

146928

**SEDROL'ÜN MİKROBİYAL
TRANSFORMASYON ÜRÜNLERİ**

Ecz. ŞEMSİDİN SKEYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SEDROL'ÜN MİKROBİYAL TRANSFORMASYON
ÜRÜNLERİ,**

ECZ.ŞEMSİDİN SKEYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı
Ağustos 2000**

**Danışman: Prof. Dr. Neş'e KIRIMER
Yardımcı Danışman: Yard.Doç.Dr. Zeynep Tunalıer**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şemsidin SKEYA'nın Sedrol'ün Mikrobiyal Transformasyon Ürünleri başlıklı Farmakognozi Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 29.08.2000 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Neş'e KIRIMER

Üye : Prof.Dr. K. Hüsnü Can BAŞER

Üye : Prof.Dr. Gülendamar TÜMEN

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.08.2000 tarih ve 23 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SEDROL'ÜN MİKROBİYAL TRANSFORMASYON ÜRÜNLERİ

ŞEMSİDİN SKEYA

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Neş'e KIRIMER
2000

Sedrol adlı seskiterpenin mikrobiyal biyotransformasyon ürünlerinin incelenmesi amacıyla 22 mikroorganizma ile ön denemeler yapılmıştır. Oluşan metabolitler, İTK ve GK kullanılarak incelenmiş, iki mikroorganizma ile (*Fusarium culmorum* ve *Aspergillus niger*) büyük miktarlarla çalışılması uygun bulunmuştur.

Metabolitlerin izolasyonunda sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile kromatografik tekniklerden (Kolon ve Flaş Kromatografisi) yararlanılmıştır. Bu metabolitler izole edildikten sonra yapıları spektroskopik teknikler (¹H-NMR, ¹³C-NMR, GC/MS) kullanılarak aydınlatılmıştır.

Fusarium culmorum isimli mikroorganizma kullanılarak 5-Hidroksisedrol ve 5-Oksosedrol, *Aspergillus niger* kullanılarak 8-Hidroksisedrol ve 8-Okso-7:14-didehidrosedrol isimli bileşikler elde edilmiştir.

Kaynak taramalarında 5-Oksosedrol' ün sentetik olarak elde edildiği görülmüştür. Bu bileşiğin doğal kaynaklardan eldesi ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir.

8-Okso-7:14-didehidrosedrol isimli bileşiğin sentetik veya doğal yoldan elde edildiğini gösteren herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Böylece bu bileşiğin varlığı ilk kez bu tezde gösterilmiştir.

Ayrıca Sedrol, 5-Hidroksisedrol ve 8-Hidroksisedrol'ün antibakteriyal aktivite testleri yapılmıştır. Her üç bileşiğin'de dikkate değer antibakteriyal etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sedrol, Mikrobiyal Biyotransformasyon, Sedrol Metabolitleri, Biyolojik Aktivite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MICROBIAL TRANSFORMATION PRODUCTS OF CEDROL

ŞEMSİDİN SKEYA

Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Pharmacognosy Department

Supervisor: Prof. Dr. Neş'e KIRIMER
August 2000

Preliminary studies were carried out with 22 microorganisms in order to investigate the microbial transformation products of the sesquiterpenoid Cedrol. The metabolites formed were screened using TLC and GC and it was decided to work with two microorganisms, *Fusarium culmorum* and *Aspergillus niger* at large scale.

Liquid-liquid extraction and chromatographic (Column and Flash) techniques were employed for the isolation of metabolites whose structures were elucidated using spectroscopic techniques such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR and GC/MS.

Biotransformation products of Cedrol with *Fusarium culmorum* were 5-Hydroxycedrol and 5-Oxocedrol while *Aspergillus niger* transformed Cedrol to 8-Hydroxycedrol and 8-Oxo-7:14-didehydrocedrol.

8-Oxo-7:14-didehydrocedrol is a new compound. 5-Oxocedrol was previously obtained as a synthetic product. This is the first report of its natural occurrence.

Antibacterial activity studies were carried out with Cedrol, 5-Hydroxycedrol and 8-Hydroxycedrol. All three compounds exhibited significant antibacterial activity.

Keywords: Cedrol, Microbial Biotransformation, Cedrol Metabolites, Biological Activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarına başladığım andan itibaren bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren. Her türlü çalışma imkanını sağlayan ve destek veren danışmanım Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e

Çalışmalarımın Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (TBAM)' nde yürütülmesinde imkan sağlayan Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Merkez Müdürü Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER' e,

Maddelerin yapılarının tayin edilmesinde yapmış olduğu katkılarından dolayı Prof. Dr. Yoshiaki NOMA ve Dr. Toshihiro HASHİMOTO' ya,

Çalışmalarımda değerli öneri ve eleştirilerinden yararlandığım Araş. Gör. Fatih DEMİRCİ' ye, Araş. Gör. İlhan BOYDAĞ' a ve Araş. Gör. Gökhan TELLİ' ye ve TBAM' daki diğer arkadaşlarıma ,

Tezin deneysel çalışmalarını gerçekleştirme olanağı bulduğum TBAM Biyotransformasyon laboratuvarının kuruluşunu 980312 nolu projeye destekleyen Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı' na

Bu süre içinde göstermiş olduğu anlayış ve yardımlarından dolayı Eşim Nilüfer' e,

Uzakta olmalarına rağmen maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana olan inançlarını hiç yitirmeyen aileme ve özellikle ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iiiv
TEZDE ADI GEÇEN MADDELERİN İNGİLİZCE İSİMLERİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Biyoteknoloji ve Biyotransformasyon	2
1.2. Terpenler	3
1.2.1. Seskiterpenler	3
1.2.2. Sedrol'ün yapısı ve Spektral Özellikleri	4
1.2.3. Sedrol'ün Bitkiler Aleminde Yayılışı	5
1.2.4. Sedrol'ün Biyosentezi	6
1.2.5. Sedrol'ün Biyotransformasyonu	8
1.2.6. Sedran Çekirdeği Taşıyan Bileşikler	13
1.2.7. Sedrol'ün Biyolojik Aktivitesi	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Materyal, Kimyasal Maddeler, Aletler ve Mikroorganizmalar	31
2.1.1. Materyal	31
2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	31
2.1.3. Kimyasal Reaktifler	31
2.1.4. Kullanılan Aletler	32
2.1.5. Mikroorganizmalar	32
2.2. Yöntem	33
2.2.1. Katı Besi Ortamının Hazırlanması	33

(Devamı) İÇİNDEKİLER

Sayfa

2.2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması	34
2.2.2.1. Birinci Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması (α -Medyum)	34
2.2.2.2. İkinci Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması	34
2.2.3. Biyotransformasyon İşlemi	34
2.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemi	37
2.2.5. Süzme İşlemi	37
2.2.6. Metabolitlerin Ekstraksiyonu, İzolasyonu ve Yapı Tayini	37
2.2.6.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	37
2.2.6.2. Kolon Kromatografisi (KK)	39
2.2.6.3. Flaş Kromatografisi (FK)	39
2.2.6.4. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	40
2.2.6.5. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi Sistemi(GC/MS)	41
2.2.6.6. Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (NMR)	42
2.2.6.7. Optik Çevirme	42
2.2.6.8. Erime Noktası	42
2.2.6.9. Kristalizasyon	42
3. SONUÇ VE TARTIŞMA	
3.1. 5- α -Hidroksisedrol	43
3.2. 5-Oksosedrol	43
3.3. 8-Hidroksisedrol	46
3.4. 8-Okso-7:14-didehidrosedrol	47
3.5. Biyolojik Aktivite Araştırmalarının Sonuçları	49
3.5.1. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları	52
3.6. Tartışma	53
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1	β -Sedrol'ün stereokimyasal yapısı	4
1.2.	Sedrol'ün Biyosentezi	7
1.3.	Sedrol'ün <i>Beauveria sulfurescens</i> ile biyotransformasyonu	8
1.4.	Sedrol'ün <i>Absidia coerulea</i> ile biyotransformasyonu	8
1.5.	Sedrol'ün <i>Chephalosporium aphidicola</i> ile biyotransformasyonu	9
1.6.	Sedrol'ün <i>Glomerella cingulata</i> ile biyotransformasyonu	9
1.7.	Sedrol'ün <i>Aspergillus niger</i> , <i>Cephalosporium casiicola</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Beauveria sulfurescens</i> ile biyotransformasyonu	10
1.8.	Sedrol'ün <i>Absidia coerulea</i> ile biyotransformasyonu	10
1.9.	Sedrol'ün <i>Bacillus cereus</i> ile biyotransformasyonu	11
1.10.	Sedrol'ün biyotransformasyon ürünlerinin birbirine dönüşümü	12
2.1.	Yöntem I	35
2.2.	Yöntem II	36
2.3.	Kolon Kromatografisi	39
2.4.	Flaş Kromatografisi	40
3.1.	5- α -Hidroksisedrol'ün Kütle Spektrumu	44
3.2.	5- α -Hidroksisedrol'ün ^1H -NMR Spektrumu	45
3.3.	5- α -Hidroksisedrol'ün ^{13}C -NMR Spektrumu	45
3.4.	5- α - Hidroksisedrol'ün HETCOR Spektrumu	46
3.5.	Sedrol'ün biyotransformasyon ürününün diğerine dönüşümü	47
3.6.	5-Oksosedrol'ün Kütle Spektrumu	47
3.7.	8-Hidroksisedrol'ün Gaz Kromatogramı	49
3.8.	8-Sedrandiol'ün Kütle Spektrumu	49
3.9.	8-Okso, 7:14-didehidrosedrol'ün Gaz Kromatogramı	51
3.10.	8-Okso, 7:14- didehidrosedrol'ün Kütle Spektrumu	51
3.11.	8-Okso, 7:14- didehidrosedrol'ün ^{13}C -NMR Spektrumu	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. İzopren türevleri	3
1.2. Sedrol'ün izole edildiği türler	5
1.3. Sedran Çekirdeği Taşıyan Bileşikler	13
1.4. Sedrol türevlerinin ¹³ C-NMR verileri	21
1.5. Sedrol türevlerinin ¹ H-NMR verileri	25
2.1. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar	33
2.2. Antibakteriyel etki için kullanılan mikroorganizmalar	33
2.3. <i>Fusarium culmorum</i> 'dan elde edilen metabolitin izolasyonu için kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi	38
2.4. <i>Aspergillus niger</i> 'den elde edilen metabolitlerin izolasyonu için kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi	38
2.5. <i>Aspergillus niger</i> 'den elde edilen metabolitlerin izolasyonu için flaş kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi	40
2.6. İTK da kullanılan çözücü sistemleri	41
3.1. Mikrodilüsyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite sonuçları	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

¹³C-NMR	: Karbon-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
¹H-NMR	: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
ATTC	: Amerikan Ortak Kültür Koleksiyon Türleri (American Type Culture Collection Corporate)
CDCl₃	: Dötoro Kloroform
d	: Çift Pik (doublet)
DEPT	: Metil (CH ₃), Metilen (CH ₂), Metin (CH) Karbonlarının Tespit Edildiği NMR Tekniği
DMSO	: Dimetilsülfoksit
F.K.	: Flaş Kromatografisi
F.N.	: Formül Numarası
GC	: Gaz Kromatografisi
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
HETCOR	: Heteronükleer Korelasyon Spektroskopisi
i.p.	: Periton içi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
K.N.	: Kaynak Numarası
LD₅₀	: Öldürücü Dozun % 50'si
m	: Çoklu Pik (multiplet)
m/z	: Kütle/Yük
MHB	: Müller-Hinton broth
MIC	: Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon
NRRL	: Kuzey Bölgesi Araştırma Merkezi (Northern Regional Research Center)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
ppm	: Milyonda Bir
rpm	: Rotasyon / Dakikada
Rt	: Tutunma Zamanı
s	: Tek Pik (singlet)
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
t	: Üçlü Pik (triplet)
TMS	: Tetrametilsilan
UV	: Ultraviyole
var.	: Varyete

Not: Metin içerisinde formül numaraları parantez içinde ve koyu olarak , kaynak numaraları ise köşeli parantez kullanılarak verilmiştir.

