroksi diizoforon ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri

Hidroksi diizoforon, diizoforon (bkz. Şekil 4.17) molekülünün (Kıran vd., 2004; Kıran vd., 2005) organik sentezle indirgenmesi sonucunda elde edilmiştir. Bu molekül ile ilgili literatürde herhangi bir biyotransformasyon çalışmasına rastlanmamıştır.

2.6.4. Oleik asit ile ilgili biyotransformasyon tepkimeleri

Oleik asit doğada bir çok bitki yağında (Fındık yağı, ayçiçeği yağı, zeytin yağı gibi) ve hayvansal yağlarda (%30'a kadar) gliserin esteri şeklinde bulunan doymamış bir yağ asididir (Jenkins vd., 2006). Bu gibi yağ asitlerinin biyotransformasyonları endüstride çok geniş bir alanda kullanılmaktadır (Bastida vd., 1999). Oleik asit plastik, naylon, kaplama, surfaktanlar, kozmetik, boyama ve tekstil endüstrisinde kullanılan yeni kimyasalların elde edilmesini sağlamaktadır (Rodríguez vd., 2001; Sellami vd., 2013). Literatürdeki oleik asit ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri Çizelge 2.3'de özetlendi.

Çizelge 2.3. Oleik asitin biyotransformasyon tepkimeleri

Metabolit	Katalizör	Kaynak
12-Hidroksi-cis-9-oktadekenoik asit	3 Fungal, 4 Maya ve 6 Bakteri Suşları	(Soda, 1988)
10-Okzo-oktadekanoik asit 10-Hidroksioktadekanoik asit	<i>Nocardia aurantia</i> ATCC 12674 <i>Nocardia</i> sp. NRRL 5646 <i>Mycobacterium fortuitum</i> UI 53378 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(El-Sharkawy vd., 1992)
10-Hidroksistearik asit, 10-Okzostearik asit ve 4-Okzolaurik asit	<i>Micrococcus luteus</i>	(Esaki vd., 1994b)
3-Hidroksioleik asit, Oktadekadienoik asit, 3-Hidrokdihexadekenoik asit, Hekzadekadienoik asit, Tetradekadienoik asit	<i>Alcaligenes</i> sp. 5-18	(Esaki vd., 1994a)
γ -Dodekalakton	Ekmek mayası	(Gocho vd., 1995)
(E)-10-Hidroksi-8-oktadekenoik asit (E)-10-Hidroksiperoxi-8-oktadekenoik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2	(Guerrero vd., 1997)
10-Hidroksi-8E-oktadekenoik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2	(Bastida vd., 1999)

Çizelge 2.3. Oleik asitin biyotransformasyon tepkimeleri (devam)

Metabolit	Katalizör	Kaynak
(E)-10-Hidroksi-8-oktadekenoik asit (E)-10-Hidroperoksi-8 oktadekenoik asit (E)-7,10-Dihidroksi-8-oktadekenoik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2 (immobilize sistem)	(Culleré vd., 2001)
(E)-11-Hidroksi-9-oktadekenoik asit (E)-10-Hidroksi-8-oktadekenoik asit (E)-9-Hidroksi-10-oktadekenoik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. 32T3	(Rodríguez vd., 2001)
(S)-(E)-10-Hidroksi-8-oktadekenoik asit	<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2 (lipoksijenaz)	(Busquets vd., 2004)
10-Hidroksi-stearik asit 10-Ketostearik asit	<i>Ruminal Microbiota</i>	(Jenkins vd., 2006)
10-Hidroksi-8(E)-Oktadekenoik Asit	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Kuo vd., 2008)
10-Hidroksi-stearik asit	Rekombinant <i>Escherichia coli</i> ve <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(Jeon vd., 2012)
Trimethylolpropane oleate	<i>Candida antarctica</i> (lipaz)	(Happe vd., 2012)
10(S)-Hidroksi-8(E)-oktadekenoik asit	<i>C. antarctica</i> (Novozym 435, a lipaz B) <i>P. aeruginosa</i> 42A2 NCIMB 40045	(Martin-Arjol vd., 2013b)
10(S)-Hidroksi-8(E)-oktadekenoik 7,10(S,S)-Hidroksi-8(E)- oktadekenoik etil esterleri	Novozym 435	(Martin-Arjol vd., 2013a)

2.7. Çalışmada Kullanılan Substratların Biyolojik Etkileri Literatür Çalışmaları

2.7.1. Abiyetik asitin biyolojik etkileri

Son dönemlerde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmalarında abiyetik asitin antikanser ve antimikrobiyal etki başta olmak üzere pek çok biyolojik aktivite (antialerjik, antiinflamatuvar, fitoaleksinin gibi ve antikonvülsan özellikler) gösterdiği ortaya konulmuştur (Harris ve Sanderson, 1963; Lin ve Chuang, 2006; Roh vd., 2010; Talapatra ve Talapatra, 2016). Abiyetik asit ile gerçekleştirilen literatürde mevcut biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçları bkz. Çizelge 2.4'te özetlendi.

Çizelge 2.4. Abiyetik asitin biyolojik etkileri

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	Antibakteriyal etki: 25 µg/mL	(Kubo vd., 1994)
Prostaglandin E2 (PGE ₂) Leukotriene C4 (LTC ₄)	COX-1 ve LOX metabolitleri üreten hücrel bir sistem olan A23187 uyarılmış makrofajlar üzerinde abiyetik asitin etkisi incelendi. Abiyetik asitin araşidonat yolunu etkilemediği ve PGE2 ve LTC4 üretimi üzerinde anlamlı bir inhibisyon etkisi göstermediği anlaşılmıştır.	(Fernández vd., 2001)
<i>Dicentrarchus Labrax</i> L. Mature eritrositi	EMN (Eritrositik mikronukleus): 0.9 µM ENA (Nükleer anormallikler): 0.9 µM ALT (karaciğer alanin aminotransferaz aktivitesi): 0.0125 µM (3.4) / ve 0.025 µM (4.9)	(Gravato ve Santos, 2002a)
D. Labrax L. Mature eritrositi	ENA (Nükleer anormallikler): 0.0125 µM	(Gravato ve Santos, 2002b)
Soya fasulyesi lipoksigenazı (EC 1.13.11.12)	Sitotoksikite; İK ₅₀ : 29.5±1.29 µM	(Uluşu vd., 2002)
<i>Anguilla anguilla</i> L.	Mutajenik eritrosit nükleer anormallikler (ENA) (2.7 µM) ve önemli bir karaciğer hasarı oluşturmuştur.	(Maria vd., 2004)
XU212 (TetK), SA-1199B (NorA), RN4220 (MsrA), EMRSA-15, EMRSA-16 ATCC 25923	Antiseptik ve antibakteriyel etki: abiyetik asit ve reserpin kompleks oluşturması sonucu MİK aktivitesinde artış göstermiştir.	(Smith vd., 2005)
HeLa servikal kanser ve HepG2	Sitotoksik Aktivite: 0.01-0.5 µg/mL	(Lin ve Chuang, 2006)
Maksimal Elektroşok Testi	Antikonvülsan etki (30 ve 100 mg/kg)	(Talevi vd., 2007)
HeLa, Vero ve Jurkat hücreleri HSV-1 virüsü (antiviral)	Sitotoksikite; İK ₅₀ : 53.0±5.6 µM / 15.0±0.6 µM ve ≥ 32.0	(Gonzalez vd., 2009)
A431 ve A549 kanser hücreleri	Sitotoksikite; İK ₅₀ : 65.41 ve 59.49 µM	(Yang vd., 2010)
Karragen, yumurta beyazı, formalin, gümüş nitrat ve gastrit ülser modelleri	Antiinflatuar (25-100 mg/kg), Antiülser (10/25/50 mg/kg) etkisi olduğu gözlenmiştir.	(Kazakova vd., 2013)
<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. aureus</i>	Konsantrasyon bağımlı antioksidan etki (DPPH) ile az antibakteriyel etki (340-980 µg/mL) ve antiasetilkolinester aktivite gözlenmiştir.	(Ramnath vd., 2015)
HeLa ve Propidium iodid (PI)	Sitotoksikite; İK ₅₀ : 176.28±0.02 µg/mL, PI boyaması Apoptoz olduğunu göstermiştir.	(Ramnath vd., 2016)
EC ₅₀	Antioksidan etki (DPPH): 4,5 µmol/mL	(Klejdysz vd., 2016)
<i>Synechococcus nidulans</i> LEGE 07171, <i>Synechocystis salina</i> LEGE 06099, <i>Chlorella vulgaris</i>	Antisiyanobakteriyel veya antialgal aktivite İK ₅₀ : 51.3±1.1 µM.	(Costa vd., 2016)
<i>S. aureus</i>	Hücrelere karşı membran potansiyeli Elektrofizyoloji (Flow sitometri) ölçülmüştür.	(Jokinen ve Sipponen, 2016)
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. acnes</i> , <i>S. mitis</i> , <i>R. mucilaginosa</i> ve <i>C. cladosporioides</i>	İK ₅₀ : 45±0.03, 0±0.05, -53±0.31 µM MİK: 31, 8, 4, 16, 31 ve 63 µg/mL Antibakteriyel etki, antimikrobiyal etki	(Helfenstein vd., 2017)

2.7.2. Betulinin biyolojik etkileri

Literatürde triterpen yapısına sahip betulin molekülünün pek çok kanser türlerine karşı etki gösterdiği ortaya konmuştur. Betulinin antiviral ve antikanserojen aktivite başta olmak üzere antiproliferatif ve apoptotik özellikleri gibi pek çok aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Alakurti vd., 2006; Mai vd., 2011; Ming-liang vd., 2011; Liu vd., 2013; Sultana ve Saify, 2013; Rastogi vd., 2015; Ali-Seyed vd., 2016). Betulin molekülü ile gerçekleştirilen literatürdeki mevcut biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçları Çizelge 2.5'te özetlendi.

Çizelge 2.5. Betulinin biyolojik etkileri

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	<i>In Vitro</i> Etki Türü ve miktarı	Kaynak
HeLa ve Hep-2 hücrelerine karşı	Sitotoksik etki; $İK_{50}$: 40 μ g/mL	(Deeb vd., 2003)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Antimikrobiyal etki; 0.59 μ g	(Cota vd., 2003)
Herpes simplex tip1 İnfluenzaFPV/Rostock, ECHO6 virüsleri	ECHO6 üzerinde antiviral etki (452.5–6.8 mkM) gözlenmiştir	(Pavlova vd., 2003)
HepG2 hücreleri ve Cilt kanserine karşı HaCat ve A431	Doza bağımlı sitotoksik aktivite ve apoptoz indükleyici etki gözlenmiştir (0.04-40 μ g/mL)	(Laszczyk vd., 2006)
<i>S. aureus</i> ML267, <i>Vibrio cholerae</i> 1313, <i>E. coli</i> ATCC 10536, <i>Shigella dysenteriae</i> 2, <i>S. cerevisiae</i> MTCC 36, <i>A. niger</i> MTCC 281, <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Antibakteriyal etki ve antifungal etki (MİK: 30-75 μ g/mL)	(Sinha vd., 2009)
<i>S. aureus</i> ve <i>Klebsiella pneumonia</i>	Antibakteriyal etki (Konsantrasyon: 90 ve 60 mg/mL)	(Kazakova vd., 2010)
<i>S. aureus</i> 375, <i>S. aureus</i> 310 (MR), <i>S.aureus</i> ATCC 25923, <i>Enterococcus faecium</i> 379, <i>B. subtilis</i> 327, <i>E. coli</i> ipm 389, <i>E. coli</i> 442 <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>K. pneumonia</i> 425, <i>P. aeruginosa</i> 339, <i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> , <i>Phorphyromonas gingivalis</i>	Zayıf antibakteriyal etki (Konsantrasyon: 64-1088 mg/mL)	(Rivero-Cruz vd., 2009)
<i>B. subtilis</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i> , <i>T. longifusus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. Flavus</i> , <i>M. canis</i> , <i>F. solani</i> , <i>C. globrata</i>	Antimikrobiyal, antibakteriyal etki İnhibisyon zonları: 18, 5, 8, 10, 6, 0, 15, 18, 0, 30, 10, 10 mm.	(Ahmed vd., 2011)
MCF7 (Kanser hücresi), HepG2 (İnsan hepatosellüler karsinom hücresi), KB (İnsan epidemal karsinom hücresi), <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	Sitotoksik; $İK_{50}$: 15, 72.3, 58.8 μ M Antibakteriyal; $İK_{50}$: >150, >150, >150, >150 ve 34.1 μ M	(Mai vd., 2011)
HCT116 (İnsan kolon karsinoma hücresi) <i>C. albicans</i> , <i>Trichophyton mentagrophyte</i> , <i>A. niger</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Sitotoksik ve antimikrobiyal etki gözlenmemiş	(Tsai vd., 2012)
<i>C. albicans</i>	Zayıf antimikrobiyal etki (+)	(Fotso vd., 2014)

Çizelge 2.5. Betulinin biyolojik etkileri (devam)

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
RCC4-çoklu ilaca dirençli insan renal karsinom hücreleri	Kaspas aracılı apoptoz yolağı ile apoptotoik etkisi gözlenmiştir (10-25 μ M)	(Yim vd., 2015)
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	Antimikrobiyal ve sitotoksiste MİK: 12.5 μ g/mL ve İK ₅₀ : 2.4 μ g/mL	(Li vd., 2015)
CC ₅₀ hücreleri ve Herpes Simplex (HSV1, HSV2)	HSV1: CC ₅₀ : >5000, EC ₅₀ : 123.9±19.1, SI: >40, MTT: 138.9±13.3, SI: >36 (μ M), HSV2: EC ₅₀ : 141.5, SI: >35, MTT: 128.4, SI: >38 (μ M)	(Álvarez vd., 2015)
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Lesteria monocytogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Vibrio cholera</i>	<i>Paecilomyces</i> WE3-F antagonistik ve antimikrobiyal etkinliği olan betulin üretibilme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir	(Barakat ve Saleh, 2016)
İnsan tümör hücreleri; (518A2, A2780, HT29, MCF-7, A549, HeLa)	Sitotoksik aktivite; EC ₅₀ : >30 μ M	(Heller vd., 2016)
İnsan tümör hücreleri; HL-60, T47D, CCRF/CEM, SW707 ve Fare hücreleri; P388, BALB/3T3	Sitotoksik aktivite; İK ₅₀ : 0.3 μ g/mL, 32.4±10.7, 10.9±5.5, 22.9±15.4, 5.5±3.3, 47.3±7.9 μ g/mL	(Bebenek vd., 2016)
Akciğer ve karaciğer Sepsis tedavisi	Betulinin sepsis tedavisinde akciğer ve karaciğer hasarını önlediği ve antiinflamatuvar etkisi olduğu gözlenmiştir	(Zhao vd., 2016a)
Fare böbreğinde (NF-kB inhibisyonu) Sepsis tedavisi	Betulinin böbrek hasarında HMBG-1 ve TLR4 mRNA Antiinflamatuvar etkisi olduğu incelenmiştir	(Zhao vd., 2016b)
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i> bark	Antioksidan etki; İK ₅₀ : >50 μ M	(Eom vd., 2016)
SIRT1-LKB1-AMPK eksen	Hepatoprotektif (6.25, 12.5, 25 μ M)	(Bai vd., 2016)
α -glukosidaz inhibitörü	α -glukosidaz inhibitör aktivitesi İK ₅₀ : 23 μ g/mL	(Qaisar vd., 2016)
Hepatik insulin duyarlılığı (tip 2 için)	İnsülin duyarlılık etkisi gözlenmiştir	(Ko vd., 2016)
IL-6, MCP-1, COX-2 ve iNOS	Antiinflamatuvar etki; 133.9±5.6, 206.5±6.5, 175.1±18.0, 63.4±5.3 μ M	(Laavola vd., 2016)
İnsan akciğer kanseri hücresi (NCI-H460)	Antiproliferatif etki İK ₅₀ : 79.2±4.0 μ g/mL	(Javed vd., 2016)
Alzheimer hastalığı	Ameliyatif etki; GSH nmol/mg: 8.779±0.448 (1mg), 11.800±0.784 (5mg), 10.694 ± 0.676 (10mg)	(Cho vd., 2016)
Göğüs kanser hücresi (BT-549)	Proliferasyon/ Sitotoksik etki İK ₅₀ : 4.3-4.6 μ g/mL	(Şıman vd., 2016)
Fare karaciğer mikrozomları; CYP1A2, CYP2C11, CYP2D6 ve CYP3A2	Sitokrom P450 inhibisyonu İK ₅₀ : 52.24 μ M (CYP1A2) ve >100 μ M	(Seervi vd., 2016)
Fare BALB/c (25, 50, 100 mg/kg 3 farklı doz çalışılmıştır)	Antidepresan, nörofarmasötik ve Antikonvulsant etki	(Verma vd., 2016)
<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Antibakteriyal ve sinerjik aktivite MİK: >128 μ g/mL	(Wang vd., 2016)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 22853, <i>E. coli</i> ATCC 11229, <i>Candida maltose</i> SBUG 700	Antimikrobiyal etki gözlenmemiştir (-)	(Alresly vd., 2016)

Çizelge 2.5. Betulinin biyolojik etkileri (devam)

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
<i>Betula pendula</i> hücre süspansiyon kültürleri	Antioksidan aktivite; (0.2)	(Hajati vd., 2016)
<i>S. typhimurium</i> kültürleri (TA98, TA100, TA102 ve TA97a)	Mutajenik etki (Ames Testi) (+S9 ve -S9 metabolik aktivasyon)	(Yoshida vd., 2016)
Akciğer, Karaciğer, Kalp (fare)	Farmakokinetik etki; f: 49.24, 31.11 ve 1.92	(Pozharitskaya vd., 2017)

2.7.3. Hidroksi diizoforonun biyolojik etkileri

Hidroksi diizoforon molekül ile gerçekleştirilen herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına literatürde rastlanmamıştır.

2.7.4. Oleik asitin biyolojik etkileri

Oksijenli ve doymamış yağ asitleri (oksilipinler) patojen mikroorganizmalara karşı bitkilere savunma gücü kazandırır (Koshino vd., 1987) ve bazı kanser türlerine karşı etkileri olduğu literatürde yer almaktadır. Bu kapsamda oleik asit molekülü ile gerçekleştirilen literatürdeki mevcut biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçları Çizelge 2.6’da özetlendi.

Çizelge 2.6. Oleik asitin biyolojik etkileri

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
<i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. pylori</i>	Sadece <i>H. pylori</i> ’ye karşı kuvvetli antibakteriyal etki test edilmiştir (6.17 ± 2.02 mM)	(Bergsson vd., 2002)
Tavşan Enteropatojenik <i>E. coli</i> Suşu	Zayıf antibakteriyal etki	(Skřivanová ve Marounek, 2007)
<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> 3 farklı fındık türü (Davianna, F. Coutard ve M. Bollwiller)	Antimikrobiyal etki; >9mm, >9mm, >9mm (++++), <1 mm, <1 mm, <1 mm, <1 mm (-). Antioksidan (DPPH) EC ₂₅ : 2.91, >5, >5	(Oliveira vd., 2008)
<i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi.</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium notatum</i>	11-15 mm 16-20 mm (kontrol 20-26 mm) Antibakteriyal ve antifungal etki	(Neogi vd., 2008)
<i>K. pneumoniae</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Antibakteriyal etki; MİK: 1.60, 1.60, 2.67, 1.60, 1.60 mg/mL	(Saxena vd., 2009)

Çizelge 2.6. Oleik asitin biyolojik etkileri (devam)

Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
<i>B. subtilis</i> MTCC 441, <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Erwinia amylovora</i> MTCC 2760, <i>Trichophyton simii</i> , <i>T. mentagrophyes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> MTCC 227	Antimikrobiyal etki; 12, 12, 16, 12, 10, 14, 9 mm Hekzanlı ekstraktlar: 31.25, 1000, 1000, 1000, 1000, 1000, 1000 µg/mL. Etil asetatlı ekstraktlar: 16.2, 1000, 500, 1000, 1000, 250, 500 µg/mL	(Thillairajasekar vd., 2009)
<i>Propionibacterium acnes</i>	Antimikrobiyal etki; Laurik asit > Oleik asit > palmitik asit	(Yang vd., 2009)
<i>Streptococcus mutans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Antimikrobiyal etki; 27.33, 57.10, 0, 73.00, 0, 100 (% inhibisyon)	(Huang vd., 2010)
<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. Pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	Antimikrobiyal etki; MİK: hepsi için 2 mg/mL. MBC: 4, 4, 2, 2, 4, 2, 2, 2, 2, 4, 4 mg/mL	(Skalicka-Woźniak vd., 2010)
<i>Y. enterocolitica</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>C. albicans</i>	Antimikrobiyal etki; MİK: 50, 50, 50, 60, 40, 45, 40 mg/mL	(Kesari vd., 2010)
<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Salmonella</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>S. cerevisiae</i>	Elma tohumu oleik asit oranı: 37.49-38.55 g/ 100g). Antimikrobiyal etki; 0.3-0.6 mg/mL	(Tian vd., 2010)
<i>B. cereus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>C. Albicans</i> ve Bitki dokusu	Antimikrobiyal (MİK: 512 µg/mL), antioksidan ve alleopatik etki	(Ascari vd., 2010)
<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Parainfluenza</i> virus type-3 Fındık ve ceviz yağı kullanılmıştır	Antiviral etki (16-<0.25 µg/mL) Antioksidan (73.58% ve 65.10%) ve antibakteriyel etki	(Orhan vd., 2011)
<i>E. coli</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Desmodium adscendens</i> yapıları	Antimikrobiyal etki (en yüksek konsantrasyon: 1.5 mg/mL) Metanol su ekstraktı daha etkili	(Muanda vd., 2011)
<i>A. hydrophila</i> , <i>E. tarda</i> , <i>E. coli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. Cholerae</i> ve <i>V. parahaemolyticus</i> bakterilerde denenmiş ve antikanser aktivitesinde (MCF-7) kolorimetrik MTT (tetrazolium) metodu	Antimikrobiyal; MİK: 15.6-125mg/L ve 7.8-62.5mg/L Antioksidan (DPPH) (max 40%) Antikanser etki; İK ₅₀ : 1.98±0.31µg/mL ve 1.86±0.21 µg/mL	(Wei vd., 2011)
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. kristinae</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>S. marcescens</i>	Antimikrobiyal etki; hepsi 0.1 µg/mL	(Sowemimo vd., 2011)
MCF-7 (insan akciğeri kanser hücresi) HT-29 (insan bağırsağı kanser hücresi)	Antikanser etki; İK ₅₀ : 48 ppm	(Dailey vd., 2011)
<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. Freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. lilacinus</i> , <i>P. fumosoroseus</i> , <i>L. lecanii</i> , <i>M. Anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> (Tve-N39) <i>B. bassiana</i> (Dv-1/07)	Antibakteriyel etki gözlenmemiş. Antifungal etki; MİK: 512, 512, 256, 512, 1024, 512 mg/L.	(Urbanek vd., 2012)
<i>S. aureus</i> , <i>K. Pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i>	Antibakteriyel etki gözlenmemiş. <i>Candida</i> sp. : 60.8±5.5% (3sa), 57.5±5.9% (12sa)	(Buthelezi vd., 2012)

Çizelge 2.6. Oleik asitin biyolojik etkileri (devam)

