

***p*-SİMENİN MİKROBİYAL
BİYOTRANSFORMASYONU**

Emil Civişov

Yüksek Lisans Tezi

***p*-SİMENİN MİKROBİYAL
BİYOTRANSFORMASYONU**

Emil Civişov

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı
Eskişehir, Temmuz 2007

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Neş'e Kırımer

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından kısmen desteklenmiştir (Proje No: 106T117).

Jüri ve Enstitü Onayı

Emil Civişov'un ***p*-Simenin Mikrobiyal Biyotransformasyonu** başlıklı Farmakognozi Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 20 Temmuz 2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Neş'e Kırımer Anadolu Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Şenay Küsmenoğlu Gazi Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Fatih Demirci Anadolu Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bilimsel ve sosyal yaşantısıyla biz öğrencilerine her zaman örnek olan,engin bilgilerini esirgemeyen, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer'e, her daim desteğiyle yanımda olan, çalışmalarına önderlik eden ve sıcak yaklaşımıyla, bilimsel pozitif sonuç alınmadığı durumlarda motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan tez danışmanım Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Neş'e Kırmıner'e (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), bilgilerini ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, doküman skıntısı çekmememi sağlayan, yürütücüsü olduğu araştırma projesine (Proje No: 106T117 TÜBİTAK) dahil ederek biyotransformasyon çalışmalarında tecrübe kazanmamı ve yetişmemi sağlayan Doç. Dr. Fatih Demirci'ye (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), değerli zamanımı harcayarak GC/MS analizlerini gerçekleştiren Doç. Dr. Betül Demirci'ye (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), HPLC analizlerini yapan Doç. Dr. Müberra Koşar'a (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve GC/MS analizlerini gerçekleştirmemi sağlayan Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Berber'e (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü), mikrobiyoloji ve biyotransformasyon bilgi ve tecrübelerini paylaşan, pratik çözüm önerileriyle destek olan, Araş. Gör. Gökalp İşcan'a (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), mikroorganizma göndererek yardım eden Center for Forest Mycology Research, Forest Products Laboratory (Amerika Birleşik Devletleri) merkezine, çalışmalarda, SOLULYS® ve KLEPTOSE® ürünlerini göndererek olanak sağlayan Roquette (Fransa) şirketi Türkiye temsilcisi Rhodia Kimyevi Md. Ltd. Şti'ne, yardımlarıyla yanımda olan Bio. Gamze Çayırdere'ye (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı), tezin yazılmasında sonsuz emeği geçen, her aşamada sabır göstererek manevi desteğini esirgemeyen, moral kaynağı olan eşim Uzm. Ecz. Sevda (İbadova) Civişova'ya ve hakkını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

***p*-SİMENİN MİKROBİYAL BİYOTRANSFORMASYONU**

ÖZET

Bu çalışmada *p*-simenin 35 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu araştırılmıştır. Bunlardan *Aspergillus niger* (NRRL 326) ile bir, *Aspergillus alliaceus* (NRRL 317) ile iki, *Penicillium claviforme* (MR376) ile beş, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) ile yedi metabolit oluşumu GC/MS ile belirlenmiştir. Bu metabolitlerden *Phanerochaete chrysosporium* ile oluşan iki metabolitin tanımlanması mümkün olmuştur. Bu metabolitler *p*-simen-8-ol ve kumin alkol (*p*-simen-7-ol)'dür. Bu iki bileşik doğal bileşikler olup daha önce çeşitli uçucu yağların bileşiminde tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilerle *p*-simenden hareketle bu metabolitlerin üretilmeleri, biyoaktivitelerinin araştırılması ve ilaç-gıda sanayii için hammadde olarak önerilmeleri mümkün olacaktır.

Anahtar kelimeler: *p*-simen, mikrobiyal biyotransformasyon, *p*-simen-8-ol, kumin alkol

MICROBIAL BIOTRANSFORMATION OF *p*-CYMENE

ABSTRACT

Overall, 35 different microorganisms were screened for biotransformation of *p*-cymene. *Aspergillus niger* (NRRL 326) gave one metabolite, *Aspergillus alliaceus* (NRRL 317) two metabolites, *Penicillium claviforme* (MR376) five metabolites, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) seven metabolites that were identified by GC/MS, respectively. Only two metabolites obtained from *Phanerochaete chrysosporium* could be identified by means of MS data. Metabolites are *p*-cymen-8-ol and cuminal alcohol (*p*-cymen-7-ol). These two natural compounds were previously identified in essential oil compositions. As a result, it is suggested to obtain metabolites from *p*-cymene and use as a raw material in drug and food industry.

Key Words: *p*-cymene, microbial biotransformation, *p*-cymen-8-ol, cuminal alcohol

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Biyotransformasyonun Tanımı, Tarihçesi ve Uygulamaları	2
Bütün Hücre Sistemleri	2
<i>Mikroorganizmalar</i>	2
<i>Bitki, organ, doku, hücre kültürleri</i>	6
<i>Hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri</i>	6
<i>İnsan hücresi</i>	7
Hücresiz Preparatlar (Enzimler)	7
Doğal Bileşiklerin Biyotransformasyonu	8
Monoterpenler	8
Monoterpenlerin Biyosentezi	8
<i>Mevalonik asit yolu</i>	9
<i>1-deoksi-D-ksiluloz 5-fosfat yolu</i>	9
p-Simenin Yapısı ve Özellikleri	11
p-Simenin Biyotransformasyonu	12
GEREÇLER	14
Gereçler, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar	14
Gereçler	14
Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	14

Aletler	14
Materyalin β -Siklodekstrin'e Emdirilmesi	14
Mikroorganizmalar	15
YÖNTEMLER	16
Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması	16
Mikroorganizma İnokülasyonu	16
Sıvı Besi Yeri	16
<i>α-Medyum Besi Yeri</i>	16
Katı Besi Yeri	16
Sterilizasyon	16
Mikroorganizmaların İmhası	17
Biyotransformasyon Çalışmaları	17
<i>α-Medyum ile çalışmalar</i>	17
<i>SGA ile çalışmalar</i>	17
Kontrol	17
Metabolitlerin Ekstraksiyonu	17
<i>Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu</i>	17
Metabolit Varlığının Tespiti	18
<i>İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)</i>	18
<i>Analitik İTK</i>	18
Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi (GC/MS)	18
BULGULAR ve TARTIŞMA	19
<i>p</i> -Simen'in Mikrobiyal Transformasyonu	20
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 ve <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317 ile	20
Mikrobiyal Transformasyon	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767 ile Mikrobiyal	20
Transformasyon	
<i>Penicillium claviforme</i> MR376 ile Mikrobiyal Transformasyon	20
Metabolit No 1	21

Metabolit No 2	21
Metabolit No 3	22
Metabolit No 4	22
Metabolit No 5	23
Metabolit No 6	23
Metabolit No 7	24
Metabolit No 8	24
Metabolit No 9	25
Metabolit No 10	25
Metabolit No 11	26
Metabolit No 12	26
SONUÇ VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Bütün Hücre Sistemleri İle Hücresiz Preparatların Biyokatalizör Olarak Karşılaştırılması	7
Çizelge 2 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Listesi	15
Çizelge 3 İTK Çalışmalarında Kullanılan Çözücü Sistemleri	18
Çizelge 4 Materyallerin Biyotransformasyonları İçin Kullanılan Mikroorganizmalar Ve Çalışmaların Sonuçları	19

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Furfural'ın Furfuril Alkole İndirgenmesi	2
Şekil 2 Maya İle Gerçekleştirilen Şıral Asetoin'in Kondensasyonu	3
Şekil 3 Vitamin C Sentezi	3
Şekil 4 Testosteron'un Biyotransformasyonla Eldesi	4
Şekil 5 Progesteron'un Mikrobiyal Biyotransformasyonu	4
Şekil 6 Akrlamit'in Biyotransformasyon Yoluyla Eldesi	4
Şekil 7 Pfizer Şirketinin Geliştirdiği Farmasötik Biyotransformasyon Reaksiyonlarından Örnekler	5
Şekil 8 Mevalonik Asit Yolağı	9
Şekil 9 1-Deoksi-D-Ksiluloz 5-Fosfat Yolağı	10
Şekil 10 Monoterpenler ve <i>p</i> -Simen Biosentezi	11
Şekil 11 <i>p</i> -Simen Biyotransformasyonu	13
Şekil 12 Metabolit No 1 Kütle Spektrumu	21
Şekil 13 Metabolit No 2 Kütle Spektrumu	21
Şekil 14 Metabolit No 3 Kütle Spektrumu	22
Şekil 15 Metabolit No 4 Kütle Spektrumu	22
Şekil 16 Metabolit No 5 Kütle Spektrumu	23
Şekil 17 Metabolit No 6 Kütle Spektrumu	23
Şekil 18 Metabolit No 7 Kütle Spektrumu	24
Şekil 19 Metabolit No 8 Kütle Spektrumu	24
Şekil 20 Metabolit No 9 Kütle Spektrumu	25
Şekil 21 Metabolit No 10 Kütle Spektrumu	25
Şekil 22 Metabolit No 11 Kütle Spektrumu	26
Şekil 23 Metabolit No 12 Kütle Spektrumu	26
Şekil 24 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ile <i>p</i> -Simenin Biyotransformasyonu	27
Şekil 25 <i>Penicillium claviforme</i> ile <i>p</i> -Simenin Biyotransformasyonu	27

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

GC/MS	:Gaz kromatografisi/Kütle spektrometrisi
eV	: Elektron volt
EI/MS	: Elektronik İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi
<i>m/z</i>	: Kütle/yük oranı

GİRİŞ ve AMAÇ

Biyotransformasyon, doğal maddelerin başlangıç maddesi olarak kullanıldığı uygulamalarla Farmakognozinin güncel konularından birini oluşturmaktadır. Günümüzde koruyucu ve tedavi edici ilaçlar ve ilaç hammaddelerinde tüm dünyada hızla doğal hammaddelere dönüş eğilimi oluşmuştur. Bu kapsamda, doğal hammaddeden başlayarak mikroorganizmalar yardımıyla elde edilen metabolitler yeni doğal hammaddeleri ortaya çıkarmaktadır.

Doğal hammaddeler içinde, basit molekül yapılarına karşın geniş biyoaktivite yelpazeleri ile monoterpenler önemli bir grubu oluşturmaktadır. Kaynak taramaları doğada yaygın olarak bulunan bir monoterpen olan *p*-simenin biyotransformasyonu ile ilgili pek az araştırma yapılmış olduğunu göstermektedir. *Pseudomonas putida*'nın iki türü ile yapılan bu araştırmalarda *p*-simen-8-ol, *p*-kumik alkol, *p*-kumik aldehit, *p*-kumat, *cis*-2,3-dihidroksi-2,3-dihidro-*p*-kumat, 2,3-dihidroksi-*p*-kumat, 2-hidroksi-3-karboksi-6-okso-7-metilokta-2,4-dienoat, 2-hidroksi-6-okso-7-metilokta-2,4-dienoat, *cis*-2-hidroksipenta-2,4-dienoat ve izobutirat adlı metabolitler elde edilmiştir (Eaton, 1997; DeFrank ve Ribbons, 1977; http-2).

Bu araştırmanın amacı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı koleksiyonunda bulunan 35 mikroorganizma ile *p*-simenin biyotransformasyonunu incelemek olarak belirlenmiştir. Oluşan metabolitlerin iki tanesi kromatografik ve spektral yöntemlerle tanımlanmıştır. Daha sonraki aşamalarda, oluşan bu metabolitlerin daha büyük ölçeklerde elde edilmesi ve biyoaktivite deneylerinin yapılması amaçlanmaktadır. Elde edilecek sonuçlara göre ilaç endüstrisine yeni hammaddeler önerilmesi mümkün olacaktır

KAYNAK BİLGİSİ

Biyotransformasyonun Tanımı, Tarihçesi ve Uygulamaları:

Biyotransformasyon, canlı organizma veya enzimleri katalizör olarak kullanılmasıyla bileşiklerin kimyasal dönüşümleri ve farklı ürünlerin elde edilmesidir. Başta ilaç hammaddeleri olmak üzere polimer üretiminde, ziraatte, kozmetik ve gıda sanayiinde uygulanmaktadır. Ayrıca, toprak, su, hava arıtılması, ksenobiyotiklerin yıkımı, biyoyakıt, kağıt ve enerji üretimi gibi alanlarda da uygulama bulmaktadır.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında yer alan biyokatalizörlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir:

- A) Bütün hücre sistemleri
 - a) Mikroorganizma (bakteri, maya, fungus)
 - b) Bitki (canlı bitki, doku ve hücre kültürleri)
 - c) Hayvan (canlı hayvan, doku ve hücre kültürleri)
 - d) İnsan
- B) Hüresiz preparatlar (enzimler) (Holland ve Weber, 2000; Kırbaş ve ark., 1999; Doble ve ark., 2004; Tengerdy ve Szakacs, 2003; Telefoncu, 1995).

A) Bütün Hücre Sistemleri:

a) Mikroorganizmalar

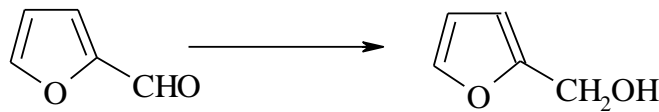
Mikroorganizma dünyası oldukça geniş spektruma sahiptir. Hali hazırda 100 binden fazla tür bilinmektedir. İlk sırada prokaryotlar (bakteriler, aktinomisetler, siyanobakteriler, riketsiyalar) ve ökaryotlar (mayalar, basit yosunlar) yer almaktadır (Yevtushenkov ve Fomichev, 2002).

İnsanoğlu, antik çağlardan beri günlük hayatında mikroorganizmaları kullanarak biyotransformasyon gerçekleştirmiştir. Bira, ekmeke, şarap, peynir üretimi bunlara örnek gösterilebilir.

İlk bilimsel ve deneysel anlamlı biyotransformasyonlardan biri 1858'de Pasteur tarafından gerçekleştirilen *Penicillium glaucum* kullanılarak D-enantiyomerin seçici parçalanmasıyla, DL-ammonium tartarat'tan L-ammonyum tartarat elde edilmiştir (Telefoncu, 1995; Vasic-Racki, 2006).

Acetobacter aceti (daha sonra *Mycoderma aceti* veya *Bacterium xylinum* olarak tanımlandı) aracılığıyla etanolün asetik asite (sirke) dönüştürülmesi Pasteur'un gerçekleştirdiği başka bir biyotransformasyondur.