TEZDE ADI GEÇEN MADDELERİN İNGİLİZCE İSİMLERİ

- γ -Bisabolene
 α -3,5,9-Cedranetriol
 β -4,5,9-Cedranetriol
 α -Funebrene
 γ -Perezol
 α -Perezol
 β -Perezol
 β -Pipitzol.
1,3,5-Cedranetriol
12-Deoxotrixilikingolide
12-Deoxy, 9-(methyl-2-butenoyl), 14-(2-Methylbutanoyl)
12-Hydroxy-7-oxo-14-nor-4-trixen-15-al
12-Ketone, 14-(2-methylbutanoyl),9-Ac
12-Ketone, 9-(2-methylbutanoyl), 14-(3-methylbutanoyl)
12-Ketone, 9-(3-methyl-2-butanoyl), 14-(2-methylbutanoyl)
12-Ketone, 9-(3-methylbutanoyl), 14-(2-methylbutanoyl)
12-Oxo: 12,3-Cedranolide
14 β -Hydroxy-4-isocedren-15,14-olide.
14,15-Di-Ac: Proustianol
14,15-Epoxy-4-isocedrene-1,3,14,15-tetrol
14,15-Epoxy-4-isocedrene-3,14,15-triol
14,15-Epoxy-4-isocedrene-3,8,14,15-tetrol
14,15-Epoxy-4-isocedrene-3,8,9,14,15-pentol
14,15-Epoxy-5(15)-isocedrene-9,12,14-triol
14-Acetoxi-3-Cedranol
14-Alcohol: 14,15-Epoxy-4-isocedren-14-ol.
14-Aldehyde: 7-Cedren-14-al.
14-Carboxylic acid
1-Oxo-3,5-Cedranediol
2-Methylbutanoyl
3-(15)-Cedrene
3-(2,3-Epoxy-2-methylbutanoyl),1-(2-methylbutanoyl),14,15-di-Ac
3-(2,3-Epoxy-2-methylbutanoyl),1-(3-methylbutanoyl),14,15-di-Ac
3-(2,3-Epoxy-2-methylbutanoyl),14,15-di-Ac:
3-(2,3-Epoxy-2-methylbutanoyl),1-propanoyl,14,15-di-Ac
3,12-Cedrenediol
3,14-Cedranediol
3,15-Cedranediol
3,4-Cedranediol
3,5,7-Cedranetriol
3,5,8-Cedranetriol
3,5-Cedranediol
3,7-Cedranediol
3,8,9-Cedranetriol
3,8-Cedranediol
3,9-Cedranediol
3-Acetoxi-8-Cedranol
3-Angeloyl, 8-(2-methylbutanoyl), 14,15-di-Ac
3-Angeloyl, 8-(3-methylbutanoyl), 14,15-di-Ac
3-Angeloyl,14,15-di-Ac
3-Cedranol
3-Cedren-15-al
3-Cedren-8-ol
3-Cedrene
3-Hydroxy-4-isocedren-15,14-olide
3-Methylbutanoyl
4-Hydroxy-3-cedrene-1,5-dione
4-Isocedren-14,15-diol
4-Isocedren-14,15-olide
4-Isocedren-15,14-olid-12-oic acid
4-Isocedren-15,14-olide
4-Isocedren-15-al
4-Cetocedrol
5-Oxocedrol
7,10-Diepi- β -Cedrene
7-Cedren-14-ol
7-Oxo-14-nor-4-isocedren-15-al
8,14-Cedranediol
8,14-Cedranoxide
8-Oxo-3-Cedranol
8-Oxo-7:14-Didehydroxycedrol
9-(3-Methyl-2-butenoyl), 14-(2-Methylbutanoyl):
9-(3-Methylbutanoyl), 14-(2-Methylbutanoyl):
9- α -Hydroxy-4-isocedren-15,14-olide.
9-Oxo-3,8-Cedranediol
9-Oxo-3-Cedranol
Acetyl aceto coenzyme A
Acetyl coenzyme A
Angeloyl-8-angeloyloxyproustianol
Angeloyl-8-hydroxyyproustianol
Angeloylprustianol
Cedranediol
Cedrol
Cedrolic acid
Coreosenarione
Dialdehyde: 4-Isocedrene-14,15-dial
Dimethylallyl pyrophosphate
Epilaccilaksholic acid.
Epilaksholic acid
Epishellolic acid.
Farnesyl pyrophosphate
Geranyl pyrophosphate
Glucose

Isocedrolic acid
Isopentenyl pyrophosphate
Jalaric acid.
Jalaric ester I
Jalaric ester II
Coreosenarion
Laccijalaric acid
Laccijalaric ester I
Laccijalaric ester II
Lacsholic acid
Phosphoenol pyruvate
Pyruvate
Renecraviotonic acid
Shelloic acid
Trikingolide
Trioxol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoteknoloji, doğal maddelerin mikroorganizmalar ve enzimler yardımıyla oluşan türevlerini konu aldığı zaman biyolojik kökenli tüm ilaç hammaddelerini inceleyen Farmakognozi bilimi için yeni bir ufuk açmaktadır. Bu konudaki çalışmalar son yirmi yılda Mikrobiyal Biyotransformasyon veya Farmakobiyoteknoloji adı altında hız kazanmıştır. Bu çalışmalarda toksisitesi daha düşük ve biyolojik aktivitesi daha güçlü hammaddelerin üretimi gerçekleştirilmektedir. Aromatik bileşiklerin büyük çoğunluğunu oluşturan mono- ve seskiterpenlerin başlangıç maddesi olarak kullanıldığı araştırmalar ise toksisite düşüklüğü yanında koku, tat ve biyolojik aktivite bakımından daha güçlü türevlerine ulaşmayı amaçlamaktadır [1-5].

Bu araştırmada ticarete *Juniperus virginiana*'dan elde edilen Sedir Yağı'nın (Cedarwood Oil) ana bileşiklerinden biri olan Sedrol hammadde olarak seçilmiştir. Sedrol bakımından zengin olan bu yağ ve diğer *Juniperus* türlerinden elde edilen benzer yağlar parfümeri sanayii, sabun sanayii ve oda sprelerinde koku verici olarak kullanılmaktadır. İnsektisit ve dezenfektan etkisinden dolayı haşere ilaçlarının bileşiminde yer almaktadır. Bu yağlardan elde edilen saf Sedrol parfümeri ve tütün sanayiinin önemli hammaddelerinden biridir. Aroma formülasyonlarında fiksatif özelliğinden dolayı da yer almaktadır [6].

Üniversitemiz Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi olanaklarından yararlanılarak ve Farmakognozi Anabilim Dalı'nda Ocak 1999'da tamamlanan bir doktora tez çalışmasında yurdumuzda yaygın olan *Juniperus foetidissima* Willd. odun uçucu yağları incelenmiş ve bu yağlardan Sedrol'ün izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç bölümünde Sedir Yağı'na eşdeğer bir uçucu yağ ve Sedrol kaynağı olarak *J. foetidissima* önerilmektedir [7]. Adı geçen araştırma kapsamında izole edilen Sedrol'ün başlangıç maddesi olarak kullanılması ile oluşan biyotransformasyon ürünlerinin incelenmesi ve bu türevlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi bu çalışmanın konusunu ve amacını oluşturmaktadır.

1.1. Biyoteknoloji ve Biyotransformasyon

Biyoteknoloji, canlı organizmalar veya bu organizmalardan elde edilen enzimlerin kullanılmasıyla yeni ve yararlı maddelerin üretimini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu tanım son yıllarda yapılmış olmakla birlikte, biyoteknoloji aslında insanlık tarihi kadar eski bir teknolojik uygulamadır. Arkeolojik bulgular günümüzden 10.000 yıl öncesinde ekmek ve şarap gibi mayalanmış ürünlerin bilindiğini ortaya koymaktadır. Binlerce yıl fermentasyon teknolojisi olarak isimlendirilen bu teknoloji, 1864'te etilalkolün *Acetobacter aceti* ile asetik aside dönüştürülmesi ile biyotransformasyonun literatüre geçmiş ilk örneğine ulaşmıştır. Ancak modern uygulamalar 1937'de steroidlerle başlamış ve günümüze kadar başta gıda sanayii olmak üzere içki, ilaç, biyokimyasal endüstrileri ve çevre teknolojileri biyotransformasyondan yararlanmaya başlamıştır.

Eczacılıkta Farmakobiyoteknoloji olarak isimlendirilen bu teknik öncelikle aşuların üretimi ve son yıllarda rekombinant-DNA teknolojisi ile üretilen ilaç gruplarını ele almaktadır [1]. Ancak klasik fermentasyon teknolojilerinin ürünü olan antibiyotikler ve doğal maddelerin biyotransformasyonu ile elde edilen birçok ürün, Farmakognosi'nin konuları içinde yer almaktadır. Bu ürünler amino asitler, tat ve koku kimyasalları (Anisaldehit, geraniol, nerol v.b.), vitaminler (Örn. Vitamin B₁₂), hormonlar (Örn. İnsülin), pigmentler (Örn. Karotenler), insektisitler (Örn. Herbisidin), organik asitler (Asetik asit, sitrik asit v.b.), proteinler (Örn. İmmüoglobulinler ve interlökinler v.b.) ve steroidler (Örn. Androstane türevleri) başlıkları altında gruplandırılabilir.

Doğal maddelerin başlangıç maddesi olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları sonunda elde edilen ürünler yine doğaldır. Biyotransformasyon işlemlerinin ve elde edilen ürünlerin, kimyasal reaksiyonlara ve sentez ürünlerine birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Örneğin sentezlerde genellikle rasemik türevler elde edilirken biyotransformasyonla istenen stereokimyasal türevin elde edilebilmektedir. Biyotransformasyon çalışmalarının bir üst basamağını ise canlı organizmalardan izole edilen enzimlerle yapılan araştırmalar oluşturmaktadır [1-5, 8].

1.2. Terpenler

İzopren çekirdeği içeren izoprenoit moleküllerdir. Terpenlerin molekül büyüklüklerine göre adlandırılmaları Çizelge 1.1.'de verilmektedir.

Çizelge 1.1. İzopren türevleri

Sınıf	İzopren Çekirdek Sayısı	Karbon Atomu Sayısı
Hemiterpen	1	5
Monoterpen	2	10
Seskiterpen	3	15
Diterpen	4	20
Sesterpen	5	25
Triterpen	6	30
Tetraterpen	8	40
Politerpen	8'den çok	40'tan çok

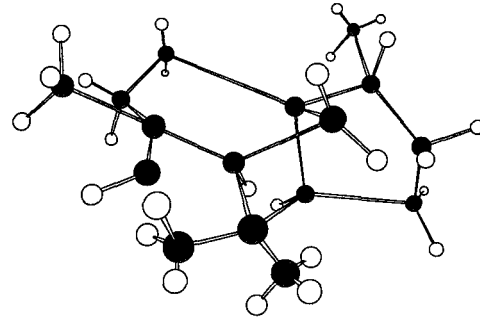
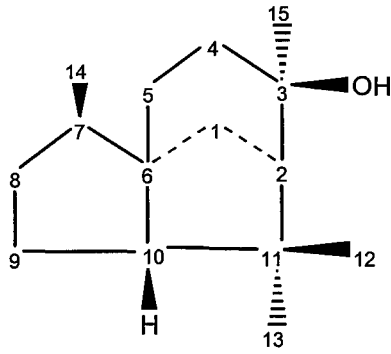
Bu türevlerden mono- ve seskiterpenler uçucu bileşikler olup uçucu yağların bileşiminde yer alırlar. Bazı diterpenlere de uçucu yağlarda rastlanabilmektedir. Bu bileşikler aromatik bitkilerin ve gıdaların aroma, koku ve tatlarından sorumlu olan maddelerdir. Aynı zamanda başta antimikrobiyal etki olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere de sahiptirler.