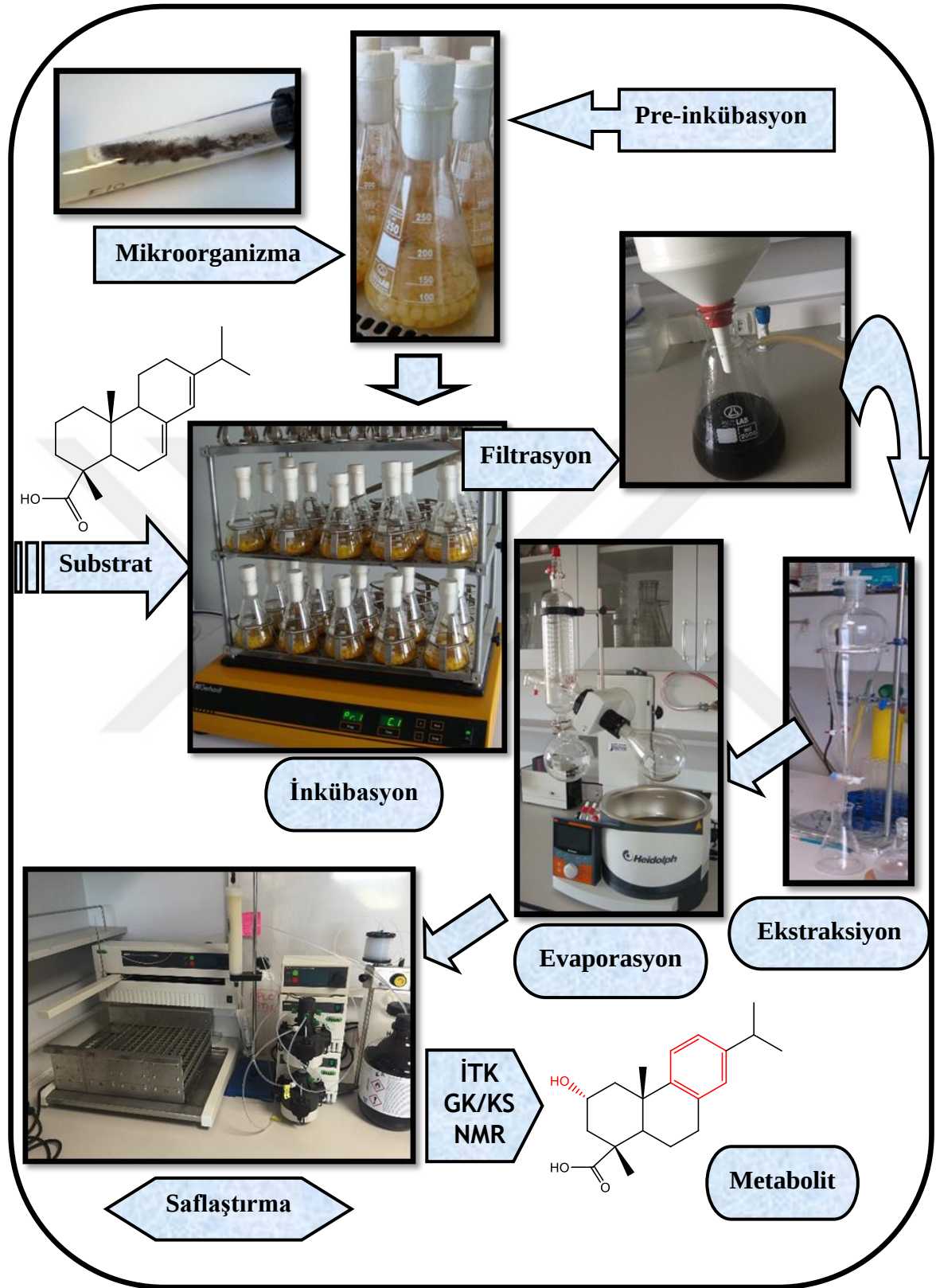
Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler	İn Vitro Etki Türü ve miktarı	Kaynak
<i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>B. cereus</i> ATCC 7064, <i>M. smegmatis</i> CCM 2067, <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, <i>M. luteus</i> La 2971, <i>E. coli</i> ATCC 11230, <i>K. pneumoniae</i> UC57, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>P. vulgaris</i> ATCC 8427, <i>C. albicans</i> ATCC 10231, <i>K. fragilis</i> NRRL 2415, <i>R. rubra</i> DSM 70403, <i>D. hansenii</i> DSM 70238, <i>H. guilliermondii</i> DSM 3432	Tüm mikroorganizmalara karşı fındık ve tohumu kuvvetli Antimikrobiyal etki (Disk Difüzyon metodu) göstermiştir.	(Kırbaşlar vd., 2012)
<i>Albizia adianthifolia</i> (Mimosoideae) bitkisi <i>P. mirabilis</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> ATCC 9002, <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. neoformans</i>	Antioksidan; ($R^2=0.946$ TEAC method ve $R^2=0.980$ DPPH. Antimikrobiyal etki; MİK: 0.1, 0.05, 0.20, 0.20, 0.40, 0.20, 0.40, 0.10, 0.20	(Tamokou vd., 2012)
<i>Sclerocarya birrea</i> (Marula)' da bulunan Oleik Asit <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium berghei</i> Fareler ile denenmiş	Antioksidan (DPPH), antidiabetik, anti-inflamatuvar analjetik, antiparazitik, antimikrobiyal etki	(Mariod ve Abdelwahab, 2012)
<i>Trichilia connaroides</i> ' da bulunan Oleik Asit <i>Spilosoma obliqua</i> <i>Spodoptera litura</i> <i>Amsacta albistriga</i> , <i>Plutella xylostella</i> <i>Ailanthus defoliator</i> , <i>Eligma narcissus indica</i> Cramer ve teak defoliator <i>Hyblaea pueria</i>	Anti-insektisit, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, antiülserogenik etki	(Senthilkumar vd., 2012)
<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) kökünde bulunan oleik asit <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, <i>B. cereus</i> ATCC 14579, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. epidermis</i> ATCC 12228, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>M. luteus</i> ATCC 1880, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>K. pneumoniae</i> CIP 32147 <i>E. coli</i> ATCC 8739 <i>S. enterica</i> , <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>S. aureus</i> ATCC 6536, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>A. niger</i> CTM 10099, <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>F. graminearum</i> <i>A. alternata</i> CTM 10230	Antioksidan (DPPH): Etil asetatlı ekstrakte en etkili sonucu verdiği gözlenmiştir. Antimikrobiyal etki; G(+) MİK: 0.312, 0.150, 0.625, 0.625, 0.625, 0.625, 0.625, G(-) MİK: 1.25, 0.312, 2.5, 0.625, 0.625, 0.312, Fungal MİK; 1.25, 2.5, 0.312, 0.625 µg/mL	(Hsouna ve Alayed, 2012)
<i>Laurus nobilis</i> L., <i>Nigella sativa</i> L. ve oleik asit <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Antibakteriyel etki ($P<0.05$)	(Taqi vd., 2013)
Oleik asit kaplı SC film <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Antimikrobiyal etki: 10.88 ± 2.18 , 11.55 ± 2.27 ve 0 mm.	(Aliheidari vd., 2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> RO13 (maya) <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> ve <i>B. cereus</i>	Literatürdeki değerlerden daha düşük antimikrobiyal etki MİK: 250-500 µg/mL	(Parfene vd., 2013)
Oleik Asit'li filmler <i>Listeria innocua</i>	Antimikrobiyal etki: 69 µmol Trolox/cm ²	(Arcan ve Yemenicioglu, 2013)
<i>B. subtilis</i> MTCC 2391, <i>S. epidermis</i> <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> MTCC 6642, <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogene</i> , <i>E. coli</i> MTCC 1563, <i>S. typhimurium</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Antimikrobiyal etki; MİK: 0.04-128 ve 0.08-2.56 mg/mL	(Chodisetti vd., 2013)
Zeytin yağı polifenoller İn vitro ve in vivo sistemler	Antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar etki	(Martín-Peláez vd., 2013)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Genel Deneysel Yöntemler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin aktive edilmesi ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan derin kültür tekniği için Gerhardt THO 500 Laboshake çalkalamalı inkübatör kullanıldı. Mikroorganizmaların aktarılma ve steril koşullarda ekim işlemleri Herasafe steril kabininde gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktları buharlaştırıp çözücü fazından ayırma işlemleri ise Rotary Evaporatör Heidolph Hei-VAP Precision cihazı ile sağlandı. Kolon kromatografisi için Büchi Sepacore X10 MPLC Flash kromatografi sistemi kullanıldı. Saflaştırma esnasında gerçekleştirilen ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmaları içinse 0,25 mm kalınlığında silika jel plakaları (Merck silika jel GF254) kullanıldı. Ayrıca bileşiklerin İTK plakaları Camag cihazının UV ışığı altında da (254 nm'de) kontrol edilerek gözlemlendi. Çözücü sistemi olarak etil asetat-hegzan (1:1) karışımı tercih edildi.

Kolon kromatografisinden elde edilen spotlar, bileşenleri anisaldehit (0,5 mL), sülfürik asit (8 mL), metanol (85 mL), asetik asit (10 mL) olan reaktif ile renklendirdikten sonra ısıtılarak (110°C) belirgin hale getirildi. Bu yöntem sonucunda saflaştırılan metabolitlerin yapısı, Varian Mercury Plus 400 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) cihazı ile tek ve iki boyutlu NMR metotları (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC vb.) kullanılarak aydınlatıldı. Polarizasyon transferi ile distorsiyonsuz iyileştirme (DEPT) spektrumu, iç standart referans olarak tetrametilsilan (TMS) ile döterokloroformda (CDCl_3) 100 MHz'de ölçüldü. Bileşiklerin optik çevirme açısı Krüss P8000-T marka polarimetre cihazı ile ölçüldü ($\lambda=589,3$ nm; $c=125$ mg/1 mL MeOH; $l=0,025$ dm; α =gözlenen sapma açısı). Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ise KBr pelleti içerisinde Bruker Tensor 27 spektrofotometre cihazında alındı. Gaz kromatografisi analizleri Agilent 6890N ve Shimadzu GC-2010/QP2010 Ultra mass detector sistemlerinde gerçekleştirildi. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu (HRMS) çalışmaları Waters SYNAPT G1 MS sistemi ile yapıldı (bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Biotransformasyon aşamaları ve metabolit izolasyonu çalışma şeması

3.2. Biyotransformasyon Tepkimeleri Çalışmaları

3.2.1. Mikroorganizmaların kullanımı

Çalışmalarda kullanılan bakteri ve fungal kültürler; Amerika Birleşik Devletleri Tarım Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu (NRRL), Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Bölümü kültür koleksiyonlarından sağlandı. Alınan kültürler, +4°C’de muhafaza edildi. Saflıklarının kontrolü için düzenli aralıklarla alt kültürleri yapılmıştır.

3.2.2. Mikroorganizmaların üretilmesi için kullanılan besiyeri bileşenleri

Kültür koleksiyonlarından alınan fungal kültürler ilk etapta hazırlanan taze yatık agar besiyerinde, bakteriler ise Mueller hinton agar (MHA) (Sigma M-9552) besiyerinde üretildi. Daha sonra hazırlanan fungal kültürler α -medium, bakteriler ise Mueller hinton broth (MHB) (Merck 1.10293) sıvı besiyerlerine aktararak çoğaltıldı (Demirci, 2000; Özşen, 2011).

Çizelge 3.1. Taze yatık agar besiyeri bileşenleri

Patates dekstroz agar	7,8 g
Agar	3,8 g
Saf su	200 mL

Çizelge 3.1’deki bileşenleri içeren karışım saf su ile 200 mL’ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri soğumadan 25 adet patolojik şişelere, şişe başı ortama 8 mL ilave edildi, otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra şişeler içerisindeki erimiş haldeki besiyerleri donmadan önce 45°’ye yakın eğim oluşturacak şekilde steril kabinin içerisinde ve UV ışığı altında 24 saat boyunca soğumaya bırakılmak suretiyle hazırlandı. Bu besiyeri biyotransformasyon tepkimelerinde kullanılan mikroorganizmaların stoklanmasında ve sıvı besiyerine ilave edilmeden önce aktifleşmesini sağlamak için kullanıldı.

Çizelge 3.2. Mueller hinton agar besiyeri bileşenleri

Et ekstraktı	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Niştasta	1,5 g
Agar	12,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak satın alınan besiyeri (Çizelge 3.2) litrede 38 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. MHA besiyeri bakterilerin stoklanması ve sıvı besiyerine aktırılmadan önce aktifleşmesini sağlamak için kullanıldı.

Çizelge 3.3. Mueller hinton broth besiyeri bileşenleri

Et ekstrakt	5,0 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Niştasta	1,5 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak satın alınan besiyeri (Çizelge 3.3) litrede 21 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. MHB besiyeri bakterilerin biyotransformasyon tepkimeleri için sıvı besiyeri olarak kullanıldı.

Çizelge 3.4. α -Medium besiyeri bileşenleri

Glikoz	20,0 g
Pepton	5,0 g
Yeast ekstrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g
Saf su	1000 mL

Çizelge 3.4'deki bileşenleri içeren karışım saf suda çözülerek hazırlanan besiyeri, 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerin ağızları alüminyum folyo kaplı selüloz tıpa ile kapatıldı. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C'de 60 dakika süre ile steril edildi. Bu besiyeri fungal kültürlerin biyotransformasyon tepkimeleri için kullanıldı.

Taze yatık besiyerindeki en taze alt kültürdeki mikroorganizmalar, steril kabinde hazırlanan 100 mL'lik sıvı besiyerine her erlene bir öze ucu dolusu olacak kadar ilave edildi. Erlenlerde yeterli miktarda mikroorganizma oluşabilmesi için 3 gün boyunca çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de (120 rpm) pre-inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümeleri sağlandıktan sonra büyük ölçekte diğer erlenlere eşit miktarlarda olacak şekilde ve steril koşullarda aktarıldı. Sıvı besiyerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Ön deneme çalışmalarında ise substrat ilavesi 3 günlük pre-inkübasyon sürecinden hemen sonra yapıldı (Akar, 2005; Kıran vd., 2005; Özşen, 2011).

3.2.3. Substrat hazırlanması ve ilavesi

Her substrat (0,5 mL veya 500 mg) 40 mL aseton içerisinde çözüldükten sonra, daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan küf içerisine inkübasyonun üçüncü gününde her erlene eşit hacimde ilave edildi. İnkübasyon oda sıcaklığında çalışan dairesel çalkalayıcı üzerinde 7-10 gün boyunca sürdürüldü. Bu sürenin sonunda biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve metabolit oluşumunun maksimum düzeye ulaştığı İTK ile tespit edildi. Erlenler üzerine etil asetat ilavesi ile biyotransformasyon sona erdirildi. Daha sonra ekstraksiyon ve izolasyon aşamalarına geçildi (Kıran vd., 2005; Özşen, 2011).

3.2.4. Metabolitlerin ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak metabolit oluşumu izlendi. Ön denemeler için; deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 3 mL alındı ve 3–5 mL etil asetat ilave edildi. Bir dakika süreyle vorteks kullanarak karıştırıldı. Etil asetatlı üst faz, başka bir pipet ile susuz sodyum sülfatta (Na_2SO_4) kurutulduktan sonra bir

numune kabına aktarıldı ve azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırıldı. Oluşan metabolitlerin spotları İTK ile kontrol edildi (Kıran vd., 2005; Özşen, 2011).

3.2.5. Metabolitlerin kromatografisi

Biyotransformasyon tepkimesini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besiyerlerine 1/1 oranında etil asetat ilave edildi. Besiyeri iyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden nuche erlenine vakum altında süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar, ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı etil asetat ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlar, susuz Na₂SO₄'ta kurutulduktan sonra evaporasyon ile uçurulmaya bırakıldı. Elde edilen kalıntı, Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (MPLC) ile saflaştırıldı. Cihazda çözücü sistemi olarak petrol eteri ve etil asetat ile hegzan ve etil asetat kullanıldı (artan gradient sistemi: %5-%95 etil asetat/hegzan karışımı ile başlayarak, %100 etil asetat ile sonlandırılır). Kolondan ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlendi (Kıran vd., 2005).

3.2.6. Metabolitlerin tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla ayırıştırılan metabolitler, preparatif İTK yöntemiyle cam plak üzerine çekilmiş silikajele emdirildi. En ideal etil asetat hegzan çözücü oranıyla yürütüldü ve silika jel cam plakadan kazındı. Kazınan silika jel aseton içerisine ilave edildi ve saflaştırılan metabolitler evaporatörde çözücüsünden ayrıldı. Elde edilen metabolit yapıları GK/KS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT/HMBC, optik çevirme açısı, FT-IR gibi spektroskopik metotlar kullanılarak ve literatürdeki benzer yapılarıdaki moleküllerin spektroskopik değerleri ile karşılaştırılarak aydınlatıldı (Kıran vd., 2005; Özşen, 2011).

3.3. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Biyotransformasyon tepkimelerinde kullanılan başlangıç maddeleri (substratları) ile oluşan metabolitlerin farklı yöntemlerle biyolojik etkileri incelendi.

3.3.1. Kontamine gıda testi çalışmaları

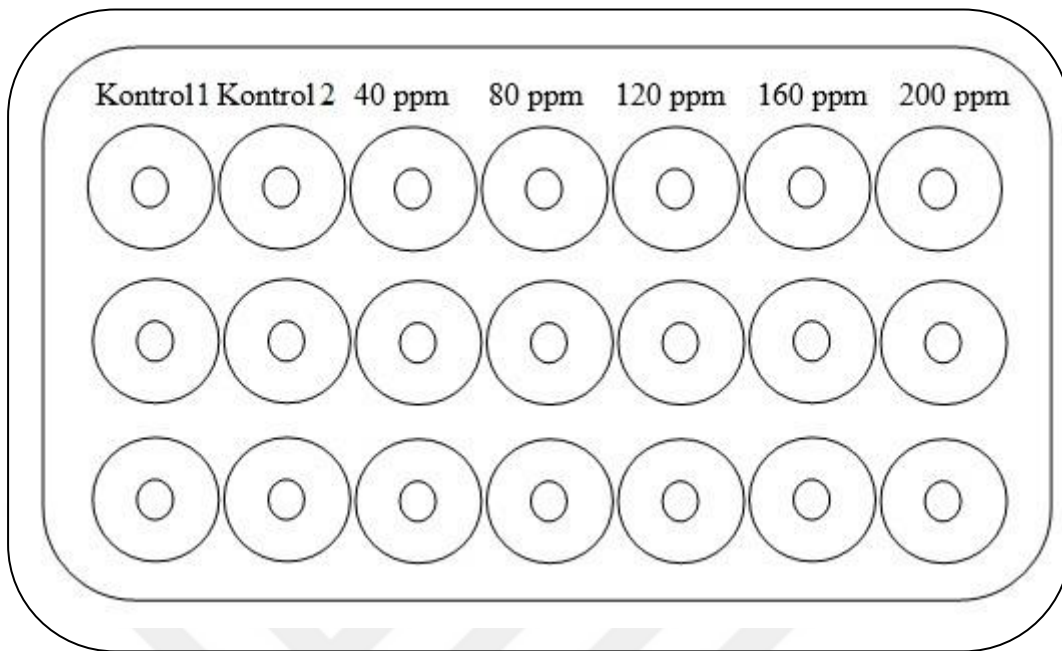
Hidroksi diizoforon substratı çalışmalarında antifungal aktivite metodu olarak kontamine gıda (poisoned food) testi kullanıldı (Kıran vd., 2004). Tartılan ve aktivitesi belirlenecek olan bileşenler saf suda çözülerek petri başına 60 mL besiyeri gelecek şekilde petri kaplarına aktarıldı ve otoklavda 1.1 atmosfer basıncında 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. Otoklavlanan besiyerleri (Çizelge 3.5) boşaltılıp 24 saat steril kabinde UV ışığı altında bekletildi. Çalışılacak patojen mikroorganizmalar öze ile stok kültürlerden alınarak ekim yapıldı ve aktivasyon için oda sıcaklığında 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda aktifleşen mikroorganizmalarla yapılacak işlem için aynı gün içerisinde aynı besiyerinden tekrar hazırlanarak 3 adet paralel seri; 5 adet farklı derişim serileri (40, 80, 120, 160 ve 200 ppm), bir mikroorganizma kontrol grubu serisi ve bir adet de etil alkol (EtOH) kontrol grubu serisi oluşturuldu. Her deneme 3 kez tekrarlandı.

Çizelge 3.5. Kontamine gıda testinde kullanılan besiyeri bileşenleri

Glikoz	20,0 g
Malt ekstrakte agar	20,0 g
Agar agar	20,0 g
Pepton	1,0 g
Saf su	1000 mL

Aktivitesi çalışılacak bileşiklerden ayrı ayrı 200 ppm’lik stok çözelti hazırlanıp, bu stok çözeltilerden belli oranlarda alınarak 160 ppm, 120 ppm, 80 ppm ve 40 ppm’lik 10 mL’lik çözeltiler oluşturuldu. Otoklavdan çıkartılan besiyerine her petri için 60 mL alınarak donmadan üzerlerini 10 mL’lik çözeltilerden ayrı ayrı 2 mL konulup 5 farklı derişimde 3 paralel seri oluşturuldu. Çözücülerle karışık besiyeri bileşenlerinin donması için steril kabin içerisinde 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda, aktifleşen mikroorganizma besiyerinden 9 numaralı steril delici (sample borer) yardımı ile alınan mikroorganizmalar 7 serinin tam ortasından çıkartılan besiyerlerinin yerine konarak (bkz. Çizelge 3.6.) 8 gün boyunca oluşan zon boyutları ölçüldü ve elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldı.

Çizelge 3.6. Kontamine gıda testi şeması

3.3.2. Agar difüzyon yöntemi çalışmaları

Deneylerde kullanılacak tüm bakteri ve fungal izolatların saf kültürleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve ticari kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir. Tüm mikroorganizmalar %15 gliserolde ve -85°C 'de (Ultrafreezer, New Brunswick) stoklanmıştır. Çalışmaya alınacak suşların devamlılığını sağlamak amacıyla Nutrient agar (NA) (Merck 1.05450.0500), Patates dekstroz agar (PDA) (Merck 1.10130), MHA ve Sabouraud dekstroz agar (SDA) (Fluka 84088) (bkz. Çizelge 3.9) besi ortamları kullanılmıştır ve düzenli aralıklarla alt kültürleri yapılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında agar kuyu difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri için MHB ve RPMI 1640 besiyerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.7. Nutrient agar besiyeri bileşenleri

Pepton	5,0 g
Et ekstrakt	3,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak elde edilen besiyeri (bkz. Çizelge 3.7) litrede 20 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. NA besiyeri test organizmalarının (bakterilerin) üretiminde kullanıldı.

Çizelge 3.8. Patates dekstroza agar besiyeri bileşenleri

Patates özü	4,0 g
D(+) Glukoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak elde edilen besiyeri (Çizelge 3.8) litrede 39 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. PDA besiyeri fungal kültürlerin üretiminde kullanıldı.

Çizelge 3.9. Sabouraud %4 dekstroza agar besiyeri bileşenleri

Bakteriyolojik pepton	10,0 g
Bakteriyolojik dekstroza	40,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak elde edilen besiyeri (Çizelge 3.9) litrede 65 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 60 dakika süre ile steril edildi. SDA besiyeri fungal kültürlerin üretiminde kullanıldı.

Çizelge 3.10. RPMI-1640 besiyeri bileşenleri

MOPS (tampon)	17,2 g
RPMI	5,2 g
NaOH (5M)	10,0 mL
Saf su	500 mL

Ticari olarak elde edilen MOPS ve RPMI (bkz. Çizelge 3.10) 100 mL steril destile suda çözülür. Üzerine 10 mL NaOH çözeltisi ilave edilir ve filtreden geçirilir. Steril duran şişede bu çözeltiye 390 mL steril destile su eklenir ve pH 7,1'e ayarlanır. Bu besiyeri fungal kültürler için kullanıldı.

Çalışmada kullanılan metabolitlerin seçilen bakteri ve fungal izolatlar karşı antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından önerilen standart yöntemler esas alınmıştır. Bu amaçla mikrodilüsyon teknikleri, bakteriler için (M100-S16); mayalar için (M27-A2) ve funguslar için de (M38-A2) protokollerinde bazı değişiklikler yapılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir (M27-A2, 2002; M100-S16, 2006; M38-A2, 2008). Standart antibakteriyal ilaçlar olarak ampisilin ve kloramfenikol; standart antifungal ilaçlar olarak da amfoterisin B ve ketokonazol kullanılmıştır.

Agar kuyu difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteyi tayin edebilmek için broth kültürlerde geliştirilen izolatlardan alınan örnekler NA ve PDA besiyerlerine ekilmiştir. Steril bir delgi ile açılan kuyulara, her molekül için ayrı olarak hazırlanan farklı derişimlerdeki stok solüsyonlardan 100'er µL alınan kuyulara inoküle edilerek ve oda sıcaklığında 2 saat diffüze olması için bekletilmiştir. Kontrol grubu için metabolit içermeyen inokülüm kullanılmıştır. Plaklar, bakteriyal kültürler için 37°C'de 18-24 saat ve fungal kültürler için de 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülerek kaydedilmiştir. Deneyler iki kez tekrarlanmış ve ortalama değerler alınmıştır (Murray vd., 1995; Olurinola, 1996).

3.3.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yöntemi çalışmaları

Broth mikrodilüsyon yöntemleri ile antimikrobiyal duyarlılık tayini için öncelikle stok kültürlerden alınan izolatların MHA ve SDA besiyerlerinde canlandırılması sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası besiyeri üzerinde gelişen kolonilerden alınıp, bakteriler için MHB; maya ve fungus türleri için de RPMI broth içeren tüplere aktarılmıştır. İnkübasyon sonrası süspansiyondaki kültürlerin bulanıklıkları, Mc Farland No: 0.5 (bakteriler için yaklaşık 10^8 cfu/mL, maya kültürü için 10^6 cfu/mL) olacak şekilde turbidometrik olarak ayarlanmıştır.

Mikrodilüsyon deneyleri steril, U tabanlı ve 96 kuyulu mikropalaklarda yapılmış ve test izolatlarına karşı her metabolitin Minimal İnhibitor Derişimi (MİK) değeri belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle CLSI önerileri doğrultusunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Testin yapılacağı gün, stok çözeltilerden önceden hazırlanıp iki katlık metabolit derişiminin 100 µL'si kuyulara inoküle edilmiş; daha sonra yine önceden iki kat seyreltilen inokülüm süspansiyonunun 100 µL'si de eklenmiştir. Böylece her kuyudaki son hacmi 200 µL olacak ve iki katlık test inokülüm oranları da sağlanmıştır. Her izolat için ilaçsız gelişim ve sterilit kontrolleri de hazırlanmıştır. Uygun inkübasyon sürelerinde bekletildikten sonra, kontrol kuyusu ile karşılaştırıldığında gelişimi %100 inhibe eden en düşük derişim MİK olarak belirlenmiştir. Deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Tüm funguslar için; amfoterisin B; bakteriler için tetrasiklin ve vankomisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler yapılırken bakteriyel izolatlar için dimetil sülfoksit (DMSO) (%50)'da çözülen test bileşenleri MHB ile seyreltilmiş ve test derişim aralıkları 15.62–4000 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. DMSO negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Resazurin çözeltilisi ilave edilerek MİK sonuçları doğrulanmıştır. Maya izolatları için de abiyetik asit ve türevlerinin son derişimleri 15.62–4000 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Fungal izolatlar için spor sayımları Thoma lamı yardımıyla yapılmıştır ve spor solüsyonları steril %0.02 Tween-80 kullanılarak hazırlanmıştır (10⁸ spore 1/mL) (M27-A2, 2002; M100-S16, 2006; M38-A2, 2008).

3.4. *İn Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin antikanser etkilerinin araştırılmasında, HepG2 insan hepatoselüler karaciğer karsinoma (ATCC® HB-8065™) ve A549 insan akciğer adenokarsinoma (ATCC® CCL-185) hücre dizileri kullanılmıştır (ATCC, ABD). Antikanser aktivitenin selektivitesi ise NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücre dizisi (ATCC® CRL-1658™) üzerinde değerlendirilmiştir (ATCC, ABD).

3.4.1. Hücrelerin hazırlanması

Türevlerin antikanser aktivitesinin araştırılmasında A549 (insan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi) kullanılmıştır. Antikanser aktivitenin seçiciliği ve

etkin antimikrobiyal ajanların sitotoksitesitesi NIH/3T3 (fare embriyonik hücre dizisi) hücre dizisinde değerlendirilmiştir (Altıntop vd., 2012; Kaplancikli vd., 2012).

HepG2 insan hepatoselüler karaciğer karsinoma hücre dizisi için, son derişimde %10 Fötal Buzağı Serumı (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya), %89 Eagle'ın Minimum Esansiyel Medyumunu (EMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 2 g/L sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanılmış ve pH 7.4'e ayarlanmıştır.

A549 insan akciğer adenokarsinoma hücre dizisi için ise son derişimde %10 FBS (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya) ve %89 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Almanya), 2 g/L NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanılmış ve pH 7.4'e ayarlanmıştır.

NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücre dizisi için, son derişimde %10 FBS (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya), %89 Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Medyumunu (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 2 g/L NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanılmış ve pH 7.4'e ayarlanmıştır.

Deneylerde kullanılan hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalanıp, sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Hücrelerin yıkanması için kültür şişesine 5 mL fosfat tamponu ilave edilerek yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir (%5 CO_2 , %95 nem ve 37°C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 mL besiyeri ilave edilip hücreler süspanse edilmiştir ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlamak için hafifçe çalkalanıp sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri

alınarak atılmıştır. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine besiyeri ilave edilerek pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu çalkalandıktan sonra 10 µL alınıp 10 µL tripan mavisi (Biorad, ABD) ile boyandıktan sonra 10 µL'si otomatik hücre sayma cihazında (Biorad, ABD) sayılmıştır. Hücre süspansiyonu 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin antiproliferatif etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan farklı etki mekanizmasına sahip ajanlar olan sisplatin, doksorubisin ve 5-flurourasil de kanser hücre dizilerine 3,9-500 µg/mL 8 dilüsyonda uygulanmıştır. Sentezlenen bileşikler için XTT testleri 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2. Hücrelere XTT sitotoksisite testinin uygulanması

Tetrazolium tuzları olan XTT (2,3-Bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolum-5-karboksianilit) ve MTT (3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid) canlı hücrelerdeki metabolik aktivitenin ölçülmesinde kullanılmıştır. Tetrazolium tuzlarını metabolizma ve solunum zinciri intakt hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolyum tuzunu elektron kenetli reaktif varlığında çözünür turuncu renkli formazana dönüştürmektedir (Berridge vd., 2005).

Sentezlenen bileşiklerin 3.9-500 µg/mL 8 seri dilüsyonları (3.9; 7.8; 15.6; 31.25; 62.5; 125; 250; 500 µg/mL) negatif ve pozitif kontroller ile birlikte plakalara uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). Son DMSO derişimi < % 0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol olarak DMSO %0,1, pozitif kontrol olarak ise sisplatin kullanılmıştır (Altıntop vd., 2012). 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ile yıkanıp, yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasına 200 µL/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. XTT1 ve XTT2 çözeltileri 1:100 oranında karıştırılarak hücre kültür plakasına 50 µL/kuyucuk olacak şekilde ilave edilmiştir.

Ardından 3 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakalar 5 dk. hafifçe çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda (Biotek, ABD) 480 nm’de optik yoğunluk (OD) değerleri okunmuştur.