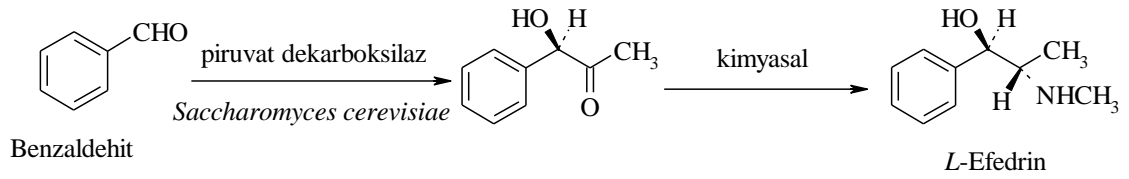
Ayrıca Dumas, 1874'te *Saccharomyces cerevisiae* ile kükürt'ten (S) hidrojen sülfür (H₂S) eldesini, Brown, 1886'da, *Bacterium aceti* ile propanol'ü propanoik asit'e oksitlenmesini, Windisch 1898'de furfural'den furfural alkol (Şekil 1) dönüşümünü gerçekleştirmiştir (Hanson, 1995).



Şekil 1. Furfural'ın furfural alkole indirgenmesi

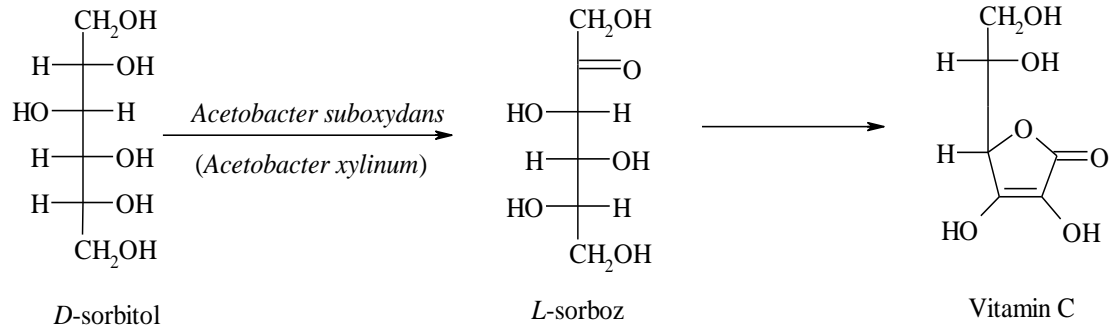
20. yüzyılın başında Liebig ve Neuberg, *Saccharomyces cerevisiae* ile birçok biyotransformasyon gerçekleştirmişler. Bunlardan bazıları Birinci Dünya Savaşı sırasında aseton, gliserol ve butanol'ün mikrobiyolojik üretimi çalışmalarında ortaya çıkmıştır.

1921'de Neuberg tarafından maya ile gerçekleştirilen şiral aseton'ün kondensasyonu özellikle kayda değerdir (Şekil 2). Benzaldehit'in fermentasyona eklenmesi ve endojen asetaldehit'le kondensasyonu, ketol'ünün oluşması ile sonuçlanmıştır. Bu da 1934'te efedrin'in ticari sentezine yol açmıştır (Vasic-Racki, 2006).



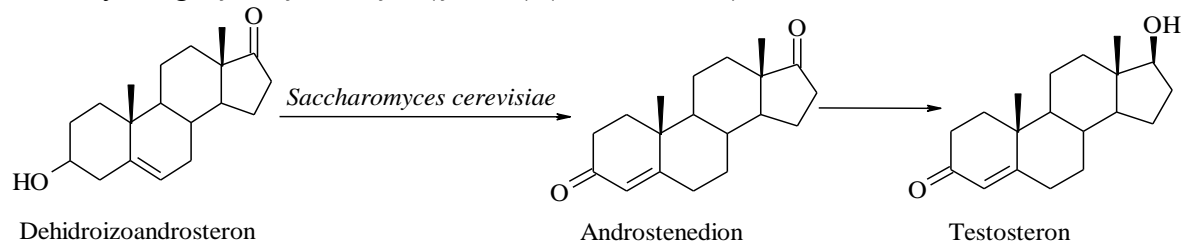
Şekil 2. Maya ile gerçekleştirilen şiral aseton'ün kondensasyonu

Bugün ekonomik değeri büyük olan bazı çalışmaların temeli 1920 ile 1940 yılları arasında atılmıştır. Endüstriyel çalışmalardan biri de 1934'te C vitamininin sentezidir (Şekil 3) (Hanson, 1995; http-1).



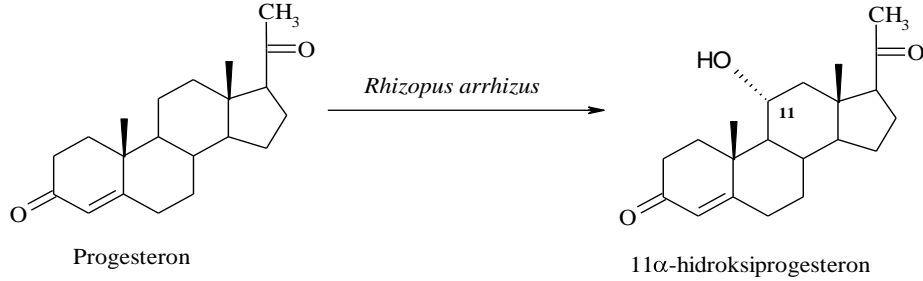
Şekil 3. Vitamin C sentezi

1937'te *Saccharomyces cerevisiae* ile dehidroizoandrosteron'un androstenedion'a oksidasyonu ve sonraki aşamada farklı bir fermentasyon kullanarak testosterona redüksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4) (Hanson, 1995).



Şekil 4. Testosteron'un biyotransformasyonla eldesi

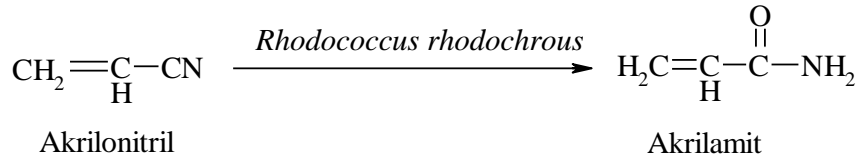
Sonraki çalışmalarda, 1948'de *Proactomyces roseus* ile, C-7 pozisyonundan kolesterolün oksidasyon ve redüksiyonu da dahil, sterollerin degradasyonu ve oksidasyonunu mümkün olmuştur. Bu çalışmalar sayesinde 1952'de *Rhizopus arrhizus*'un progesteron'un C-11 pozisyonunu hidroksillemesi sonucunda 11 α -hidroksiprogesteron elde edilmiştir (Peterson ve ark., 1952).



Şekil 5. Progesteron'un mikrobiyal biyotransformasyonu

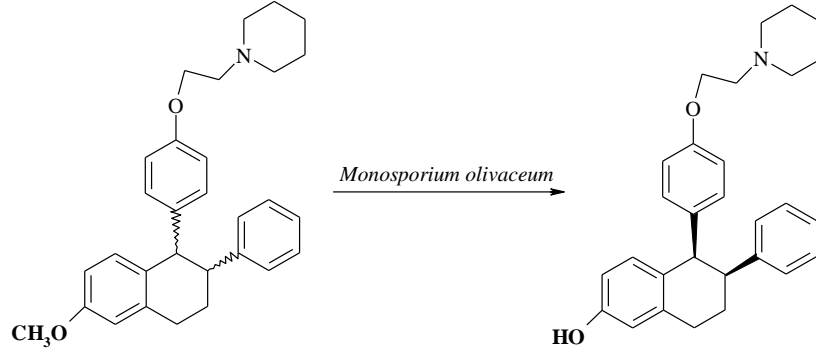
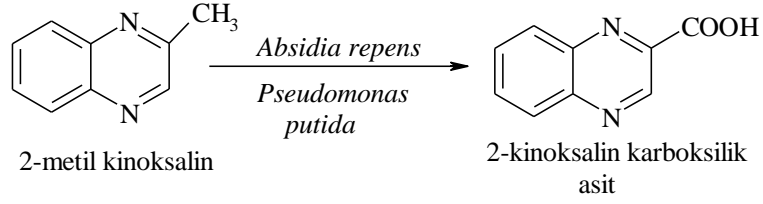
Steroidlerin mikrobiyal hidroksilasyonu ile kortikosteroid sentezi için ara ürünlerin elde edilmesi, biyotransformasyonun endüstriyel uygulamasına yönelik önemli bir adım olmuştur. Bu çalışmalar için progesteron, bitkisel steroid diosgenin'den elde edilmiş, fakat kaynak sağlanmasındaki problemler, başka başlangıç materyalleri araştırmasına yol açmıştır. Soya fasulyesi, yağında yüksek miktarda sitosterol ve stigmasterol bulunması nedeniyle kaynak olarak tercih edilmiş, ve bu bileşiklerin farklı steroid hormonlara başlangıç maddesi olabilecek androstenediona degradasyonu için bakteriyel yöntemler geliştirilmiştir.

Endüstriyel seviyede gerçekleştirilen akrilonitril'in akrilamit'e hidrolizi polimer sanayiinde kullanım bulmuştur. (Şekil 6) (Vasic-Racki, 2006).

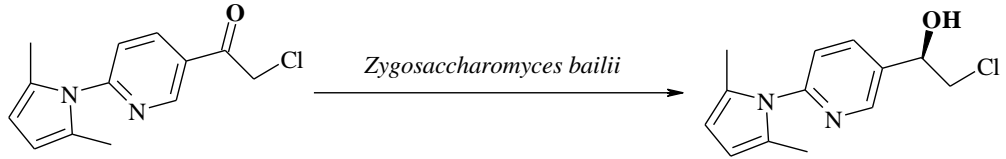


Şekil 6. Akrilamit'in biyotransformasyon yoluyla eldesi

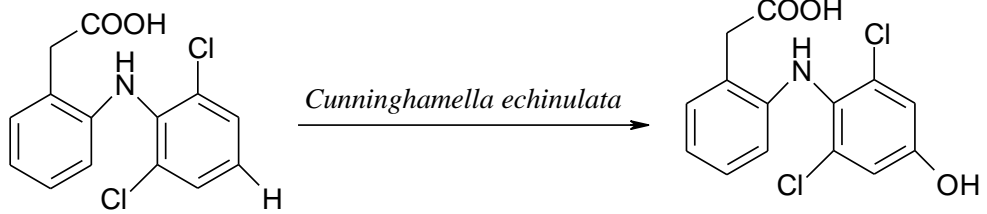
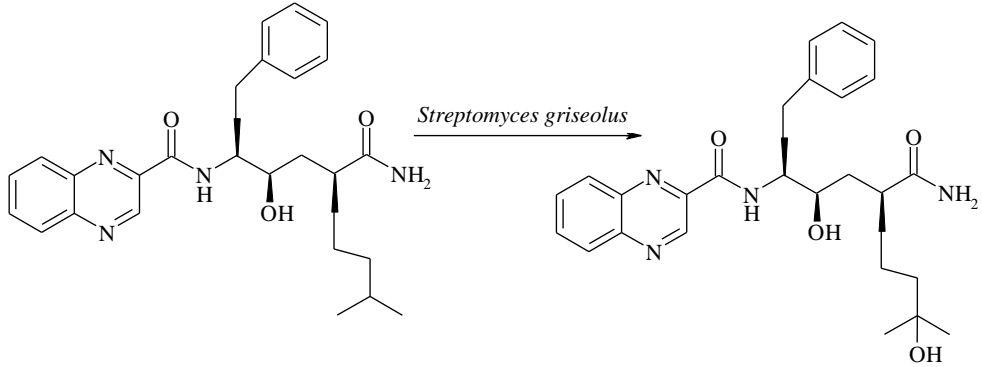
Birçok ilacın kimyasal sentezle rasematlar şeklinde oluşması ve Talidomit gibi ürünlerde sadece tek enantiomerin yararlı olup diğerinin toksik ve yan etkilere sahip olması, biyotransformasyonun şıral sentezlerde uygulanmasının önemini arttırmıştır. Buna örnek olarak, *Pseudomonas putida* tarafından gerçekleştirilen aromatik bileşiklerin *cis*-sikloheksadien-1,2-dihidrodiol'lere oksidasyonu gösterilmektedir (Hanson, 1995). Günümüzde, Pfizer gibi şirketlerin mikrobiyal transformasyona geniş yer ayırması biyotransformasyonun ne denli önem kazandığını ortaya koymaktadır (Şekil 7). Ayrıca biyotransformasyonun düşük maliyet ve yüksek verimle gerçekleşip, genelde çevre dostu olması ve çalışma sırasında kuvvetli asit ve bazlara ihtiyaç duyulmamasıyla araştırmacı açısından güvenli çalışma koşulları sağlaması geleneksel kimyasal senteze tercih sebebi olabilir. (Davies ve ark., 1989; Truesdell, 2005)



Diastereoselektif O-demetilasyon *Monosporium olivaceum* gibi funguslar tarafından gerçekleştirilebilir.



Asimetrik keton redüksiyonu sonucu %99 enantiyomerik verimle alkol oluşmaktadır.



Diklofenak 4'-hidroksidiklofenak
 Şekil 7. Pfizer şirketinin geliştirdiği farmasötik biyotransformasyon reaksiyonlarından örnekler

b) Bitki, organ, doku, hücre kültürleri

Bitkinin tamamı, doku veya hücre süspansiyonları biyotransformasyon aracı olarak kullanılmaktadırlar. Genel olarak “organ, doku, hücre kültürü” terimi aseptik olarak geliştirilen aşağıdaki bitki parçalarına uygulanmaktadır:

1. agar ortamında kallus dokularına,
2. hücrelerin süspansiyon kültürlerine,
3. protoplast kültürlerine,
4. izole embriyolara,
5. izole organlara (kök uçları, filizlerin meristemleri).