Gıda, parfümeri ve ilaç sanayiinde mono- ve seskiterpenlerin yeni türevleri her dönemde kullanım alanı bulmaktadır. Yeni türevlerin eldesi için son yıllarda hızlı bir gelişme gösteren biyotransformasyon tekniği, elde edilen ürünün doğal olması nedeniyle, kimyasal sentezlere tercih edilmektedir [10].

1.2.1. Seskiterpenler

Günümüzde 1000'den fazla seskiterpen bilinmekte ve bunlar 100 farklı karbon iskeleti taşımaktadırlar. Seskiterpenler özellikle tat ve ilaç katkısı açısından büyük değerleri olan bir gruptur. Seskiterpenlerle yapılan ilk biyotransformasyon araştırmaları 1990'lı yıllarda Sedrol ve Sedren'le başlamıştır [11].

1.2.1. Sedrol'ün Yapısı ve Spektral Özellikleri



Sedrol (1)

3-Sedranol,

3-Hidroksisedran

1H-6a,2-Metanoazulen-3-ol, oktahidro,3,7,11,11-tetrametil-,(3R,3aS,6R,7R, 8aS)

● Oksijen, ● Karbon, ○ Hidrojen

Şekil 1.1 β-Sedrol'ün stereokimyasal yapısı

Kapalı Formül	:	C ₁₅ H ₂₆ O
Molekül Ağırlığı	:	222.370
Erime Noktası	:	85-86°C
[α]²⁰(CHCl₃, c 1.13)	:	+8.63
IR (cm⁻¹)	:	3638, 2958, 1466, 1377, 1130, 1091, 1006.

Sedrol'ün ¹³C NMR Değerleri

C	δ (ppm)
1	42.0
2	61.0
3	75.1
4	35.4
5	31.6
6	54.1
7	41.5
8	37.0
9	25.4
10	56.5
11	43.4
12	28.9
13	27.7
14	15.6
15	30.2

GC/MS (70eV m/z):

222[M⁺], 207(17), 189(6), 177(6), 165(13), 161(13), 151(72), 150(94), 149(22), 135(32), 121(26), 119(27), 107(31), 95(100), 93(32), 81(36), 79(25), 77(18), 67(21), 55(25)

Sedrol'ün ¹H NMR Değerleri

H	δ (ppm)	H	δ (ppm)
H-1 (H)	1.35	H-8 (H)	1.27
H-1 (H)	1.64	H-9 (H)	1.51
H-2 (H)	1.56	H-9 (H)	1.38
H-4 (H)	1.70	H-10 (H)	1.77
H-4 (H)	1.81	H-12 (3H)	0.92
H-5 (H)	1.37	H-13 (3H)	1.30
H-5 (H)	1.41	H-14 (3H)	0.83
H-7 (H)	1.65	H-15 (3H)	1.25
H-8 (H)	1.86		

1.2.1. Sedrol'ün Bitkiler Aleminde Yayılışı

Sedrol içeren bitkiler, cins isimlerine göre alfabetik olarak sıralanmış, familia ve kaynakları ile Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Sedrol içeren türler

No	Bitki ismi	Familiya	Kaynak
1.	<i>Acorus calamus</i>	Araceae	19
2.	<i>Aloysia triphylla</i>	Verbenaceae	20
3.	<i>Ampelopsis grossedentata</i>	Vitaceae	21
4.	<i>Arytemisia annua</i>	Asteraceae	22
5.	<i>Basella rubra</i>	Basellaceae	23
6.	<i>Cananga odorata</i>	Annonaceae	24
7.	<i>Chamaecyparis formosensis</i>	Cupressaceae	25
8.	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Cupressaceae	26
9.	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Cupressaceae	27
10.	<i>Cinnamomum porrectum</i>	Lauraceae	28
11.	<i>Cryptomeria japonica</i>	Taxodiaceae	29
12.	<i>Cunninghamia konishii</i>	Taxodiaceae	30
13.	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	Taxodiaceae	31
14.	<i>Cupressus bakeri</i>	Cupressaceae	32
15.	<i>Cupressus dupreziana</i>	Cupressaceae	33,
16.	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cupressaceae	34
17.	<i>Dysoxylum spectabile</i>	Meliaceae	35
18.	<i>Eucalyptus astringens</i>	Myrtaceae	36,37
19.	<i>Eucalyptus bosistoana</i>	Myrtaceae	36
20.	<i>Helichrysum odoratissimum</i>	Asteraceae	38
21.	<i>Juniperus ashei</i>	Cupressaceae	39,40
22.	<i>Juniperus californica</i>	Cupressaceae	40,41
23.	<i>Juniperus chinensis</i>	Cupressaceae	39,40,42,43
24.	<i>Juniperus comitana</i>	Cupressaceae	44
25.	<i>Juniperus communis</i>	Cupressaceae	39,40,45
26.	<i>Juniperus conferta</i>	Cupressaceae	39,40
27.	<i>Juniperus deppeana</i>	Cupressaceae	39,40
28.	<i>Juniperus erithrocarpa</i>	Cupressaceae	39,40
29.	<i>Juniperus excelsa</i>	Cupressaceae	39,40
30.	<i>Juniperus foetidissima</i>	Cupressaceae	39,40,46
31.	<i>Juniperus formosana</i>	Cupressaceae	47,48
32.	<i>Juniperus horizontalis</i>	Cupressaceae	39,40,46
33.	<i>Juniperus macropoda</i>	Cupressaceae	49
34.	<i>Juniperus mexicana</i>	Cupressaceae	50,51
35.	<i>Juniperus monosperma</i>	Cupressaceae	39,40
36.	<i>Juniperus monticola</i>	Cupressaceae	52
37.	<i>Juniperus occidentalis</i>	Cupressaceae	39,40
38.	<i>Juniperus occidentalis var. australis</i>	Cupressaceae	40
39.	<i>Juniperus occidentalis var. occidentalis</i>	Cupressaceae	40
40.	<i>Juniperus osteosperma</i>	Cupressaceae	39,40
41.	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Cupressaceae	53,54
42.	<i>Juniperus phoenicea</i>	Cupressaceae	39,40,53
43.	<i>Juniperus pinchotii</i>	Cupressaceae	39,40
44.	<i>Juniperus procera</i>	Cupressaceae	39,40,55,56
45.	<i>Juniperus uthaensis</i>	Cupressaceae	60
46.	<i>Juniperus virginiana</i>	Cupressaceae	40,50,55,56,61-65
47.	<i>Lepechinia chalapensis</i>	Lamiaceae	66
48.	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	67
49.	<i>Micromeria carminea</i>	Lamiaceae	68

Çizelge 1.2. (devamı) Sedrol'ün izole edildiği türler

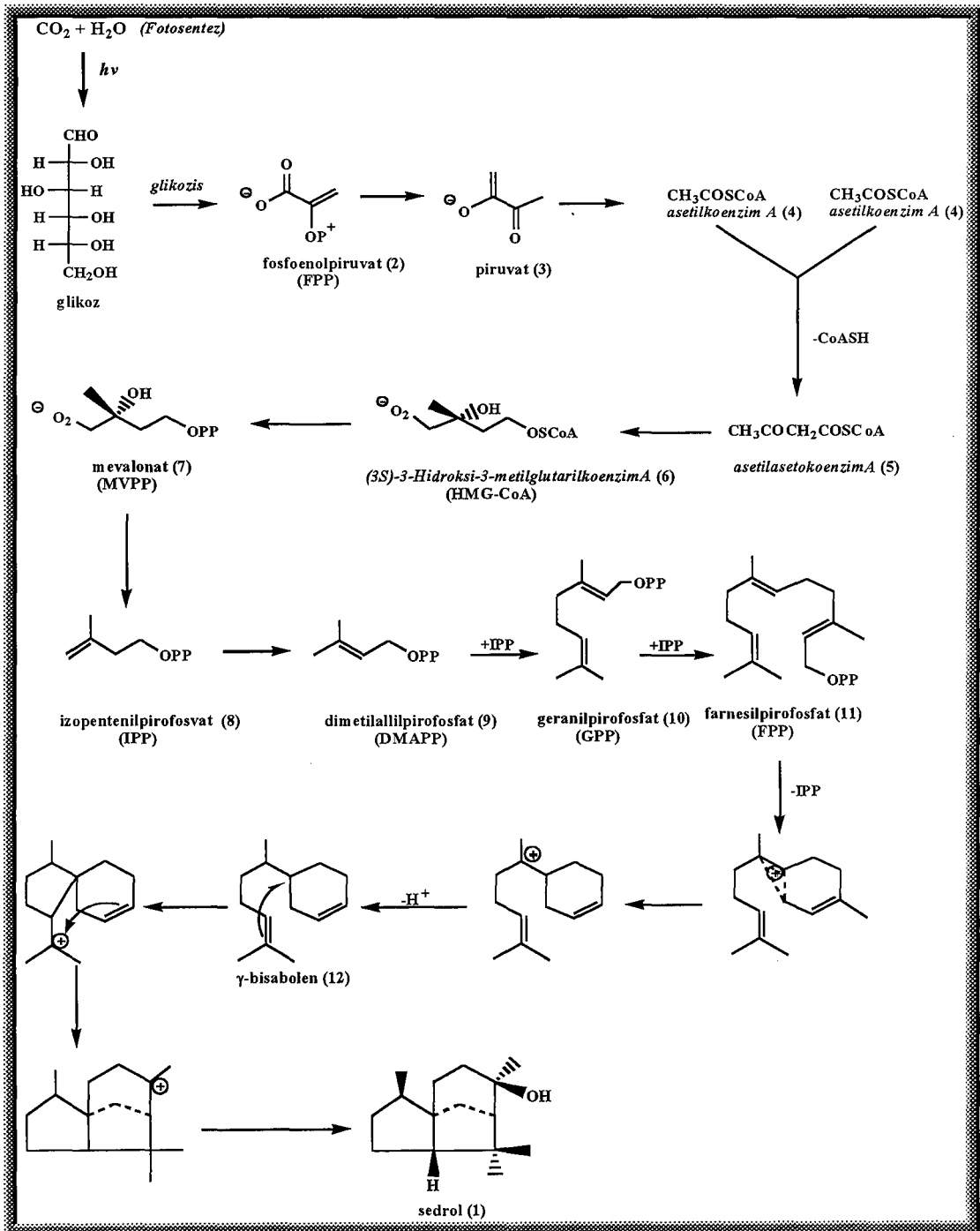
No	Bitki ismi	Familya	Kaynak
50.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	69
51.	<i>Juniperus recurvata</i>	Cupressaceae	39,40,56
52.	<i>Juniperus scopulorum</i>	Cupressaceae	39,40
53.	<i>Juniperus semiglobosa</i>	Cupressaceae	39,40
54.	<i>Juniperus squiamata</i>	Cupressaceae	57,58
55.	<i>Juniperus standleyi</i>	Cupressaceae	44
56.	<i>Nyssa sinensis</i>	Nyssaceae	70
57.	<i>Oropanax elatus</i>	Araliaceae	71
58.	<i>Pimpinella achilleifolia</i>	Apiaceae	72
59.	<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	73
60.	<i>Plectranthus tenuiflorus</i>	Lamiaceae	74
61.	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	75
62.	<i>Satureja odora</i>	Lamiaceae	76
63.	<i>Saussurea lappa</i>	Asteraceae	77
64.	<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae	78
65.	<i>Thuja orientalis</i>	Cupressaceae	79
66.	<i>Thuja standishii</i>	Cupressaceae	26
67.	<i>Widdringtonia whytei</i>	Cupressaceae	80

1.2.4. Sedrol'ün Biyosentezi

Sedrol'ün biyosentezi, yeşil bitkilerde fotosentez siklusünde CO₂ ve güneş ışını etkisiyle glikoz oluşumuyla başlar. Glikoz, glikoliz reaksiyonu ile fosfoenolpiruvat (2), piruvat (3) ve asetilkoenzim A'ya (4) dönüşür.