Test maddelerinin her bir derişimi için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. % inhibisyon değerlerine karşılık derişimleri ile doz-cevap eğrisi çizilerek maddelerin inhibitör derişim 50 (İK₅₀) değerleri hesaplanmış ve maddelerin sitotoksik özellikleri yorumlanmıştır. Tüm deneyler 4 tekrarlı ve 3 farklı zamanda tekrar edilerek yapılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(OD_{\text{test maddesi}} - OD_{\text{kör}} / OD_{\text{çözücü kontrol}} - OD_{\text{kör}}) \times 100] \quad (3.1)$$

Bileşiklerin selektiviteleri önceki çalışmalar ile belirtilen formül yardımıyla hesaplanmıştır (Popiolkiewicz vd., 2005). İK₅₀ değeri 500 µg/mL büyük değerler 500 olarak alınmıştır.

$$\text{Selektivite İndeksi (SI)} = (\text{İK}_{50} \text{ NIH/3T3} / \text{İK}_{50} \text{ HepG2/MCF-7/A549}) \times 100 \quad (3.2)$$

Bileşiklerin NIH/3T3 hücre dizisine karşı sitotoksisiteleri, onların antimikrobiyal aktivitelerine karşı selektivitelerini belirlemek amacı ile de kullanılmıştır. Bileşiklerin antimikrobiyal etki potansiyellerinin belirleyicisi olarak seçicilikleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Orme vd., 2001; Hillegass vd., 2010; Lomelino vd., 2012).

$$\text{SI} = (\text{İK}_{50} \text{ NIH/3T3}) / \text{MİK} \quad (3.3)$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Abiyetik Asit Çalışmaları

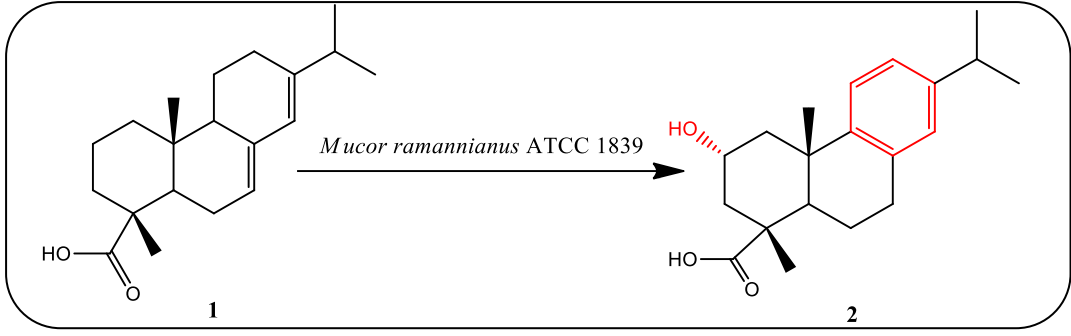
4.1.1. Biyotransformasyon tepkimeleri

Abiyetik asit molekülünün 28 mikroorganizma ile ön biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Ön biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda elde edilen abiyetik asit substratına ait İTK'ların incelenmesi sonucunda (bkz. Ek Açıklamalar-A), metabolit elde edilebileceği düşünülen aşağıda biyotransformasyon tepkimeleri preparatif ölçekte tekrarlanmıştır.

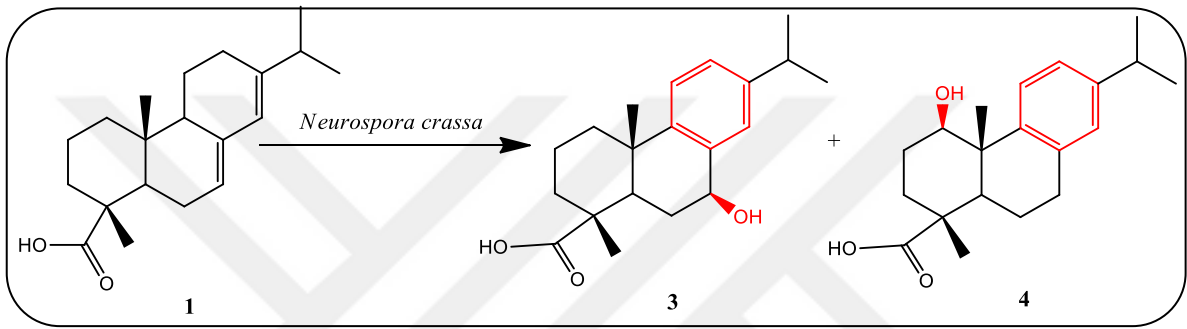
Yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilen İTK'lara göre, aşağıdaki mikroorganizmalar kullanılarak büyük ölçekli çalışmalar gerçekleştirilmiştir; *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Aspergillus niger* NRRL 326, *Aspergillus niger* ATCC 10549, *Penicillium adametzii* NRRL 737, *Fusarium solani* ATCC 1284, *Fusarium culmorum*, *Hansenula anomala* ATCC 20170, *Mucor ramannianus* ATCC 1839, *Neurospora crassa* (izolat), *Corynespora cassicola* DSM 62475, *Fusarium heterosporium* (izolat), *Trametes versicolor* ATCC 200801, *Trichotesium roseum* (izolat).

Abiyetik asidin (1) 12 farklı mikroorganizma ile preparatif ölçekte gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen ekstraktlarda çok sayıda bileşik içeren karışımlar elde edilmiştir. Fakat sadece iki biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen karışımlardan saf metabolit elde edilebilmiştir. Bunlardan ilki *M. ramannianus* ATCC 1839 diğeri ise *N. crassa* (izolat) ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleridir.

M. ramannianus ATCC 1839 ile elde edilen karışımdan bir metabolitin yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak 2 α -hidroksi dehidroabiyetik asit (2) olarak tanımlanmıştır (bkz. Şekil 4.1). *N. crassa* (izolat) ile elde edilen karışımdan ise iki adet metabolit saf olarak elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Abiyetik asidin *M. ramannianus* ile biyotransformasyon tepkimesi



Şekil 4.2. Abiyetik asidin *N. crassa* ile biyotransformasyon tepkimesi

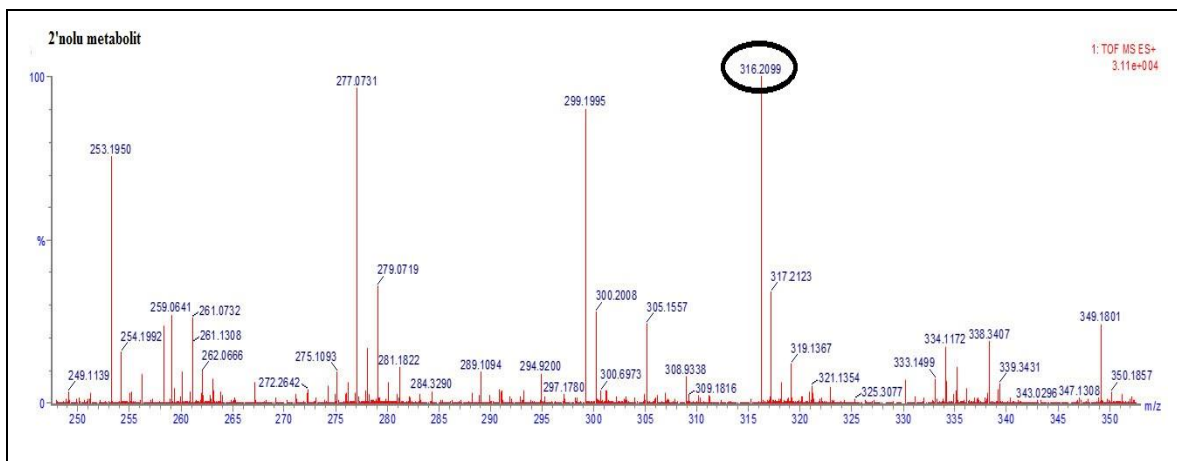
Kolon kromatografisinden (MPLC) %35 etil asetat-hegzan çözücü sistemi kullanılarak %12.7 verimle saflaştırılan ve 2α-hidroksi dehidroabiyetik asit (2) olarak tanımlanan metabolite ait IR spektroskopisi değerleri sonucu molekülün yapısında hidroksil grubu olduğu 3387 cm^{-1} 'de gelen yayvan pik ile doğrulanmaktadır (bkz. Çizelge 4.1).

^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları, başlangıç molekülü olan abiyetik asidin spektrumları ile karşılaştırıldığında, metabolite ait proton spektrumunda 4.02-4.10 ppm aralığında yeni bir proton pikinin 1 H ölçüsünde multiplet olarak geldiği, karbon spektrumunda ise 65.5 ppm'de yeni bir hidroksil grubu taşıyan tersiyer karbon atomuna ait bir pikin varlığı gözlemlendi (bkz. Çizelge 4.2-4.3). HRMS (MS: m/z 316 $[\text{M}]^+$) (bkz. Şekil 4.3) ve optik çevirme açısı ($[\alpha]_D^{20} = +106.7$) gibi diğer spektroskopik analizler, ortaya konan yapıyı doğrulamıştır.

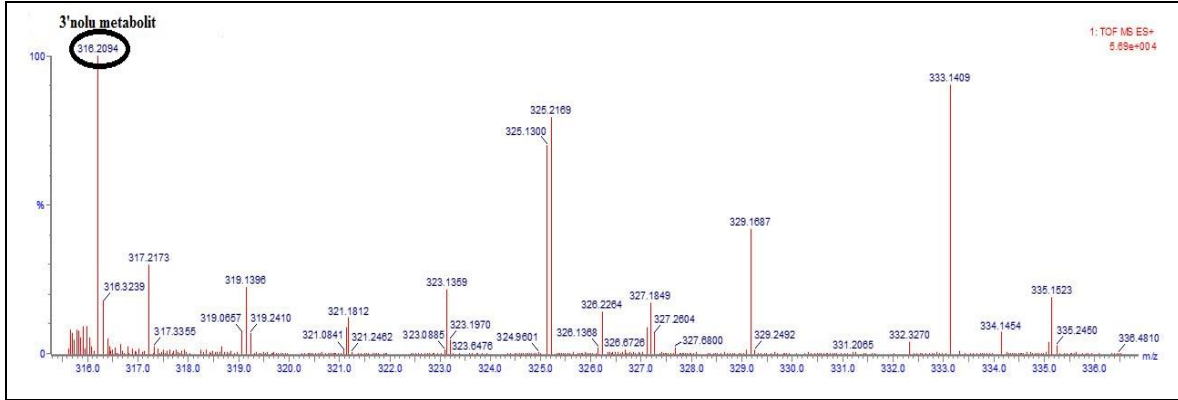
N. crassa (izolat) ile elde edilen karışımın kolon kromatografisinden (MPLC) elde edilen metabolitler sırasıyla %30 ve %35 etil asetat-hegzan çözücü sistemi kullanılarak %15.5 ve 20.1 verimle saflaştırılmış ve yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak 7 β -hidroksi dehidroabiyetik asit (**3**) ve 1 β -hidroksi dehidroabiyetik asit (**4**) olarak tanımlanmıştır. IR değerlerleri sonucu moleküllerin yapısında hidroksil grubu olduğu sırasıyla 3410 cm⁻¹ ve 3377 cm⁻¹'de gelen yayvan pikler ile doğrulanmaktadır (bkz. Çizelge 4.1).

¹H ve ¹³C-NMR spektrumları, başlangıç molekülü olan abiyetik asidin spektrumları ile karşılaştırıldığında, metabolitlere ait proton spektrumlarında sırasıyla 4.87-4.91 ppm ve 3.96-4.00 ppm aralıklarında yeni birer proton piklerinin 1 H ölçüsünde multipler olarak geldiği, karbon spektrumunda ise sırasıyla 70.7 ppm ve 77.5 ppm'de yeni birer hidroksil grubu taşıyan tersiyer karbon atomuna ait piklerin varlığı gözlemlendi (bkz. Çizelge 4.2-4.3). HRMS sonuçları ise sırasıyla m/z 316.2094 [M]⁺ (hesaplanan C₂₀H₂₈O₃; 316.2038) (bkz. Şekil 4.4) ve m/z 317.2120 [M+H]⁺ (hesaplanan C₂₀H₂₉O₃, 317.2117) olarak ölçülmüştür (bkz. Şekil 4.5). Optik çevirme açıları sırasıyla $[\alpha]_D^{20} = -28.0$ ve $[\alpha]_D^{20} = +60.0$ olarak ölçülmüştür.

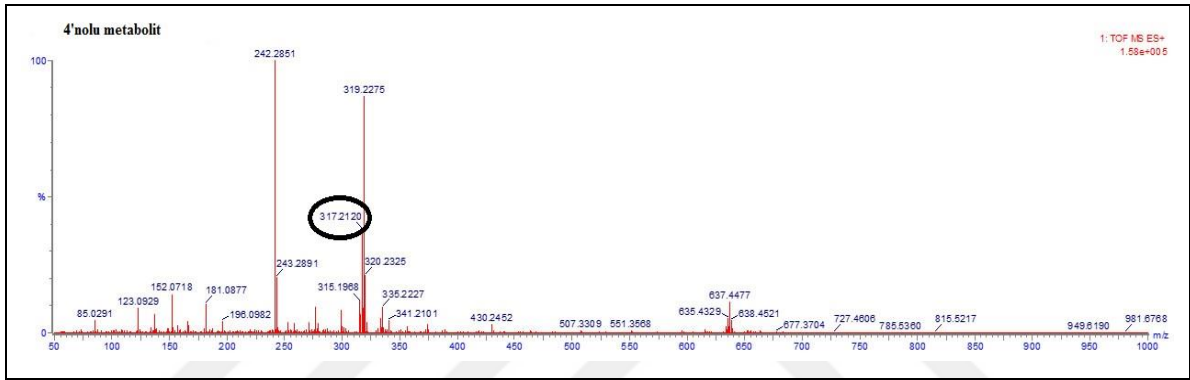
Tüm spektroskopik veriler metabolitlerin yapısına yeni bir hidroksil grubunun ilave edildiğini göstermiştir (bkz. Şekil 4.6-4.15 ve Çizelge 4.2-4.3).



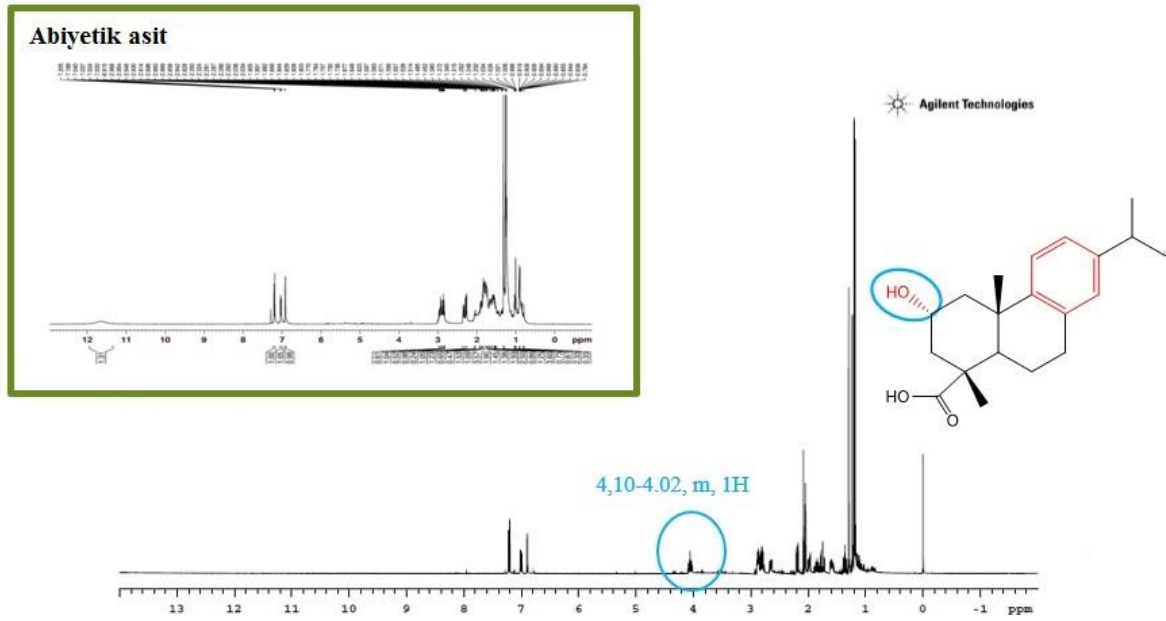
Şekil 4.3. 2 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu



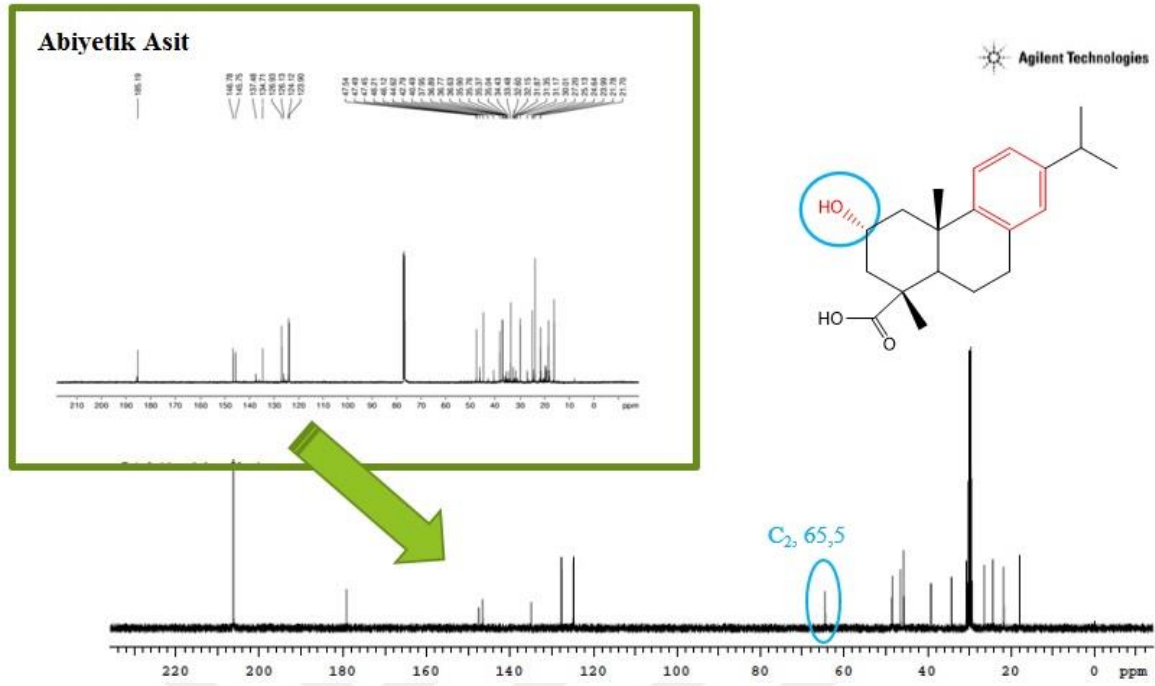
Şekil 4.4. 3 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu



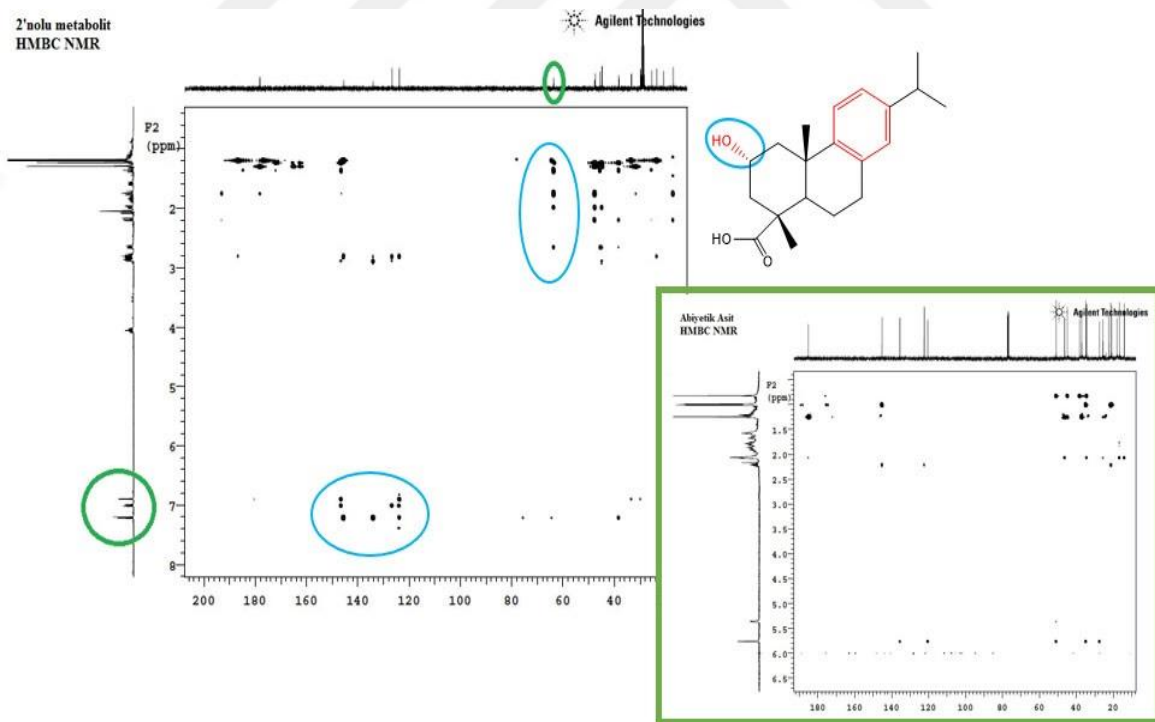
Şekil 4.5. 4 Nolu metabolite ait HRMS spektrumu



Şekil 4.6. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait ^1H -NMR spektrumları

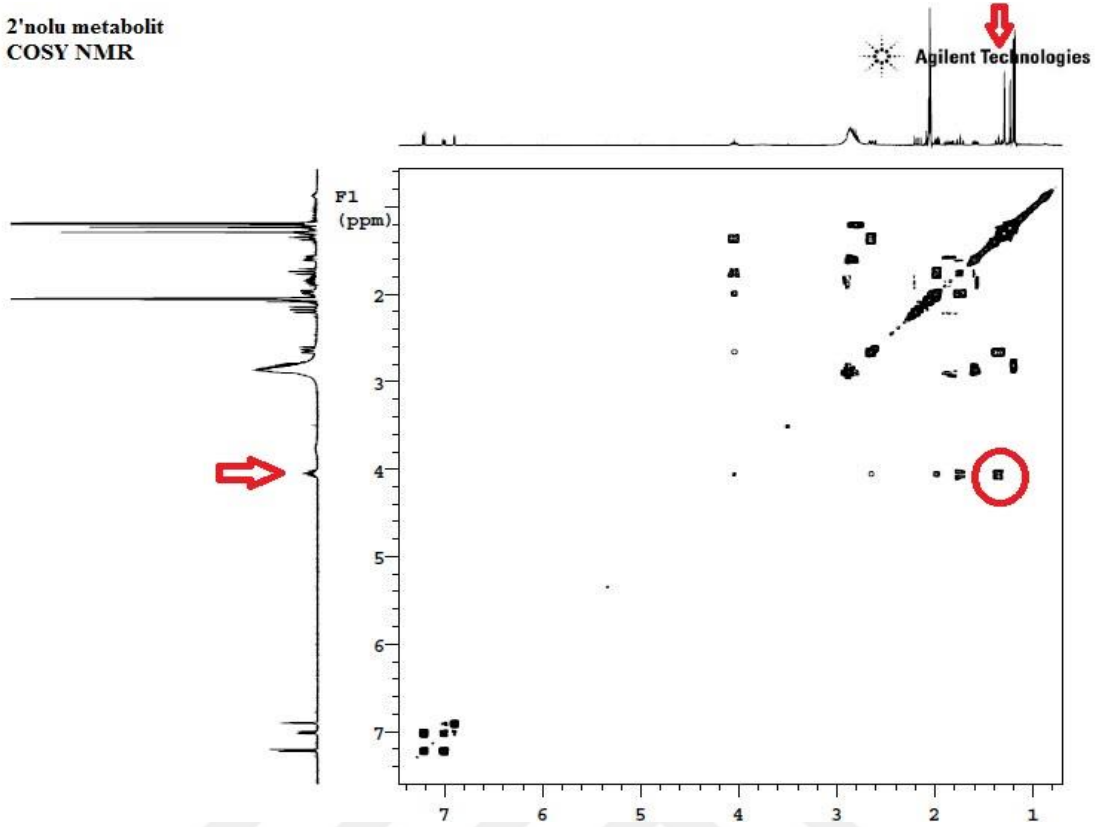


Şekil 4.7. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait ^{13}C -NMR spektrumları