Kontaminasyon kolaylığı, özel besiyeri gereksinimi, fiziksel faktörlerin etkisi gibi dezavantajlar bu tip biyokatalizörlerin kullanımını zorlaştırmaktadır (Demirci 2000; Bolta ve ark., 2000; Lucumi ve ark., 2002; Zhan ve ark., 2005; Sakamaki ve ark., 2004; Moyano ve ark., 2007; Sakamaki ve ark., 2005; Thangavel ve ark., 2007; Chiang ve Abdullah, 2007; Zhu ve ark., 2000; Kouakou ve ark., 2006; Gadzovska ve ark., 2007; Matsuura ve ark., 2002; Kutney, 1997; Dai ve ark., 2002; Wang ve ark., 2007; Sánchez-Sampedro ve ark., 2007; Lindmark-Henriksson ve ark., 2004; Furuya ve ark., 1998; Tsyrenov, 2003).

c) Hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri

Hayvan hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, sadece yapı ve fizyolojisinin aydınlatılmasıyla sınırlı kalmayıp, farklı fizyolojik, biyokimyasal ve immünolojik proseslerle ilgili bilgi eldesine yardımcı olmuştur. Hayvan hücreleri, insanlar için çok miktarda yararlı kimyasal madde üretmektedir, örneğin, enzimler (urokinaz), hormonlar, büyüme faktörleri ve immünoregülatörler (interlökin ve interferon). Canlı hayvan çalışmalarına örnek olarak solucan, fare, rat, tavşan, balık ile yapılanlar verilebilir. Bitki kullanımında geçerli olan başta kontaminasyon (kimyasal ve biyolojik) ve uygun besiyeri seçimi olmak üzere tüm olumsuzluklar hayvan kullanımında da geçerlidir (Demirci, 2000; Ask ve ark., 2006; Merlanti ve ark., 2007; Montesissa ve ark., 2004; Livingstone, 1998; Czech ve ark., 2004; Oertel ve ark., 2007; Asai ve ark., 2004; Coldham ve ark., 1999;).

d) İnsan hücresi

İnsan vücudunda yaşam için gerekli sayısız kompleks biyolojik aktiviteler gerçekleşmektedir. Hedeflenen hücreler izole edilerek vücut dışında yaşatılıp biyotransformasyon amacıyla kullanılmaktadırlar (Gómez-Lechón ve ark., 2007; Schmelzer ve ark., 2006).

B) Hücresiz Preparatlar (Enzimler)

IUB (International Union of Biochemistry) İsimlendirme Komitesi tarafından enzimler 6 ana grup altında toplanmıştır (Davis ve ark., 1989; Hanson, 1995; Buchholz ve ark., 2005):

1. *Oksidoredüktazlar*: Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları gerçekleştirirler. Oksijenin C-C bağlarına bağlanmasının ve alkenlere eklenmesinin yanısıra hidrojenin eklenmesinden ve çıkarılmasından,
2. *Transferazlar*: Açıl veya şeker grupların substratlar arası taşınmasından,
3. *Hidrolazlar*: Amitlerin, epoksitlerin, esterlerin ve nitrillerin hidrolizi ve oluşumundan,

4. *Liyazlar*: Alken, imin, ve karbonil gruplarına HX gibi ($X \neq OH$) fonksiyonel grupların eklenmesinden,
 5. *İzomerazlar*: Epimerizasyon, rasemizasyon gibi izomerizasyon reaksiyonlarının katalizlenmesinden,
 6. *Ligazlar*: C-C, C-O, C-S ve C-N bağlarının oluşumundan sorumludurlar.

Bu enzimlerin canlılardan izole edilerek biyotransformasyon araştırmalarında kullanılması hücre sistemlerine üstünlükleri göstermekte ise bazı olumsuzlukları da bulunmaktadır. Bunlar karşılaştırmalı olarak Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Bütün hücre sistemleri ile hücre dışı preparatların biyokatalizör olarak karşılaştırılması

Biyokatalizör	Avantaj	Dezavantaj
Bütün hücre sistemleri	-ucuz -enzim kofaktörler mevcut -tek hücrede çok sayıda enzim bulunmaktadır -çözücülerle etkileşebilir -birden fazla reaksiyon	-özel düzenek ve mikrobiyoloji tecrübesine ihtiyaç var -besiyerinden gelen fazla miktarda yan metabolit -preparatif çalışmalarda metabolitin sudan izolasyon zorluğu -birden fazla reaksiyon
Hücre dışı preparatlar (enzimler)	-seçici reaksiyonlar yapma imkanı -basit düzenek -çözücülere karşı dayanıklı olabilir -metabolitlerin ekstraksiyon ve izolasyonu kolay	-pahalı -kofaktörlere ihtiyaç var -tek tip reaksiyon

Doğal Bileşiklerin Biyotransformasyonu

Doğal maddelerin araştırılması Farmakognozi biliminin çalışma alanıdır. Biyokatalizör (mikroorganizma, enzim, canlı hücre ve/veya doku) aracılığıyla gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan maddeler de doğal oldukları için Farmakognozi’nin içinde yer almaktadırlar. Doğal maddeler içinde ilaç etken maddeleri yanında koku ve tat vericiler ile gıda katkı maddeleri de yer almaktadır. Son yıllarda artan, hem tüketiciler tarafından doğal kaynaklı ürün tüketme hem de ticari ürün geliştiricilerin ürünlerinde doğal madde kullanma eğilimi ve günlük yaşamımızda koku ve tat maddelerin sıklıkla kullanılması, biyotransformasyonun önemini arttırmaktadır. Doğal koku ve tat maddeleri için uçucu yağlar kaynak olarak gösterilebilir. Uçucu yağlar ise monoterpen ve seskiterpenlerden, kısmen de diterpenlerden oluşmaktadır. Tez çalışmada kullanılan *p*-simen monoterpen yapısında olması nedeniyle monoterpenler hakkında kısa bir bilgi verilmiştir.

Monoterpenler

İzoprenler, mevcut doğal maddelerin en kapsamlı gruplardan biridir ve 30.000 bilinen bileşiğin yapıtaşını oluşturmaktadır (Başer ve Demirci, 2007). Çok sayıda biyokimyasal fonksiyonları bilinmektedir. Elektron taşıma zincirlerinde kinon

yapısında, membran bileşenlerinde (arkabakterideki prenillipidler, ökaryotlar ve öbakterilerde steroller), hücrealtı (subcellular) hedefleme ve regülasyonda (proteinlerin prenilasyonu-hidrofobik moleküllerin katılımı), fotosentetik pigmentlerde (karotenoidler, klorofil yan zincirleri), hormonlar (gibberellinler, brassinosteroidler, absisik asit) ve bitki koruma bileşiklerinde bulunmaktadırlar (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler).

Monoterpenler 10 karbonlu iki izopren iskeletinden oluşmaktadır. Uçucu yağların ve oleozinlerin karakteristik bileşenleridir. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin salgı sistemlerinde depolanırlar, diğer bitkilerde ise minör metabolitler olarak bulunurlar. (Başer ve Demirci, 2007; Lange ve ark., 2000; Liu ve ark., 2005) .

Monoterpenlerin Biyosentezi

Monoterpenlerin biyosentezinin izoprenden gerçekleştiği bilinmektedir. İzoprenoit sentezi mevalonik asit (Şekil 8) ve 1-deoksi-*D*-ksiluloz 5-fosfat (Şekil 9) olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Her iki yolun sonunda, monoterpen sentezi için substrat olan geranil difosfat oluşmaktadır (Liu ve ark., 2005; Croteau, 1987; Eisenreich ve ark., 2004; Sponsel, 2002; Hanson, 2001).

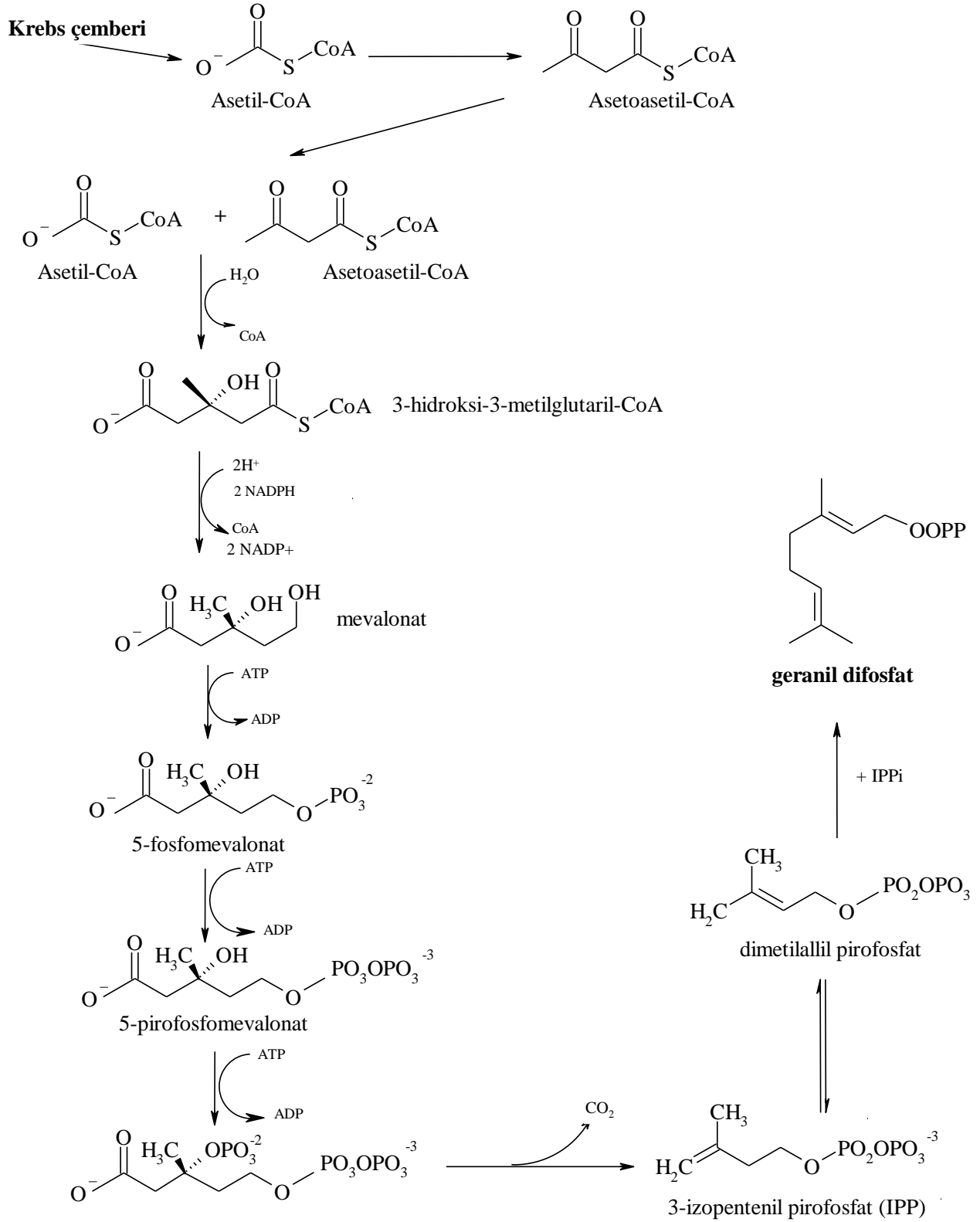
a) Mevalonik asit yolu

Sitozollerde gerçekleşmektedir. Fotosentezle üretilen glikoz, glikolizis ile asetil koenzim A'ya dönüşmektedir. Asetil-CoA, asetoasetil-CoA'ya dönüştükten sonra ikisinin birleşmesi sonucu 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) oluşmaktadır. HMG-CoA'nın indirgenmesi sonucu oluşan mevalonik asit'le reaksiyon devam edip, 3-izopentenil pirofosfat'ın dimetilallil pirofosfata izomerleşerek geranil difosfata dönüşmesiyle son bulmaktadır. Şekil 8'de ayrıntılı reaksiyon yer almaktadır.

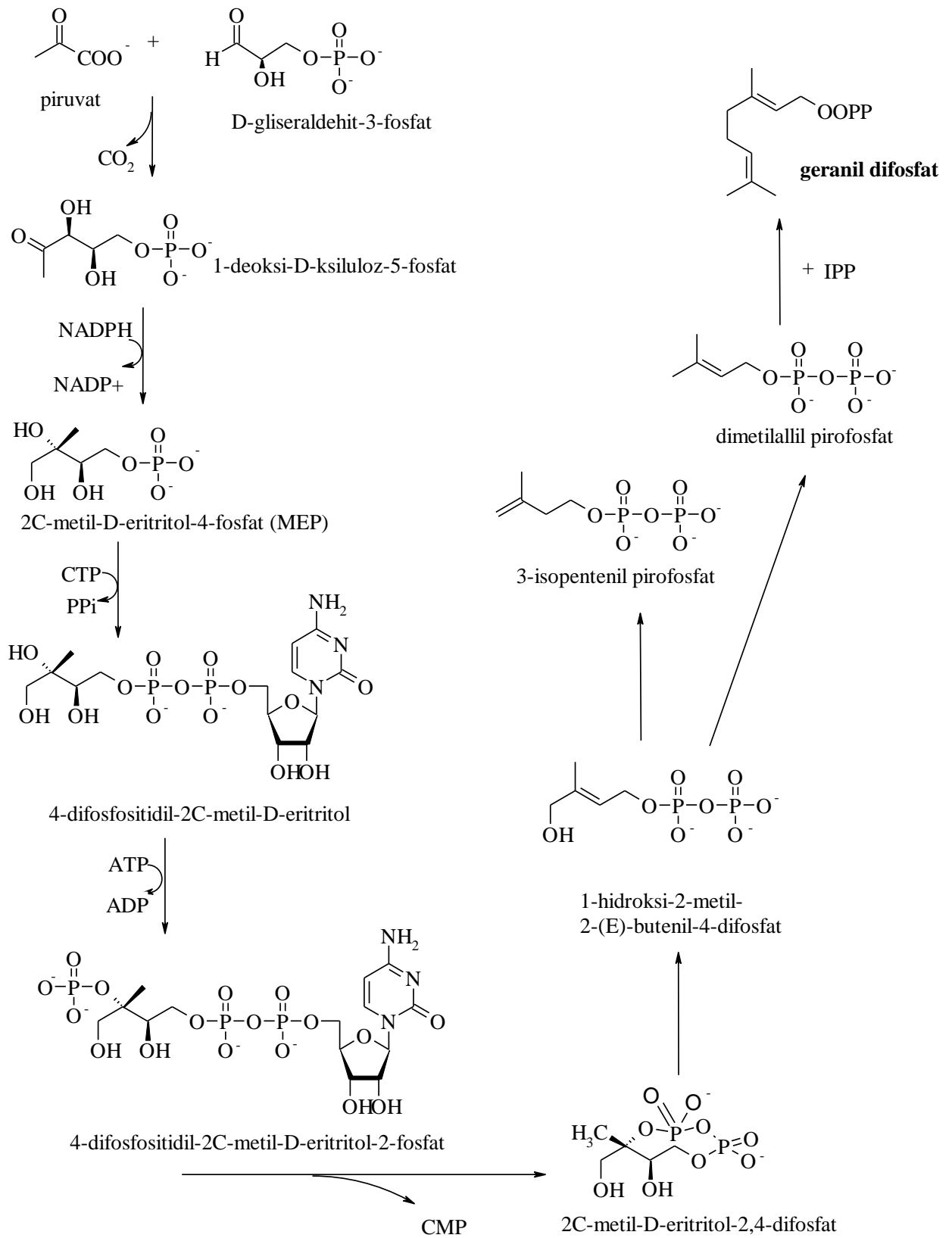
b) 1-deoksi-*D*-ksiluloz 5-fosfat yolu

Plastitlerde gerçekleşmektedir. Piruvat ve gliseraldehit 3-fosfat'ın 1-deoksi-*D*-ksiluloz 5-fosfat'a dönüşmesiyle başlamaktadır. (*E*)-4-hidroksi-3-metil-but-2-enil pirofosfat'ın izopentenil pirofosfat'a ve dimetilallil pirofosfat'a dönüşüp, son iki bileşikten de geranil difosfat oluşumuyla reaksiyon son bulmaktadır. Şekil 9'da ayrıntılı reaksiyon açıklanmaktadır.