İki molekül asetilkoenzim A, asetoasetilkoenzim A'yı (5) verir. Asetilkoenzim A ile asetoasetilkoenzim A' nın (3S)-3-hidroksi-3-metilglutarilkoenzim A (HMG-CoA) (6) formuna kondensasyonu HMG-CoA sentetaz enzimi tarafından katalizlenir. Bir sonraki basamakta HMG-CoA redüktaz enziminin katalizlediği HMG-CoA ile NADHP redüksiyon reaksiyonu ile 6 C'lu mevalonat (MVPP) (7) oluşur [81]. CO₂ ve bir P ayrılması ile 5 C'lu izopren çekirdeklerinden izopentenilpirofosfat (İPP) (8) ile 3,3-dimetilallilpirofosfat (DMAPP) (9) meydana gelir. DMAPP' nin baş kısmı ile İPP' in kuyruk kısmının birleşmesi geranilpirofosfat (GPP)'ı (10) verir. Biyosentetik olarak seskiterpen yapısı, geranilpirofosfata bir izopentenilpirofosfat molekülünün katılmasıyla meydana gelen farnesilpirofosfat (FPP)' tan (11) oluşur [81-82]. Farnesilpirofosfat'ın formundan hareketle γ -bisabolen (12) meydana gelir, bu madde birçok seskiterpenin prekürsörüdür. Bu durum γ -Bisabolen, halka kapanması ve bir hidroksil çıkışı ile Sedrol iskeletine dönüşür [83]. Bu durum Şekil 1.2.'de şematik olarak belirtilmiştir.

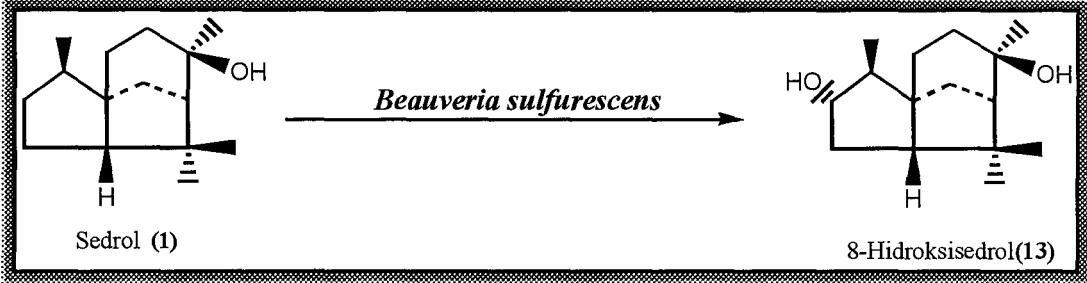
Şekil 1.2. Sedrol'ün Biyosentezi



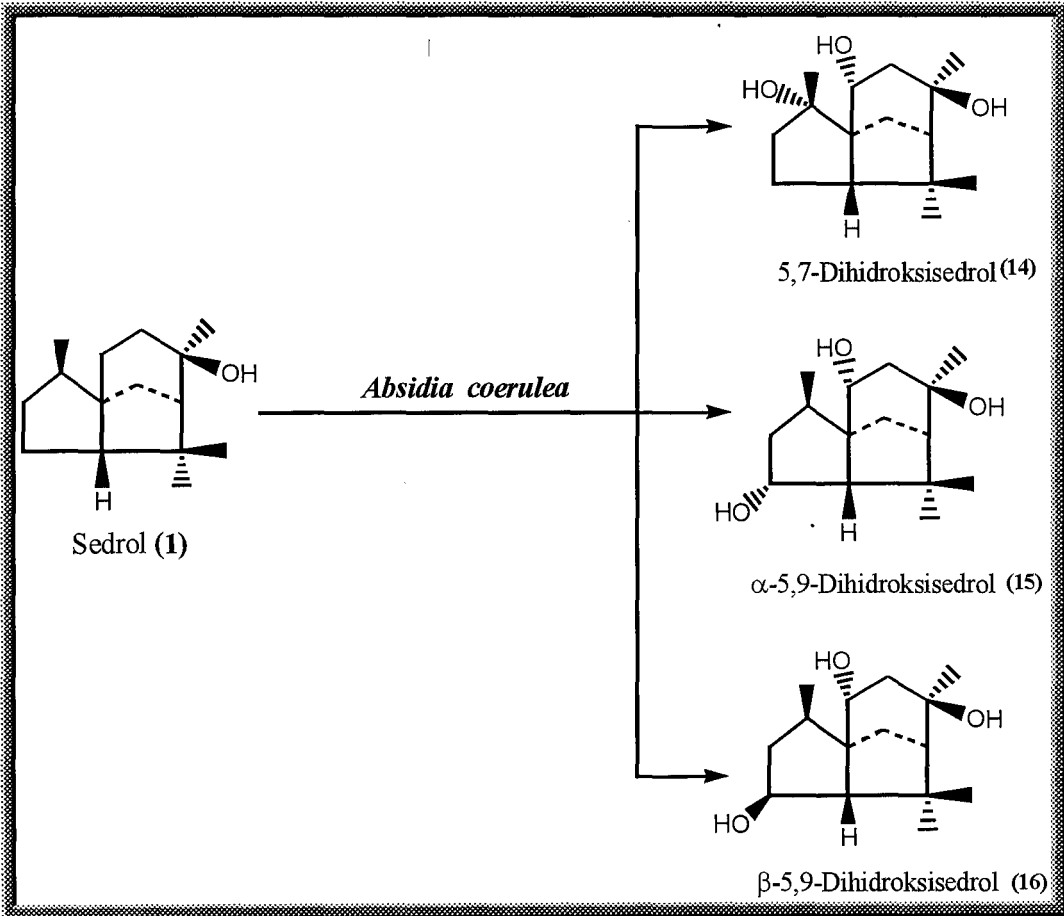
1.2.5. Sedrol'ün Biotransformasyonu

Sedrol'ün biyotransformasyonu ile ilgili tüm çalışmalar Şekil 1.3-1.10'da verilmektedir [85-93].

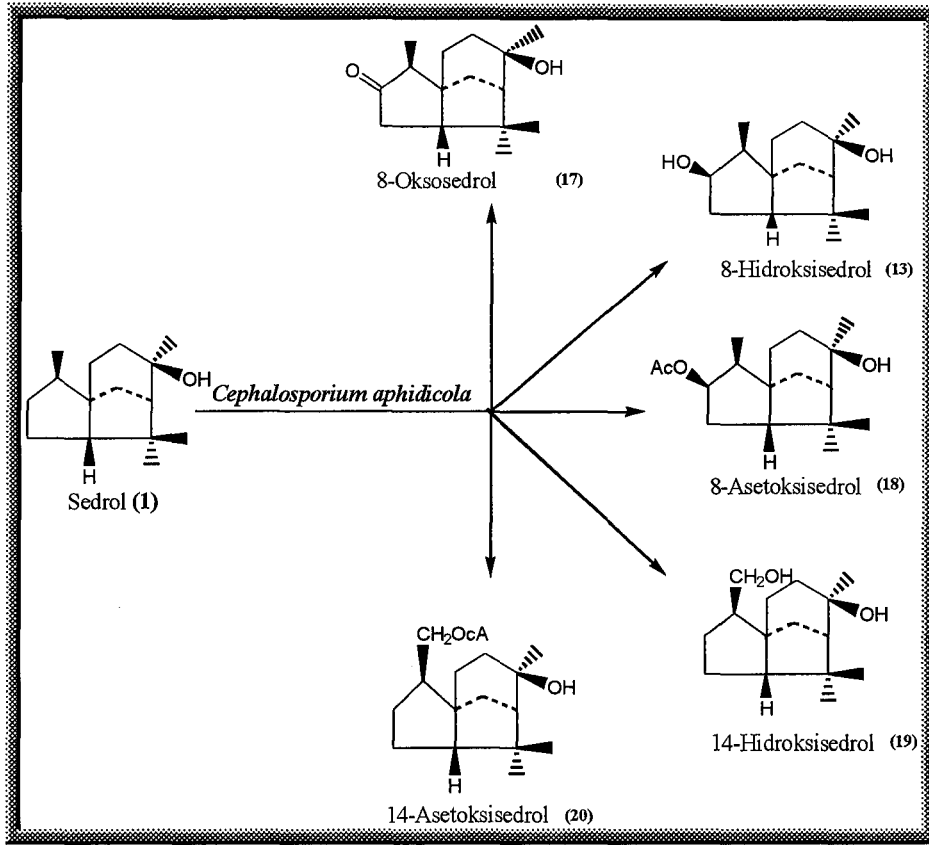
Şekil 1.3. Sedrol'ün *Beauveria sulfurescens* ile biyotransformasyonu [92]



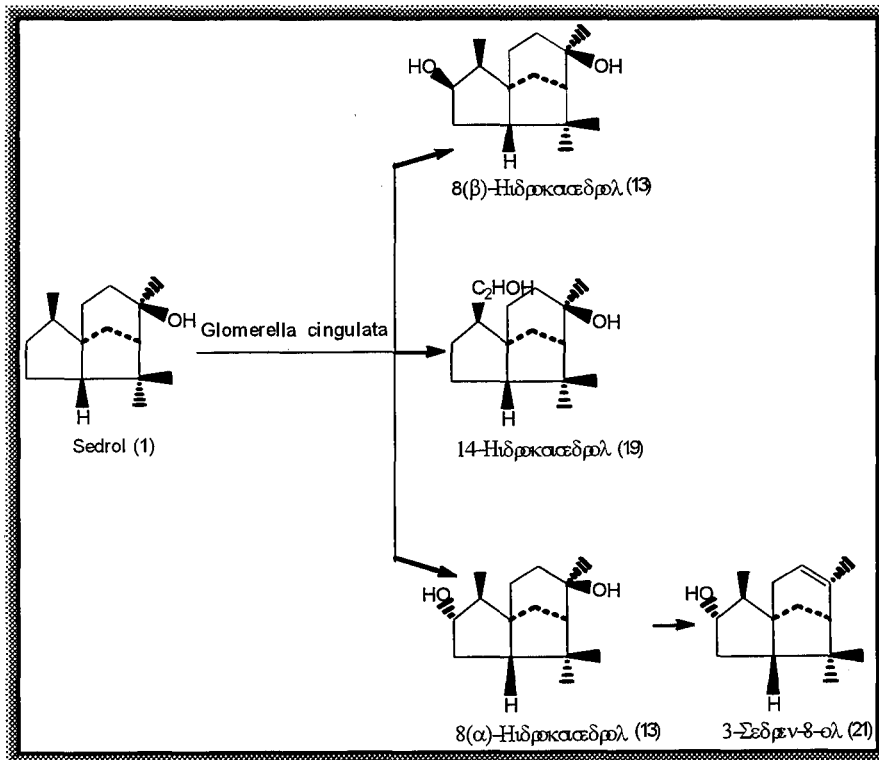
Şekil 1.4. Sedrol'ün *Absidia coerulea* ile biyotransformasyonu [88]