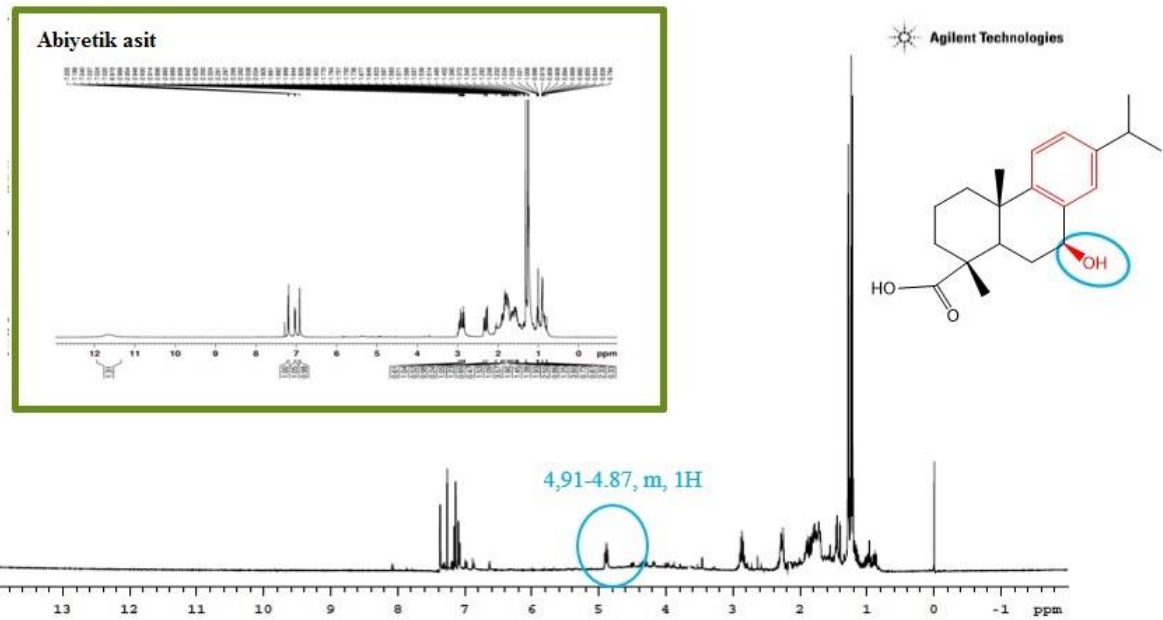


Şekil 4.8. Abiyetik asit (1) ve 2 nolu metabolite ait HMBC spektrumları

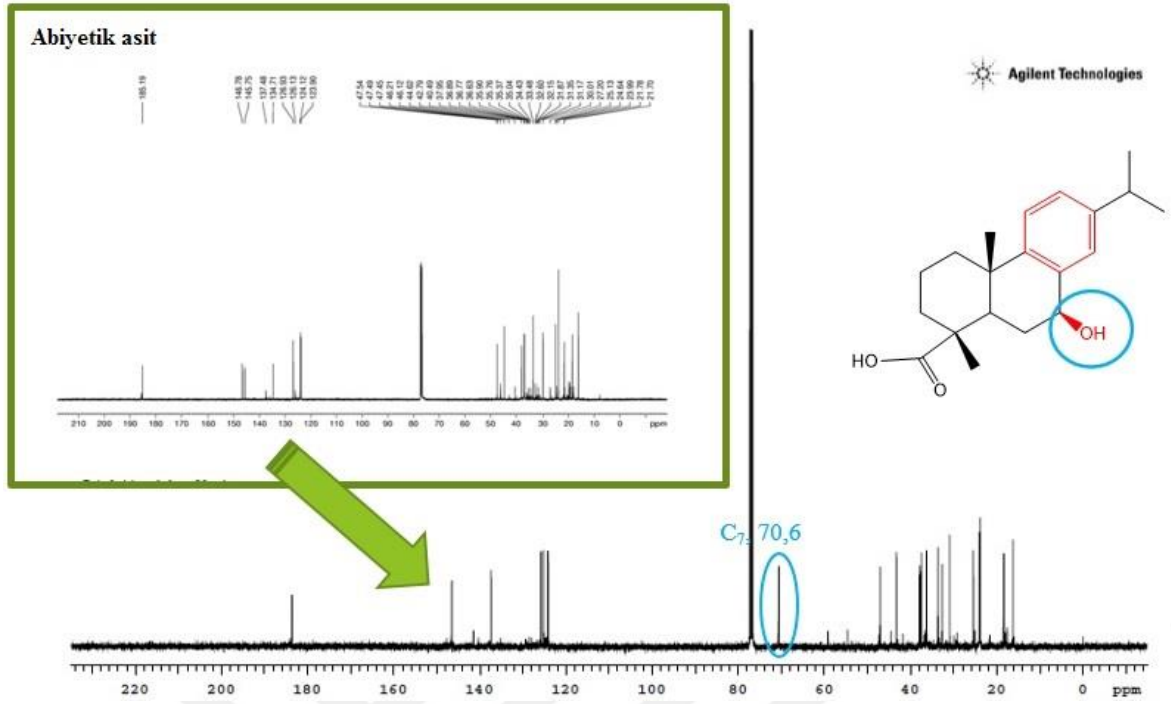
2'nolu metabolit
COSY NMR



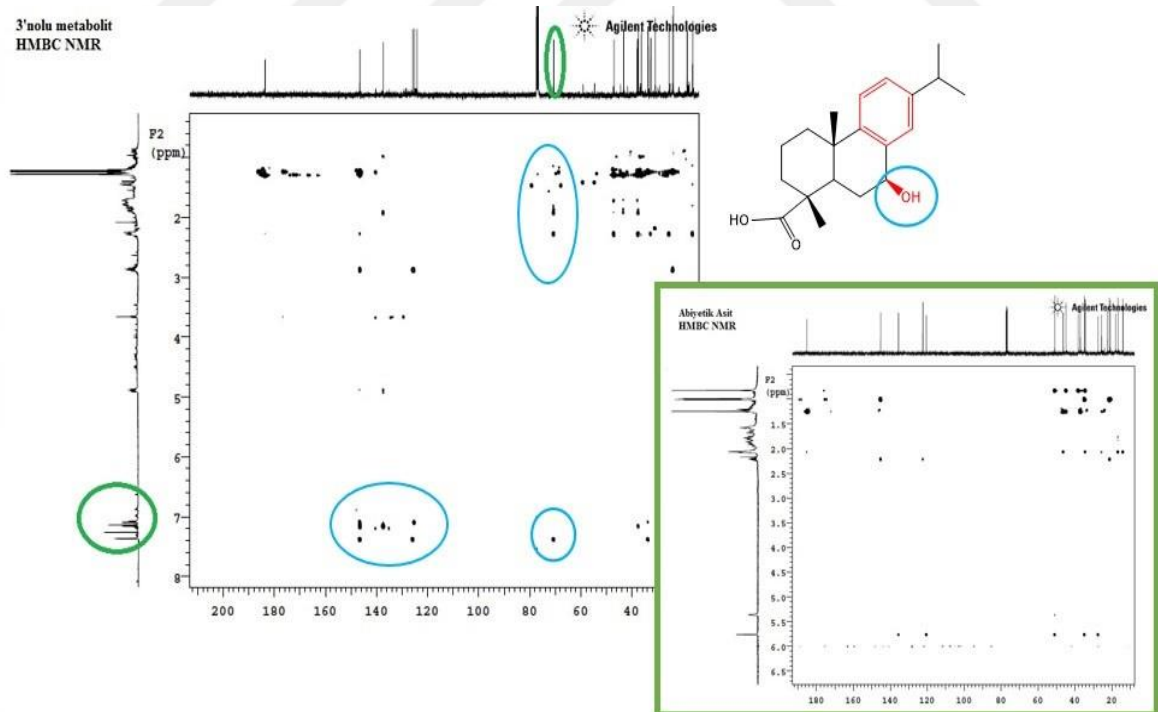
Şekil 4.9. 2 Nolu metabolitine ait COSY spektrumu



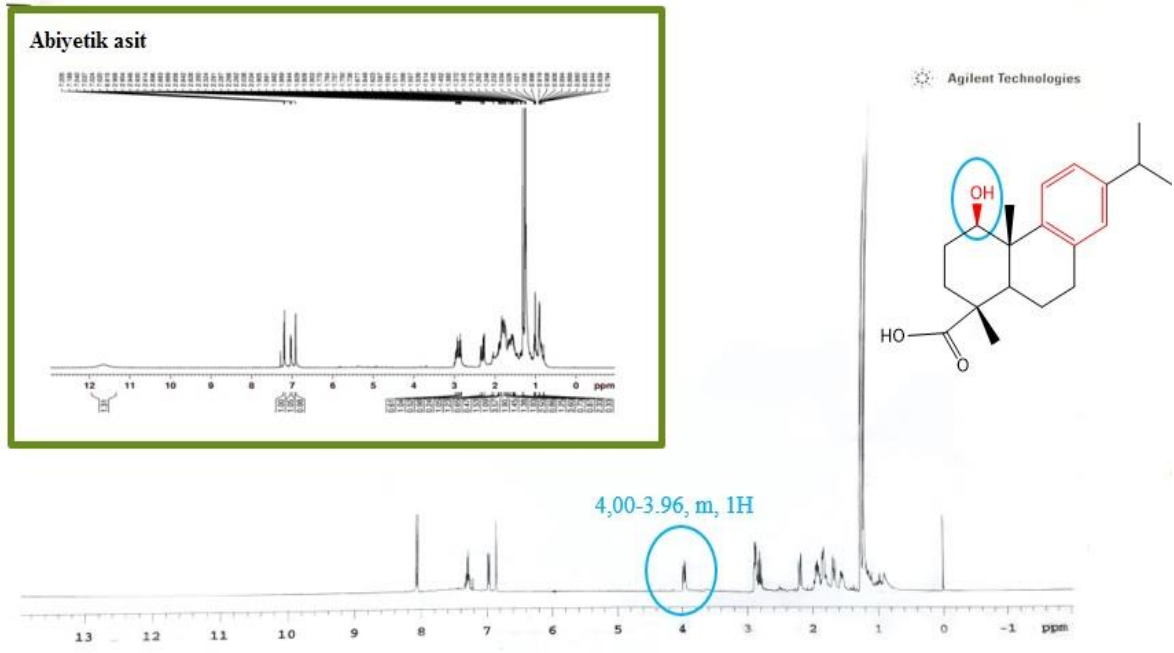
Şekil 4.10. Abiyetik asit ve 3 nolu metabolite ait ^1H -NMR spektrumları



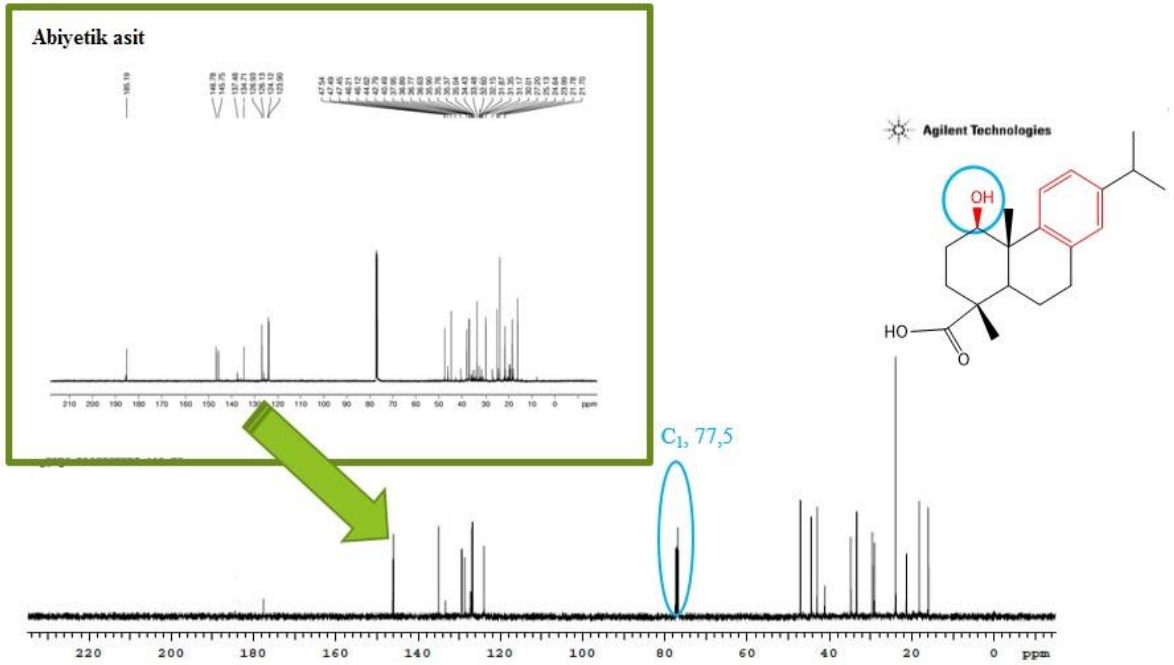
Şekil 4.11. Abiyetik asit ve 3 nolu metabolite ait ^{13}C -NMR spektrumları



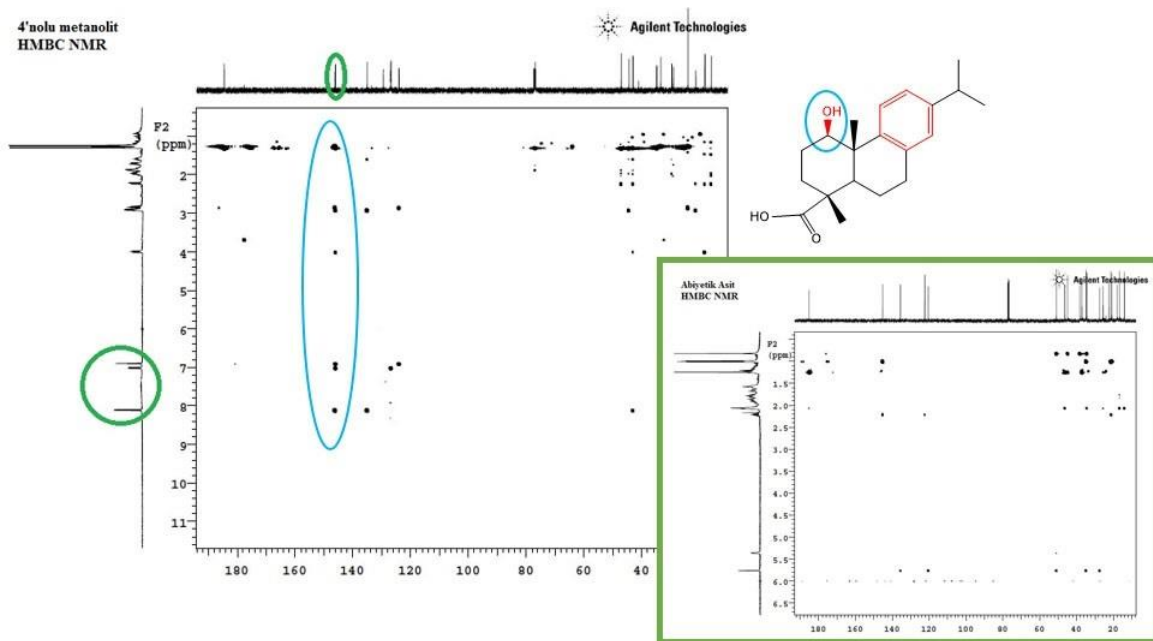
Şekil 4.12. Abiyetik asit (1) ve 3 nolu metabolite ait HMBC spektrumları



Şekil 4.13. Abiyetik asit ve 4 nolu metabolite ait ^1H -NMR spektrumları



Şekil 4.14. Abiyetik asit ve 4 nolu metabolite ait ^{13}C -NMR spektrumları



Şekil 4.15. Abiyetik asit (1) ve 4 nolu metabolite ait HMBC spektrumları

Çizelge 4.1. Abiyetik asit metabolitlerinin (2-4) IR verileri

2	(KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3387, 2859, 1676, 1574, 1496, 1387, 1229, 1034, 957, 818, 729, 625
3	(KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3410, 2932, 1701, 1557, 1460, 1389, 1267, 974, 824, 702, 658
4	(KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3377, 2954, 1692, 1558, 1487, 1379, 1225, 953, 831, 705, 600

Çizelge 4.2. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) ^1H -NMR spektroskopisine ait veriler

1	0.82 (3H, s, CH_3), 0.98-0.99 (3H, d, $J = 4$ Hz, CH_3), 1.00-1.01 (3H, d, $J = 3.6$ Hz, CH_3), 1.25 (3H, s, CH_3), 2.17-2.23 (1H, m, CH), 5.36-5.36 (1H, br s, CH)
2	1.23 (3H, s, CH_3), 1.29 (3H, s, CH_3), 1.16 (6H, d, $J = 7.6$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 4.02-4.10 (1H, m, CH), 6.90 (1H, br s, CH), 6.99-7.02 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, CH), 7.20-7.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, CH)
3	1.27 (3H, s, CH_3), 1.28 (3H, s, CH_3), 1.22-1.23 (6H, d, $J = 7.2$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 4.87-4.91 (1H, m, CH), 7.08-7.10 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, CH), 7.14-7.16 (1H, d, $J = 8$ Hz, CH), 7.37 (1H, br s, CH)
4	1.26 (3H, s, CH_3), 1.27 (3H, s, CH_3), 1.20-1.22 (6H, d, $J = 7.2$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.96-4.00 (1H, m, CH), 6.86 (1H, br s, CH), 6.96-6.99 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, CH), 8.06-8.08 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, CH)

Çizelge 4.3. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) ^{13}C -NMR spektroskopisine ait veriler

	1	2	4	3
No	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
C1	38.3	48.4	77.5	37.9
C2	18.0	65.5	29.7	18.4
C3	37.2	46.5	34.9	37.5
C4	46.3	48.6	47.2	47.1
C5	44.9	45.7	44.6	43.3
C6	25.6	21.7	21.4	32.7
C7	120.5	30.7	29.2	70.7
C8	135.5	134.9	135.0	137.4
C9	50.9	147.5	146.3	146.6
C10	34.4	39.2	43.1	36.3
C11	22.5	124.9	126.9	125.2
C12	27.4	124.7	124.1	125.8
C13	165.2	146.5	146.1	146.5
C14	122.4	127.7	129.5	124.2
C15	34.9	34.3	33.5	33.7
C16	21.4	24.3	24.1	24.0
C17	20.9	24.4	24.1	23.9
C18	16.7	26.3	16.1	25.4
C19	185.2	179.1	184.6	183.7
C20	14.0	17.9	18.3	16.2

Literatür taramaları sonucunda 2 nolu metabolitin dehidroabiyetik asidin *Mucor circinelloides* IT25 ve *Mortierella isabellina* HR32 (Mitsukura vd., 2005), 3 nolu metabolitin *Aspergillus niger* (Gouiric vd., 2004) ve 4 nolu metabolitin ise *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* (Tapia vd., 1997) ve *Phlebiopsis gigantea* (Beek vd., 2007) ile biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca 3 nolu metabolitin *Callicarpa pedunculata* (Yi ve Yan, 2011), *Pinus banksiana* (Georges vd., 2012) ve *Cedrus deodara* LOUD (Ohmoto vd., 1987) gibi pek çok bitkiden izole edildiği belirtilmiştir.

Elde edilen metabolitler literatürde mevcut olmasına rağmen, çalışmalarımızın literatür çalışmalarından önemli bir farkındalığı vardır. Bu farkındalık; 2, 3 ve 4 nolu metabolitlerin abiyetik asitten biyotransformasyon tepkimeleri ile elde edilmesine yönelik ilk çalışma olmasından kaynaklanmaktadır. Özetle, yürütülen çalışma literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

4.1.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için önemli bitki ve insan patojeni olan, biyofilm üreten ve son çalışmalarda da pek çok araştırmacı tarafından araştırma konusu olan mikroorganizmalar seçilmişlerdir.

Antimikrobiyal testler için sıvı mikrodilüsyon referans testi ile CLSI (funguslar için; M38-A2 bakteriler için; M100-S16 ve mayalar için; M27-A2) agar difüzyon testi kullanılmıştır (M27-A2, 2002; M100-S16, 2006; M38-A2, 2008). Sıvı mikrodilüsyon çalışmalarında 10 fungus (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Aspergillus niger* ATCC 10549, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* ATCC 1284, *Fusarium moniliforme* NRRL 2374, *Fusarium culmorum*, *Fusarium heterosporium*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* AHU 9424 ve *Aspergillus nidulans*), 3 maya (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 2001 ve *Candida krusei* ATCC 6258) ve 6 bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Proteus vulgaris* NRRL B-123, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 ve *Escherichia coli* ATCC 8739) izolatları çalışılmıştır.

Agar difüzyon deney sonuçları 11 fungal izolat ile test edilmiştir. Her bileşen için stok solüsyon için çözücü olarak DMSO (%50) kullanılmış ve spor solüsyonlar (10^8 spor mL^{-1}) 0.02% Tween-80 içerisinde Thoma lamında sayımı gerçekleştirilmiş, DMSO negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Spor solüsyonlardan 1 mL alınarak drigalsi spatula ile PDA (25 mL) içeren petrilere aktarılmış, mediuma steril delici ile 6 mm çapında delikler delinmiş ve ölçümler çap üzerinden tam zon oluşumu hesaplanarak yapılmıştır. Her komponentten 40 μL açılan kuyucuklara eklenmiş ve agar difüzyon metodu sonuçları 27°C’de sırasıyla 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. Metabolitlerin (2-4) ve abiyetik asitin (1) inhibisyon zonları amfoterisin B (9-36 mm) standart antifungal ajan ile kıyaslanmıştır. “-” işareti etki hiç yok anlamına gelmektedir (bkz. Çizelge 4.4).

Sonuç olarak, *A. alternata*, *A. flavus*, *F. heterosporium*, *F. moniliforme* ve *F. solani* izolatlarına karşı (kontrol ilacı dışında) abiyetik asit türevleri abiyetik asitten daha fazla inhibisyon aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir (>15 mm). Tüm sıvı mikrodilüsyon

testlerinde son derişim aralığı 15.62-4000 µg/mL'dir. MİK sonuçları fungal izolatlarda 72 saat ve 27°C, bakteriyal izolatlar için 24 saat ve 37°C inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. Resazurin çözeltisi ilave edilerek MİK sonuçları doğrulanmıştır. MİK sonuçları okunurken %100 büyüme inhibisyonu dikkate alınmıştır. Antifungal testler için amfoterisin B ve ketokonazol antifungal ajanları, antibakteriyal testler için ampfisilin ve kloramfenikol antibakteriyal ajanlar (son derişimler 0.04-40 µg/mL) ile kıyaslanarak yorumlanmıştır. Tüm deneyler çift tekrarlı yapılmıştır. Bkz. Çizelge 4.5, abiyetik asit (1) ve türevlerinin (2-4) izolatlara karşı sıvı mikrodilüsyon sonuçlarını göstermektedir. Sonuç olarak, test edilen tüm derişimlerde hem abiyetik asit hem de türevleri önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (>250 µg/mL). Bu metabolitler arasında 2 nolu bileşik, *S. epidermidis* ATCC 12228'e karşı abiyetik asitten daha etkili antifungal aktivite göstermiştir. Sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri genel olarak kullanılan metabolite ve kullanılan bakteriyal suşa bağlı olarak benzerlikler göstermiştir. Ancak metabolitler kullanılan test aralığında *Candida* suşlarına karşı belirgin bir antimikrobiyal aktivite göstermemişlerdir. Fungal izolatlar için abiyetik asit ve türevlerinin MİK değerleri çoğunlukla 125-4000 µg/mL arasındadır. Tüm fungal izolatlar içinde 3 nolu bileşik (500 µg/mL), *A. flavus*'a karşı abiyetik asitten (1000 µg/mL) daha etkili bulunmuştur. 2 ve 4 nolu bileşikler fungal izolatlara karşı önemli bir inhibitör etki göstermemiştir.

Sonuç olarak referans sıvı mikrodilüsyon testi verilerine göre abiyetik asidin etkisi metabolitlerine göre daha etkili olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) inhibisyon zonları

Başlangıç derişimi:		8 mg/mL			8 mg/mL			8 mg/mL			8 mg/mL														
		1			2			3			4			DMSO			64µg/mL			Amfoterisin B 32µg/mL			16µg/mL		
Saat:		24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Fungal kültürler																									
<i>A. alternata</i>		-	-	-	-	-	-	-	14	16	-	-	-	-	-	-	23	24	26	20	21	24	15	17	21
<i>A. niger</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	21	23	17	18	20	16	18	19
<i>A. parasiticus</i>		-	-	-	-	-	13	-	-	12	-	-	12	-	-	-	13	14	18	11	13	17	11	13	14
<i>A. flavus</i>		-	-	11	-	10	11	12	13	15	-	11	12	-	-	-	29	30	32	23	24	26	17	19	20
<i>A. nidulans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	35	36	30	33	34	24	25	27
<i>B. cinerea</i>		-	-	-	-	-	11	-	-	11	-	-	13	-	-	-	22	23	25	21	22	24	20	21	21
<i>F. culmorum</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	18	19	19	12	13	15	9	10	13
<i>F. heterosporium</i>		-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	13	16	-	-	-	18	19	20	15	16	18	16	17	17
<i>F. moniliforme</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	14	15	-	-	-	32	33	33	29	31	32	20	22	24
<i>F. solani</i>		-	-	10	-	-	-	-	17	19	-	-	-	-	-	-	28	29	30	24	26	26	25	26	27

Çizelge 4.5. Abiyetik asit (1) ve metabolitlerinin (2-4) antimikrobiyal aktivite MİK değerleri (µg/mL)

Bakteriyal kültürler	1	2	3	4	Amfisilin	Kloromfenikol
<i>S. aureus</i>	500	2000	2000	2000	0.08	10
<i>P. vulgaris</i>	500	1000	1000	1000	0.08	10
<i>S. typhimurium</i>	500	1000	1000	2000	0.16	10
<i>S. epidermidis</i>	1000	500	1000	1000	1.25	10
<i>B. subtilis</i>	250	1000	1000	1000	0.08	5
<i>E. coli</i>	2000	2000	2000	2000	5	5
Maya izolatları					Amfoterisin B	Ketokonazol
<i>C. albicans</i>	1000	1000	1000	1000	0.31	0.04
<i>C. glabrata</i>	250	1000	1000	1000	0.16	0.04
<i>C. krusei</i>	500	1000	1000	1000	0.31	0.16
Fungal kültürler					Amfoterisin B	DMSO
<i>A. parasiticus</i>	500	2000	1000	2000	0,250	1. kuyucuk
<i>A. niger</i>	500	2000	500	2000	≤0,062	1. kuyucuk
<i>A. flavus</i>	1000	2000	500	2000	1	2. kuyucuk
<i>F. solani</i>	1000	4000	1000	2000	0,125	1. kuyucuk
<i>F. moniliforme</i>	1000	4000	1000	2000	0,125	1. kuyucuk
<i>F. culmorum</i>	1000	4000	1000	2000	≤0,062	1. kuyucuk
<i>F. heterosporium</i>	1000	2000	1000	2000	4	1. kuyucuk
<i>A. alternata</i>	500	2000	1000	2000	≤0,062	2. kuyucuk
<i>B. cinerea</i>	125	500	500	1000	≤0,062	2. kuyucuk
<i>A. nidulans</i>	1000	2000	1000	2000	≤0,062	1. kuyucuk

4.1.3. Sitotoksosite çalışmaları

Sitotoksosite testleri, ilaç adaylarının hücrelerin temel fonksiyonlarına etkilerini belirleyerek hücresel hasarın değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler hücre sayısına, morfolojisine ve metabolik aktivitesine dayanarak ilaç adaylarının toksisitesi ve güvenilirliği hakkında ön bilgi sağlamaktadır (Pohjala vd., 2007). Sitotoksik etkilerin belirlenmesi ve mekanizmasının aydınlatılmasında mitokondriyal aktivite tayini (MTT/XTT) sık kullanılan bir yöntemdir (Langdon vd., 2010).

Amerikan Kanser Birliği'nin hazırladığı rapora göre, gelişmekte olan ülkelerde en sık teşhis edilen kanserler erkeklerde akciğer, hepatoselüler ve mide iken kadınlarda meme, serviks ve akciğer kanseri olarak sıralanmaktadır. Erkeklerde akciğer kanseri; kanser ilişkili ölümlerin en başında yer alırken ikinci sırayı ise hepatoselüler karsinoma almaktadır. Kadınlarda ise akciğer kanserinin ikinci, hepatoselüler karsinomanın ise beşinci sırada olduğu tespit edilmiştir (American Cancer Society, 2015). Ayrıca son yıllarda hepatoselüler karsinomanın görülme sıklığının arttığı saptanmıştır (Attwa ve El-Etreby, 2015). Bu noktada ortak paydada tüm dünyada her iki cinsiyet açısından da akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinoma oldukça önem taşımaktadır. Bu sebeple de çalışmamızda sonuç bileşiklerinin A549 insan akciğer adenokarsinoma ve HepG2 insan hepatoselüler karsinoma hücre dizileri üzerindeki antikanser etkileri XTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve $İK_{50}$ değerleri belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.6).

1 no'lu bileşik, abiyetik asit ve metabolitleri antikanser aktiviteleri açısından kıyaslandığında, **2** no'lu metabolit A549 hücre hattına karşı 320.8 $\mu\text{g/mL}$; **3** no'lu metabolitin ise A549 akciğer karsinoma hücre hattına karşı 268.9 $\mu\text{g/mL}$, HepG2 hepatoselüler karsinoma hücre hattına karşı ise 196.6 $\mu\text{g/mL}$ $İK_{50}$ değerine sahip olduğu bulunmuştur. **4** no'lu metabolitin ise test edilen derişimlerde her iki kanserli hücre hattına karşı sitotoksik etkisi tespit edilmemiştir. **1** no'lu bileşik abiyetik asitin ise A549 akciğer karsinoma hücre hattına karşı $İK_{50}$ değeri 120 $\mu\text{g/mL}$; HepG2 hepatoselüler karsinoma hücre hattına karşı ise $İK_{50}$ değeri 180 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir.