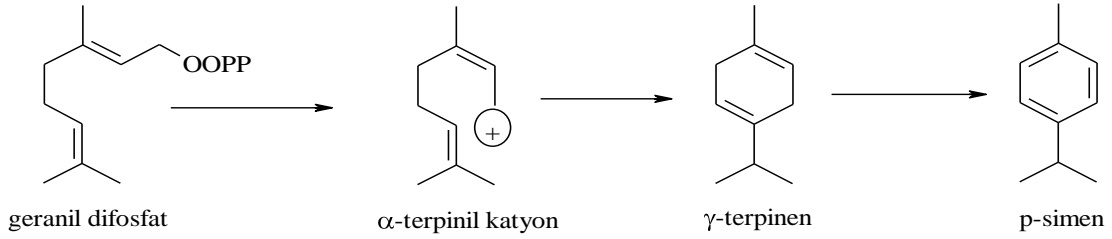
Geranil difosfattan monoterpen ve *p*-simen biyosentezi Şekil 10'da verilmektedir



Şekil 8. Mevalonik asit yolağı



Şekil 9. 1-deoksi-D-ksiluloz 5-fosfat yolağı

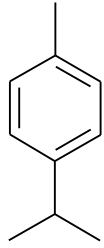


Şekil 10. Monoterpenler ve *p*-simen biyosentezi

p-Simenin Yapısı ve Özellikleri

Sinonimleri: 1-izopropil-4-metil-benzen; kamfogen;
p-metil-kumen; simen; simol; dolsimen;
p-izopropilmetilbenzen; 4-izopropil-1-metilbenzen;
p-izopropiltoluene; *p*-metilizopropil benzen;
 1-metil-4-izopropilbenzen; parasimen; parasimol

Formülü:



$C_{10}H_{14}$; MA: 134.22 g/mol

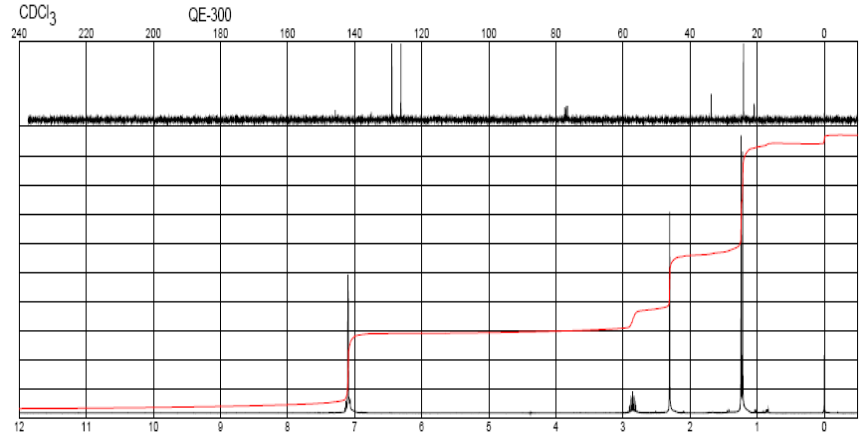
Bitkiler aleminde bulunuşu: Familya: Apiaceae, Hemerocallidaceae, Orchidaceae, Ruscaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Caryophyllaceae, Nyctaginaceae, Cucurbitaceae, Cycadaceae, Zamiaceae, Dipsacaceae, Lecythidaceae, Primulaceae, Theophrastaceae, Fabaceae, Apocynaceae, Gentianaceae, Rubiaceae, Geraniaceae, Oleaceae, Calycanthaceae, Lauraceae, Annonaceae, Magnoliaceae, Malvaceae, Thymelaeaceae, Nelumbonaceae, Berberidaceae, Moraceae, Rosaceae, Meliaceae, Solanaceae, Musaceae (http-3)

Bitkiler: *Angelica archangelica* L. [Apiaceae] (Kök)
Juniperus virginiana L. [Cupressaceae] (Yaprak)
Myristica fragrans HOUTT. [Myristicaceae] (Tohum)
Nigella sativa L. [Ranunculaceae] (Tohum)
Phyllanthus niruri L. [Euphorbiaceae] (Yaprak)
Tagetes minuta L. [Asteraceae] (Bitki) (http-4)

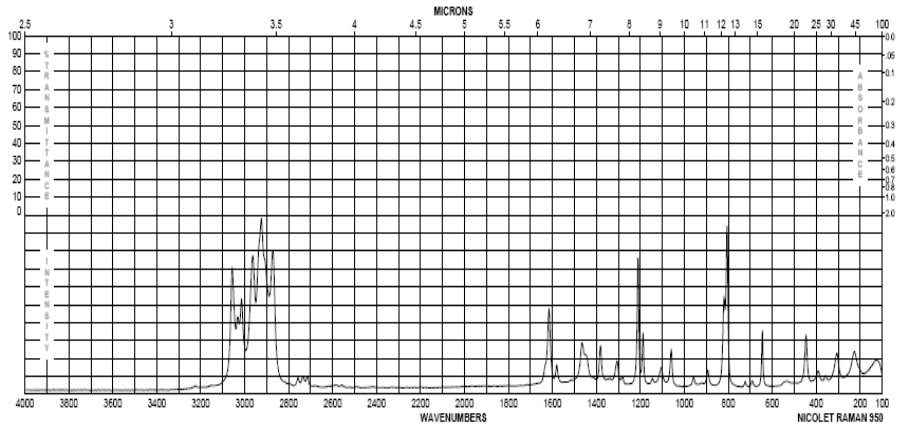
CAS No: 99-87-6

Fiziko Kimyasal Özellikleri : KN: 176-178 °C; EN: -68 °C ;
 Çözünürlük: aseton, etanol, eter, metanol
 d: 0.86 g/mL;
 n_D^{20} : 1.491

FT-NMR :



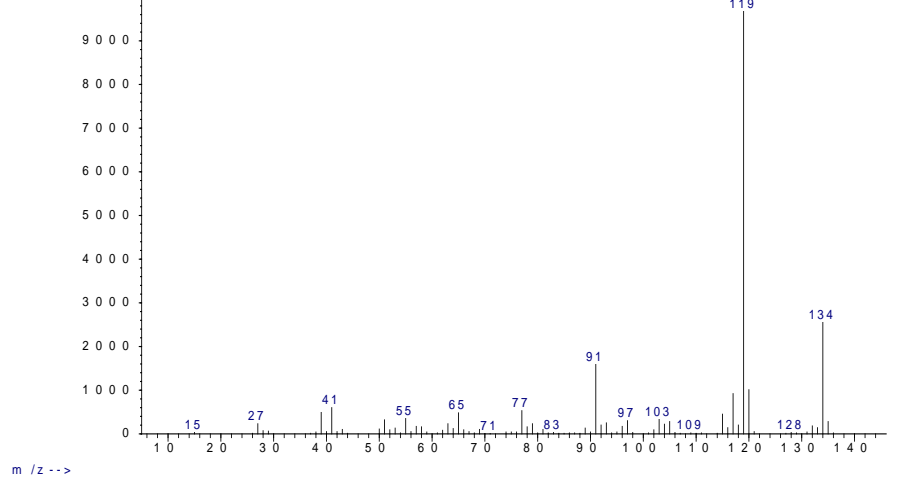
FT-IR RAMAN :



Kütle Spektrumu

Abundance

methyl-4-(1-methylethyl)-; p-Cymene; p-Cimene; p-Cymol; p-Isopropyltoluene; p-Methylisopropylbenzene; Camphogen; Dolcymene;



Fiyatı:

29.30 Euro/L - 17.20 Euro/mL

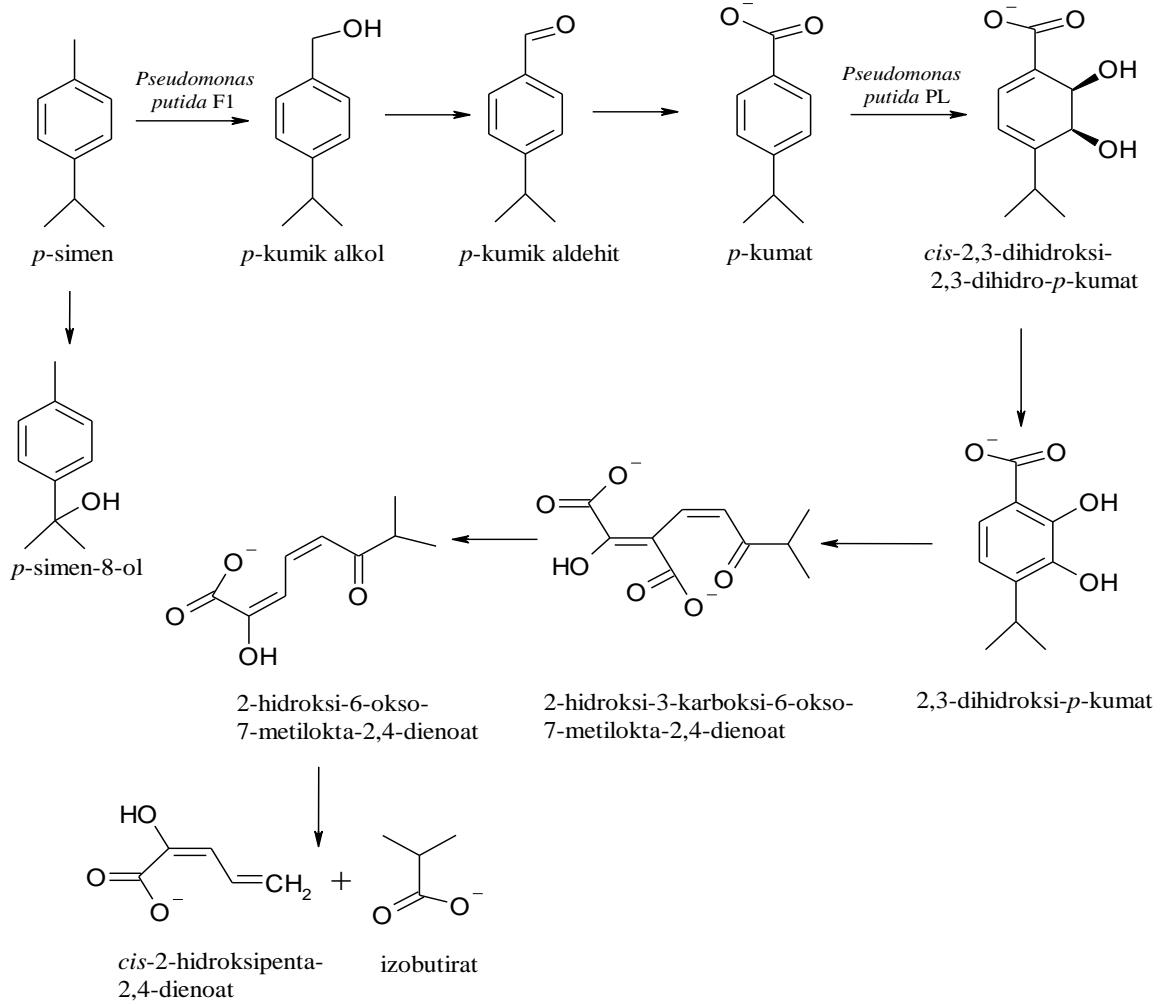
Kaynak:

[Sigma-Aldrich] <http://www.sigmaaldrich.com> (25.05.2007)

p-Simenin Biyotransformasyonu

Doğada çok yaygın ve ucuz olmasına rağmen, *p*-simen substrat olarak kullanıldığı sınırlı sayıda mikrobiyal biyotransformasyon çalışması yapılmıştır. Bir *Pseudomonas putida* F1 türü ile *p*-simen'in oksidasyonu sonucu kuminik asit oluşumu bildirilmiştir. Ayrıca, *Pseudomonas putida* PL türü ile bir seri

biyotransformasyon reaksiyonu araştırılmıştır. *p*-Simen biyotransformasyonu Şekil 11’da verilmiştir (Eaton, 1997; DeFrank ve Ribbons, 1977; http-2). Oluşan metabolitler: *p*-simen-8-ol, *p*-kumik alkol, *p*-kumik aldehit, *p*-kumat, *cis*-2,3-dihidroksi-2,3-dihidro-*p*-kumat, 2,3-dihidroksi-*p*-kumat, 2-hidroksi-3-karboksi-6-okso-7-metilokta-2,4-dienoat, 2-hidroksi-6-okso-7-metilokta-2,4-dienoat, *cis*-2-hidroksipenta-2,4-dienoat, izobutirat.



Şekil 11. *p*-Simen biyotransformasyonu

GEREÇLER ve YÖNTEM

Bu bölümde biyotransformasyon araştırmalarında kullanılan materyaller, mikroorganizmalar, kimyasal maddeler, çözücüler, aletler ve deneysel çalışmalarla ilgili genel bilgiler verilmiştir.