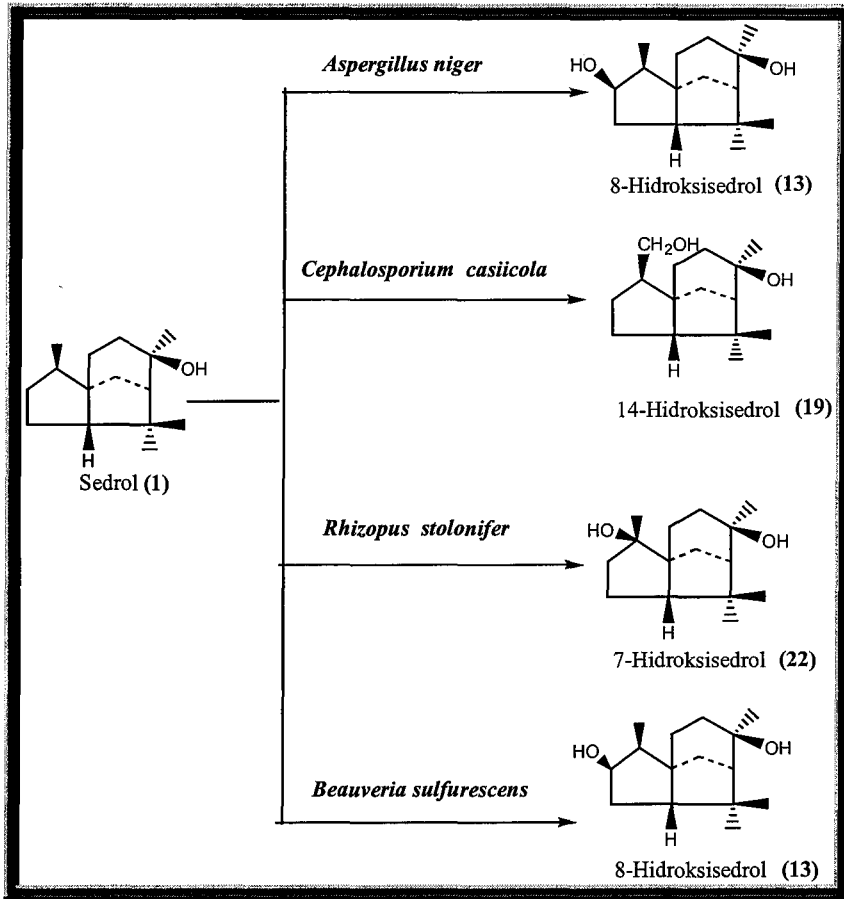
Şekil 1.5. Sedrol'ün *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu [85]



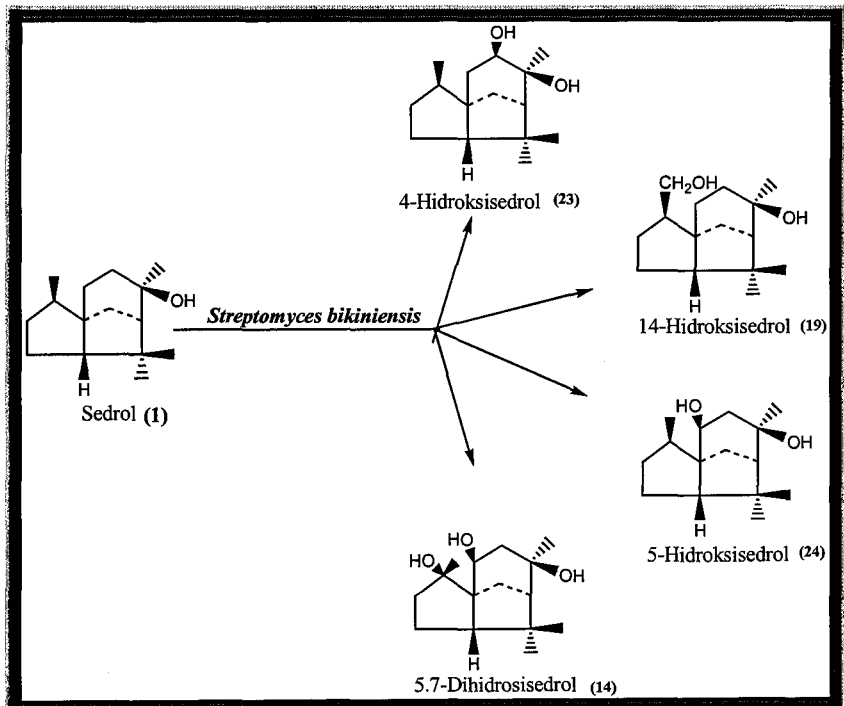
Şekil 1.6. Sedrol'ün *Glomerella cingulata* ile biyotransformasyonu [86]



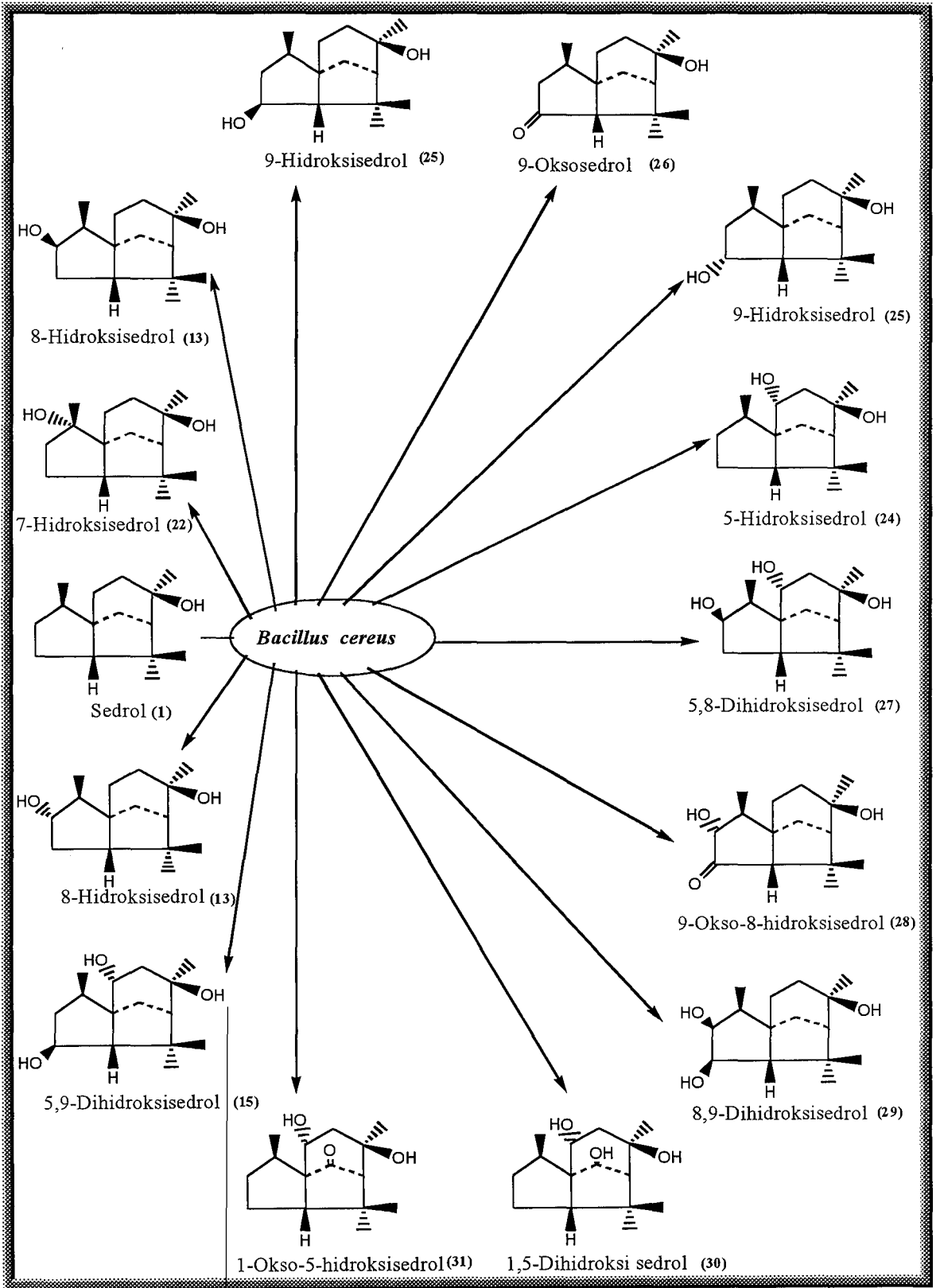
Şekil 1.7. Sedrol'ün *Aspergillus niger*, *Cephalosporium casiiicola*, *Rhizopus stolonifer*, *Beauveria sulfurescens* ile biyotransformasyonu [89]



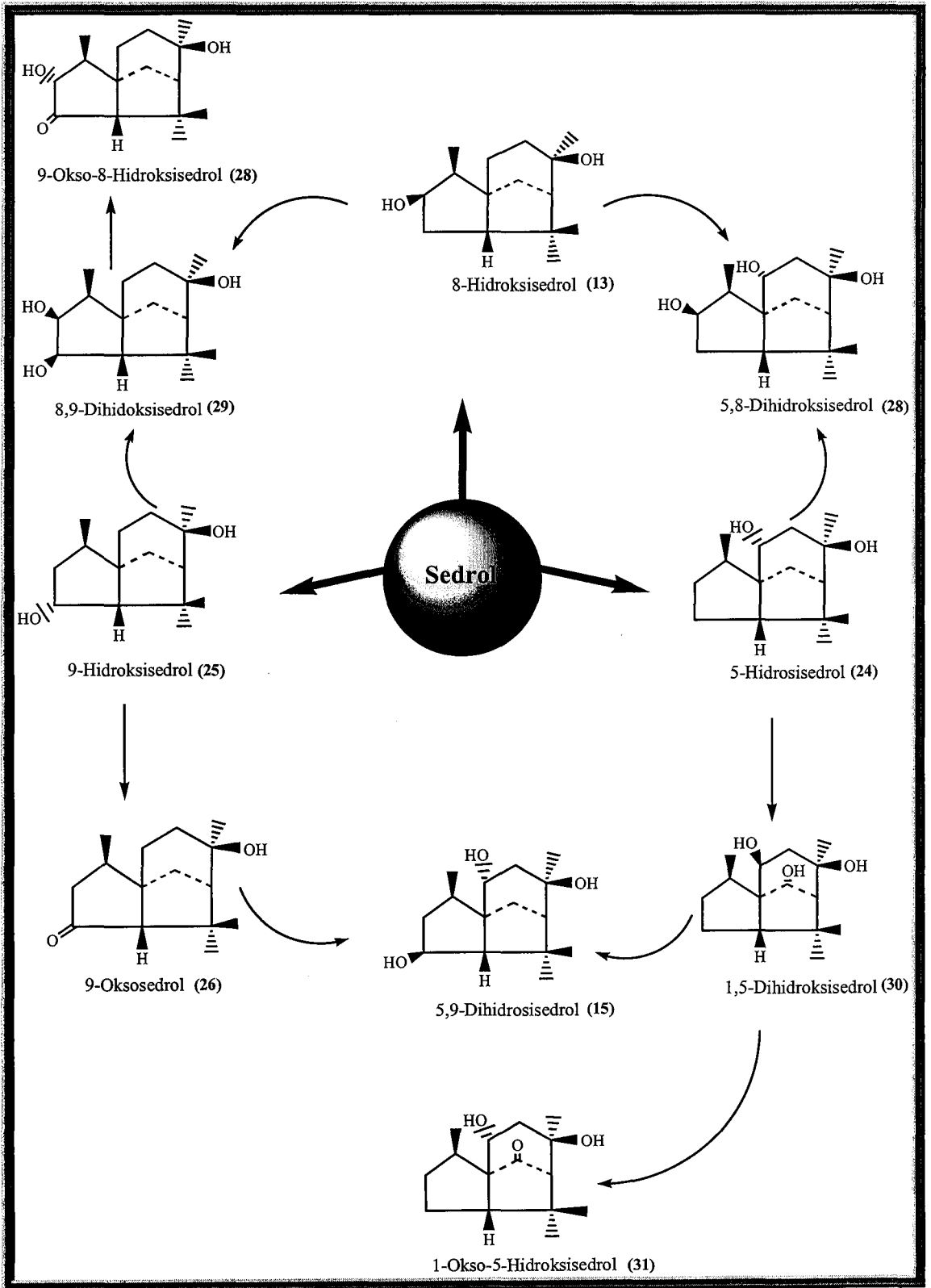
Şekil 1.8. Sedrol'ün *Absidia coerulea* ile biyotransformasyonu [91]