İlaç adaylarının geliştirilme sürecinde SI, karşılaştırılmalarına olanak sağlayan bir gösterge olarak önem kazanmıştır. İlaç adaylarına ait selektivite indeksinin 100'den çok

büyük değerlere ulaşması ve pozitif kontrol olan ilaçtan daha büyük bir selektivite indeksine sahip olması bileşiklerin ilaç adayı olarak daha ileri aşamalara taşınabileceklerinin de en önemli belirleyicisidir. Antikanser ve antifungal etkileri araştırılan bileşiklerin ise sağlıklı hücelere zarar vermeksizin, kanserli hücelere veya etkin oldukları patojene selektivite göstermesi gerekmektedir (Popiolkiewicz vd., 2005; López-Lázaro, 2015). Bu sebeple bu çalışmada bileşiklerin NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast (sağlıklı) hücre dizisi üzerinde sitotoksiteleri incelenerek SI değerleri hesaplanmıştır. Antikanser etkili türevlerin SI değerlerinin yüksek olması, antikanser etkilerinin seçici olduğunu göstermektedir (bkz. Çizelge 4.3). Bu açıdan 1 no'lu bileşik ve 2, 3 ve 4 no'lu metabolitleri değerlendirildiğinde, abiyetik asit metabolitlerine göre sağlıklı hücre dizisine en fazla sitotoksik etki gösteren bileşik olarak bulunmuştur ($İK_{50}=115.7 \mu\text{g/mL}$). 2 ve 4 no'lu metabolitler test edildikleri derişimlerde sağlıklı hücre hattına karşı sitotoksite göstermezken 3 no'lu metabolitin hafif derecede sitotoksiteye sahip olduğu gösterilmiştir ($İK_{50}= 368 \mu\text{g/mL}$). 1 no'lu bileşiğin $İK_{50}$ değerleri metabolitlerine kıyasla daha düşük dozda gibi görünse de sağlıklı hücelere karşı sitotoksitesi selektivite indeksi hesaplanmasının ışığında etkinliğini sınırlandırmaktadır.

Önceki çalışmalar, özellikle selektivite indeksi 100'den çokça yüksek olan bileşiklerin ilerleyen aşamadaki araştırmalara geçmelerini önermektedir (Popiolkiewicz vd., 2005). Bu noktadan hareketle 156 SI değerine sahip olan 2 no'lu metabolit insan akciğer kanserine karşı selektif olarak etki gösteren bir madde olarak kabul edilebilir. Ek olarak, 3 no'lu metabolit de insan heptoselüler karsinomasına karşı en etkili ve en selektif bileşik olma potansiyelini 187 olan SI değeri ile göstermektedir. Bu noktada hem 2 no'lu metabolit hem de 3 no'lu metabolit 1 no'lu bileşik olan abiyetik asite göre daha etkili ve aynı zamanda seçici antikanser aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.6. 1-4 Bileşiklerine ait $İK_{50}$ ve SI değerleri

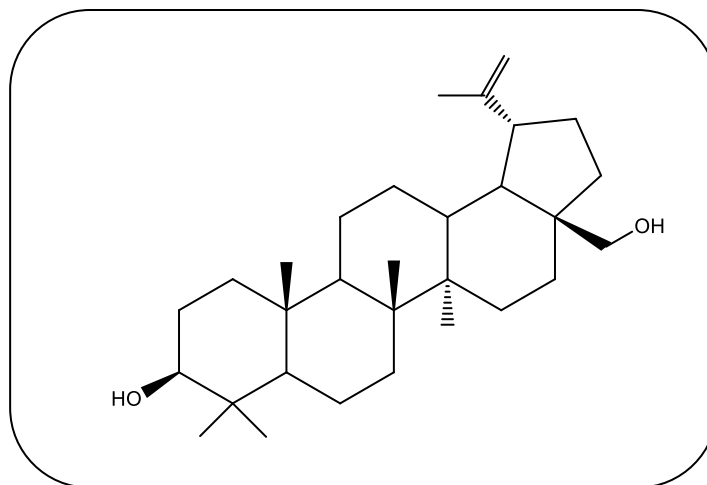
Bileşikler	$İK_{50}$ değerleri ($\mu\text{g/mL}$)			SI değerleri	
	NIH/3T3	A549	HepG2	A549	HepG2
1	115.7 $\pm$ 7.3	120 $\pm$ 5.9	180 $\pm$ 7.1	96.3	64.2
2	>500	320.8 $\pm$ 15.7	>500	156	100
3	368 $\pm$ 11.3	268.9 $\pm$ 12.4	196.6 $\pm$ 9.1	137	187
4	>500	>500	>500	100	100
Sisplatin	500 $\pm$ 5.6	21.5 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 1.1	2326	1302

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Sonuç olarak, antikanser aktivite açısından ise özellikle **2** ve **3** no'lu bileşiklerin ilaç geliştirilme süreci açısından bir üst basamağa taşınarak *in vitro* çalışmalarla etkinliklerinin ve toksisitelerinin aydınlatılmasının mümkün olabileceği söylenebilir.

4.2. Betulin Çalışmaları

Betulin, triterpen yapısına sahip (Şekil 4.23) bir bileşiktir. Literatürde betulin molekülü ile gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmalarından olumlu sonuçlar alınmış ve türevlerinin organik sentezi veya biyolojik türevlendirilmesi üzerinde çalışmalara yoğunlaşmıştır (bkz. Çizelge 2.2).



Şekil 4.16. Betulin molekülünün yapısı

4.2.1. Biyotransformasyon tepkimeleri

Betulin molekülünün 28 mikroorganizma ile ön biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (bkz. Ek Açıklamalar-B). Ön biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda elde edilen betulin substratına ait İTK'ların incelenmesi sonucunda, metabolit elde edilebileceği düşünülen aşağıda biyotransformasyon tepkimeleri preparatif ölçekte tekrarlanmıştır.

Yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilen İTK'lara göre, büyük ölçekli çalışmalar yapılan organizmalar; *Corynespora cassicola* DSM 62475 ve *Fusarium heterosporium* mikroorganizmalarıdır. Betulin molekülünün 2 farklı mikroorganizma ile preparatif ölçekte gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen ekstraktlarda çok sayıda bileşik içeren karışımlar elde edilmiştir. Fakat kolon kromatografisi ve MPLC (orta basınçlı sıvı kromatografisi) teknikleri ile gerçekleştirilen saflaştırma çalışmaları sonucunda herhangi bir saf metabolit elde edilememiştir.

Betulin molekülü ile gerçekleştirilen literatür çalışmaları Çizelge 2.2'de özetlendi. İlgili tablo incelendiğinde betulin molekülünün mantar, izole enzim ve bakteriler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda genellikle betulon ve betulinik asit türevlerine dönüştürüldüğü görülmektedir. Çalışmamızda literatürde yer almayan yeni mantarlarla (28 adet) betulin molekülünün biyoteknolojik olarak türevlendirilmesine çalışılmış fakat metabolit elde edilmesi sağlanamamıştır.

4.2.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Betulin ile gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık deneylerinde, maddeler için çalışma aralığı: 4000–15.6 µg/mL ve standartlar için ise çalışma aralığı: 40–0,04 µg/mL şeklinde hazırlanmıştır. Maddeler %50 DMSO çözeltisi içinde çözülüp, plate üzerinde 10. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapılmıştır.

Çizelge 4.7. Betulin molekülüne ait antimikrobiyal aktivite MİK değerleri (µg/mL)

Bakteriyal kültürler	Betulin	Amfisilin	Kloromfenikol
<i>S. aureus</i>	2000	0.08	10
<i>P. vulgaris</i>	4000	0.08	10
<i>S. typhimurium</i>	4000	0.16	10
<i>S. epidermidis</i>	2000	1.25	10
<i>B. subtilis</i>	4000	0.08	5
<i>E. coli</i>	2000	5	5
Maya izolatları		Amfoterisin B	Ketokonazol
<i>C. albicans</i>	1000	0.31	0.04
<i>C. glabrata</i>	1000	0.16	0.04
<i>C. krusei</i>	1000	0.31	0.16
Fungal kültürler		Amfoterisin B	DMSO
<i>A. parasiticus</i>	2000	0,250	1. kuyucuk
<i>A. niger</i>	2000	≤0,062	1. kuyucuk
<i>A. flavus</i>	2000	1	2. kuyucuk
<i>F. solani</i>	2000	0,125	1. kuyucuk
<i>F. moniliforme</i>	2000	0,125	1. kuyucuk
<i>F. culmorum</i>	2000	≤0,062	1. kuyucuk
<i>F. heterosporium</i>	4000	4	1. kuyucuk
<i>A. alternata</i>	1000	≤0,062	2. kuyucuk
<i>B. cinerea</i>	1000	≤0,062	2. kuyucuk
<i>A. nidulans</i>	2000	≤0,062	1. kuyucuk

Agar difüzyon deney sonuçları abiyetik asit ve metabolitleri deneylerinde olduğu gibi (bkz. Sayfa 47-50) aynı şekilde 11 fungal izolat ile test edilmiştir ve sonuçlar 27°C’de sırasıyla 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. İnhibisyon zonları amfoterisin B (9-36 mm) standart antifungal ajan ile kıyaslanmıştır. Test edilen tüm derişimlerde betulin önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (≥1000 µg/mL).

4.2.3. Sitotoksosite çalışmaları

Betulinin sitotoksosite çalışma sonuçları değerlendirildiğinde sağlıklı hücre dizisine karşı (NIH/3T3) İK₅₀ değeri 62.5 µg/mL ile sitotoksosite gösterdiği saptanmıştır. Bu noktada, A549 ve HepG2 hücre dizilerine karşı; sırasıyla 207.7 µg/mL ve 125 µg/mL İK₅₀ değerleri ile Sİ değerleri sırasıyla 30 ve 50 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, betulinin aktivitesinin seçici olmadığı ve sağlıklı hücrelere karşı toksik etkisinin etkinliğini sınırlandırdığını söylemek mümkündür. Betulin molekülü ile ilgili elde edilen bu değerler literatürde aynı hücrelerle betulin ve betulin içeren ekstraktlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında (İK₅₀ = 5-15 µg/mL) farklılık göstermektedir (Li vd., 2014;

Li vd., 2015). Bu farklılıklar bize hücre hatlarının pasaj sayılarındaki ve inkübasyon zamanındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Fakat her iki çalışmada da bu antiproliferatif etkilerinin doza bağımlı olduğunu ortaya koymuştur (Li vd., 2015). Betuline ait sitotoksosite sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

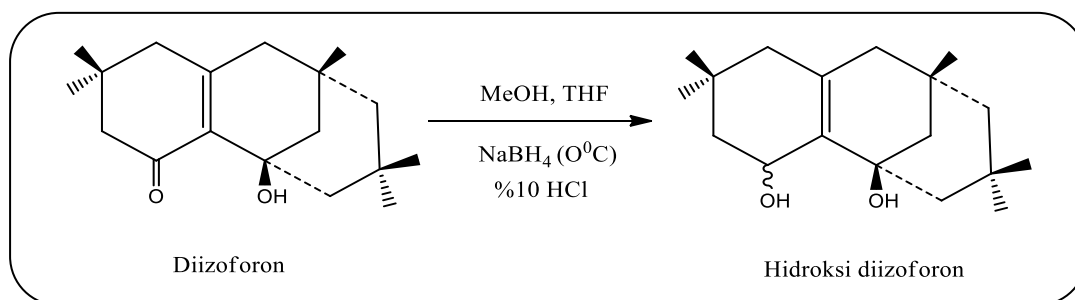
Çizelge 4.8. Betulin bileşiğine ait $İK_{50}$ ve SI değerleri

Bileşikler	$İK_{50}$ değerleri ($\mu\text{g/mL}$)			SI değerleri	
	NIH/3T3	A549	HepG2	A549	HepG2
Betulin	62.5 $\pm$ 9.6	207.7 $\pm$ 18.1	125 $\pm$ 15.1	30	50
Sisplatin	500 $\pm$ 5.6	21.5 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 1.1	2326	1302

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Hidroksi Diizoforon Çalışmaları

Fitoaleksin molekülleri bir grup sekonder metabolit yapısına sahip bileşik olup çeşitli bitkiler tarafından büyümeleri, gelişmeleri ve patojenik funguslara karşı savunma ajanı olarak üretilirler (Kıran vd., 2005). Hidroksi diizoforon molekülü diizoforondan tek adımlık organik tepkime ile elde edildi. Bu amaçla, diizoforon molekülü (3 mL) MeOH (50 mL) ve tetrahidrofuran (THF) (150 mL) içerisinde çözüldü. Sodyum borhidrür (NaBH_4) (3,5 g) 0°C ’de -buz banyosu- çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon 3-4 saat boyunca oda sıcaklığında sürdürüldü. Daha sonra reaksiyon karışımına %10’luk HCl ilave edildi. Reaksiyon karışımı etil asetat ile ekstrakte edildikten sonra, su ve sodyum hidrojen karbonat çözeltileri ile 3’er kere yıkandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen karışım evaporatörde uçuruldu ve hidroksi diizoforon molekülü (Şekil 4.17) enantiyomerik karışım olarak elde edildi (Kıran vd., 2004; Kıran vd., 2005).



Şekil 4.17. Diizoforon molekülünden hidroksi diizoforon sentezi

4.3.1. Biyotransformasyon tepkimeleri

Hidroksi diizoforon molekülünün 27 mikroorganizma ile ön biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (bkz. Ek Açıklamalar-C). Ön biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda elde edilen hidroksi diizoforon substratına ait İTK'ların incelenmesi sonucunda, metabolit elde edilebileceği düşünülen aşağıda biyotransformasyon tepkimeleri preparatif ölçekte tekrarlanmıştır.

Yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilen İTK'lara göre, büyük ölçekli çalışmalar yapılan organizmalar; *Aspergillus niger* NRRL 326, *Penicillium claviforme* MR 326, *Fusarium culmorum* (izolat), *Corynespora cassiicola* DSM 62475, *Fusarium heterosporium* (izolat), *Alternaria alternata* (izolat) ve *Phanerachaeete chrysosporium* ME 446 mikroorganizmalarıdır. Hidroksi diizoforon molekülünün 7 farklı mikroorganizma ile preparatif ölçekte gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen ekstraktlarda çok sayıda bileşik içeren karışımlar elde edilmiştir. Fakat kolon kromatografisi ve MPLC teknikleri ile gerçekleştirilen saflaştırma çalışmaları sonucunda herhangi bir saf metabolit elde edilememiştir. Ancak hidroksi diizoforon molekülü ve *P. chrysosporium* ME 446 mikroorganizması ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen ve metabolit içerdiği düşünülen biyotransformasyon karışımı, polaritelerine göre 3'e (E1, E2 ve E3) ayrılmış ve kontamine gıda testi kullanılarak *A. niger* mikroorganizmasına karşı antifungal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

4.3.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Hidroksi diizoforon molekülü ve *P. chrysosporium* ME 446 mikroorganizması ile yapılan biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen metabolit ekstraktlarından (E1, E2 ve E3) 5 adet farklı derişim serileri (40, 80, 120, 160 ve 200 ppm) hazırlandı. Deney, *A. niger* NRRL 326'a karşı gerçekleştirildi. 3 adet paralel seri ve bir mikroorganizma kontrol grubu serisi ve bir adet de etil alkol kontrol grubu serisi oluşturuldu. Her deneme 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar kaydedildi (bkz. Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Kontamine gıda testi çalışması sonuç tablosu

Günler:	1.Gün			2.Gün			3.Gün			4.Gün			5.Gün			6.Gün			7.Gün			(cm)
Bileşikler:	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	Çap
40 ppm	+	+	+	1	0.9	0.8	1	1	1	1.3	1.1	1.2	1.5	1.1	1.2	1.6	1.4	1.3	1.6	1.4	1.3	r
	+	+	+	1.9	1.8	1.8	2.1	2.1	2.2	2.6	2.2	2.4	2.7	2.4	2.6	2.9	2.6	2.8	2.9	2.6	2.8	R
80 ppm	+	-	-	0.9	0.8	0.7	1.2	1	1	1.2	1.1	1.1	1.5	1.1	1.2	1.6	1.3	1.2	1.6	1.3	1.2	r
	+	-	-	1.8	1.8	1.6	2.3	2.1	1.9	2.5	2.2	2.2	2.8	2.4	2.5	2.9	2.6	2.7	2.9	2.6	2.7	R
120 ppm	-	-	-	0.9	0.7	0.6	1	1	1	1.1	1	1	1.2	1.2	1	1.3	1.3	1.1	1.3	1.3	1.1	r
	-	-	-	1.8	1.8	1.7	2	2	2	2.1	2.2	2	2.3	2.3	2.2	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	R
160 ppm	-	-	-	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.6	1	1	0.6	1	1	0.6	1.1	1	0.6	1.1	1	r
	-	-	-	1.7	1.7	1.7	1.7	1.9	1.8	1.7	2	2	1.7	2.1	2.2	1.7	2.2	2.2	1.7	2.2	2.2	R
200 ppm	-	-	-	0.6	0.6	0.5	1	1	0.8	0.6	1	0.9	0.6	1.2	1	0.6	1.3	1.1	0.6	1.3	1.1	r
	-	-	-	1.7	1.8	1.6	2	2	1.7	2	2.1	2	2	2.3	2.1	2	2.4	2.1	2	2.4	2.1	R
EtOH	+	+	+	0.9	0.7	0.9	1	1.2	1	1	1.2	1.1	1.1	1.3	1.2	1.4	1.4	1.5	1.4	1.4	1.5	r
	+	+	+	1.8	1.6	1.8	2.1	2.6	2	2.2	2.5	2.3	2.4	2.7	2.5	2.7	2.8	2.9	2.7	2.8	2.9	R
<i>A. niger</i> NRRL 326	1.1	1.1	1.1	1.4	1.5	1.4	1.7	1.8	2	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	r
	2.2	2.3	2.2	2.6	2.8	2.6	3.3	3.5	3.8	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	R

+: hafif büyüme / - : büyüme yok, TB: tam büyüme, r: yarıçap / R: dış çap

Kontamine gıda testi sonuçlarına göre hidroksi diizoforon metabolitlerinden E1 metabolit ekstraktı diğer metabolit ekstraktlarına oranla daha fazla inhibisyon aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Aktivite sıralaması **E1>E3>E2** şeklinde bulunmuştur. Mikroorganizma kontrol grubu dördüncü günden itibaren tam büyüme (TB) göstermiştir. Sonuç olarak Hidroksi diizoforon kolon kromatografisi metabolit ekstraktları *A. niger* NRRL 326'a karşı belirgin bir antimikrobiyal aktivite göstermemişlerdir.

4.4. Oleik Asit Çalışmaları

Oleik asit ile ilgili yapılan biyotransformasyon tepkimeleri ve biyolojik aktivite çalışmaları (bkz. Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.6) özetlendi. Biyotransformasyon çalışmalarında genelde bakteriler ve az sayıda fungal kültürler kullanılmıştır. Oleik asitle ilgili biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş fakat elde edilen metabolitlerle ilgili biyolojik aktivite çalışmaları literatürde rapor edilmemiştir.

4.4.1. Biyotransformasyon tepkimeleri

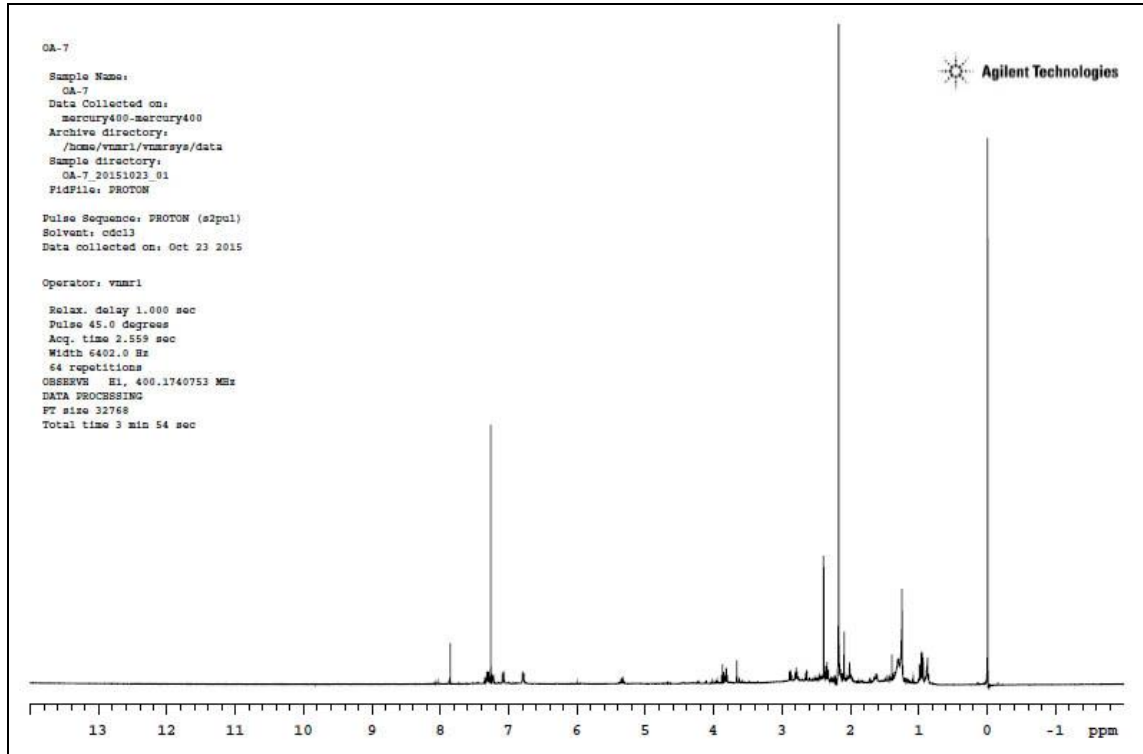
Oleik asit molekülünün 27 mikroorganizma ile ön biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (bkz. Ek Açıklamalar-D).

Yürütülen ön biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen İTK'ların incelenmesi sonucunda metabolit ürettiği düşünülen; *Aspergillus alliaceus* NRRL 317, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Alternaria alternata* (izolat) ve *Aspergillus terreus* var.*africanus* (izolat) mikroorganizmaları ile büyük ölçekli biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir.

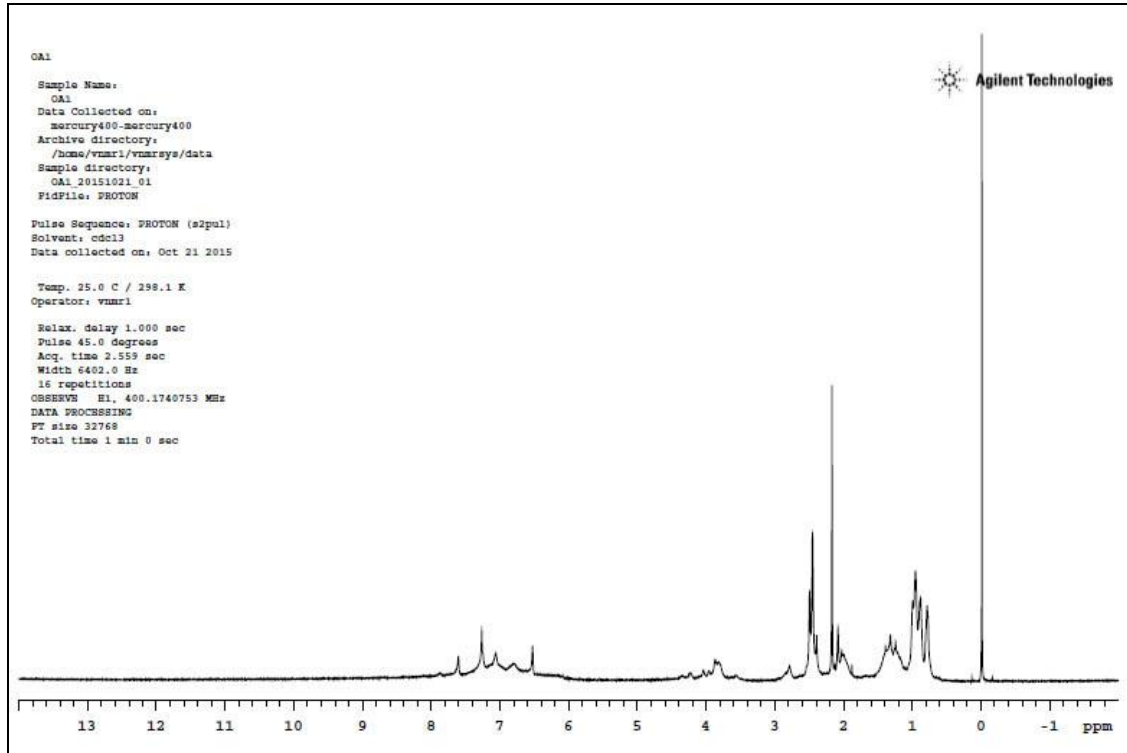
Oleik asit molekülünün 4 farklı mikroorganizma ile preparatif ölçekte gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen ekstraktlarda çok sayıda bileşik içeren karışımlar elde edilmiştir. Fakat kolon kromatografisi ve MPLC (orta basınçlı sıvı kromatografisi) teknikleri ile gerçekleştirilen saflaştırma çalışmaları sonucunda herhangi bir saf metabolit elde edilememiştir. Ancak oleik asit molekülü ile *A. alternata* ve *A. terreus* var.*africanus* (izolat) mikroorganizmaları kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen biyotransformasyon

karışımları kolon kromatografisi ile saflaştırılmaya çalışılmış fakat sporlar ikiyeşerli gelmiştir. Bu şekilde elde edilen 6 farklı ekstrakt (E4-E9) polarite farklılıklarına göre ayrılmış antimikrobiyal ve antikanserojen etkileri çalışılmıştır.

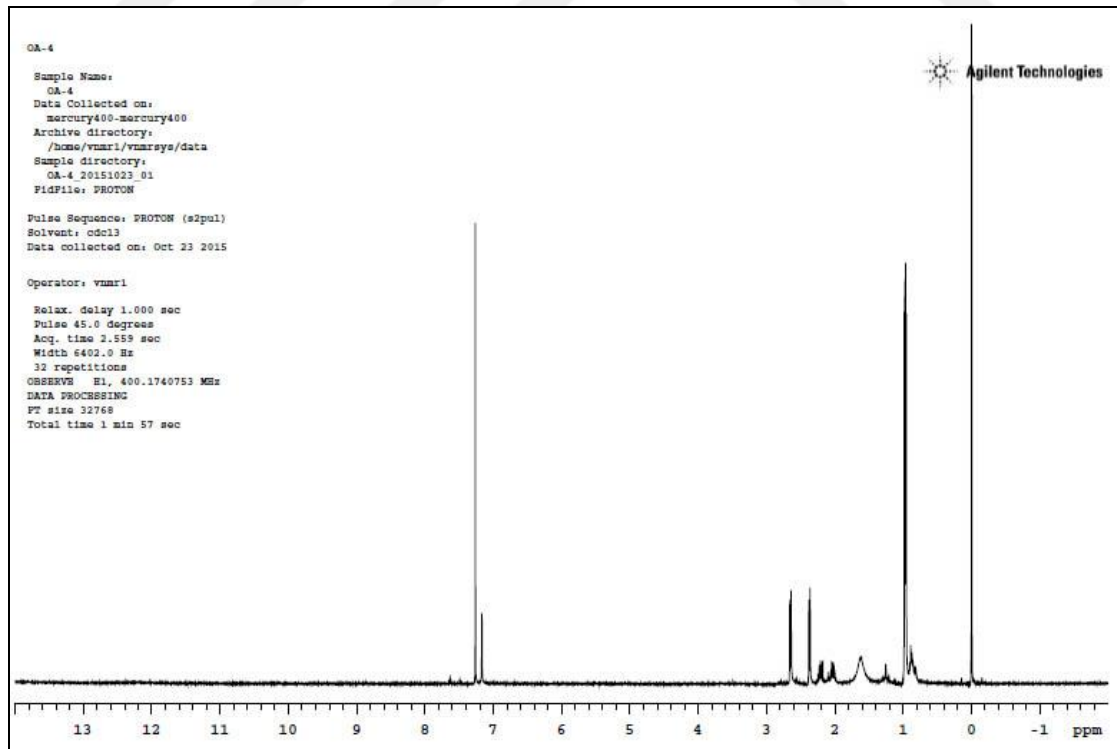
Oleik asit çalışmaları sonucunda yapı aydınlatmaya yönelik gerçekleştirilen mg ölçekte biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda elde edilen metabolit ekstraktlarından saf metabolit izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Elde edilen ekstraktların $^1\text{H-NMR}$ spektrumları alınmıştır (bkz. Şekil 4.18-4.23). İlgili spektrumların incelenmesi sonucunda olası metabolitlerin çifte bağ taşımayan ve hidroksil grubu içeren türevlerden oluştuğu kanaatine varılmıştır.