Materyaller, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar Gereçler

- *p*-Simen (Sigma-Aldrich)

Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- *n*-Hekzan
- Etilasetat (EtOAc)
- Glikoz (Fluka)
- Sodyum hipofosfat (Na₂HPO₄)
- Yeast Extract (Fluka)
- Sodyum klorür (NaCl)
- Püskürtme ile kurutulmuş mısır koçanı tozu (Spray dried corn steep) SOLULYS® (Roquette)
- Sülfürik asit (Merck)
- Anisaldehit (Fluka)
- Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Fluka)
- Hazır İTK plakları (Silikajel) (alüminyum destek, Merck, 0.25 mm)
- β-Siklodekstrin -KLEPTOSE® (Roquette)
- Pepton (Fluka)
- Metanol
- Asetik asit

Aletler

- Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GC/MS), [Agilent Technologies]
- Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GC/MS), [Thermo]
- Otoklav [Hirayama]
- Laminar Akış Kabini [Esco]
- Çalkalayıcılı İnkübatör [New Brunswick]
- İnkübatör [Heraeus]
- Hızlı Vakumlu Yoğunlaştırıcı [Labconco]

Materyalin β-Siklodekstrin'e Emdirilmesi

Ön denemeler sonucu, uçucu olması nedeniyle *p*-simen'in β-siklodekstrin'e emdirilerek besiyerine eklenmesi uygun görülmüştür (Trichard, 2006). 1.5-2 ml *n*-hekzan'da çözünen *p*-simen üzerine 3-5 katı β-siklodekstrin ilave edilmiştir. Karıştırılarak *n*-hekzan'ın uzaklaşması sağlanmıştır.

Mikroorganizmalar

Biyotransformasyon çalışmalarında, Farmakognozi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu'ndan kullanılan mikroorganizmaların listesi Çizelge 2'de verilmektedir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların listesi

NO	Mikroorganizma	Suş No
1.	<i>Alternaria alternata</i>	NRRL 20593
2.	<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 317
3.	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549
4.	<i>Aspergillus niger</i>	izolat 1
5.	<i>Aspergillus niger</i>	izolat 2
6.	<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 326
7.	<i>Botrytis cinerea</i>	AHU 9424
8.	<i>Cellulomonas flavigena</i>	ATCC 482
9.	<i>Corynespora casseiicola</i>	DSM 62474
10.	<i>Corynespora casseiicola</i>	DSM 62475
11.	<i>Fusarium culmorum</i>	Anadolu Ü. Fen.Fak. Biyoloji Böl.
12.	<i>Fusarium heterosporum</i>	DSM 62719
13.	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374
14.	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 1284
15.	<i>Hansenula anomala</i>	ATCC 20170
16.	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NRRL Y-8279
17.	<i>Mucor rammannianus</i>	ATCC 1839
18.	<i>Neurospora crassa</i>	N24
19.	<i>Neurospora crassa</i>	Wild type
20.	<i>Penicillium adametzii</i>	NRRL 737
21.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NRRL 792
22.	<i>Penicillium claviforme</i>	MR376
23.	<i>Penicillium expansum</i>	Balikesir Üniv. Biyoloji Böl.
24.	<i>Penicillium sp.</i>	Tokushima Üniv. Eczacılık Fak.
25.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Balikesir Üniv. Biyoloji Böl.
26.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	BKM-F-1767
27.	<i>Pseudomonas putida</i>	NRRL B-4067
28.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Ankara Ziraat Araştırma Merkezi
29.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
30.	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	ATCC 11385
31.	<i>Thamnidium elegans</i>	ATCC 18191
32.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	NRRL Y-866
33.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Anadolu Ü. Fen.Fak. Biyoloji Böl.
34.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ATCC 8661
35.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	NRRL YB-423

ATCC-American Type Culture Collection (Amerika BD); NRRL-Northern Regional Research Lab. Agricultural Res. Service C.C. (USDA) (Amerika BD); DSM- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Almanya) ;

YÖNTEM

Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması

Mikroorganizmalar Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), Müller Hinton Agar (MHA) katı besi yerlerinde eğik tüp, Petri kabı ya da liyofilize halde orijinal kültür koleksiyonlarından (ATCC/ NRRL) temin edilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca toprak, su, bitki numunelerinden özel teknikler ile izole edilen mikroorganizmalar birkaç pasajlama işleminden sonra saflaştırılarak koleksiyona kazandırılmıştır. 1 ml %10'luk gliserol içeren kapaklı Eppendorf tüpler içine aktarılan stok mikroorganizmalar ise -85°C'de muhafaza edilmiştir. Eğik besi yerlerinde saklanan mikroorganizmalar 6 aylık periotlarla canlandırılmıştır.

Mikroorganizma İnokülasyonu

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

Sıvı Besi Yeri

Mikroorganizmalar yeterli büyüklüğe ulaştığında, biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, agarlı katı besi yerinden, sıvı besi yerine transfer edilmiştir. Kullanılan sıvı besi yeri:

α -Medyum besi yeri

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

Katı Besi Yeri

SGA besiyeri orijinal ambalajındaki tarife uygun olarak hazırlanmıştır. Steril edilerek petri kaplarına dökülmüştür.

Sterilizasyon

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

Mikroorganizmaların İmhası

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

Biyotransformasyon Çalışmaları

α -Medyum ve SGA ile olmak üzere 2 çalışma yapılmıştır.

α -Medyum ile çalışmalar

250 ml'lik Erlen'lerde bulunan 100 ml steril sıvı besi yerine, laminar akış kabininde, oda sıcaklığında, tazelenmiş mikroorganizma öze ucu dolusu miktarda inoküle edilmiştir. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümesi sağladıktan sonra (24-48 saat) bu besi yeri üzerine p-simen, besi yeri miktarına bağlı olarak %1-10 oranlarında ilave edilmiştir. 26°C, 200 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmış ve 1., 3., 5., 7., 10., ve 14. günlerde örnekleme yapılmıştır.

SGA ile çalışmalar

14 cm çapında Petri kabında bulunan SGA besiyerine *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767), 4 öze dolusu miktarda inoküle edilmiştir. Yeterince büyüerek ve kabının tamamını kaplaması gerçekleştikten sonra (3-5 gün), β -siklodekstrin'e emdirilmiş p-simen, SOLULYS® ile karıştırılarak elek vasıtasıyla, mikroorganizmanın üzerine eklenmiştir. 28°C'de etüve inkübasyona bırakılmış ve 1., 3., 5. ve 7. günlerde örnekleme yapılmıştır.

Kontrol

Tüm biyotransformasyon çalışmalarında kontrol olarak, aynı koşullarda hazırlanmış ve saklanmış sıvı besiyeri durumunda besi yeri + mikroorganizma + β -siklodekstrin, katı besiyeri durumunda ise besi yeri + mikroorganizma + β -siklodekstrin + SOLULYS® bulunduran kaplar (Erlen veya Petri kabı) kontrol olarak kullanılmıştır. Bu kontrol ile transformasyonun gerçekleştirildiği besi yeri karşılaştırılarak metabolitlerin gerçek mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığı belirlenmiştir.

Metabolitlerin Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon

Metabolit oluşumunu izlemek amacıyla yapılan işlemdir. Steril koşullar altında, önceden 2 ml EtOAc ilave edilmiş deney tüplerine steril uçlu pipetörler ile biyotransformasyon besi ortamından 2 ml aktarılmış, 15-20 saniye vorteks kullanarak karıştırılmıştır. EtOAc'lı üst faz, başka bir pipet bir numune kabına aktarılarak bu işlem toplam 3 kere tekrarlanmıştır. 39°C'de vakuumlu hızlı karıştırıcı kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır. İTK veya GC/MS sistemi ile metabolit varlığı kontrol edilmiştir.

Metabolit Varlığının Tespiti

İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Analitik İTK

Aluminyum destek üzerine, 0.2/0.25 mm kalınlığındaki silikajel 40/60 GF₂₅₄ kaplanmış 20x20 cm ebatlarında hazır plaklar kullanılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında, nemsiz ve karanlık özel muhafazalı kutularında saklanmıştır. Uygun çözücü sistemlerinde (Çizelge 3) sürüklenen numuneler kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak anisaldehit/H₂SO₄ + ısı (120°C de 3-5 dakika) kullanılmıştır.

Çizelge 3. İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri

<i>Çözücüler</i>	<i>Oranları</i>
Hekzan : EtOAc	8:2
Hekzan : EtOAc	8:3
Hekzan : EtOAc:Aseton	7:3:1

Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi (GC/MS)

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ürünlerin kütle spektrumlarının alınması için bu sistem kullanılmıştır. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi analizlerinde Agilent 5975 GC-MSD sistemi, polar özellikteki HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 mikrometre film kalınlığı) ve taşıyıcı gaz olarak Helyum (0.8 mL/dak) kullanılmıştır. **A** sıcaklık programı uygulanmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C, split oranı 40:1'dir. 70 eV Enerjide ve *m/z* 35-450 kütle aralığında maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Thermo PolarisQ GC-MS sistemi, apolar özellikteki Teknokroma TRB-5MS kolon (30m x 0.32mm Ø, 0.25 mikrometre film kalınlığı) kullanılmıştır. Uygulanan sıcaklık programı **B**'dir.

Sıcaklık Programları:

A (polar kolon)

60 °C'de 10 dak,
4 °C/dak artışla 220 °C'ye,
220 °C'de 10 dak,
1 °C/dak artışla 240 °C'ye.

B (apolar kolon)

50 °C'de 0 dak,
20 °C/dak artışla 100 °C'ye,
100 °C'de 1 dak,
30 °C/dak artışla 145 °C'ye,
145 °C'de 2 dak,
40 °C/dak artışla 220 °C'ye,
220 °C'de 1 dak,
30 °C/dak artışla 300 °C'ye,
300 °C'de 5 dak.

Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" yanı sıra Wiley GC/MS, NIST, Adams ve MassFinder 3.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

p-Simen, 35 mikroorganizma ile bir önceki bölümde açıklanan metotlar kullanılarak biyotransformasyona bırakılmış, dönüşümlerin gerçekleşip gerçekleşmediği İTK ile kontrol edilmiştir. Mikroorganizmaların isimleri ve çalışmaların sonuçları Çizelge 4’te özetlenmiştir.

Çizelge 4. Materyallerin biyotransformasyonları için kullanılan mikroorganizmalar ve çalışmaların sonuçları

NO	Mikroorganizma	<i>p</i> -Simen (μ l)	Metabolit/ Adet	Not
36.	<i>Alternaria alternata</i>	50	-	
37.	<i>Aspergillus alliaceus</i>	100	+ / 2 *	<i>b</i>
38.	<i>Aspergillus niger</i>	50	-	
39.	<i>Aspergillus niger</i>	50	-	
40.	<i>Aspergillus niger</i>	50	-	
41.	<i>Aspergillus niger</i>	100	+ / 1 *	<i>b</i>
42.	<i>Botrytis cinerea</i>	50	-	
43.	<i>Cellulomonas flavigena</i>	100	-	
44.	<i>Corynespora casseiicola</i>	50	-	
45.	<i>Corynespora casseiicola</i>	50	-	
46.	<i>Fusarium culmorum</i>	50	-	
47.	<i>Fusarium heterosporum</i>	50	-	
48.	<i>Fusarium moniliforme</i>	50	-	
49.	<i>Fusarium solani</i>	100	-	
50.	<i>Hansenula anomala</i>	50	-	
51.	<i>Kluyveromyces lactis</i>	50	-	
52.	<i>Mucor rammannianus</i>	50	-	
53.	<i>Neurospora crassa</i>	50	-	
54.	<i>Neurospora crassa</i>	50	-	<i>b</i>
55.	<i>Penicillium adametzii</i>	50	-	
56.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	50	-	
57.	<i>Penicillium claviforme</i>	100	+ / 5	<i>b</i>
58.	<i>Penicillium expansum</i>	50	-	<i>b</i>
59.	<i>Penicillium sp.</i>	50	-	
60.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	50	-	
61.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	600	+ / 7	<i>b</i>
62.	<i>Pseudomonas putida</i>	50	-	
63.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	50	-	
64.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	-	
65.	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	100	-	

Çizelge 4. (Devam) Materyallerin biyotransformasyonları için kullanılan mikroorganizmalar ve çalışmaların sonuçları

66.	<i>Thamnidium elegans</i>	50	-	
67.	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	50	-	
68.	<i>Trichoderma harzianum</i>	50	-	
69.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	50	-	
70.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	50	-	

s : *p*-simen; b : substrat β -siklodextrin'e emdirilmiştir; + : transformasyon mevcut; - : transformasyon yok (İTK'ne göre); *-İTK'ne göre

***p*-Simen'in Mikrobiyal Transformasyonu**

35 mikroorganizma ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2'de özetlenen sonuçlara göre ancak 4 mikroorganizma ile metabolit oluşumu belirlenmiştir. Biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitlerin EI/MS değerleri ve kütle spektrumları ilgili başlıklar altında verilmiştir.

***Aspergillus niger* NRRL 326 ve *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 ile Mikrobiyal Transformasyon**

Bu mikroorganizmalarla biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler İTK de teşhis edilmelerine rağmen, polar ve apolar kolona sahip farklı GC/MS sistemlerinde teşhis edilememiştir. Uçucu özellikte olmadıkları düşünülmüştür. Tanımlanabilmeleri için ileriki çalışmalarda farklı kromatografik yöntemlerle teşhis edilmeleri ve saflaştırılmaları mümkün olabilecektir.

***Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 ile Mikrobiyal Transformasyon**

Bu mikroorganizma ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda polar kolona sahip GC/MS sistemi ve A sıcaklık programı kullanılarak 7 metabolit tespit edilmiş, sadece 2 tanesi tanımlanmıştır. Tanımlanan metabolitler : *p*-simen-8-ol ve kumin alkoldür. Tüm metabolitlerin kütle spektrumları Şekil 12-18'de verilmiştir.

***Penicillium claviforme* MR376 ile Mikrobiyal Transformasyon**

Bu mikroorganizma biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler İTK sisteminde belirlenmiştir. Polar kolona sahip GC/MS sisteminde gözlenememelerine karşın apolar kolona sahip GC/MS sisteminde B sıcaklık programı kullanılarak kütle spektrumları alınabilmiştir. Wiley ve NIST kütüphaneleri taraması sonucu spektrumları benzerlik gösteren bileşiklerin isimleri verilmiştir. Bu metabolitler: 3-methyl-fenol veya 2-methyl-fenol, feniletıl alkol, 3-hidroksi-benzaldehit veya 4-hidroksi-benzaldehit, 3-hidroksi-benzenmetanol, 2-metil-2-(4'-metoksifenil)pentanon-4 veya 3,9-Dihidroksi-6,10,10-trimetilbisiklo [4.4.0]dek-1-en-5-on'dur. Bu bileşiklerin kütle spektrumları Şekil 19-23'de verilmiştir.