Şekil 1.9. Sedrol'ün *Bacillus cereus* ile biyotransformasyonu [87]



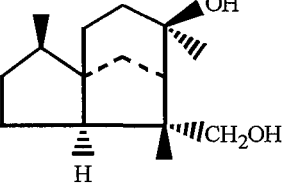
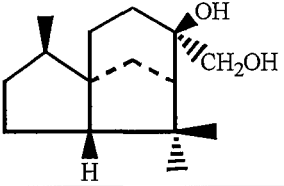
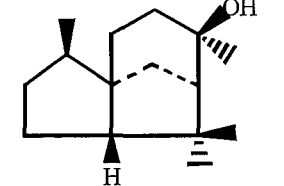
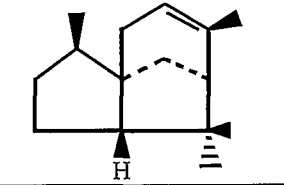
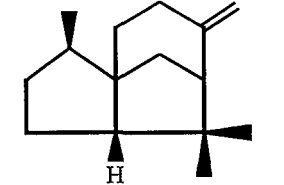
Şekil 1.10. Sedrol'ün biyotransformasyon ürünlerinin birbirine dönüşümü [87]



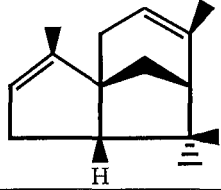
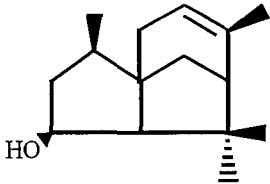
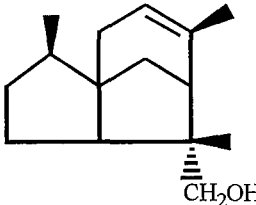
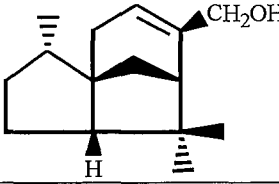
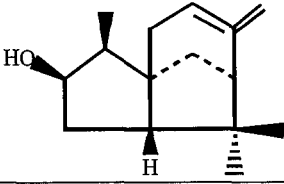
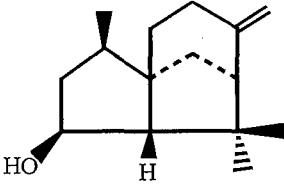
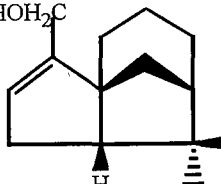
1.2.6. Sedran Çekirdeği Taşıyan Bileşikler

Bitkisel kaynaklardan izole edilmiş ya da biyotransformasyon ürünü olan veya kimyasal sentezlerle elde edilmiş türevler Çizelge 1.3.'de verilmektedir [94].

Çizelge 1.3. Sedrol'un türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
1.	$C_{15}H_{26}O_2$	238.369		(3β, 11α-form): 3,12-Sedrandiol, Sedrandiol	32
1.a.	$C_{15}H_{26}O_2$	238.369	-	(3β, 11β-form): (8,14-Sedrandiol), Sedrandiol	33
2.	$C_{15}H_{26}O_2$	238.369		(3α-form): 3,15-Sedrandiol	34
3.	$C_{15}H_{26}O$	222.370		(3β-form): 3-Sedranol, Sedrol	1
4.	$C_{15}H_{24}$	204.355		(2α, 6α-form): 3-Sedrene, α-Sedren	35
4.a.	$C_{15}H_{24}$	204.355	-	(2β, 6β-form): α-Funebren	36
5.	$C_{15}H_{24}$	204.355		(7αH, 10βH): 3(15)-Sedren, β-Sedren	37
5.a.	$C_{15}H_{24}$	204.355	-	(7βH, 10αH-form): 7,10-Diepi-β-Sedren	38

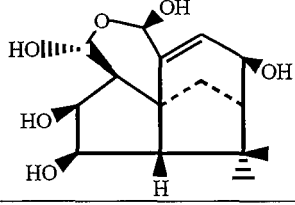
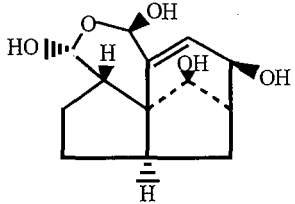
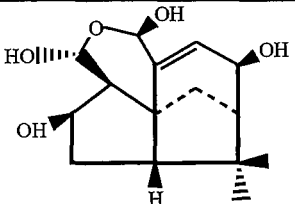
Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
6.	$C_{15}H_{24}$	204.355		7-Sedren	39
7.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		(9β-form): 3-Sedren-9-ol, α-Bitol	40
8.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		3-Sedren-12-ol	41
9.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		3-Sedren-15-ol	42
9.a.	$C_{15}H_{22}O$	218.338	-	15-Aldehit: 3-Sedren-15-al	43
10.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		(8β-form): 3(15)-Sedren-8-ol, β-İzobitol	44
11.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		(9β-form): 3(15)-Sedren-9-ol, β-Bitol	45
12.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		7-Sedren-14-ol	46
12.a.	$C_{15}H_{22}O$	218.338	-	14-Aldehit: 7- Sedren-14-al	47
12.b.	$C_{15}H_{22}O_2$	234.338	-	14-Karboksilik asit: 7- Sedren-14-al	48

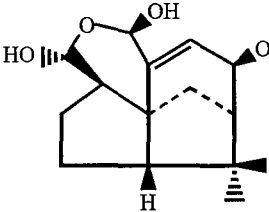
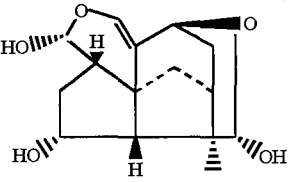
Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
13.	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321		(4 β ,14 α -form): 4,12;14,15-Diepoksi- 5(15)-izosedren-14-ol, 12- Deoksotriksilingolit	49
14.	$C_{15}H_{20}O_4$	264.321		(2 α ,6 α ,10 β H-form): 2,4-Dihidroksi-3-sedren- 1,5-dion, γ-Perezol	50
14.a.	$C_{20}H_{26}O_5$	346.422	-	(2 α ,6 α ,10 β H-form): 2-Angeloil: α-Perezol	51
14.b.	$C_{20}H_{26}O_5$	346.422	-	(2 β ,6 β ,10H-form): 2-Angeloil: β-Perezol	52
15.	$C_{15}H_{22}O_3$	250.337		(1R,2 β ,6 β ,10 α H-form): 1,2-Dihidroksi-3-sedren-4- on, Koreosenarion	53
16.	$C_{15}H_{24}O$	220.354		(3 β ,11 β form): 3,12-Epoksisedran, 8,14-Sedranoksid	54
16.a.	$C_{15}H_{22}O_2$	234.338	-	(1R,2 β ,6 β ,10 α H-form): 12-Okso: 12,3-Sedranolid	55
17.	$C_{15}H_{18}O_4$	262.305		(14 α -form): 14,15-Epoksi-14-hidroksi- 3,5(15)-izosedradien-12- oik asit, Triksol	56
18.	$C_{15}H_{18}O_4$	262.305		(4 β ,14 α -form): 14,15-Epoksi-14-hidroksi- 5(15)-izosedren-12,4-olid, Triksikingolid	57
18.a.	$C_{20}H_{26}O_5$	346.422	-	(4 β ,14 α -form): 2-Metilbutanoil Triksikingolid	58

Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'un türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
19.	$C_{15}H_{22}O_6$	298.335		(3 β ,8 β ,9 β -form): 14,15-Epoksi-4-izosedren-3,8,9,14,15-pentol	59
19.a.	$C_{29}H_{40}O_{10}$	548.629	-	(3 β ,8 β ,9 β -form): 3-Angeloil, 8-(2-metilbutanoil), 14,15-di-Asetil	60
20.	$C_{15}H_{22}O_5$	282.336		(1 β ,3 α ,15 β -form): 14,15-Epoksi-4-izosedren-1,3,14,15-tetrol	61
20.a.	$C_{24}H_{32}O_9$	464.511	-	(1 β ,3 α ,15 β -form): 3-(2,3-Epoksi-2-metilbutanoil), 14,15-di-asetil	62
20.b.	$C_{27}H_{36}O_{10}$	520.575	-	(1 β ,3 α ,15 β -form): 3-(2,3-Epoksi-2-metilbutanoil), 1-propanoil, 14,15-di-asetil	63
20.c.	$C_{29}H_{40}O_{10}$	548.629	-	(1 β ,3 α ,15 β -form): 3-(2,3-Epoi-2-metilbutanoil), 1-(2-metilbutanoil), 14,15-di-asetil	64
20.d.	$C_{29}H_{40}O_{10}$	548.629	-	(1 β ,3 α ,15 β -form): 3-(2,3-Epoksi-2-metilbutanoil), 1-(3-metilbutanoil), 14,15-di-asetil	65
20.e.	$C_{24}H_{32}O_8$	448.512	-	(1 β ,3 α ,15 β -form): 3-Angeloil, 14,15-di-asetil	66
21.	$C_{15}H_{22}O_5$	282.336		(8 β -form): 14,15-Epoksi-4-izosedren-3,8,14,15-tetrol	67
21.a.	$C_{24}H_{32}O_8$	448.512	-	(8 β -form): 3-Angeoil, 14,15-di-asetil	68
21.b.	$C_{29}H_{38}O_9$	530.614	-	(8 β -form): 3-Angeoil, 14,15-di-asetil	69

Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
22	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266.336		(3β,14α,15β-form): 14,15-Epoksi-4-izosedren-3,14,15-triol	70
22.a	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	350.411	-	(3β,14α,15β-form): Proustianol	71
22.b	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	432.513	-	(3β,14α,15β-form): Angeloilprustianol	72
23	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.320		(4β,9α,12α,14α-form): 14,15-Epoksi-5(15)-izosedren-9,12,14-triol	73
23.a	C ₂₅ H ₃₆ O ₇	448.555	-	(4β,9α,12α,14α-form): 9-(3-Metilbutanoil), 14-(2-Metilbutanoil)	74
23.b	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	446.539	-	(4β,9α,12α,14α-form): 9-(3-Metil-2-butenoil), 14-(2-Metilbutanoil)	75
23.c	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	404.459	-	(4β,9α,12α,14α-form): 12-Keton, 14-(2-metilbutanoil),:	76
23.d	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	446.539	-	(4β,9α,12α,14α-form): 12-Keton, 9-(2-metilbutanoil), 14-(3-metilbutanoil)	77
23.e	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	444.524	-	(4β,9α,12α,14α-form): 12-Keton, 9-(3-metil-2-butenoil), 14-(2-metilbutanoil)	78
23.f	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	446.539	-	(4β,9α,12α,14α-form): 12-Keton, 9-(3-metilbutanol), 14-(2-metilbutanoil)	79
23.g	C ₂₅ H ₃₆ O ₇	448.555	-	(4β,9α,12β,14α-form): 9-(3-Metilbutanoil), 4-(2-Metilbutanoil).	80
23.h	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	446.539	-	(4β,9α,12β,14α-form): 9-(3-Metil-2-butenoil), 14-(2-Metilbutanoil)	81
23.i	C ₂₅ H ₃₄ O ₆	430.540	-	(4β,9α,12β,14α-form): 12-Deoksi, 9-(metil-2-butenoil), 14-(2-Metilbutanoil)	82