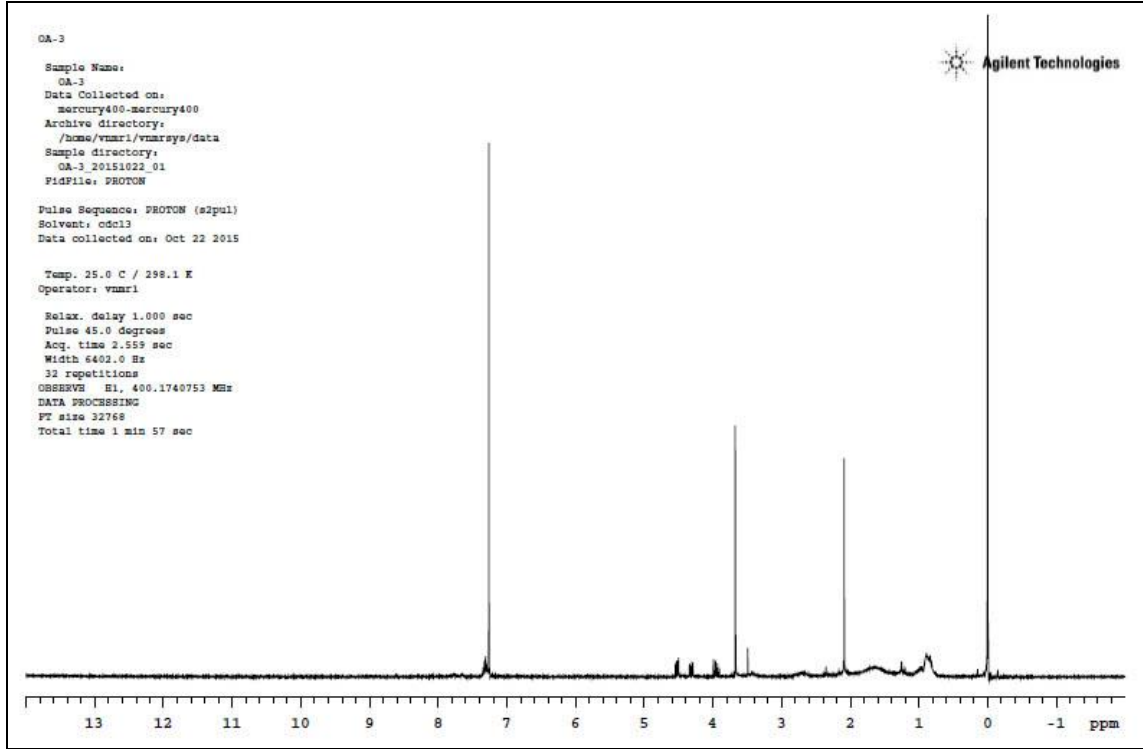
Şekil 4.18. E4 Numunesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



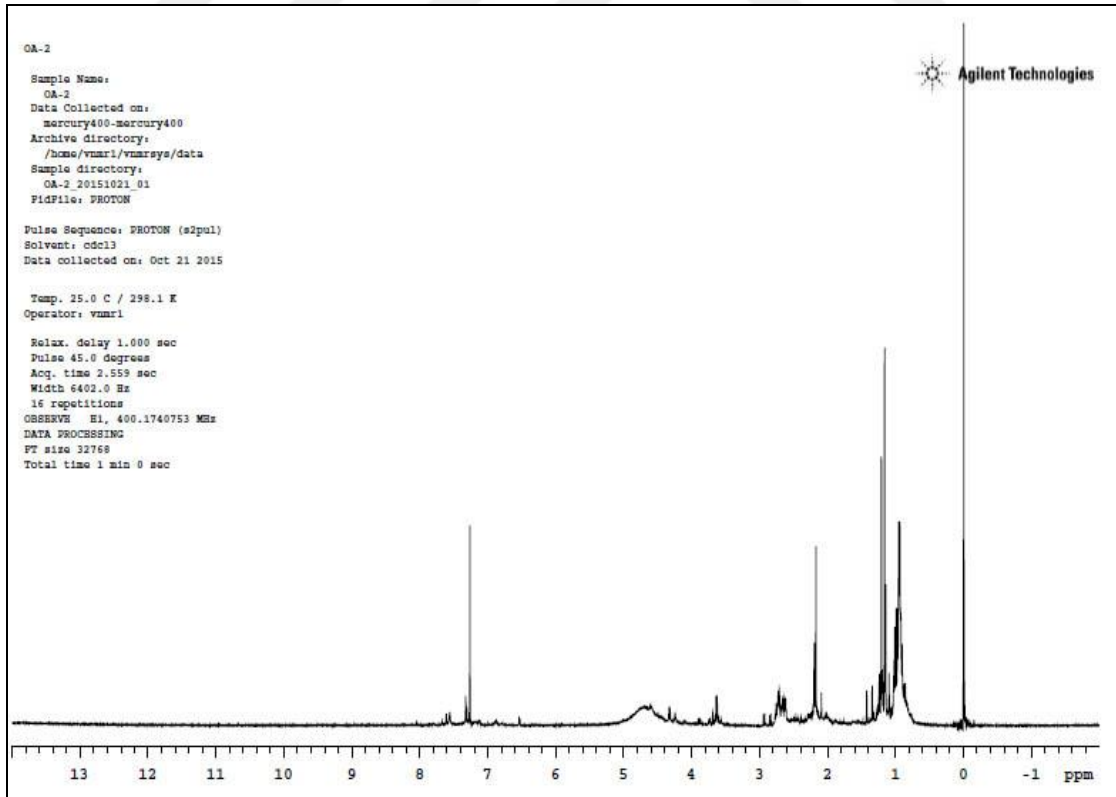
Şekil 4.19. E5 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu



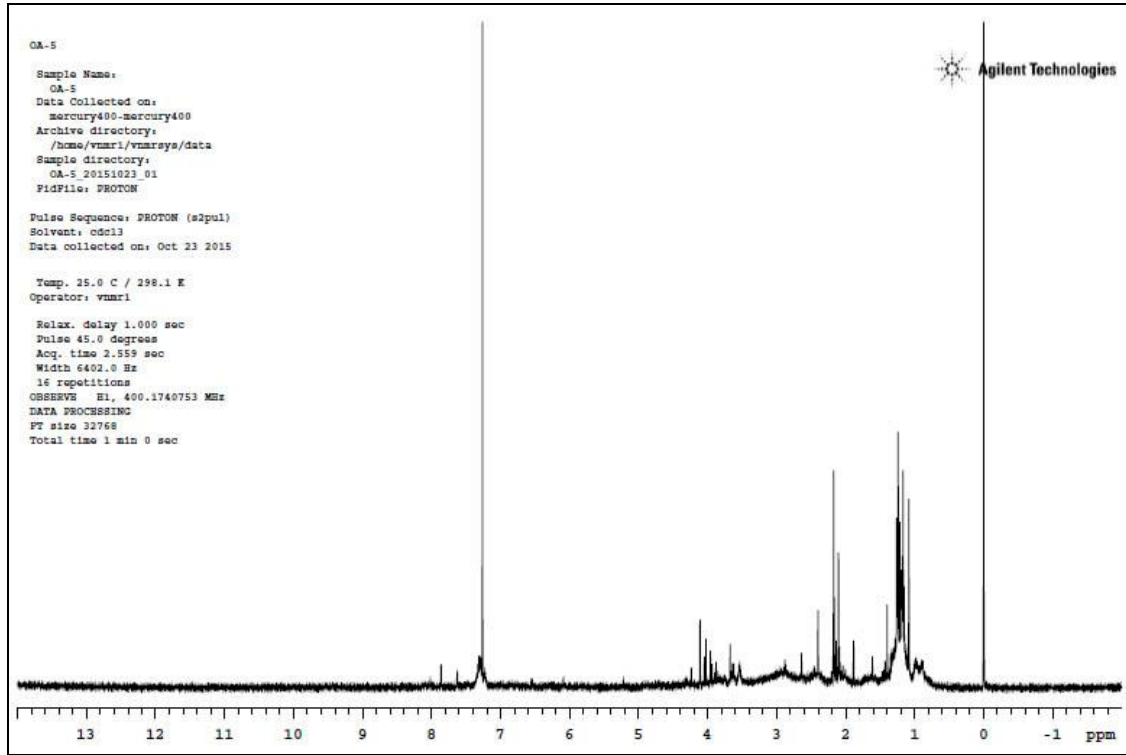
Şekil 4.20. E6 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 4.21. E7 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu



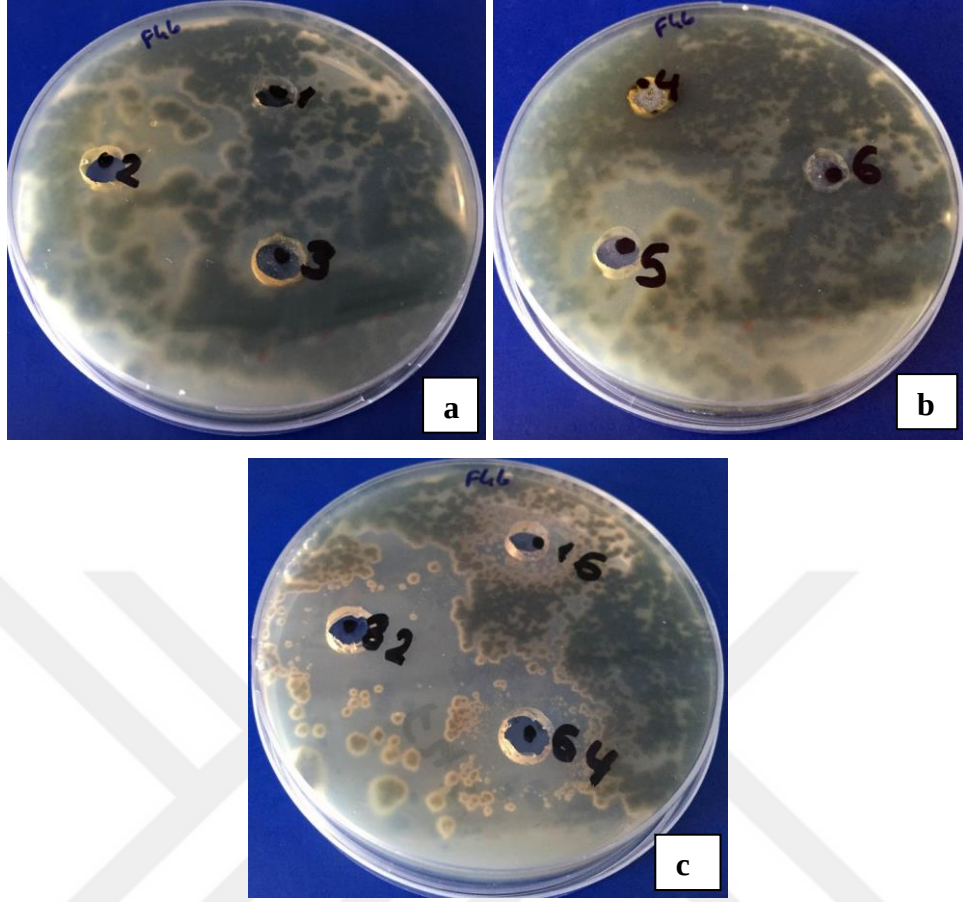
Şekil 4.22. E8 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu



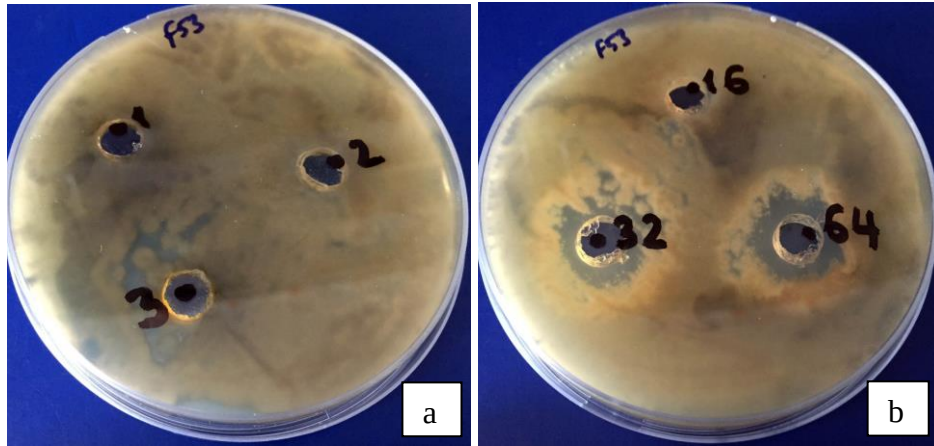
Şekil 4.23. E9 Numunesinin ^1H -NMR Spektrumu

4.4.2. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Agar difüzyon deney sonuçları aşağıdaki tablolarda özetlendi. Petrilere açılan kuyucuklar 9 mm'dir ve ölçümler çap üzerinden tam zon oluşumu hesaplanarak yapılmıştır. “-” işareti etki hiç yok anlamına gelmekte ve üremenin tam gerçekleştiğini göstermektedir. *P. valentinum* (izolat) ve *A. nidulans* (izolat) için hayalet bölge ve tam zon olmak üzere 2 zon ölçümü yapılmıştır. Antifungal testler için ise broth mikrodilüsyon referans testi ile CLSI (funguslar için; (M38-A2, 2008) ve mayalar için; (M27-A2, 2002) disk difüzyon testi kullanılmıştır. Broth mikrodilüsyon çalışmalarında 3 fungus (*A. niger* ATCC 10549, *F. heterosporium* (izolat), *P. valentinum* (izolat)) ve 3 maya izolatları (*S. cerevisiae* ATCC 976, *H. anomala* ATCC 20170, *S. pararoseus* ATCC 11385) çalışılmıştır. Toplamda 27 izolat agar difüzyon metodu ile test edilmiştir. Broth mikrodilüsyon testlerinde son konsantrasyon aralığı 0.49-1000 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. MİK sonuçları 48 saat ve 27°C inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. MİK sonuçları okunurken %100 büyüme inhibisyonu dikkate alınmıştır. Antifungal testler amfoterisin B antifungal ajanı ile kıyaslanarak yorumlanmıştır (bkz. Çizelge 4.10).



Şekil 4.24. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının *C. cassiicola* DSM 62475 ile antifungal aktivite resimleri; (a) E5, E8, E7 ekstraktları, (b) E6, E8, E4 ekstraktları, (c) Amfoterisin B inhibisyon zonları



Şekil 4.25. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının *A. alternata* ile antifungal aktivite resimleri; (a) E5, E8, E7 ekstraktları, (b) Amfoterisin B inhibisyon zonları

Duyarlılık testi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilki broth mikrodilüsyon yöntemi (M100-S16, 2006) diğeri ise agar disk difüzyon yöntemidir. Broth mikrodilüsyon testleri için son konsantrasyon aralığı 0.98-2000 µg/mL'dir. MİK sonuçları 24 saat ve 37°C inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. MİK sonuçları okunurken %100 büyüme inhibisyonu dikkate alınmıştır. Bütün metabolit ekstraktları içerisinde en etkili antifungal aktivite gösteren **E7** (62.5-125 µg/mL) metabolit ekstraktıdır. **E9**, **E4** ve **E6** (250 µg/mL) metabolit ekstraktları tüm funguslara karşı oleik asitten (500 µg/mL) daha etkilidir (bkz. Şekil 4.26). Ayrıca **E9**, **E4** ve **E6** *H. anomala* ATCC 20170 ve *S. pararoseus* ATCC 11385'e karşı oleik asitten daha etkili sonuç göstermiştir. Agar difüzyon metodu sırasıyla 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra 27°C'de inkübe edilerek sonuçlar kaydedilmiştir (bkz. Çizelge 4.11).

Sırasıyla; **E9** metaboliti için *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 (34 mm), *C. cassiicola* DSM 62475 (27 mm) ve *P. valentinum* (izolat) (16 mm); **E6** metaboliti için, *F. solani* ATCC 1284 (32 mm); **E7** metaboliti için, *A. niger* ATCC 10549 (22 mm), *A. alliaceus* NRRL 317 (25 mm), *F. moniliforme* NRRL 2374 (26 mm), *A. alternata* (izolat) (20 mm); **E8** metaboliti için, *C. cassiicola* DSM 62475 (25 mm) ve *P. chrysosporium* ME 446 (40 mm) amfoterisin B'den daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (bkz. Şekil 4.24-4.25).

Ayrıca mayalar ile yapılan çalışmalar için fungal kültürlerle benzer sonuçlar kaydedilmiştir; **E6** metaboliti için, *S. pararoseus* ATCC 11385 (23 mm); **E7** metaboliti için, *S. cerevisiae* ATCC 9763 (26 mm); **E8** metaboliti için, *H. anomala* ATCC 20170 (24 mm) değerleri ölçülmüştür (bkz. Çizelge 4.12).

Antifungal testler ampisilin antibakteriyel ajanı ile kıyaslanarak yorumlanmıştır. Bütün metabolit ekstraktları içerisinde en etkili antibakteriyel aktivite gösteren **E7** (125 µg/mL) metabolitidir. **E9** ve **E4** ekstraktlarının ise test bakterilerine karşı substrat olan oleik asitten (250 µg/mL) daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca **E8** ekstraktı sadece *B. subtilis*'e karşı etkili olduğu kaydedilmiştir (bkz. Çizelge 4.14-4.16).

Agar difüzyon metodu sonuçları tüm plateler 24 saat ve 37°C inkübasyon sürecinden sonra okunmuştur. Standart antibakteriyel ajan olarak ise vankomisin ile tetrasiklin standartları kullanılmıştır. **E8** metabolit ekstraktı *B. subtilis*'e karşı 18 mm

çapında bir zon oluşumu göstermiştir ve oleik asitten daha etkili olduğu kaydedilmiştir (bkz. Çizelge 4.13).

Çizelge 4.10. Amfoterisin B standardının fungal inhibisyon zonları

(Antifungal aktivite zon çapı: mm; NG: Gelişim Yok)									
Standart madde konsantrasyonu	Amf.B 64µg/mL			Amf.B 32µg/mL			Amf.B 16µg/mL		
GÜN	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.
<i>A. parasiticus</i>	24	25	25	22	22	22	18	19	20
<i>A. niger</i> NRRL	22	26	29	22	23	25	20	23	24
<i>A. niger</i> ATCC	22	22	23	20	20	22	18	19	19
<i>A. alliaceus</i>	22	25	26	22	23	24	19	22	22
<i>P. claviforme</i>	22	24	28	21	24	27	20	21	25
<i>P. adametzii</i>	16	16	17	15	15	17	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	25	25	25	22	23	23	18	18	18
<i>F. solani</i>	20	21	23	17	18	22	17	18	20
<i>F. moniliforme</i>	20	25	28	15	23	24	12	20	20
<i>F. culmorum</i>	17	20	22	12	15	16	11	11	11
<i>M. ramannianus</i>	14	20	21	13	19	20	11	17	18
<i>N. crassa</i>	30	32	32	26	29	30	20	24	25
	20	21	21	18	19	20	13	16	16
<i>C. cassiicola</i>	23	25	25	20	22	24	18	20	21
<i>F. heterosporium</i>	13	13	14	-	-	-	-	-	-
<i>A. alternata</i>	19	22	22	15	19	20	13	18	20
<i>B. cinerea</i>	NG								
<i>T. versicolor</i>	NG								
<i>P. chrysosporium</i>	30	33	34	20	25	27	18	23	27
	15	15	16	13	15	15	-	-	-
<i>P. primulinum</i>	20	20	20	11	11	11	-	-	-
<i>P. valentinum</i>	30	33	33	30	32	33	30	30	32
	20	20	20	20	21	21	20	20	20
<i>A. terreus</i> var. <i>africanus</i>	18	21	23	15	18	18	-	-	-
<i>P. cinnabarinus</i>	NG								
<i>T. roseum</i>	NG								
<i>A. nidulans</i>	32	34	34	30	32	32	28	28	28
	17	20	20	16	18	18	13	15	16

Çizelge 4.11. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının fungal inhibisyon zonları

(Antifungal aktivite zon çapı: mm; NG: Gelişim Yok)																								
	(1.) 4mg/mL			(2.) 4mg/mL			(3.) 2mg/mL			(4.) 4mg/mL			(5.) 2mg/mL			(6.) 4mg/mL			(7.) 4mg/mL			(8.)		
Metabolit ekst.	E4			E5			E6			E7			E8			E9			Oleik asit			DMSO		
GÜN	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.
<i>A. parasiticus</i>	11	11	11	15	18	24	10	11	12	11	11	11	11	11	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i> NRRL	11	12	14	-	11	11	-	11	11	-	13	14	-	11	11	-	11	12	-	10	14	-	-	-
<i>A. niger</i> ATCC	-	-	-	13	13	30	-	-	-	17	20	22	11	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. alliaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	25	25	-	-	-	30	32	34	-	-	-	-	-	-
<i>P. claviforme</i>	23	25	28	12	12	12	12	12	13	11	12	13	-	-	-	-	-	-	14	15	16	-	-	-
<i>P. adametzii</i>	12	12	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	11	11	11	-	-	-	12	16	18	11	13	16	13	13	13	11	11	11	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i>	13	15	17	14	22	23	15	15	32	-	-	-	12	12	12	13	14	15	-	-	-	-	-	-
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	11	18	23	24	26	26	-	-	-	-	11	12	-	-	-	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	12	13	-	-	-	10	11	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. ramannianus</i>	-	-	11	-	-	-	-	11	11	14	17	18	-	-	-	11	13	14	-	21	23	-	-	-
<i>N. crassa</i>	13	15	20	16	18	20	16	18	18	11	13	14	10	13	15	15	17	20	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	18	20	11	25	25	20	25	27	-	-	-	-	-	-
<i>F.heterosporium</i>	13	15	16	-	-	-	12	14	18	15	16	17	-	-	-	13	14	16	11	11	11	11	11	11
<i>A. alternata</i>	12	14	17	10	11	12	11	12	12	14	19	20	12	17	18	10	11	11	-	-	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>	NG																							
<i>T. versicolor</i>	NG																							
<i>P. chrysosporium</i>	-	43	45	-	20	20	-	-	-	-	30	30	-	38	40	-	-	20	-	-	-	-	-	-
<i>P. primulinum</i>	-	-	-	16	17	18	12	16	17	12	17	20	16	17	18	18	18	20	10	11	11	-	-	-
<i>P. valentinum</i>	-	-	-	-	11	11	-	-	-	-	11	13	-	13	13	14	16	16	-	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i> var.africanus	10	10	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	15	18	12	17	19	-	-	-	-	-	-
<i>P. cinnabarinus</i>	NG																							
<i>T. roseum</i>	NG																							
<i>A. nidulans</i>	-	13	14	-	-	11	-	-	-	13	15	15	11	16	16	-	15	17	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının maya inhibisyon zonları

	(1.) 4mg/mL			(2.) 4mg/mL			(3.) 2mg/mL			(4.) 4mg/mL			(5.) 2mg/mL			(6.) 4mg/mL			(7.) 4mg/mL			(8.)		
Metabolit ekst.	E4			E5			E6			E7			E8			E9			Oleik asit			DMSO		
GÜN	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.
<i>S. cerevisiae</i>	20	21	22	15	17	19	21	22	25	18	25	26	17	18	22	18	20	21	-	-	-	-	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-	-	20	22	23	-	-	-	-	-	-	23	24	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pararoseus</i>	-	-	-	-	-	-	23	23	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antifungal aktivite zon çapı: mm							Amf.B 64µg/mL			Amf.B 32µg/mL			Amf.B 16µg/mL											
							2.	4.	6.	2.	4.	6.	2.	4.	6.									
							27	28	29	25	25	27	23	25	26									
							25	26	26	24	28	28	24	25	25									
							34	36	37	35	35	35	36	36	36									

Çizelge 4.13. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının bakteriyel inhibisyon zonları

Bakteriyel kültürler	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
E5 (4 mg/mL)	15	10	-
E8 (4 mg/mL)	18	14	-
E9 (2 mg/mL)	-	-	-
Oleik asit (4 mg/mL)	16	-	-
Tetrasiklin (16 µg/mL)	24	13	13
Tetrasiklin (32 µg/mL)	27	17	19
Tetrasiklin (64 µg/mL)	29	20	21
Vankomisin (16 µg/mL)	22	-	-
Vankomisin (32 µg/mL)	25	-	-
Vankomisin (64 µg/mL)	26	-	-
DMSO	-	-	-
Antibakteriyel aktivite zon çapı: mm.			

Çizelge 4.14 Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antifungal aktivite MİK değerleri

Başlangıç kons. (µg/mL)	4000	4000	1000	2000	2000	2000	4000	512
Plate harfi	F	A	D	C	B	E	G	H
Fungal kültürler	E4	E5	E6	E7	E8	E9	Oleik asit	Amf.B.
<i>A. niger</i> ATCC	250	500	250	125	500	250	500	128
<i>F. heterosporium</i>	250	500	250	125	500	250	500	64
<i>P. valentinum</i>	250	500	250	125	500	250	500	128

Çizelge 4.15. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antifungal aktivite MİK değerleri

Başlangıç kons. (µg/mL)	4000	4000	1000	2000	2000	2000	4000	512
Plate harfi	F	A	D	C	B	E	G	H
Fungal kültürler	E4	E5	E6	E7	E8	E9	Oleik asit	Amf.B.
<i>S. cerevisiae</i>	125	250	125	62.5	250	125	125	128
<i>H. anomala</i>	62.5	500	62.5	62.5	125	62.5	125	64
<i>S. pararoseus</i>	250	500	250	125	500	250	500	64

Çizelge 4.16. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antibakteriyel aktivite MİK değerleri

Başlangıç kons. (µg/mL)	2000	4000	2000	2000	1000	4000	4000	128
Plate harfi (Şekil 4.43)	F	A	D	C	B	E	G	H
Bakteriyel kültürler	E4	E5	E6	E7	E8	E9	Oleik asit	Ampisilin
<i>B. subtilis</i>	250	500	250	125	250	250	500	1
<i>S. aureus</i>	250	500	250	125	500	250	500	4
<i>E. coli</i>	250	500	500	125	500	250	500	2



Şekil 4.26. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının antibakteriyel MİK resimleri

4.4.3. Sitotoksosite çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları için oleik asitten elde edilen metabolit ekstraktları kullanılmıştır. A549 hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik aktivite gösteren karışımlar sırasıyla ($İK_{50}$ değerleri) 62.5 (**E9**), 89.6 (**E5**) ve 117.03 (**E4**) $\mu\text{g/mL}$ 'dir. **E9** ve **E4** ekstraktları NIH3T3 hücrelerine etkisinden daha fazla A549 hücrelerine karşı etki göstermiştir. **E9**, A549 hücrelerine karşı pozitif kontrol olan sisplatin ile benzer antikanser aktivite etkisi göstermiştir ($İK_{50(cis)} = 43.52 \mu\text{g/mL}$).

Sitotoksosite çalışmaları sonucunda **E9** metabolit ekstraktının A549 hücrelerine karşı selektif olduğu ve NIH3T3 sağlıklı hücrelerine karşı düşük sitotoksik etkisi ($İK_{50} = 122.7 \mu\text{g/mL}$) ile antikanser potansiyele sahip olduğu söylenebilir (Çizelge 4.17).