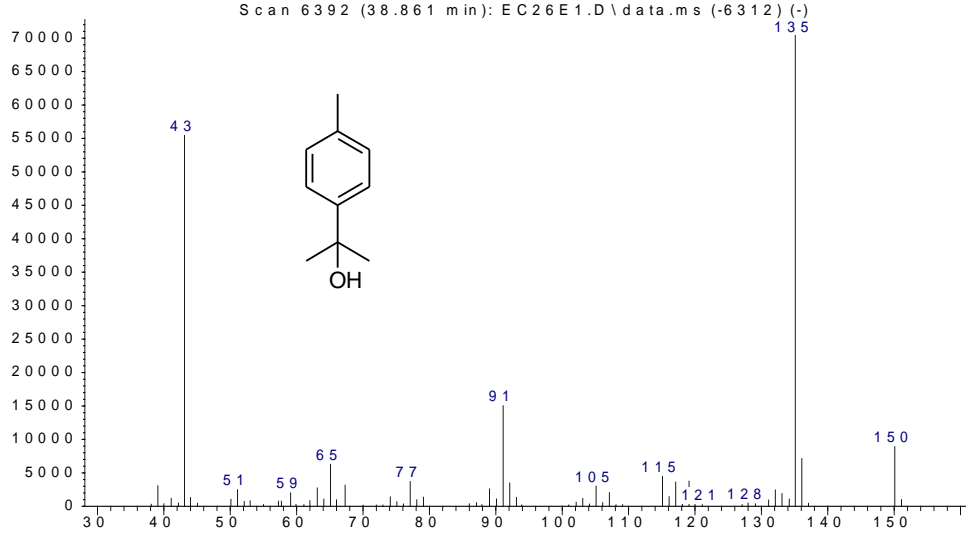
Metabolit No: 1 (M1)

Adı : *p*-simen-8-ol

EI/MS m/z : 150 (M^+), 135(100), 115, 105, 91, 77, 65, 59, 51, 43

Kütle Spektrumu : Şekil 12’de verilmiştir.

Abundance



Şekil 12. *p*-Simen-8-ol kütle spektrumu

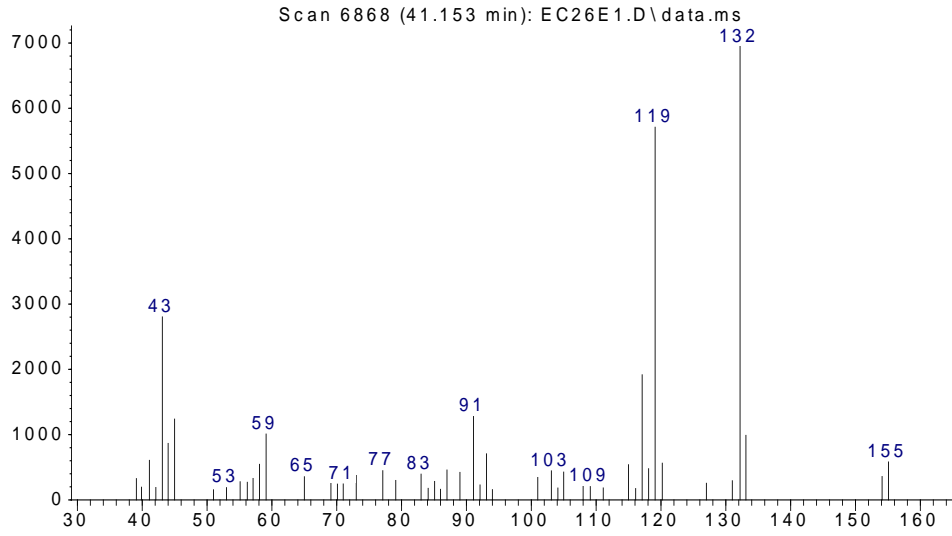
Metabolit No: 2 (M2)

Adı : tanımlanamadı

EI/MS m/z : 155 (M^+), 132(100), 119, 103, 91, 83, 77, 65, 59, 43

Kütle Spektrumu : Şekil 13’de verilmiştir.

Abundance



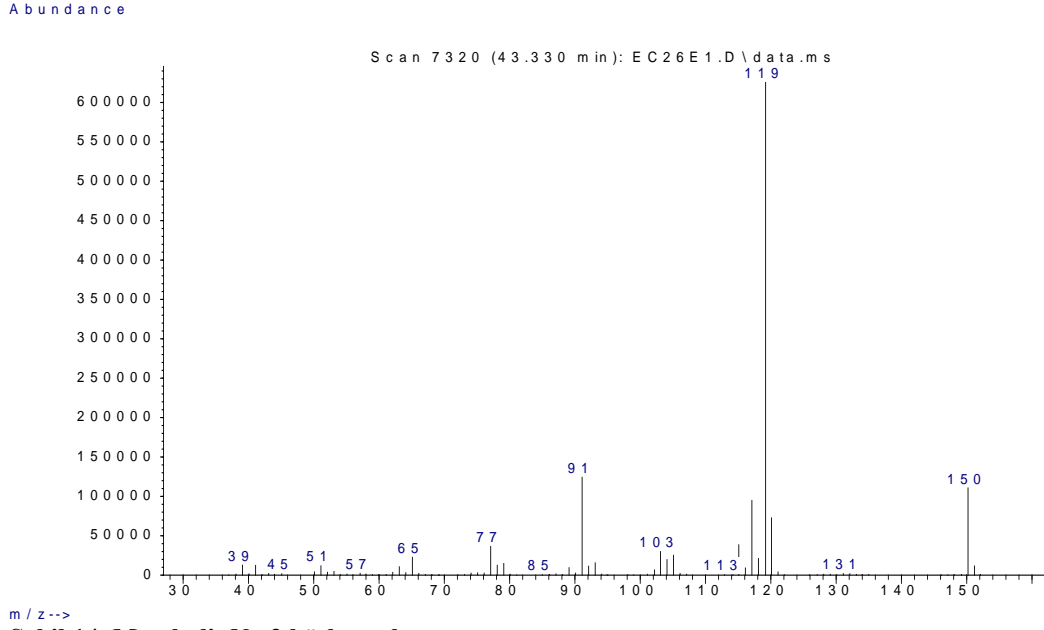
Şekil 13. Metabolit No 2 kütle spektrumu

Metabolit No: 3 (M3)

Adı : *p*-simen-9-ol kütle spektrumu ile benzerlik göstermiş, bu nedenle *p*-simenol olduğu düşünülmüştür (Riffle ve ark., 1991).

EI/MS m/z :150 (M^+), 119 (100), 117, 103, 91, 77, 65, 51, 39

Kütle Spektrumu : Şekil 14’de verilmiştir.



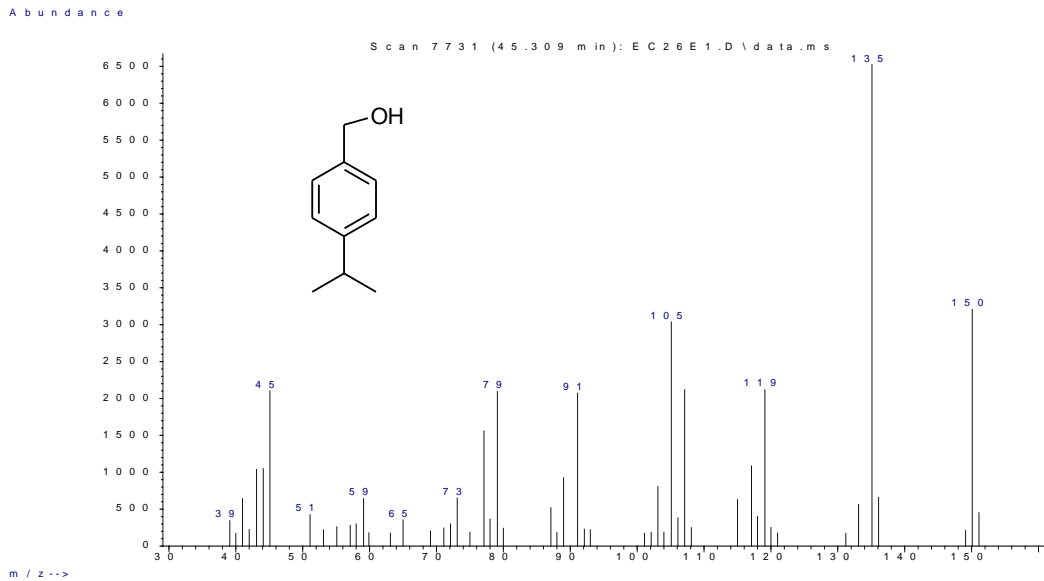
Şekil 14. Metabolit No 3 kütle spektrumu

Metabolit No: 4 (M4)

Adı : Kumin Alkol

EI/MS m/z :150 (M^+), 135 (100), 119, 105, 91, 79, 77, 73, 65, 59, 51, 45, 39

Kütle Spektrumu : Şekil 15’de verilmiştir.



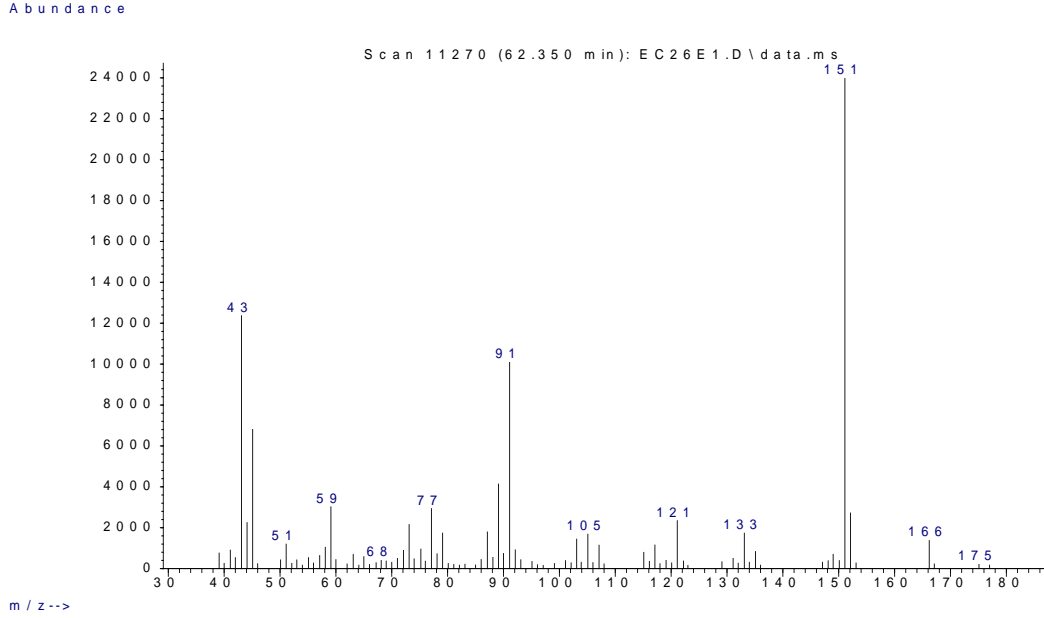
Şekil 15. Kumin alkol kütle spektrumu

Metabolit No: 5 (M5)

Adı : tanımlanamadı

EI/MS m/z : 166 (M^+), 151 (100), 133, 121, 105, 91, 77, 59, 51, 45, 43

Kütle Spektrumu : Şekil 16'da verilmiştir.



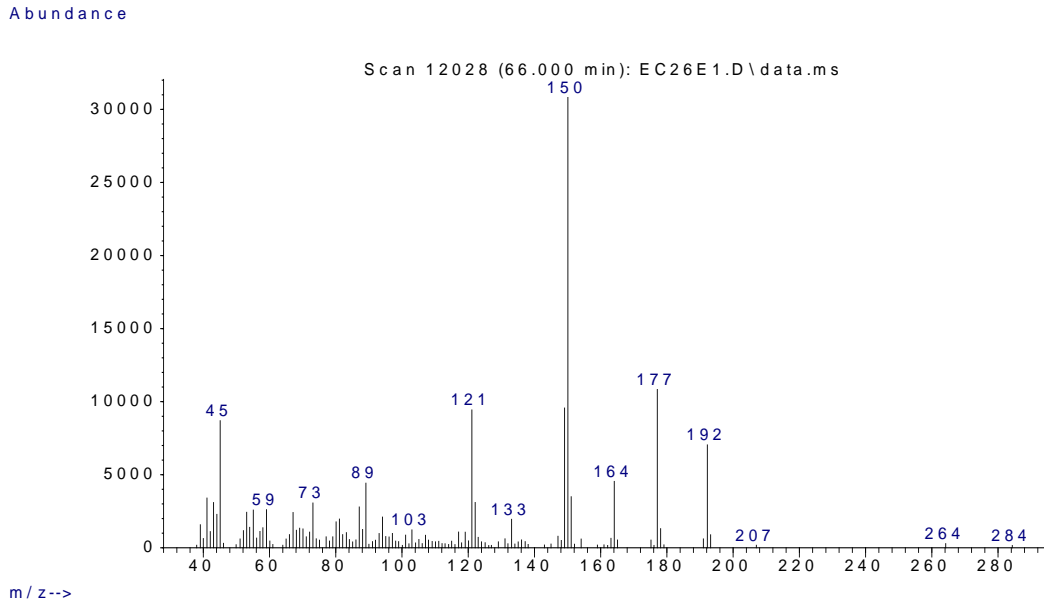
Şekil 16. Metabolit No 5 kütle spektrumu

Metabolit No: 6 (M6)

Adı : tanımlanamadı

EI/MS m/z : 192 (M^+), 177, 164, 150(100), 133, 121, 103, 89, 73, 59, 45

Kütle Spektrumu : Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 17. Metabolit No 6 kütle spektrumu

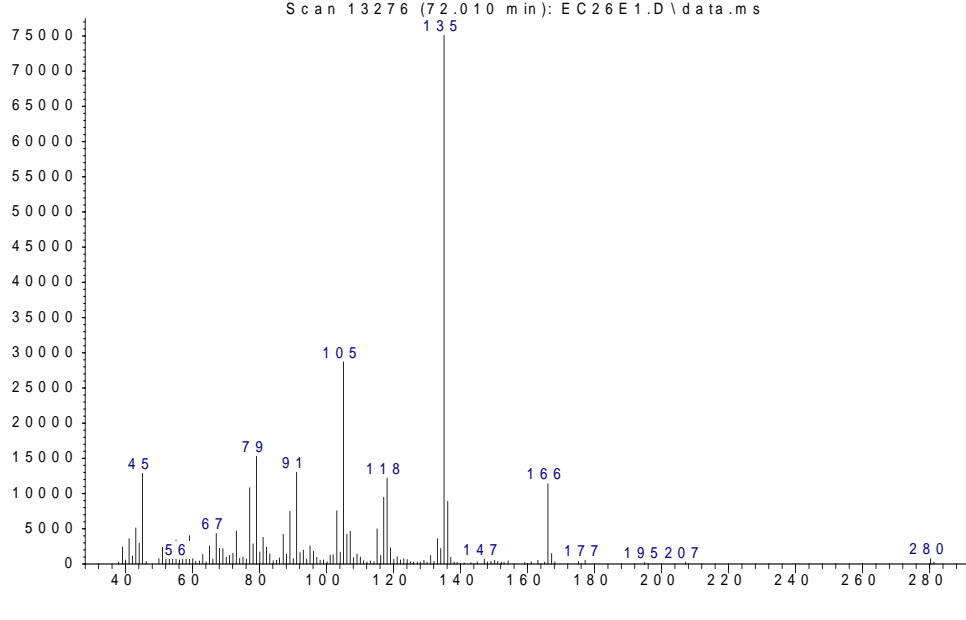
Metabolit No: 7 (M7)

Adı : tanımlanamadı

EI/MS m/z : 166 (M^+), 135(100), 118, 105, 91, 79, 67, 56, 45

Kütle Spektrumu : Şekil 18’de verilmiştir.