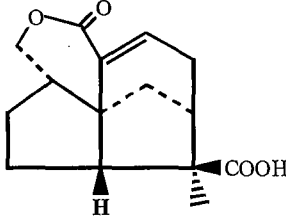
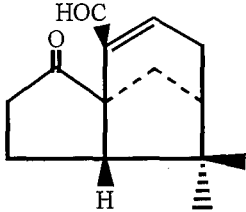
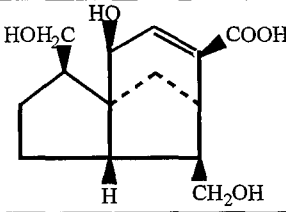
Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
24.	$C_{15}H_{24}O_3$	252.353		3-Hidroksi-12-sedranoik asit	83
25.	$C_{15}H_{24}O_3$	252.353		(3 β -form): 3-Hidroksi-14-sedranoik asit, İzosedrolük asit	84
26.	$C_{15}H_{24}O_2$	236.353		(3 β -form): 3-Hidroksi-9-sedranon, 4-Ketosedrol	26
27.	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321		(2 α ,6 β -form): 4-Hidroksi-3-sedren-1,5-dion	85
27 a	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321	-	(2 β ,6 β -form): β-Pipitzol	86
28.	$C_{15}H_{22}O_3$	250.337		(5 β -form): 5-Hidroksi-3-sedren-15-oik asit, Renekraviotonik asit	87
29.	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321		3-Hidroksi-4-izosedren-15,14-olid	88
30.	$C_{15}H_{20}O_4$	264.321		(5 β ,7 α -form): 5-Hidroksi-14-okso-3-sedren-15-oik asit, Lassijalarik asit	89

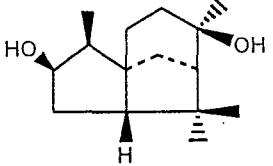
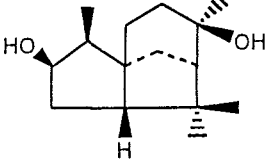
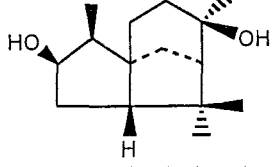
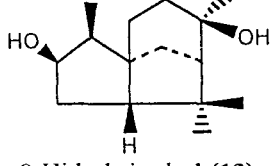
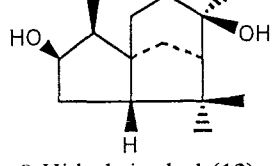
Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Açık Formül	Madde Adı	F.N.
30.a.	$C_{15}H_{22}O_4$	266.336	-	(5 β ,7 α -form): 14-Alkol: 5,14-Dihidro-3-sedren- oik asit, Epilassilakşolik asit	90
30.b.	$C_{15}H_{20}O_5$	280.320	-	14-Karboksilik asit: Lassiçelloik asit	91
30.c.	$C_{15}H_{22}O_4$	266.336	-	14-Alkol: Lassilakşolik asit	92
31.	$C_{14}H_{18}O_3$	234.294		12-Hidroksi-7-okso-14-nor-4-trixen -15-al	93
32.	$C_{15}H_{22}O$	218.338		4-İzosedren-15-al	94
33.	$C_{15}H_{24}O$	236.353		4-İzosedren-14,15-diol	95
33.a.	$C_{15}H_{20}O_2$	232.322	-	Dialdehid: 4-İzosedren-14,15-dial	96
34.	$C_{15}H_{20}O_2$	232.322		4-İzosedren-15,14-olid	97
34.a.	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321	-	9 α -Hidroksi-4-izosedren-15,14-olide	98
34.b.	$C_{15}H_{20}O_3$	248.321	-	14 β -Hidroksi-4-isedren-15,14-olid	99
35.	$C_{15}H_{20}O_2$	232.322		4-İzosedren-14,15-olid	100

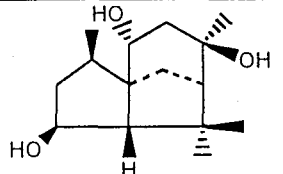
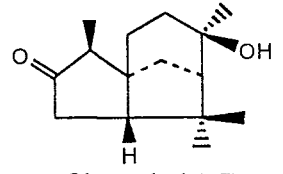
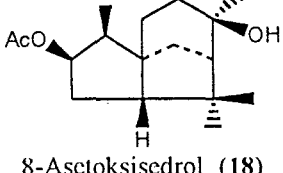
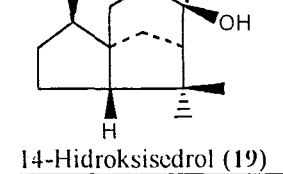
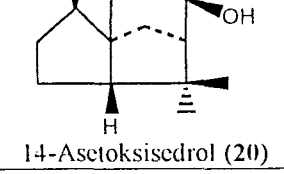
Çizelge 1.3. (Devamı) Sedrol'ün türevleri

No	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Acık Formül	Madde Adı	F.N.
36.	$C_{15}H_{18}O_4$	262.305		4-İzosedren-15,14-olid-12-oik asit	101
37.	$C_{14}H_{18}O_2$	218.295		7-Okso-14-nor-4-izosedren-15-al	102
38.	$C_{15}H_{22}O_5$	282.336		(5β,7αH,11β-form): 5,12,14-Trihidroksi-3-sedren-15-oik asit, Lakşolik asit	103
38.a.	$C_{15}H_{20}O_6$	296.319	-	(5β,7αH,11β-form): 14-Karboksilik asit: 5,12-Dihidroksi-3-sedren-14,15-dioik asit, Şelloik asit	104
38.b.	$C_{15}H_{20}O_5$	280.320	-	(5β,7βH,11β-form): 14-Aldehit: 5,12-Dihidroksi-14-okso-3-sedren-15-oik asit, Jalarik asit	105
38.c.	$C_{31}H_{48}O_7$	532.716	-	(5β,7βH,11β-form): 14-Aldehid, 5-(16-hidroksi-9-hekzadekanoil): Jalarik ester I	106
38.d.	$C_{31}H_{50}O_9$	566.731	-	(5β,7βH,11β-form): 14-Aldehide, 5-O-(9R,10R,16-trihidroksihekzadekanoil): Jalarik ester II	107
38.e.	$C_{15}H_{20}O_6$	296.319	-	(5β,7βH,11β-form): 14-Karboksilik asit: Epışelloik asit	108

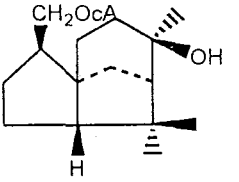
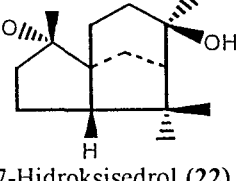
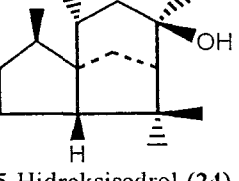
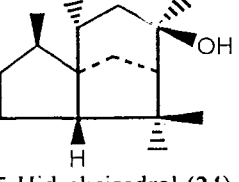
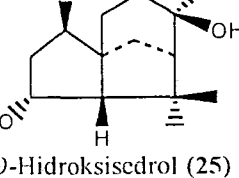
Çizelge 1.4. Sedrol türevlerinin ¹³C-NMR verileri

Formül	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	K.N.
 8-Hidroksisedrol (13)	43.1	61.0	74.8	35.3	34.2	50.8	50.2	81.4	32.1	52.7	42.5	27.3	29.5	12.3	30.2	87
 8-Hidroksisedrol (13)	43.5	60.6	73.4	41.3	33.2	52.9	47.1	81.1	36.2	56.8	46.1	28.4	29.7	12.2	32.5	87
 8-Hidroksisedrol (13)	42.4	54.3	75.0	35.0	32.7	52.7	46.0	79.9	33.9	61.5	42.9	29.1	27.5	10.7	30.2	85
 8-Hidroksisedrol (13)	43.0	60.9	74.8	35.2	34.2	50.7	50.1	81.3	32.1	52.6	42.5	27.3	29.5	12.3	30.1	86
 8-Hidroksisedrol (13)	42.3	61.4	74.9	34.9	33.8	52.6	45.9	79.8	32.7	54.2	42.8	29.0	27.4	9.60	30.1	86

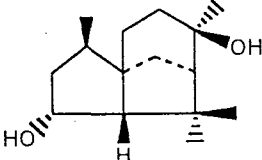
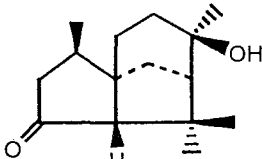
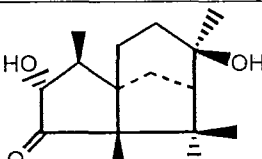
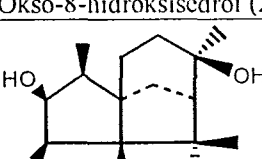
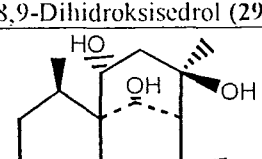
Çizelge 1.4. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹³C-NMR verileri

Formül	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	KN
 <p>5,9-Dihidroksisedrol (15)</p>	40.5	61.5	74.1	44.6	71.6	57.5	39.5	48.7	73.0	56.2	44.8	31.1	28.9	14.1	31.2	87
 <p>8-Oksosedrol (17)</p>	37.7	52.3	74.1	35.1	34.3	52.6	48.4	220	35.8	58.1	44.1	30.0	27.8	8.9	30.1	85
 <p>8-Asetoksisedrol (18)</p>	42.3	54.2	74.8	34.9	31.3	52.9	44.5	82.5	32.1	61.5	42.9	29.1	27.5	10.0	30.3	85
 <p>14-Hidroksisedrol (19)</p>	42.6	57.4	75.0	34.9	30.9	53.3	50.4	32.1	25.8	61.2	43.0	29.0	27.5	63.7	30.2	85
 <p>14-Asetoksisedrol (20)</p>	42.3	57.3	34.8	34.8	31.0	53.3	46.4	32.3	25.8	61.1	43.1	29.0	27.5	65.4	30.2	85

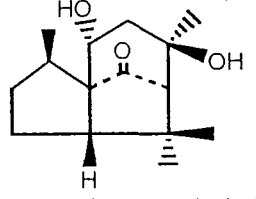
Çizelge 1.4. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹³C-NMR verileri

Formül	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	K.N.
 <p>14-Asetoksisedrol (20)</p>	42.6	61.2	74.9	34.9	30.9	53.3	50.1	32.1	25.8	57.4	43.0	29.0	27.5	63.7	30.2	86
 <p>7-Hidroksisedrol (22)</p>	41.3	53.7	74.8	35.6	30.1	57.6	79.5	36.5	21.5	59.2	44.9	27.4	28.4	24.3	30.4	87
 <p>5-Hidroksisedrol (24)</p>	40.1	60.9	74.5	45.4	72.0	58.2	44.6	40.1	26.3	52.2	43.0	27.4	29.3	14.7	31.5	87
 <p>5-Hidroksisedrol (24)</p>	41.3	55.2	140	118	39.3	50.0	50.8	81.3	35.2	56.3	47.1	26.5	27.1	12.7	24.7	86
 <p>9-Hidroksisedrol (25)</p>	42.7	62.7	74.8	34.7	31.3	52.9	37.8	46.2	73.0	60.9	46.0	28.9	30.1	15.1	30.6	87