İlerleyen çalışmalarda **E9** metabolit ekstraktının mekanistik ya da hayvan modellerinde antikanser aktivitesi değerlendirilebilir.

Çizelge 4.17. Oleik asit ve metabolit ekstraktlarının sitotoksosite değerleri

Bileşikler	$İK_{50}$ değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	
	NIH/3T3	A549
E4	>500	463.15
E5	>500	500
E6	90.5	>500
E7	46.3	89.6
E8	280.6	117.03
E9	122.7	62.5
Sisplatin	ND	43.52

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tezi çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

5.1. Biyotransformasyon Tepkimeleri Sonuçları

1. Abiyetik asidin *M. ramannianus* (izolat) ve *N. Crassa* (izolat) ile biyotransformasyon tepkimeleri sonucu monohidroksillenmiş üç farklı türevi [2α , 7β ile 1β -hidroksi dehidroabiyetik asit] sırasıyla %12.7, 15.5 ile 20.2 verimle elde edildi. Bu çalışmamızla 2α , 7β ile 1β -hidroksi dehidroabiyetik asit türevleri, abiyetik asidin doğrudan biyotransformasyon tepkimesi ile literatürde ilk kez elde edilmiştir.
2. Betulin molekülü ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu saf metabolit elde edilememiştir.
3. Hidroksi diizoforon molekülü ile ön deneme sonucunda olumlu olduğu belirtilen *P. chrysosporium* ME 446 mikroorganizması ile yapılan biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen metabolit karışımları saf olarak elde edilememiştir ve net yapıları aydınlatılamamıştır.
4. Oleik asit substrat molekülü ile ön deneme sonucunda olumlu olduğu belirtilen, *A. alliaceus* NRRL 317, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. alternata* (izolat) ve *A. terreus* var.*africanus* (izolat) mikroorganizmaları ile büyük ölçekli biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda 4 adet mikroorganizmanın oleik asiti türevlerine dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Karışımlar mikroorganizmalardan gelen safsızlıklarla beraber NMR analizine gönderilmiş olup yapılarına hidroksil grubu ilavesi yapıldığı anlaşılmıştır. Bu duruma biyotransformasyon tepkimeleri sonucu oluşan karışımlardaki metabolitlerin çok sayıda olması ve polaritelerinin birbirlerine çok yakın olmasından kaynaklanmıştır. Tepkimeler sonucu oluşan metabolit karışımları saf olarak elde edilememiştir.

5.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

1. Abiyetik asit, betulin ve oleik asit ile mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen türevlerinin broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak farklı patojen mikroorganizmalara karşı test edilen bütün derişimlerde önemli bir aktivite gözlemlenmemiştir ($>250 \mu\text{g/mL}$).
2. Hidroksi diizoforon molekülü ile biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen metabolit karışımları kontamine gıda testi kullanılarak *A. niger* NRRL 326 mikroorganizmasına karşı aktivitesi araştırıldı. Kontamine gıda testi sonuçlarına göre hidroksi diizoforon metabolitlerinden E1 metaboliti diğer metabolitlere oranla daha fazla inhibisyon aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak sonuç olarak tüm metabolitlerin belirgin bir aktivite göstermediği kaydedilmiştir.

5.3. Sitotoksosite Sonuçları

1. Abiyetik asit türevleri arasında A549 hücresine karşı en etkili ve selektif antikanser etkiyi 2 nolu bileşik olan 2α -hidroksi dehidroabiyetik asit ($\text{İK}_{50}=320 \mu\text{g/mL}$ ve $\text{SI}>156$) göstermiştir. Abiyetik asit türevleri arasında HepG2 hücresine karşı en etkili ve selektif antikanser etkiyi 3 nolu bileşik olan 7β -hidroksi dehidroabiyetik asit ($\text{İK}_{50}=196.6 \mu\text{g/mL}$ ve $\text{SI}>187$) göstermiştir. Antimikrobiyal ve antikanserojen etki gösterebilecek aday moleküllerin elde edilmesine çalışılmıştır. Elde edilen veriler, antikanser aktivite açısından özellikle 2 ve 3 no'lu bileşiklerin ilaç geliştirilme süreci açısından bir üst basamağa taşınarak *in vivo* çalışmalarla etkinliklerinin ve toksisitelerinin aydınlatılmasının mümkün olabileceği söylenebilir. İlgili moleküllerin antikanser potansiyelleri bulunmakta olup tedavisinde kullanılabilecek etken bir molekül elde edilmesine yönelik çalışmalar için iyi bir çıkış molekülü olduğu ve türevlerinin elde edilerek yeni çalışmaların yapılması önerilmektedir.
2. Betulin molekülünün antikanserojen etkisi çalışması, elde edilmesi muhtemel metabolitleri için karşılaştırma amaçlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen veriler, literatürdeki aynı çalışmalarla karşılaştırılmış ve bunun sonucunda değerler arasında farklılıklar olduğu bulunmuştur. Bu farklılıklar, hücre

hatlarının pasaj sayılarındaki ve inkübasyon zamanındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

3. Oleik asit sitotoksiste çalışmaları sonucunda ise **E9** metabolit ekstraktının antikanser özellik taşıma özelliğine sahip olduğu ve mekanistik ya da hayvan modellerinde antikanser aktivitesi çalışmalarında kullanılabileceği değerlendirilmiştir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, E., Sharif, A., Hussain, S., Malik, A., Ul, H. M., Munawar, M. A., Nagra, S. A., Anwar, J., Ashraf, M., Afza, N., Athar, M., 2011, Phytochemical and antimicrobial studies of *Grewia tenax*, Journal of the Chemical Society of Pakistan, 33, 5, 676-681.
- Akar, T., 2005, Furanosteroid yapıları bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi, Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s.
- Akihisa, T., Takamine, Y., Yoshizumi, K., Tokuda, H., Kimura, Y., Ukiya, M., Nakahara, T., Yokochi, T., Ichiishi, E., Nishino, H., 2002, Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products, Journal of Natural Products, 65, 3, 278-282.
- Alakurtti, S., Maekelae, T., Koskimies, S., Yli-Kauhaluoma, J., 2006, Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29, 1, 1-13.
- Ali-Sayed, M., Jantan, I., Vijayaraghavan, K., Bukhari, S. N. A., 2016, Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy, Chemical Biology & Drug Design, 87, 4, 517-536.
- Aliheidari, N., Fazaeli, M., Ahmadi, R., Ghasemlou, M., Emam-Djomeh, Z., 2013, Comparative evaluation on fatty acid and *Matricaria recutita* essential oil incorporated into casein-based film, International Journal of Biological Macromolecules, 56, 69-75.
- Alresly, Z., Lindequist, U., Lalk, M., Porzel, A., Arnold, N., Wessjohann, L. A., 2016, Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus*, Records of Natural Products, 10, 1, 103-108.
- Altıntop, M. D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Ilgın, S., Atli, Ö., Işcan, G., Kaplancikli, Z. A., 2012, Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 58, 299-307.
- Álvarez, Á. L., Habtemariam, S., Parra, F., 2015, Inhibitory effects of lupene-derived pentacyclic triterpenoids from *Bursera simaruba* on HSV-1 and HSV-2 in vitro replication, Natural Product Research, 29, 24, 2322-2327.
- American Cancer Society, 2015, Global Cancer Facts and Figures 2015; American Cancer Society, Atlanta, 1-56 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anonim, 2016, Yeni ilaç geliştirme süreci, <http://www.pfizer.com.tr/arge/yeni-ila%C3%A7-geli%C5%9Firme-s%C3%BCreci>, erişim tarihi: 19.02.2017.
- Arcan, I., Yemenicioglu, A., 2013, Development of flexible zein-wax composite and zein-fatty acid blend films for controlled release of lysozyme, *Food Research International*, 51, 1, 208-216.
- Armstrong, D. W., Yamazaki, H., 1986, Natural flavors production: A biotechnological approach, *Trends in Biotechnology*, 4, 10, 264-268.
- Asakawa, Y., Ishida, T., Toyota, M., Takemoto, T., 1986, Terpenoid biotransformation in mammals. IV. Biotransformation of (+)-longifolene, (-)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)-dehydroabietic acid in rabbits, *Xenobiotica*, 16, 8, 753-767.
- Ascari, J., Takahashi, J. A., Boaventura, M. A. D., 2010, Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 1, 20-28.
- Attwa, M. H., El-Etreby, S. A., 2015, Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma, *World Journal of Hepatology*, 7, 12, 1632-1651.
- Bai, T., Yang, Y., Yao, Y.-L., Sun, P., Lian, L.-H., Wu, Y.-L., Nan, J.-X., 2016, Betulin alleviated ethanol-induced alcoholic liver injury via SIRT1/AMPK signaling pathway, *Pharmacological Research*, 105, 1-12.
- Banerjee, S., Singh, S., Rahman, L. U., 2012, Biotransformation studies using hairy root cultures - a review, *Biotechnology Advances*, 30, 3, 461-468.
- Barakat, K., Saleh, M., 2016, Bioactive betulin produced by marine *Paecilomyces* WE3-F, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 3, 34-40.
- Bastida, J., Andres, C. D., Cullere, J., Busquets, M., Manresa, A., 1999, Biotransformation of oleic acid into 10-Hydroxy-8(E)-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2, *Biotechnology Letters*, 21, 12, 1031-1035.
- Bayraç, Z. B., 2011, Türkiye'de ilaç pazarının gelişimi ve Karaman ili örneği, Yüksek Lisans tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, İşletme, 130 s.
- Bebenek, E., Kadela-Tomanek, M., Chrobak, E., Wietrzyk, J., Sadowska, J., Boryczka, S., 2016, New acetylenic derivatives of betulin and betulone, synthesis and cytotoxic activity, *Medicinal Chemistry Research*, 26, 1, 1-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Beek, T. A. v., Claassen, F. W., Dorado, J., Godejohann, M., Sierra-Alvarez, R., Wijnberg, J. B. P. A., 2007, Fungal biotransformation products of dehydroabietic acid, *Journal of Natural Products*, 70, 2, 154-159.
- Berger, R. G., 2007, *Flavours and fragrances chemistry, bioprocessing and sustainability*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s.648.
- Bergsson, G., Steingrímsson, Ó., Thormar, H., 2002, Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 4, 258-262.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S., 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Bleif, S., Hannemann, F., Lisurek, M., Kries, J. P. v., Zapp, J., Dietzen, M., Antes, I., Bernhardt, R., 2011, Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase, *Chembiochem*, 12, 4, 576-582.
- Busquets, M., Deroncelé, V., Vidal-Mas, J., Rodríguez, E., Guerrero, A., Manresa, A., 2004, Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid, *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 2, 129-139.
- Buthlezi, S., Southway, C., Govinden, U., Bodenstein, J., Toit, K. d., 2012, An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil, *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 1, 325-330.
- Cho, N., Kim, H. W., Lee, H. K., Jeon, B. J., Sung, S. H., 2016, Ameliorative effect of betulin from *Betula platyphylla* bark on scopolamine-induced amnesic mice, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 1, 166-171.
- Chodisetti, B., Rao, K., Giri, A., 2013, Phytochemical analysis of *Gymnema sylvestre* and evaluation of its antimicrobial activity, *Natural Product Research*, 27, 6, 583-587.
- Costa, M. S., Rego, A., Ramos, V., Afonso, T. B., Freitas, S., Preto, M., Lopes, V., Vasconcelos, V., Magalhaes, C., Leao, P. N., 2016, The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in cyanobacteria, *Scientific Reports*, 6, 23456-23467.
- Cota, B. B., Oliveira, A. d. B. d., Souza-Filho, J. D. d., Braga, F. C., 2003, Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*, *Fitoterapia*, 74, 7-8, 729-731.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cross, B. E., Myers, P. L., 1968, The bacterial transformation of abietic acid, *Biochemical Journal*, 108, 2, 303-310.
- Crueger, W., Crueger, A., 1990, *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*, Sinauer Associates, Inc., USA.
- Culleré, J., Durany, O., Busquets, M., Manresa, A., 2001, Biotransformation of oleic acid into (*E*)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid and (*E*)-7,10-dihydroxy-8-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2 in an immobilized system, *Biotechnology Letters*, 23, 3, 215-219.
- Dailey, O. D. J., Wang, X., Chen, F., Huang, G., 2011, Anticancer activity of branched-chain derivatives of oleic acid, *Anticancer Research*, 31, 10, 3165-3170.
- Davies, H. G., Green, R. H., Kelly, D. R., Roberts, S. M., 1989, *Biotransformations in preparative organic chemistry: The use of isolated and whole cell systems in synthesis*, Academic Press, s.268.
- Deeb, K. S. E., Al-Haidari, R. A., Mossa, J. S., Ateya, A.-M., 2003, Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11, 4, 184-191.
- Demain, A. L., 2000, Microbial biotechnology, *Trends Biotechnology*, 18, 1, 26-31.
- Demirci, F., 2000, Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137 s.
- Dimitri, G. M., Lio, P., 2017, DrugClust: A machine learning approach for drugs side effects prediction, *Computational Biology and Chemistry*, 68, 204-210.
- Doménech-Carbó, M. T., Osete-Cortina, L., Cañizares, J. d. l. C., Bolívar-Galiano, F., Romero-Noguera, J., Fernández-Vivas, M. A., Martín-Sánchez, I., 2006, Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry, *Analytical bioanalytical chemistry*, 385, 1265-1280.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M., Puglia, A. M., 2002, Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites, *Journal of Biotechnology*, 99, 3, 187-198.
- Dordick, J. S., Khmelnitsky, Y. L., Sergeeva, M. V., 1998, The evolution of biotransformation technologies, *Current Opinion in Microbiology*, 1, 3, 311-318.
- El-Sharkawy, S. H., Yang, W., Dostal, L., Rosazza, J. P. N., 1992, Microbial oxidation of oleic acid, *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 2, 141-147.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eom, H. J., Kang, H. R., Kim, H. K., Jung, E. B., Park, H. B., Kang, K. S., Kim, K. H., 2016, Bioactivity-guided isolation of antioxidant triterpenoids from *Betula platyphylla* var. *japonica* bark, *Bioorganic Chemistry*, 66, 97-101.
- Esaki, N., Ito, S., Blank, W., Soda, K., 1994a, Biotransformation of oleic acid by *Alcaligenes* sp. 5-18, a bacterium tolerant to high concentrations of oleic acid, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 2, 148-151.
- Esaki, N., Ito, S., Blank, W., Soda, K., 1994b, Biotransformation of oleic acid by *Micrococcus luteus* cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 2, 319-321.
- Faber, K., 2011, *Biotransformations in organic chemistry*, 6th. Edition, Berlin, Springer Science & Business Media, s.423.
- Feng, Y., Li, M., Liu, J., Xu, T.-Y., Fang, R.-S., Chen, Q.-H., He, G.-Q., 2013, A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalysed by *Cunninghamella blakesleeana*, *Food Chemistry*, 136, 1, 73-79.
- Fernández, M. A., Tornos, M. P., García, M. D., Heras, B. D. l., Villar, A. M., Sáenz, M. T., 2001, Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 6, 867-872.
- Fessner, W.-D., 1998, *An introduction to biotransformations in organic chemistry*. By J. R. Hanson, *Angewandte Chemie, International Edition*, 37, 21, 3055.
- Flickinger, M. C., Drew, S. W., 1999, *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, 1st. Edition, John Wiley & Sons Inc, USA, s.2756.
- Fotso, G. W., Ntuny, A. N., Ngachussi, E., Dube, M., Mapitse, R., Kapche, G. D. W. F., Andrae-Marobela, K., Ngadjui, B. T., Abegaz, B. M., 2014, Epunctanone, a new benzophenone, and further secondary metabolites from *Garcinia epunctata* Stapf (Guttiferae), *Helvetica Chimica Acta*, 97, 7, 957-964.
- Geisler, K., Jensen, N. B., Yuen, M. M. S., Madilao, L., Bohlmann, J., 2016, Modularity of conifer diterpene resin acid biosynthesis: P450 enzymes of different CYP720B clades use alternative substrates and converge on the same products, *Plant Physiology*, 171, 1, 152-164.
- Georges, P., Legault, J., Lavoie, S., Grenon, C., Pichette, A., 2012, Diterpenoids from the buds of *Pinus banksiana* Lamb., *Molecules*, 17, 9716-9727.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., Narasu, M. L., 2001, Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects, *Biotechnology Advances*, 19, 3, 175-199.
- Gocho, S., Tabogami, N., Inagaki, M., Kawabata, C., Komai, T., 1995, Biotransformation of oleic acid to optically active γ -dodecalactone, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 8, 1571-1572.
- Gonzalez, M. A., Correa-Royero, J., Agudelo, L., Mesa, A., Betancur-Galvis, L., 2009, Synthesis and biological evaluation of abietic acid derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 6, 2468-2472.
- Gonzalez, M. A., Perez-Guaita, D., Correa-Royero, J., Zapata, B., Agudelo, L., Mesa-Arango, A., Betancur-Galvis, L., 2010, Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2, 811-816.
- Gouiric, S. C., Feresin, G. E., Tapia, A. A., Rossomando, P. C., Schmeda-Hirschmann, G., Bustos, D. A., 2004, $1\beta,7\beta$ -Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic acid by *Aspergillus niger*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 3, 281-284.
- Gravato, C., Santos, M. A., 2002a, Juvenile sea bass liver biotransformation and erythrocytic genotoxic responses to pulp mill contaminants, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 53, 1, 104-112.
- Gravato, C., Santos, M. A., 2002b, Juvenile sea bass liver biotransformation induction and erythrocytic genotoxic responses to resin acids, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 3, 238-247.
- Grishko, V. V., Nazarov, A. V., Tolmacheva, I. A., Tarasova, E. V., Ivshina, I. B., 2014, Chemical Conversions of Betulone Produced by Biotransformation, *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 5, 857-861.
- Grishko, V. V., Tarasova, E. V., Ivshina, I. B., 2013, Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66, *Process Biochemistry*, 48, 11, 1640-1644.
- Guerrero, A., Casals, I., Busquets, M., Leon, Y., Manresa, A., 1997, Oxydation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acids by *Pseudomonas* sp. 42A2, *Biochimica et biophysica acta*, 1347, 1, 75-81.
- Hajati, R. J., Payamnoor, V., Bezdi, K. G., Chashmi, N. A., 2016, Optimization of callus induction and cell suspension culture of *Betula pendula* roth for improved