Abundance



Şekil 18. Metabolit No 7 kütle spektrumu

Metabolit No: 8 (M8)

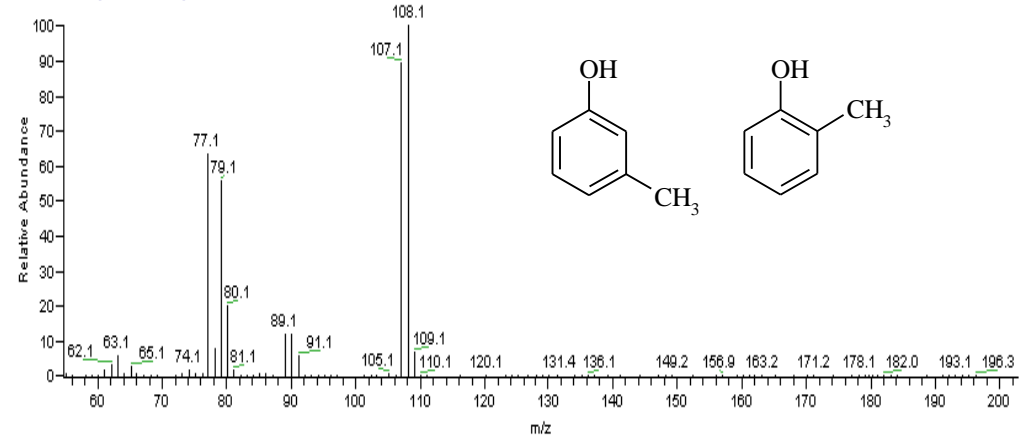
Kütüphane taraması sonucu çıkan benzer bileşikler :

Bileşik	Kütüphane
3-metil-fenol	Wiley7N
3-metil-fenol	NIST02
2-metil-fenol	Wiley7N

Kütle Spektrumu : Şekil 19’da verilmiştir.

EI/MS m/z : 110 (M^+), 109, 108(100), 107, 91, 89, 80, 79, 77, 74, 65, 63, 62

EC28C #74 RT: 3.74 AV: 1 AV: 5 SB: 12.67-72.76-81 NL: 1.56E5
T: + e Full ms [50.00-850.00]



Şekil 19. Metabolit No 8 kütle spektrumu

Metabolit No: 9 (M9)

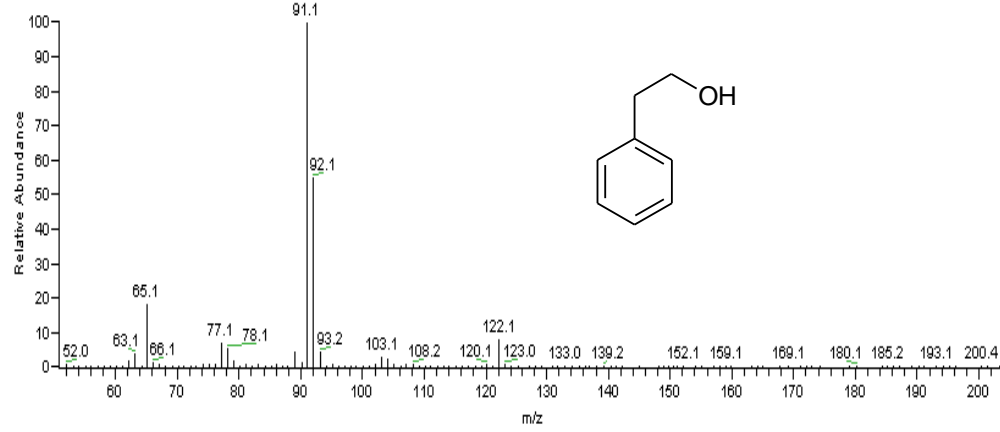
Kütüphane taraması sonucu çıkan benzer bileşikler :

Bileşik	Kütüphane
Feniletıl alkol	NIST02
Feniletıl alkol	Wiley7N

Kütle Spektrumu : Şekil 20’da verilmiştir.

EI/MS m/z : 122 (M^+), 103, 93, 92, 91(100), 78, 77, 66, 65, 63, 52

EC28C #117 RT: 4.17 AV: 1 NL: 4.03E4
T: + e Full ms [50.00-650.00]



Şekil 20. Metabolit No 9 kütle spektrumu

Metabolit No: 10 (M10)

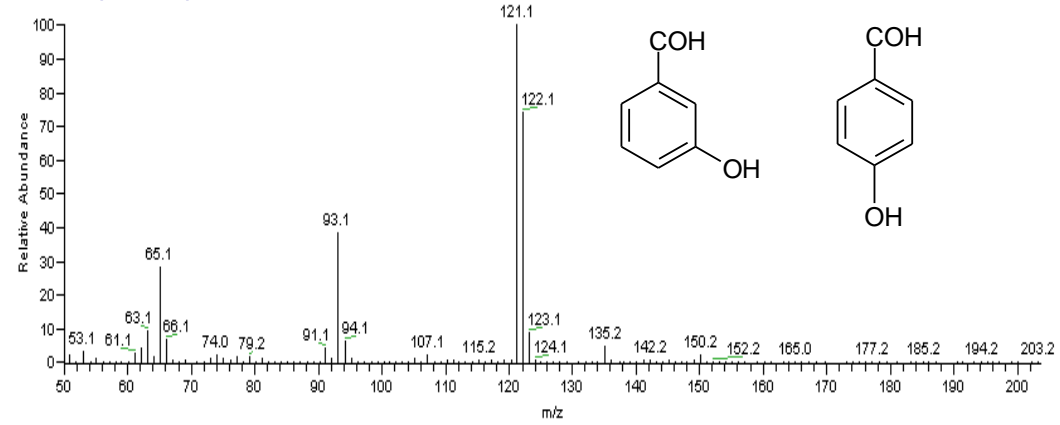
Kütüphane taraması sonucu çıkan benzer bileşikler :

Bileşik	Kütüphane
3-hidroksi-benzaldehit	Wiley7N
4-hidroksi-benzaldehit	Wiley7N

Kütle Spektrumu : Şekil 21’de verilmiştir.

EI/MS m/z : 150 (M^+), 135, 124, 123, 122, 121 (100), 107, 94, 93, 91, 79, 74, 66, 65, 63, 61, 53

EC28C #262 RT: 5.64 AV: 1 NL: 2.53E4
T: + e Full ms [50.00-650.00]



Şekil 21. Metabolit No 10 kütle spektrumu

Metabolit No: 11 (M11)

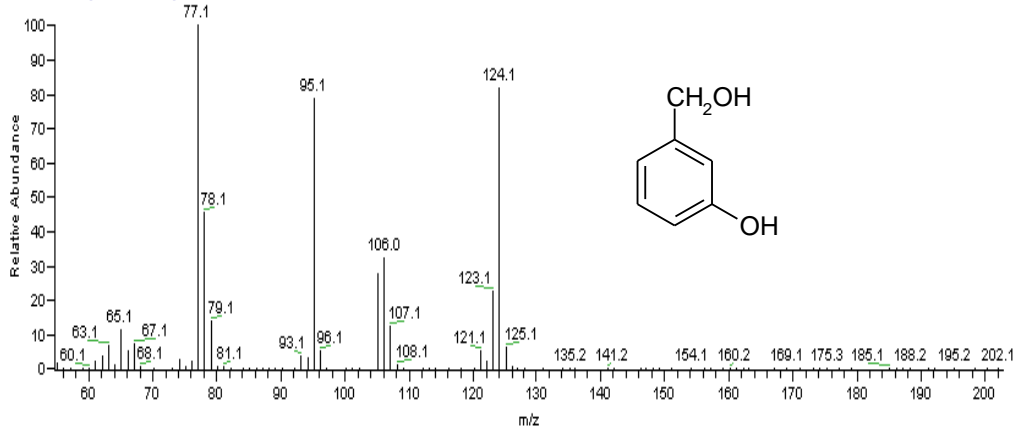
Kütüphane taraması sonucu çıkan benzer bileşikler :

Bileşik	Kütüphane
3-hidroksi-benzenmetanol	Wiley7N
3-hidroksi-benzenmetanol	NIST02

Kütle Spektrumu : Şekil 22’de verilmiştir.

EI/MS m/z : 125 (M^+), 124, 123, 121, 107, 106, 96, 95, 79, 78, 77 (100), 67, 65

EC28C #300 RT: 6.02 AV: 1 AV: 5 SB: 12 293-298 302-307 NL: 4.16E4
T: + c Full ms [50.00-650.00]



Şekil 22. Metabolit No 11 kütle spektrumu

Metabolit No: 12 (M12)

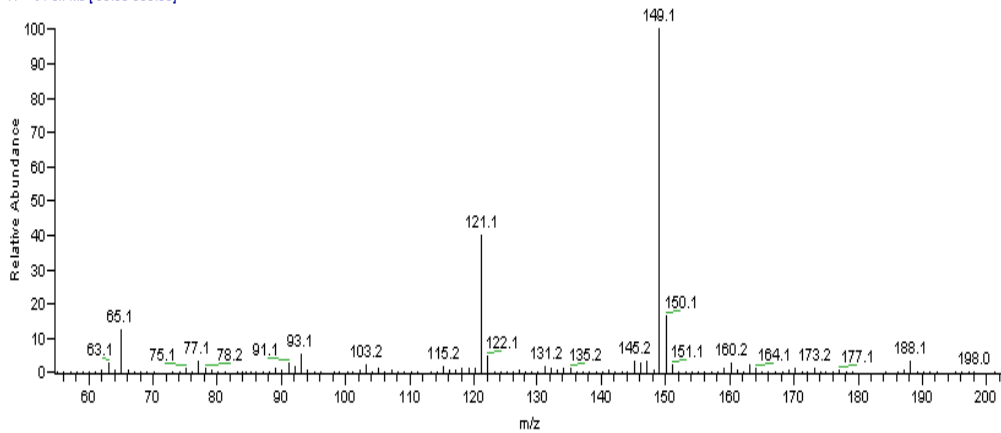
Kütüphane taraması sonucu çıkan benzer bileşikler :

Bileşik	Kütüphane
2-Metil-2-(4'-metoksifenil)pentanon-4	NIST02
3,9-Dihidroksi-6,10,10-trimetilbisiklo[4.4.0]dek-1-en-5-on	Wiley7N

Kütle Spektrumu : Şekil 23’de verilmiştir.

EI/MS m/z : 150 (M^+), 149(100), 145, 122, 121, 115, 103, 93, 91, 78, 77, 75, 65

EC28C #568 RT: 8.75 AV: 1 AV: 5 SB: 12 561-566 570-575 NL: 7.10E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]



Şekil 23. Metabolit No 12 kütle spektrumu

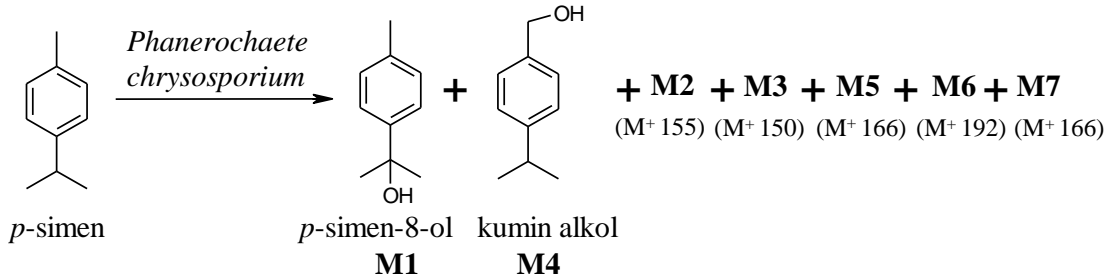
SONUÇ ve ÖNERİLER

Ticari olarak piyasada bulunan *p*-simen ile 35 farklı mikroorganizmanın biyotransformasyonu incelenmiş, oluşan metabolitler önce ince tabaka kromatografisi yöntemiyle izlenmiştir. Daha sonra metabolitlerin tanımlanabilmesi için gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemlerinden ve çeşitli kütüphanelerden yararlanılmıştır. Çizelge 4 de özetlendiği gibi sadece 4 mikroorganizma ile dönüşüm gerçekleşmiştir. Bu mikroorganizmalar *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium claviforme* ve *Phanerochaete chrysosporium* dur.