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- production of betulin, betulinic acid, and antioxidant activity, *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*, 52, 4, 400-407.
- Hanson, J. R., 1995, *An introduction to biotransformations in organic chemistry*, Oxford, New York, Freeman/Spektrum, Bell&Bain Ltd., s.92.
- Happe, M., Grand, P., Farquet, S., Aeby, S., Heritier, J.-C., Corthay, F., Mabillard, E., Marti, R., Vanoli, E., Grogg, A.-F., Nussbaum, S., Roduit, A., Tieche, F., Salem, S., Constantin, C., Schmitt, E., Zahno, S., Ellert, C., Habib, A., Wyss, J., Fischer, F., 2012, Microwave barrel reactor use in trimethylolpropane oleate synthesis by *Candida antarctica* lipase in a biphasic non-solvent process, *Green Chemistry*, 14, 8, 2337-2345.
- Harris, G. C., Sanderson, T. F., 1963, Abietic acid, *Organic Syntheses*, 32, 4, 1.
- Harvey, A. L., 2008, Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 13, 19-20, 894-901.
- Helfenstein, A., Vahermo, M., Nawrot, D. A., Demirci, F., Iscan, G., Krogerus, S., Yli-Kauhaluoma, J., Moreira, V. M., Tammela, P., 2017, Antibacterial profiling of abietane-type diterpenoids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 1, 132-137.
- Heller, L., Perl, V., Wiemann, J., Al-Harrasi, A., Csuk, R., 2016, Amino(oxo)acetate moiety: A new functional group to improve the cytotoxicity of betulin derived carbamates, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 12, 2852-2854.
- Hillegass, J. M., Shukla, A., Lathrop, S. A., MacPherson, M. B., Fukagawa, N. K., Mossman, B. T., 2010, Assessing nanotoxicity in cells in vitro, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 3, 219-231.
- Hsouna, A. B., Alayed, A. S., 2012, Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) roots to control pathogen and spoilage bacteria, *African Journal of Biotechnology*, 11, 47, 10753-10760.
- Huang, C. B., George, B., Ebersole, J. L., 2010, Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms, *Archives of Oral Biology*, 55, 8, 555-560.
- İşcan, G., 2009, Bazı doğal aromatik maddelerin mikrobiyal transformasyonu ve biyolojik etkileri, Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 83 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Janocha, S., Zapp, J., Kleser, M., Bohlmann, J., Bernhardt, R., 2013, Resin acid conversion with CYP105A1: an enzyme with potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids, *Chembiochem*, 14, 467-473.
- Janssens, L., Pooter, H. L. D., Schamp, N. M., Vandamme, E. J., 1992, Production of flavors by microorganisms, *Process Biochemistry*, 27, 4, 195-215.
- Javed, S., Oise, I. E., Nahar, L., Ismail, F. M. D., Mahmood, Z., Sarker, S. D., 2016, Isolation, identification and antiproliferative activity of triterpenes from the genus *Monothecca* A. DC, *Records of Natural Products*, 10, 6, 782-787.
- Jenkins, T. C., AbuGhazaleh, A. A., Freeman, S., Thies, E. J., 2006, The production of 10-hydroxystearic and 10-ketostearic acids is an alternative route of oleic acid transformation by the ruminal microbiota in cattle, *Journal of Nutrition*, 136, 4, 926-931.
- Jeon, E.-Y., Lee, J.-H., Yang, K.-M., Joo, Y.-C., Oh, D.-K., Park, J.-B., 2012, Bioprocess engineering to produce 10-hydroxystearic acid from oleic acid by recombinant *Escherichia coli* expressing the oleate hydratase gene of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Process Biochemistry*, 47, 6, 941-947.
- Jokinen, J. J., Sipponen, A., 2016, Refined spruce resin to treat chronic wounds: rebirth of an old folkloristic therapy, *Advances in wound care*, 5, 5, 198-207.
- Kaplancikli, Z. A., Altintop, M. D., Turan-Zitouni, G., Ozdemir, A., Ozic, R., Akalın, G., 2012, Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of novel oxadiazole derivatives, *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 27, 1, 51-57.
- Kazakova, O. B., Giniyatullina, G. V., Tolstikov, G. A., Medvedeva, N. I., Utkina, T. M., Kartashova, O. L., 2010, Synthesis, modification, and antimicrobial activity of the *N*-methylpiperazinyll amides of triterpenic acids, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 36, 3, 383-389.
- Kazakova, O. B., Smirnova, I. E., Tkhu, H. D. T., Nguen, T. T., Apryshko, G. N., Zhukova, O. S., Medvedeva, N. I., Nazyrov, T. I., Tret'yakova, E. V., Chudov, I. V., Ismagilova, A. F., Suponitsky, K. Y., Kazakov, D. V., Safarov, F. E., Tolstikov, G. A., 2013, Synthesis, structure, and pharmacological activity of (7*R*,8*S*)-epoxy-(13*R*,17*R*)-trioxolane abietic acid, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39, 2, 202-210.
- Kesari, V., Das, A., Rangan, L., 2010, Physico-chemical characterization and antimicrobial activity from seed oil of *Pongamia pinnata*, a potential biofuel crop, *Biomass and Bioenerg*, 34, 1, 108-115.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kieslich, K., 1976, Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds, Thieme, s.1262.
- Kıran, İ., Akar, T., Görgülü, A., Kazaz, C., 2005, Biotransformation of racemic diisophorone by *Cephalosporium aphidicola* and *Neurospora crassa*, Biotechnology Letters, 27, 14, 1007-1010.
- Kıran, İ., Yıldırım, H. N., Hanson, J. R., Hitchcock, P. B., 2004, The antifungal activity and biotransformation of diisophorone by the fungus *Aspergillus niger*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, 1366-1370.
- Kırbaşlar, F. G., Türker, G., Özsoy-Güneş, Z., Ünal, M., Dülger, B., Ertuş, E., Kızılkaya, B., 2012, Evaluation of fatty acid composition, antioxidant and antimicrobial activity, mineral composition and calorie values of some nuts and seeds from Turkey, Records of Natural Products, 6, 4, 339-349.
- Klejdysz, T., Legosz, B., Czuryżkiewicz, D., Czerniak, K., Pernak, J., 2016, Biobased Ionic Liquids with Abietate Anion, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 4, 12, 6543-6550.
- Ko, B.-S., Ryuk, J. A., Kang, S., Moon, B. R., Park, S., 2016, A 70% Ethanol Extract of Mistletoe Rich in Betulin, Betulinic Acid, and Oleanolic Acid Potentiated β -Cell Function and Mass and Enhanced Hepatic Insulin Sensitivity, Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2016, 1-13.
- Koshino, H., Togiya, S., Yoshihara, T., Sakamura, S., Shimanuki, T., Sato, T., Tajimi, A., 1987, Four fungitoxic C-18 hydroxy unsaturated fatty acids from stromata of *Epichloë typhina*, Tetrahedron Letters, 28, 1, 73-76.
- Krings, U., Berger, R. G., 1998, Biotechnological production of flavours and fragrances, Applied Microbiology Biotechnology, 49, 1, 1-8.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., 1994, Naturally occurring antiacne agents, Journal of Natural Products, 57, 1, 9-17.
- Kuo, T. M., Huang, J.-K., Labeda, D., Wen, L., Knothe, G., 2008, Production of 10-Hydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid from Oleic Acid Conversion by Strains of *Pseudomonas aeruginosa*, Current Microbiology, 57, 5, 437-441.
- Küfrevioğlu, İ., Keha, E., 2012, Biyokimya, 11. Baskı, Aktif Yayınevi.
- Laavola, M., Haavikko, R., Hamalainen, M., Leppanen, T., Nieminen, R., Alakurtti, S., Moreira, V. M., Yli-Kauhaluoma, J., Moilanen, E., 2016, Betulin derivatives effectively suppress inflammation *in vitro* and *in vivo*, Journal of Natural Products, 79, 2, 274-280.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Langdon, S. R., Mulgrew, J., Paolini, G. V., Hoorn, W. P. V., 2010, Predicting cytotoxicity from heterogeneous data sources with Bayesian learning, *Journal of Cheminformatics*, 2, 11, 1-18.
- Laszczyk, M., Jaeger, S., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A., Schempp, C. M., 2006, Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*), *Planta Medica*, 72, 15, 1389-1395.
- Li, H., Webster, D., Johnson, J. A., Gray, C. A., 2015, Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Alnus incana*, *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 148-151.
- Li, X.-D., Zhang, Y.-J., Han, J.-C., 2014, Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling, *Tumor Biology*, 35, 11, 11153-11158.
- Liese, A., Filho, M. V., 1999, Production of fine chemicals using biocatalysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 6, 595-603.
- Lin, C. H., Chuang, H. S., 2006, Use of abietic acid and derivatives thereof for inhibiting cancer, United States.
- Liu, H., Lei, X.-L., Li, N., Zong, M.-H., 2013, Highly regioselective synthesis of betulone from betulin by growing cultures of marine fungus *Dothideomycete* sp. HQ 316564, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 88, 32-35.
- Liu, J.-H., Yu, B.-Y., 2010, Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds, *Current Organic Chemistry*, 14, 14, 1400-1406.
- Liu, J., Fu, M. L., Chen, Q. H., 2011, Biotransformation optimization of betulin into betulonic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100-6 cells, *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1, 90-97.
- Lomelino, R. O., Castro-Silva, I. I., Linhares, A. B. R., Alves, G. G., Santos, S. R. A., Gameiro, V. S., Rossi, A. M., Granjeiro, J. M., 2012, The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (β TCP/HA 70:30) granules increases bone repair, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 3, 781-788.
- López-Lázaro, M., 2015, A Simple and Reliable Approach for Assessing Anticancer Activity In Vitro, *Current Medicinal Chemistry*, 22, 11, 1324-1334.
- Loughlin, W. A., 2000, Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, 74, 1, 49-62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- M27-A2, 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard, Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], Wayne, Pennsylvani, USA, 22, 15, 51 p.
- M38-A2, 2008, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard, second edition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], Wayne, Pennsylvani, USA, 22, 16, 51 p.
- M100-S16, 2006, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Sixteenth informational supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], Wayne, Pennsylvani, USA, 26, 3, 188 p.
- Mai, H. D. T., Minh, H. N. T., Pham, V. C., Bui, K. N., Nguyen, V. H., Chau, V. M., 2011, Lignans and other constituents from the roots of the Vietnamese medicinal plant *Pseuderanthemum palatiferum*, *Planta Medica*, 77, 9, 951-954.
- Mamoli, L., Vercellone, A., 1937, Biochemical transformation of 5-androstenedione into isoandrostanediol and 4-testosterone. Further contribution to the genesis of sex hormones, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 70B, 470, 2079-2082.
- Mao, D.-B., Feng, Y.-Q., Bai, Y.-H., Xu, C.-P., 2012, Novel biotransformation of betulin to produce betulone by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 6, 825-829.
- Maria, V. L., Correia, A. C., Santos, M. A., 2004, *Anguilla anguilla* L. genotoxic and liver biotransformation responses to abietic acid exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 2, 202-210.
- Mariod, A. A., Abdelwahab, S. I., 2012, *Sclerocarya birrea* (Marula), an african tree of nutritional and medicinal uses: a review, *Food Reviews International*, 28, 4, 375-388.
- Martin-Arjol, I., Busquets, M., Isbell, T. A., Manresa, A., 2013a, Production of 10(S)-hydroxy-8(E)-octadecenoic and 7,10(S,S)-hydroxy-8(E)-octadecenoic ethyl esters by Novozym 435 in solvent-free media, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 18, 8041-8048.
- Martin-Arjol, I., Busquets, M., Manresa, A., 2013b, Production of 10(S)-hydroxy-8(E)-octadecenoic acid mono-estolides by lipases in non-aqueous media, *Process Biochemistry*, 48, 2, 224-230.
- Martín-Peláez, S., Covas, M. I., Fitó, M., Kušar, A., Pravst, I., 2013, Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims, *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 5, 760-771.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martin, A. M., 1991, Bioconversion of waste materials to industrial products, Elsevier Applied Science, s.556.
- Martin, G. D. A., Reynolds, W. F., Reese, P. B., 2004, Investigation of the importance of the C-2 oxygen function in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145, *Phytochemistry*, 65, 6, 701-710.
- Merey, G., 2016, İlaç kimyası ve endüstriyel uygulamaları ders notları, http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey_24.02.2016_2N9Y.pdf, erişim tarihi: 05.02.2017.
- Ming-liang, F., Jing, L., Ya-chen, D., Yu, F., Ruo-si, F., Qi-he, C., Xiao-jie, L., 2011, Effect of ionic liquid-containing system on betulinic acid production from betulin biotransformation by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc cells, *European Food Research and Technology*, 233, 3, 507-515.
- Mitsukura, K., Imoto, T., Nagaoka, H., Yoshida, T., Nagasawa, T., 2005, Regio- and stereo-selective hydroxylation of abietic acid derivatives by *Mucor circinelloides* and *Mortierella isabellina*, *Biotechnology Letters*, 27, 17, 1305-1310.
- Miura, N., Matsumoto, Y., Miyairi, S., Nishiyama, S., Naganuma, A., 1999, Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells, *Molecular Pharmacology*, 56, 6, 1324-1328.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Dicko, A., 2011, Study on biological activities and chemical composition of extracts from *Desmodium adscendens* leaves, *Journal of Natural Products*, 4, 100-107.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, H. R., 1995, *Manual of Clinical Microbiology*, 6th, American Society for Microbiology Press, s.15-18.
- Neogi, U., Saumya, R., Mishra, R. K., Raju, K. C., 2008, Lipid content and *in vitro* antimicrobial activity of oil seeds of some Indian medicinal plants, *Current Research in Bacteriology*, 1, 1, 1-6.
- Ohmoto, T., Saito, M., Yamaguchi, K., 1987, Constituents of pollen. XIV.¹⁾ Constituents of *Cedrus deodara* Loud. (3), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 6, 2443-2447.
- Oliveira, I., Sousa, A., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A., 2008, Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 5, 1801-1807.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olurinola, P. F., 1996, A laboratory manual of pharmaceutical microbiology, National Institute for Pharmaceutical Research and Development, s.69-105.
- Omeliński, V. L., 1923, Aroma-producing microorganisms, Journal of Bacteriology, 8, 393-419.
- Oreste, G., Hans-Peter, M., 2010, Industrial biotransformation, Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, s.5248.
- Orhan, I., Özçelik, B., Şener, B., 2011, Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles, Turkish Journal of Biology, 35, 2, 251-258.
- Orme, I., Secrist, J., Anathan, S., Kwong, C., Maddry, J., Reynolds, R., Poffenberger, A., Michael, M., Miller, L., Krahenbuh, J., Adams, L., Biswas, A., Franzblau, S., Rouse, D., Winfield, D., Brooks, J., 2001, Search for new drugs for treatment of tuberculosis, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 7, 1943-1946.
- Orpiszewski, J., Hebda, C., Szykula, J., 1990, Microbial transformation of abietic acid to methyl abietate, Biotechnology Letters, 12, 2, 137-138.
- Özcengiz, G., 2002, Endüstriyel üretimde gen teknolojileri, Avrasya Dosyası - Moleküler biyoloji ve gen teknolojileri özel, 8, 3, s. 104-119.
- Özşen, Ö., 2011, İzoforon analoglarının sentezi, biyotransformasyonu ve biyolojik etkileri, Yüksek Lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Bölümü, 62 s.
- Özşen, Ö., Kıran, İ., Dağ, İ., Atlı, Ö., Çiftçi, G. A., Demirci, F., 2017, Biotransformation of abietic acid by fungi and biological evaluation of its metabolites, Process Biochemistry, 52, 130-140.
- Parfene, G., Horincar, V., Tyagi, A. K., Malik, A., Bahrim, G., 2013, Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*, Food Chemistry, 136, 3-4, 1345-1349.
- Pavlova, N. I., Savinova, O. V., Nikolaeva, S. N., Boreko, E. I., Flekhter, O. B., 2003, Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses, Fitoterapia, 74, 5, 489-492.
- Peterson, D. H., Murray, H. C., 1952, Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11, Journal of the American Chemical Society, 74, 1871-1872.
- Phillipson, J. D., 2001, Phytochemistry and medicinal plants, Phytochemistry, 56, 3, 237-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pohjala, L., Tammela, P., Samanta, S. K., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P., 2007, Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays, *Analytical Biochemistry*, 362, 2, 221-228.
- Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J. S., Mazurek, A. P., 2005, In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides, *Cancer Letters*, 229, 1, 67-75.
- Pozharitskaya, O. N., Karlina, M. V., Shikov, A. N., Kosman, V. M., Makarov, V. G., Casals, E., Rosenholm, J. M., 2017, Pharmacokinetics and tissue disposition of nanosystem-entrapped betulin after endotracheal administration to rats, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42, 2, 327-332.
- Qaisar, M. N., Uzair, M., Imran, M., Chaudhary, B. A., Hussain, S. N., 2016, New α -glucosidase inhibitors from *Croton bonplandianum* *Croton bonplandianum* Baill (Euphorbiaceae), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 2, 319-326.
- Qazi, M. S., Sultana, N., Kamal, M., 2013, Biotransformation of pentacyclic terpene isolated from *Alstonia scholaris* (R.Br.), *Biocatalysis and Biotransformation*, 31, 4, 148-152.
- Qi-he, C., Jing, L., Hai-feng, Z., Guo-qing, H., Ming-liang, F., 2009, The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 3, 175-180.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., Subburam, V., 2000, Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 2, 268-273.
- Ramnath, M. G., Thirugnanasampandan, R., Mathusalini, S., Mohan, P. S., 2016, Hepatoprotective and cytotoxic activities of abietic acid from *Isodon wightii* (Benth) H. Hara, *Pharmacognosy research*, 8, 3, 206-208.
- Ramnath, M. G., Thirugnanasampandan, R., Sadasivam, M., Mohan, P. S., 2015, Antioxidant, antibacterial and antiacetylcholinesterase activities of abietic acid from *Isodon wightii* (Benth) H. Hara, *Free Radicals and Antioxidants*, 5, 1, 1-5.
- Rastogi, S., Pandey, M. M., Rawat, A. K. S., 2015, Medicinal plants of the genus *Betula*-Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 62-83.
- Rishton, G. M., 2008, Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues, *American Journal of Cardiology*, 101, 10A, 43-49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rivero-Cruz, J. F., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rivero-Cruz, B., 2009, Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*, *Revista Latinoamericana de Química*, 37, 2, 155-163.
- Roberts, S. M., Turner, N. J., Willets, A. J., Turner, M. K., 1995, *Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms*, Cambridge University Press, s.195.
- Rodríguez, E., Espuny, M. J., Manresa, A., Guerrero, A., 2001, Identification of (*E*)-11-hydroxy-9-octadecenoic acid and (*E*)-9-hydroxy-10-octadecenoic acid by biotransformation of oleic acid by *Pseudomonas* sp. 32T3, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 6, 593-597.
- Roh, S.-S., Park, M.-K., Kim, Y.-u., 2010, Abietic acid from *Resina pini* of *Pinus* species as a testosterone 5 α -reductase inhibitor, *Journal of Health Science*, 56, 4, 451-455.
- Saxena, R., Joshi, D. D., Singh, R., 2009, Chemical composition and antimicrobial activity of walnut oil, *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3, 2-3, 115-118.
- Seervi, M., Lotankar, S., Barbar, S., Sathaye, S., 2016, Assessment of cytochrome P450 inhibition and induction potential of lupeol and betulin in rat liver microsomes, *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 31, 2, 115-122.
- Sellami, M., Chaari, A., Aissa, I., Bouaziz, M., Gargouri, Y., Miled, N., 2013, Newly synthesized dopamine ester derivatives and assessment of their antioxidant, antimicrobial and hemolytic activities, *Process Biochemistry*, 48, 10, 1481-1487.
- Senthilkumar, N., Murugesan, S., Vijayalakshmi, K. B., 2012, GC-MS-MS analysis of *Trichilia connaroides* (Wight & Arn.) Benth (Meliaceae): a tree of ethnobotanical records, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2, 2, 193-197.
- Šiman, P., Filipová, A., Tichá, A., Niang, M., Bezrouk, A., Havelek, R., 2016, Effective method of purification of betulin from birch bark: the importance of its purity for scientific and medicinal use, *PLoS One*, 11, 5, e0154933/0154931-e0154933/0154914.
- Sinha, B. N., Bansal, S. K., Pattnaik, A. K., 2009, Phytochemical and antimicrobial activity of extracts, fractions and betulin, 7-methyl juglone obtained from *Diospyros paniculata*, *Journal of Natural Remedies*, 9, 1, 99-102.
- Skalicka-Woźniak, K., Los, R., Glowniak, K., Malm, A., 2010, Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*, *Chemistry & Biodiversity*, 7, 11, 2748-2754.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skřivanová, E., Marounek, M., 2007, Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*, *Folia Microbiologica*, 52, 1, 70-72.
- Smith, D. J., Park, J., Tiedje, J. M., Mohn, W. W., 2007, A large gene cluster in *Burkholderia xenovorans* encoding abietane diterpenoid catabolism, *Journal of Bacteriology*, 189, 17, 6195-6204.
- Smith, E., Williamson, E., Zloh, M., Gibbons, S., 2005, Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*, *Phytotherapy Research*, 19, 6, 538-542.
- Soares, M., Christen, P., Pandey, A., Raimbault, M., Soccol, C. R., 2000, A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue, *Bioprocess Engineering*, 23, 6, 695-699.
- Soda, K., 1988, Biotransformation of oleic acid of ricinoleic acid, *From Proc.- World Conferene on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*, 178, 9.
- Sowemimo, A. A., Pendota, C., Okoh, B., Omotosho, T., Idika, N., Adekunle, A. A., Afolayan, A. J., 2011, Chemical composition, antimicrobial activity, proximate analysis and mineral content of the seed of *Detarium senegalense* JF Gmelin, *African Journal of Biotechnology*, 10, 48, 9875-9879.
- Steinberg, F. M., Raso, J., 1998, Biotech pharmaceuticals and biotherapy: An overview, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1, 2, 48-59.
- Sultana, N., Saify, Z. S., 2013, Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, 6, 1113-1128.
- Süzer, Ö., 2005, *Farmakoloji*, 3. Baskı, *Klinisyen Tıp Kitabevleri*.
- Talapatra, S. K., Talapatra, B., 2016, *Chemistry of Plant Natural Products*, Springer Heidelberg.
- Talevi, A., Cravero, M. S., Castro, E. A., Bruno-Blanch, L. E., 2007, Discovery of anticonvulsant activity of abietic acid through application of linear discriminant analysis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6, 1684-1690.
- Tamokou, J. d. D., Simo, M. D. J., Keilah, L. P., Tene, M., Tane, P., Kuiate, J. R., 2012, Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae), *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 99, 1-10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tapia, A. A., Vallejo, M. D., Gouiric, S. C., Feresin, G. E., Rossomando, P. C., Bustos, D. A., 1997, Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species, *Phytochemistry*, 46, 1, 131-133.
- Taqi, A., Askar, K. A., Mutihac, L., Stamatini, I., 2013, Effect of *Laurus nobilis* L. oil, *Nigella sativa* L. oil and oleic acid on the antimicrobial and physical properties of subsistence agriculture: the case of cassava/pectin based edible films, *Food and Agricultural Immunology*, 24, 2, 241-254.
- Tarasova, E. V., Grishko, V. V., Ivshina, I. B., 2015, Betulin biotransformation by *Rhodococcus actinobacteria*, *Bulletin of Perm University. Biology/Vestnik Permskogo Universiteta. Seria Biologia*, 1, 31-40.
- Tarasova, E. V., Grishko, V. V., Ivshina, I. B., 2017, Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation, *Process Biochemistry*, 52, 1-9.
- Telefoncu, A., Pazarlıoğlu, N., 2010, *Biyoteknoloji: Temel prensipler ve uygulamalar*, İzmir Birleşik Matbaacılık, s.605.
- Ten, L. N., Yoon, G. J., Chae, S. M., 2016, Modification of betulin into betulone by bacteria *Rhodococcus erythropolis* BT78, *Chemistry of Natural Compounds*, 52, 5, 956-958.
- Thillairajasekar, K., Duraipandiyan, V., Perumal, P., Ignacimuthu, S., 2009, Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr) (microalga) from south east coast of Tamil Nadu, India, *International Journal of Integrative Biology*, 5, 3, 167-170.
- Tian, H.-L., Zhan, P., Li, K.-X., 2010, Analysis of components and study on antioxidant and antimicrobial activities of oil in apple seeds, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61, 4, 395-403.
- Tramper, J., 1996, Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts, *Biotechnology and Bioengineering*, 52, 2, 290-295.
- Tsai, P.-W., Castro-Cruz, K. A. D., Shen, C.-C., Ragasa, C. Y., 2012, Chemical constituents of *Broussonetia luzonicus*, *Pharmacognosy Journal*, 4, 31, 01-04.
- Tübitak, 2004, *Biyoteknoloji ve gen teknolojileri stratejisi, vizyon 2023 projesi*. Ankara: 47 s.
- Ulus, N. N., Ercil, D., Sakar, M. K., Tezcan, E. F., 2002, Abietic acid inhibits lipoxygenase activity, *Phytotherapy Research*, 16, 1, 88-90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Urbanek, A., Szadziwski, R., Stepnowski, P., Boros-Majewska, J., Gabriel, I., Dawgul, M., Kamysz, W., Sosnowska, D., Gołębiowski, M., 2012, Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae), *Journal of Insect Physiology*, 58, 9, 1265-1276.
- Verma, V., Tripathi, A. C., Saraf, S. K., 2016, Bioactive non-sterol triterpenoid from *Streblus asper*: microwave-assisted extraction, HPTLC profiling, computational studies and neuro-pharmacological evaluation in BALB/c mice, *Pharmaceutical Biology* (Abingdon, United Kingdom), 54, 11, 2454-2464.
- Wang, C.-M., Chen, H.-T., Wu, Z.-Y., Jhan, Y.-L., Shyu, C.-L., Chou, C.-H., 2016, Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*, *Molecules*, 21, 2, 139-150.
- Wei, L. S., Wee, W., Siong, J. Y. F., Syamsumir, D. F., 2011, Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer property and chemical composition of *Michelia champaca* seed and flower extracts, *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 1, 19-24.
- Xu, P., Hua, D., Ma, C., 2007, Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production, *Trends in Biotechnology*, 25, 12, 571-576.
- Yang, D., Pornpattananangkul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C.-M., Zhang, L., 2009, The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*, *Biomaterials*, 30, 30, 6035-6040.
- Yang, N.-Y., Liu, L., Wei-WeibTao, Dua, J.-A., Tian, L.-J., 2010, Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells, *Phytochemistry*, 71, 13, 1528-1533.
- Yemşen, Ö., Abay, A., Şar, S., 2013, Eczacılık bilimleri; Türkiye'de ruhsatlı biyoteknolojik ve biyobenzer ürünlerde mevcut durumun değerlendirilmesi, *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 2, 1, 1-11.
- Yi, L., Yan, H., 2011, Abietane diterpenes from *Callicarpa pedunculata*, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 23, 1, 66-68.
- Yim, N.-H., Jung, Y. P., Kim, A., Kim, T., Ma, J. Y., 2015, Induction of apoptotic cell death by betulin in multidrug-resistant human renal carcinoma cells, *Oncology Reports*, 34, 2, 1058-1064.
- Yoshida, E. H., Tribuiani, N., Sabadim, G., Neto, M. D. A., Oshima-Franco, Y., Varanda, E. A., 2016, Evaluation of betulin mutagenicity by *Salmonella*/Microsome test, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6, 3, 443-447.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zafar, S., Ahmed, R., Khan, R., 2016, Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis, *Free Radical Research*, 50, 9, 939-948.
- Zhao, H., Liu, Z., Liu, W., Han, X., Zhao, M., 2016a, Betulin attenuates lung and liver injuries in sepsis, *International Immunopharmacology*, 30, 50-56.
- Zhao, H., Zheng, Q., Hu, X., Shen, H., Li, F., 2016b, Betulin attenuates kidney injury in septic rats through inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway, *Life Sciences*, 144, 185-193.



EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar-A: Abiyetik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

Ek Açıklamalar-B: Betulin molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

Ek Açıklamalar-C: Hidroksi diizoforon molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

Ek Açıklamalar-D: Oleik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

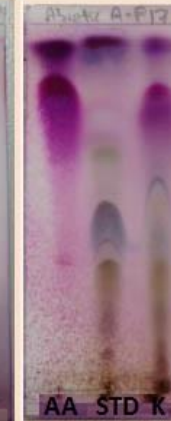
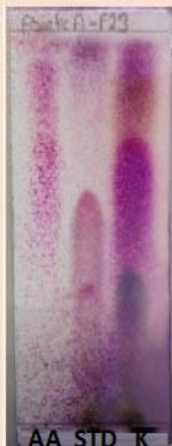
Ek Açıklamalar-E: Tez Çalışmasından Üretilen ve Sunulan Makale ve Bildiriler

Ek Açıklamalar-F: Tez Çalışmamı Destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri

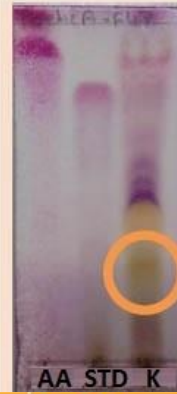
EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar-A: Abiyetik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

(AA: Abiyetik asit, K: Karışım spotu, STD: Sadece mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol spotu)

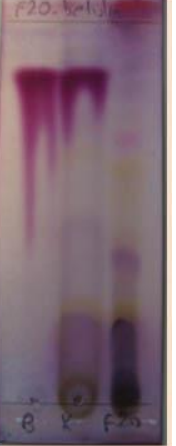
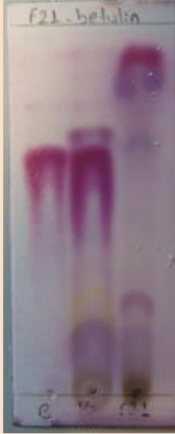
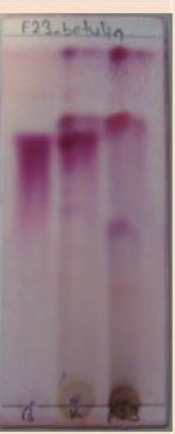
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737
					
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792	<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385
					

Ek Açıklamalar-A: Abiyetik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları (devam)

<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Corynespora cassicola</i> DSM 62475	<i>Fusarium heterosporium</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME
					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	<i>Penicillium primulinum</i>	<i>Penicillium valentinum</i>	<i>Aspergillus terreus</i> var. africanus	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
					
<i>Trihofesium roseum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424	<i>Mucor plumbeus</i>		
					

Ek Açıklamalar-B: Betulin molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

(B: Betulin, K: Karışım spotu, STD: Sadece mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol spotu)

<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737
					
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792	<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	<i>Sporobolomyces parvoseus</i> ATCC 11385
					

Ek Açıklamalar-B: Betulin molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları (devam)

<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Corynespora cassicola</i> DSM 62475	<i>Fusarium heterosporium</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phanerachaete chrysosporium</i> ME
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	<i>Penicillium primulinum</i>	<i>Penicillium valentinum</i>	<i>Aspergillus terreus</i> var.africanus	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
	<i>Trichotesium roseum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424	<i>Mucor plumbeus</i>	

Ek Açıklamalar-C: Hidroksi diizoforon molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

(HD: Hidroksi diizoforon, K: Karışım spotu, STD: Sadece mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol spotu)

<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792	<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	<i>Sporobolomyces parvoseus</i> ATCC 11385

Ek Açıklamalar-C: Hidroksi diizoforon molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları (devam)

<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62475	<i>Fusarium heterosporium</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	<i>Penicillium primulinum</i>	<i>Penicillium valentinum</i>	<i>Aspergillus terreus</i> var.africanus	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
<i>Trichotesium roseum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424			

Ek Açıklamalar-D: Oleik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları

(OA: Oleik asit, K: Karışım spotu, STD: Sadece mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol spotu)

<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737
F9-OA 1:1 	F10-OA 1:1 	F11-OA 1:1 	F12-OA 1:1 	F13-OA 1:1 	F20-OA 1:1
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792	<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	<i>Sporobolomyces paraseus</i> ATCC 11385
F21-OA 1:1 	F22-OA 1:1 	F23-OA 1:1 	F24-OA 1:1 	F30-OA 1:1 	F31-OA 1:1

Ek Açıklamalar-D: Oleik asit molekülü ile gerçekleştirilen ön biyotransformasyon İTK'ları (devam)

<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62475	<i>Fusarium heterosporium</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME
F36-OA 1:1	F40-OA 1:1	OA-F46 3D 1:1	F47-OA 1:1	OA-F53 8D	F69-OA 1:1
OA K STD	OA K STD	OA K STD	OA K STD	OA K STD	OA K STD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	<i>Penicillium primulinum</i>	<i>Penicillium valentinum</i>	<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
F27-OA 1:1	F68-OA 1:1	F91-OA 1:1	F92-OA 1:1	F93-OA 1:1	96
OA K STD	OA K STD	OA K STD	OA K STD	OA K STD	STD OA K
	<i>Trichotesium roseum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424		
	F99-OA 1:1	F98-OA 1:1	F9		
	OA K STD	OA K STD	STD OA K		

Ek Açıklamalar-E: Tez Çalışmasından Üretilen ve Sunulan Makale ve Bildiriler

MAKALE	DERGİ ADI	YAZARLAR
Biotransformations Of Abietic Acid By Fungi And Biological Evaluation Of Its Metabolites	Process Biochemistry 52 (2017) 130-140 (Özşen vd., 2017)	Özge Özşen İsmail Kıran İlknur Dağ Özlem Atlı Gülşen A. Çiftçi Fatih Demirci

BİLDİRİ TÜRÜ	YAZARLAR	BİLDİRİ ADI	KONGRE ADI	YER VE TARİHİ
Poster	Özge Özşen İsmail Kıran Özlem Atlı Fatih Demirci	Microbial biotransformation of oleic acid and the cytotoxicity of biotransformation mixtures	11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds	Antalya 1 Ekim 2015
Poster	Özge Özşen İsmail Kıran Özlem Atlı İlknur Dağ	Antimicrobial evaluation of oleic acid biotransformation metabolites	11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds	Antalya 1 Ekim 2015
Poster	Özge Özşen İsmail Kıran Fatih Demirci	microbial transformation of oleic acid by 27 different microorganisms	11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds	Antalya 1 Ekim 2015
Sözlü	Özge Özşen İsmail Kıran İlknur Dağ	Antimicrobial activities of abietic acid and Its biotransformation metabolites	International Turkic World Conference on Chemical Science and Technologies	Üsküp Makedonya 26 Ekim 2016
Sözlü	İsmail Kıran Özge Özşen Fatih Demirci	Biotransformation of diterpene abietic by Fungi	International Conference on Antimicrobial Research	Malaga İspanya 29 Haziran 2016
Poster	Özge Özşen İsmail Kıran Özlem Atlı	Investigating the cytotoxicity of biotransformation metabolites of abietic acid	International Conference on Antimicrobial Research	Malaga İspanya 29 Haziran 2016

Ek Açıklamalar-F: Tez Çalışmamı Destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri**1) Tübitak 1001 Projesi:**

Proje yürütücüsü: Prof. Dr. İsmail Kıran

Proje başlığı: Yeni ilaç adayı moleküllerinin mikrobiyal biyodönüşüm tepkimeleri ile eldesi ve biyolojik etkilerinin incelenmesi (Proje no: 114Z380)

Proje çalışanları: Doç Dr. İlknur Dağ, Doç. Dr. Gülşen A. Çiftçi, Yrd. Doç. Dr. Özlem Atlı

Proje bursiyerleri: **Araş. Gör. Özge Özşen**, Ceren Oturanel, Aysun Ayrım, Ş. Gamze Kahraman

Proje bütçesi: 371322,00 TL

Proje başlangıç ve bitiş tarihleri: 01.10.2014-01.04.2017

2) ESOGÜ BAP C1 Projesi:

Proje yürütücüsü: Prof. Dr. İsmail Kıran

Proje başlığı: Oleik asit türevlerinin mikrobiyal biyodönüşüm tepkimeleri ile eldesi ve biyolojik etkilerinin incelenmesi (Proje no: 2014-654)

Proje çalışanları: Yrd. Doç. Dr. Özlem Atlı, **Araş. Gör. Özge Özşen**

Proje bütçesi: 99999,65 TL

Proje başlangıç ve bitiş tarihleri: 14.12.2014-13.12.2015

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İzmir’de doğan Özge Özşen, ilk, orta ve lise öğrenimini Bursa’da tamamladı. 2008 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun oldu. 2009 yılında aynı bölümde Araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2011 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisansını tamamladı ve 2011 yılında aynı enstitüde Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda doktora programına kayıt oldu. Halen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını devam ettirmektedir.