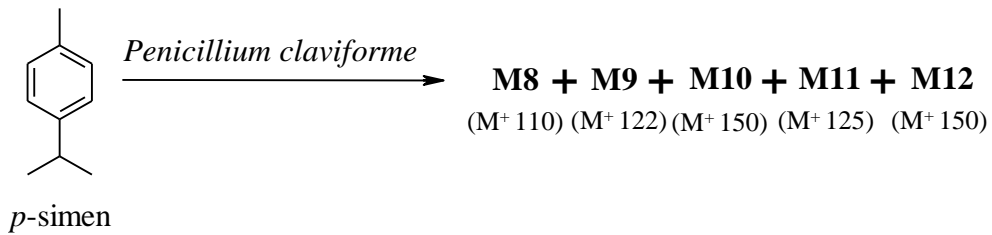
p-Simen'in *Aspergillus niger* NRRL 326 ve *Aspergillus alliaceus* NRRL 317 ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler İTK de dedekte edilmelerine rağmen, polar ve apolar kolona sahip farklı GC/MS sistemlerinde tespit edilememiştir. Uçucu özellikte olmadıkları düşünülmüştür. Tanımlanabilmeleri, ileriki çalışmalarda farklı kromatografik yöntemlerle teşhis edilmeleri ve saflaştırılmaları ile mümkün olabilecektir.

p-Simen'in *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 ile biyotransformasyonu sonucu toplam 7 metabolit oluşmuştur (metabolitler M1-M7; Şekil 24). Metabolitler GC/MS polar kolonda gözlenmiş, kütle spektrumları alınmış ve bunlardan sadece ikisi tanımlanmıştır. Tanımlanan metabolitler *p*-simen-8-ol ve kumin alkol'dür. Bu iki bileşik doğal bileşikler olup daha önce çeşitli uçucu yağların bileşiminde bulunuşları bildirilmiştir (Başer ve ark., 2006; Sagar ve ark., 2005; Salido ve ark., 2004).

p-Simen'in *Penicillium claviforme* MR376 ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitler GC/MS apolar kolonda gözlenmiş ve bu metabolitlerin kütle spektrumları verilmiştir (metabolitler M8-M12; Şekil 25).



Şekil 24. *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 ile *p*-simenin biyotransformasyonu



Şekil 25. *Penicillium claviforme* MR376 ile *p*-simenin biyotransformasyonu

Kaynak taramalarında rastlanan aktivite çalışmalarında, *p*-simenin *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* H37, *Candida albicans* M1, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida tropicalis* H18, *Candida glabrata* H16, *Candida glabrata* H30, *Candida krusei* H9, *Candida guilliermondii* MAT 23, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 mikroorganizmalarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), sırasıyla 0.16-0.32, 0.08-0.16, 0.16-0.32, 0.63, 0.16-0.32, 0.08-0.16, 0.32, 0.08-0.16, 0.16 µL/mL bulunmuştur (Pina-Vaz ve ark., 2004). Ayrıca zayıf antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir (Haraguchi ve ark., 1997).

Asetilkolinesteraz aktivitesi inhibisyonu çalışmasında *p*-simen, etkisiz bulunmuştur (Miyazawa, 1997).

Kumin alkol (*p*-simen-7-ol), yapılan çalışmada butillenmiş hidroksi anisol'ün (BHA) etkisine yakın güçlü antioksidan etki göstermiştir (Fadel ve ark., 1999).

Tanımlanamayan metabolitler için daha büyük ölçekte biyotransformasyon çalışmaları yapılarak bu metabolitlerin preparatif kromatografik yöntemlerle elde edilmeleri ve tanımlanmaları mümkün olacaktır. Tanımlanan metabolitler, kumin alkol ve *p*-simen-8-ol, bu çalışmada belirlenen mikroorganizmalar yardımıyla *p*-simen'den hareketle bol miktarda elde edilerek biyoaktiviteleri açısından değerlendirilebilecektir. Doğal yollarla elde edilen bu doğal bileşiklerin ilaç ve gıda ürünlerinde, ayrıca tad ve koku katkısı olarak gıdadan temizlik ürünlerine kadar çok çeşitli alanlarda değerlendirilmeleri de mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., Nagao, A., Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin in a mice and HEPG2 cells: Formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites, *Drug Met. Dispos.*, 32 (2), 205-211 (2004).

Ask, K., Décologne, N., Ginies, C., Låg, M., Boucher, J.L., Holme, J.A., Pelczar, H., Camus, P., Metabolism of nilutamide in rat lung, *Biochem. Pharm.*, 71, 377-385 (2006).

Başer, K.H.C., Demirci, F., *Chemistry of Essential Oils, Flavours and Fragrances*, R.G. Berger (Ed), Springer Berlin Heidelberg New York, 43-83 (2007).

Başer, K.H.C., Özek, G., Özek, T., Duran, A., Composition of the Essential Oil of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. Fruits Obtained by Microdistillation, *J. Essent. Oil Res.*, 18(5), 515-517 (2006).

Bolta, Z., Baričevič, D., Bohanec, B., Andrenšek, S., A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 62, 57-63 (2000).

Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T., *Introduction to enzyme technology, Biocatalysts and Enzyme Technology*, K. Buchholz, V. Kasche, U.T. Bornscheuer (Eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 18-19 (2005).

Chiang, L., Abdullah, M.A., Enhanced anthraquinones production from adsorbent-treated *Morinda elliptica* cell suspension cultures in production medium strategy, *Process Biochem.*, 42, 757-763 (2007).

Coldham, N.G., Howells, L.C., Santi, A., Montesissa, C., Langlais, C., King, L.J., Macpherson, D.D., Sauer, M.J., Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology, *J. Steroid Biochem. Molecular Biology*, 70, 169-184 (1999).

Croteau, R., Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids, *Chem. Rev.*, 87, 929-954 (1987).

Czech, E., Olszowy, Z., Nowicka, J., The influence of L-carnitine on methanol biotransformation in rats, *Exp. Toxic. Pathol.*, 55, 367-377 (2004).

Dai, J., Ye, M., Guo, H., Zhu, W., Zhang, D., Hu, Q., Zheng, J., Guo, D., Regio- and stereo-selective biotransformation of 2 α ,5 α ,10 β ,14 β -tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene by *Ginkgo* cell suspension cultures, *Tetrahedron*, 58, 5659-5668 (2002).

Davies, H.G. and Green, R.H., Kelly, D.R., Roberts, S.M., *Biotransformations in preparative organic chemistry, the use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis*, Academic Press Limited, London, (1989).

- DeFrank, J.J., Ribbons, D.W., *p*-Cymene pathway in *Pseudomonas putida*: Initial reactions, *J. Bacteriol.*, 129 (3), 1356-1364 (1977).
- Demirci, F., Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2000).
- Doble, M., Kruthiventi, A.K., Gaikar V.G., Introduction and Overview, Biotransformations and Bioprocesses, M. Doble, A.K. Kruthiventi, V.G. Gaikar (Eds), Marcel Dekker, Inc., New York, (2004).
- Eaton, R.W., *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate, *J. Bacteriol.*, 179 (10), 3171-3180 (1997).
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F., Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 1404-1426 (2004).
- Fadel H., Marx F., El-Sawy A., El-Ghorab A., Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils., *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208, 212–216 (1999)
- Furuya, T., Asada, Y., Mizobata, S., Matsuura, Y., Hamada, H., Biotransformation of *p*-aminobenzoic acid by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*, *Phytochem.*, 49 (1), 109-111 (1998).
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, J., Hagège, D., Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 89, 1-13 (2007).
- Gómez-Lechón, M.J., Castell J.V., Donato M.T., Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: *In vitro* variability as a reflection of *in vivo*, *Chem.-Bio. Inter.*, 168(1), 30-50 (2007).
- Hanson, J.R., An introduction to biotransformations in organic chemistry, W.H. Freeman and Company Limited, Oxford, 1-10 (1995).
- Hanson, J.R., The development of strategies for terpenoid structure determination, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 607-617, 2001.
- Haraguchi H., Ishikawa H., Sanchez Y., Ogura T., Kubo Y., Kubo I., Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5(5) 865-871 (1997).
- Holland, H.L., Weber, H.K., Enzymatic hydroxylation reactions, *Chem. Biotech.*, 11, 547-553 (2000).

http-1 <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325vitamins.html>
(08.05.2007).

http-2 *p*-Cymene pathway map, http://umbbd.msi.umn.edu/pcy/pcy_map.html/
(14.05.2007).

http-3 <http://www.pherobase.com/database/floral-compounds/floral-taxa-compounds-detail-p-cymene.php> (10.06.2007)

http-4 Dr. Duke's *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, <http://www.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=CYMENE>
(05.07.2007)

Kırbaş, Z., Keskin, N., Güner, A., Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63, 335-442 (1999).

Kouakou, T.H., Tégou, P.W., Valls, J., Kouadio, Y.J., Decendit, A., Mérillon, J.-M., First evidence of *trans*-resveratrol production in cell production cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86, 405-409 (2006).

Kutney, J.P., Plant cell culture combined with chemistry-routes to clinically important compounds, *Pure & Appl. Chem.*, 69 (3), 431-436 (1997).

Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R., Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13172-13177 (2000).

Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Vaněk, T., Valterová, I., Högberg, H.-E., Sjödin, K., Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture, *J. Biotech.*, 107, 173-184 (2004).

Liu, Y., Wang, H., Ye, H.-C., Li, G.-F., Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering, *J. Integrative Plant Biology*, 47 (7), 769-782 (2005).

Livingstone, D.R., The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish, *Comp. Biochem. Physiology Part A*, 120, 43-49 (1998).

Lucumi, E., Vera, A., Hallard, D., van der Heijden, R., Verproorte, R., Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana elegans* after feeding of tryptamine and loganin or secologanin, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 68, 293-299 (2002).

Matsuura, Y., Chai, W., Endoh, E., Suhara, J., Hamada, H., Horiuchi, C.A., Oxidative cleavage of the C-C bond of 3,6-dialkylcyclohexane-1,2-diones by cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*, *Phytochem.*, 61, 661-673 (2002).

Merlanti, R., Gallina, G., Capolongo, F., Contiero, L., Biancotto, G., Dacasto, M., Montesissa C., An in vitro study on metabolism of 17 β -boldenone and boldione using cattle liver next term and kidney subcellular fractions, *Analytica Chim. Acta*, 586 (1-2), 177-183 (2007).

Miyazawa, M., Watanabe, H., Kameoka, H., Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 677-679 (1997).

Montesissa, C., Capolongo, F., Santi, A., Biancotto, G., Dacasto, M., Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes, *The Veterinary J.*, 167, 87-94 (2004).

Moyano, E., Palazón, J., Bonfill, M., Osuna, L., Cusidó, R.M., Oksman-Caldentey, K.-M., Piñol, M.T., Biotransformation of hyoscyamine into scopolamine in transgenic tobacco cell cultures, *J. Plant Phys.*, 164, 521-524 (2007).

Oertel, R., Kilian, B., Siegmund, W., Kirch, W., Determination of propiverine and its metabolites in rat samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1149, 121-126 (2007).

Peterson, D.H., Murrays, H.C., Eppstein, H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, D., Leigh, H.M., Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5933-5936 (1952).

Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de-Oliveira J., Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds., *JEADV*, 73-78, 18 (2004).

Riffle, M. S., Waller, G.R., Don, S., Murray, D.S., Sgaramello R.P., Composition of essential oil from *Proboscidea louisianica* (Martyniaceae), *Proceedings Of The Oklahoma Academy of Science*, 71, (1991).

Sagar, D.V., Naik, S.N., Rout, P.K., Rao, Y. R., Composition of Essential Oils of *Tagetes patula* L. Growing in Northern India, *J. Essent. Oil Res.*, 17, 446-448 (2005).

Sakamaki, H., Itoh, K-i., Chai, W., Hayashida, Y., Kitanaka, S., Horiuchi, C.A., Biotransformation of (\pm)- α -ionone and β -ionone by cultured cells of *Caragana chamlagu*, *J.Mol.Catal. B: Enzym.*, 27, 177-181 (2004).

Sakamaki, H., Itoh, K-i., Taniai, T., Kitanaka, S., Takagi, Y., Chai, W., Horiuchi, J.A., Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*, *J.Mol.Catal. B: Enzym.*, 32, 103-106 (2005).

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A., Luque, P., Chemical Composition and Seasonal Variations of Spike Lavender Oil from Southern Spain J. Essent. Oil Res., 16, 206-210 (2004).

Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tárrago, J., Corchete, P., Silymarin synthesis and degradation by peroxidases of cell suspension cultures of *Silybum marianum*, J. Plant Physiology, 164, 669-674 (2007).

Schmelzer, E., Acikgoez, A., Frühauf, N.R., Crome, O., Klemptner, J., Christians, U., Bader, A., Biotransformation of cyclosporin in primary rat, porcine and human liver cell co-cultures, Xenobiotica, 36(8), 693–708 (2006).

Sponsel, V.M., The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: Early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis, J. Plant Growth Regul., 20, 332-345 (2002).

Sökmen A., Sökmen M., Daferera D., Polissiou M., Candan F., Ünlü M., Akpulat H.A., The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae), Phytother. Res. 18, 451–456 (2004).

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

Thangavel, P., Long, S., Minocha, R., Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 88, 201-216 (2007).

Tengerdy, R.P., Szakacs, G., Bioconversion of lygnocellulose in solid substrate fermentation, Biochem. Engin. J., 13, 169-179 (2003).

Trichard L., Duchêne D., and Bochot A. , Cyclodextrins in Dispersed Systems, Cyclodextrins and Their Complexes, H Dodziuk (Ed), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 423 (2006).

Truesdell, S., Biotransformations for a green future, Chemical Engineering Progress, 101(10), 44-47 (2005).

Tsyrenov, B.Dj., Osnovy biotekhnologii: Kultivirovanie izolirovannyx kletok i tkaney rasteniy, Chast 2, Uchebno-metodicheskoe posobiye, Vost.-Sib. Tekhn. Univ., Rossiya (2003).

Vasic-Racki, D., History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities, Industrial Biotransformations, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey (Eds.) Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1-36 (2006).

Wang, J., Liao, X., Zhang, H., Du, J., Chen, P., Accumulation of chlorogenic acid in cell suspension cultures of *Eucommia ulmoides*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 74, 193-135 (2003).

Yevtushenkov, A.N., Fomichev, Y.K., *Vybor tekhnologicheskix obyektov, Vvedenie v biotekhnologiyu*, A.N. Yevtushenkov, Y.K. Fomichev (Eds), BGU, Minsk, 16 (2002).

Zhan, J., Zou, J.- H., Ma, X., Dai, J., Biotransformation of 14-deacetyl sinenxan A by Ginkgo cell suspension cultures and the cytotoxic activity evaluation, *J.Mol.Catal. B: Enzym.*, 36, 43-46 (2005).

Zhu, W., Asghari, G., Lockwood, G.B., Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures, *Fitoterapia*, 71, 501-506 (2000).