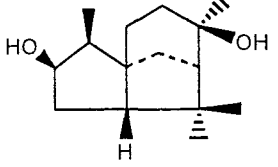
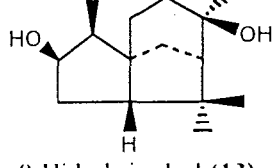
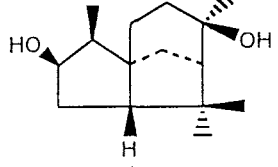
Çizelge 1.4. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹³C-NMR verileri

Formül	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	KN
 <p>9-Hidroksisedrol (25)</p>	42.5	61.6	74.9	34.8	31.8	53.0	38.8	46.8	73.5	65.2	42.8	28.6	28.3	15.3	30.3	87
 <p>9-Oksosedrol (26)</p>	41.4	60.9	74.4	33.2	31.3	53.6	35.4	47.7	22.0	59.7	46.2	28.2	28.4	18.3	30.4	87
 <p>9-Okso-8-hidroksisedrol (28)</p>	36.1	59.4	74.4	34.7	34.3	49.6	42.8	80.8	21.8	61.9	45.6	28.1	28.2	12.9	30.5	87
 <p>8,9-Dihidroksisedrol (29)</p>	43.0	61.5	74.6	34.2	31.7	50.3	49.1	82.1	73.3	57.3	44.6	30.1	28.7	11.8	31.2	87
 <p>1,5-Dihidroksisedrol (30)</p>	65.8	60.2	72.6	41.6	71.0	58.7	52.2	46.7	44.5	60.8	42.3	31.3	29.1	15.5	32.3	87

Çizelge 1.4. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹³C-NMR verileri

Formül	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	K.N.
 <p>1-Okso-5-hidroksisedrol (31)</p>	21.9	58.7	74.1	46.1	71.5	57.6	49.5	36.4	40.8	57.1	46.1	28.1	28.0	19.0	31.1	87

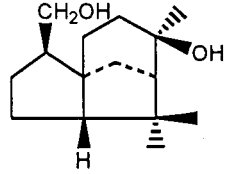
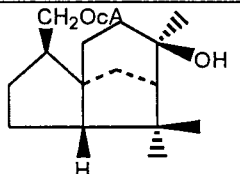
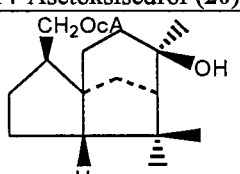
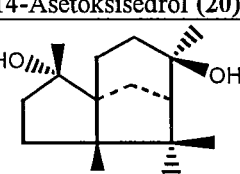
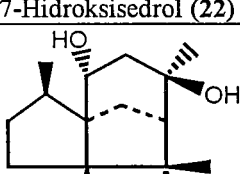
Çizelge 1.5. Sedrol türevlerinin ¹H-NMR verileri

Formül	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	Diğer	Diğer	F.N.
 <p>8-Hidroksisedrol (13)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.03	1.26	1.34	0.96 7.20	OH 3.60 dt 9.8 5.1	-	[87]
 <p>8-Hidroksisedrol (13)</p>	-	-	-	-	3.99 <i>J</i> 9.85 .2Hz	-	0.32	-	-	-	-	1.65	1.50	1.15	1.70 7.00	OH 4.06 dd <i>J</i> =10 6.5 Hz	OH dt 4.36 <i>J</i> =9.8 5.2 Hz	[87]
 <p>8-Hidroksisedrol (13)</p>	-	-	-	-	-	-	-	1H q 4.29 <i>J</i> =4 Hz	-	-	-	3H s 1.01	3H s 1.27	3H s 1.35	3H d 0.91 <i>J</i> =7.4 Hz	-	-	[85]

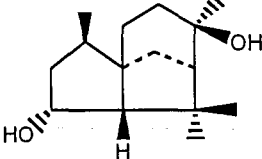
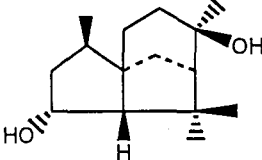
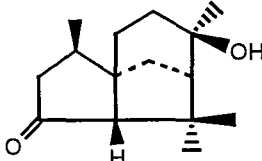
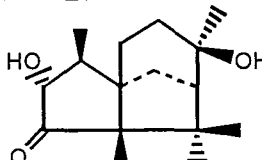
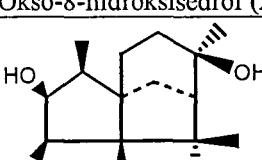
Çizelge 1.5. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹H-NMR verileri

Formül	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	Diger	Diger	E.N.
 8-Hidroksisedrol (13)	-	-	-	-	-	-	-	1H dt 3.61 J=10 5.5 Hz	-	-	-	3H s 1.26	3H s 1.01	3H s 1.34	3H d 0.96 J=7.0 Hz	OH dd 3.50 J=10 3.2Hz	4.06	[86]
 8-Hidroksisedrol (13)	1H d J=1.5 10.5 Hz	-	-	-	-	-	-	1H dt 4.26 5.0 4.0 Hz	-	1H t 2.16 J=9.0 Hz	-	3H s 1.26	3H s 1.00	3H s 1.34	3H d 0.91 J=7.0 Hz	-	-	[86]
 5,9-Dihidroksisedrol (15)	3.26	-	-	-	3.78 J= 9.9 6.3 Hz	-	-	-	4.36 J= 5 Hz	-	-	1.35	1.42	1.24	11.5 7.00	OH 3.78 dd J=9.9 6.3 Hz	OH m 4.36	[87]
 8-Oksosedrol (17)	1H 1.29 J= 12 Hz	1H d 1.53 J= 5 Hz	-	1H 2.05	1H 1.44	-	1H dq 2.06 J=2.71 Hz	-	1H dd 2.20 J=193 Hz	1H ddd J=119 Hz	1H ddt 1.70 J=133 Hz	3H 0.92	3H 1.27	3H 1.38	3H 0.93 J= 7.3 Hz	-	-	[85]
 8-Asetoksisedrol (18)	-	-	-	-	-	5.26 J= 4.2 Hz	-	-	-	-	-	3H s 1.01	3H s 1.34	-	3H d 0.82 J= 7.3 Hz	OAc 3H s 2.04	-	[85]

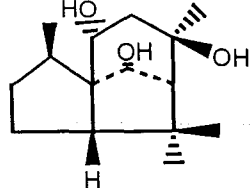
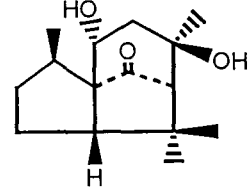
Çizelge 1.5. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹H-NMR verileri

Formül	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	Diger	Diger	F.N.
 <p>14-Hidroksisedrol (19)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3H s 1.02	3H s 1.28	3H s 1.34	1H dd 3.49 J=7.7 10.6 Hz	-	-	[85]
 <p>14-Asetoksisedrol (20)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3H s 1.01	3H s 1.27	3H s 1.33	1H dd 3.95 J=7.2 11 Hz	OAc 3H s 2.05	-	[85]
 <p>14-Asetoksisedrol (20)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3H s 1.27	3H s 1.02	3H s 1.33	1H dd 3.49 J=7.5 10.5 Hz	-	-	[86]
 <p>7-Hidroksisedrol (22)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.18	1.28	1.05	1.29 s	-	-	[87]
 <p>5-Hidroksisedrol (24)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.26	1.04	1.34	1.14 7.10	OH 3.78 dd J=9.2 6.1 Hz	-	[87]

Çizelge 1.5. (Devam) Sedrol türevlerinin ¹H-NMR verileri

Formül	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	Diğer	Diğer	F.N.
 <p>9-Hidroksisedrol (25)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.35	1.44	1.28	0.92 7.30	OH 4.34 dd 8.6 4.3	-	[87]
 <p>9-Hidroksisedrol (25)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.32	1.40	1.05	0.89 6.80	OH 3.50 m	-	[87]
 <p>9-Oksosedrol (26)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.33	1.48	1.03	0.89 7.20	-	-	[87]
 <p>9-Okso-8-hidroksisedrol (28)</p>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.97	1.49	1.33	1.17 6.50	OH 3.89 d J=11 Hz	-	[87]
 <p>8,9-Dihidroksisedrol (29)</p>	-	-	-	-	-	-	-	3.55	4.06 J=3.6 Hz	-	-	1.33	1.43	1.26	0.98 7.10	OH J=10 3.2 Hz	OH 4.06 J=3.6 Hz	[87]

Çizelge 1.5. (Devamı) Sedrol türevlerinin ¹H-NMR verileri

Formül	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	Diğer	Diğer	F.N.
 <p>1,5-Dihidroksisedrol (30)</p>	3.26 <i>J</i> =2.6 Hz	-	-	-	3.78 <i>J</i> =9.8 6.4 Hz	-	-	3.89	-	-	-	1.29	1.23	1.43	1.16 7.20	OH 3.26 d <i>J</i> =2.6 Hz	OH dd 3.78 <i>J</i> =9.8 6.4 Hz	[87]
 <p>1-Okso-5-hidroksisedrol (31)</p>	-	-	-	-	-	-	-	3.48	4.06	-	-	1.32	1.46	1.11	1.20 7.20	OH 3.99 dd <i>J</i> =9.8 6.3 Hz	-	[87]

1.2.7. Sedrol'ün Biyolojik Aktivitesi

Antiparaziter etki: *In vitro* deneyleri sonucunda *Schistosoma mansoni*'ye karşı 10.0 µg/ml konsantrasyonda aktif bulunmuştur [95].

İnsektisit etki: *In vivo* deneyler sonucunda *Juniperus recurva* üzerindeki dişi *Culex pipiens* isimli böcek için LD₅₀ 21.2 µg/böcek verilerek üzerinde aktif olduğu gözlenmiştir [96].

Sivrisinekler üzerindeki LD₅₀ değeri 21.2 µg olarak belirlenmiştir [97].

Antienflamatuvar etki: Tavşanlarla yapılan deneylerde 13.0 µg/ml'de aktif bulunmuştur [97].

Antifungal etki: *Lentinus edodes* ile yapılan çalışmalarda aktif olduğu belirlenmiştir [98].

Akut toksisite: LD₅₀ 425 mg/kg i.p. olarak bulunmuştur [7].

Sitotoksik etki: NIH 3T3/F29 fibroblast hücre kültürlerinde 100 µg/ml dozda hücrelerin tamamının öldüğü, dozun azalmasına bağlı olarak etkinin azaldığı bildirilmektedir. C6 glikoma hücre serisi hücre kültürlerinde Sedrol'ün 0.1 mg/ml'den itibaren giderek artan dozlarda ve p<0.005 anlamlılıkta hücreleri öldürdüğü belirlenmiştir. CO25 N-RAS onkojeni taşıyan miyoblast hücre kültürlerindeki çalışmalarda 0.1-1.0 µg/ml dozları uygulanmış ve ayrıca deksametazon fosfatın (DMP) 1 µg konsantrasyondaki dozu ile kombinasyonu kullanılmıştır. Sedrol'ün 0.1 µg/ml'de DMP'nin tümörojenik etkisini engellediği, 1 µg/ml'de bu etkinin arttığı ancak sadece uygulanan hücrelerde toksisitenin başladığı gözlenmiştir

1. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde, çalışmalarda kullanılan Sedrol'ün kaynağı, kimyasal maddeler, reaktifler, mikroorganizmalar ve aletler açıklanmakta, yapılan deneysel ve bu çalışmalarda kullanılan yöntemler hakkında bilgi verilmektedir. Çalışmalar, TBAM (Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi)'da bulunan Biyotransformasyon, Bitki Kimyası ve Kalite Kontrol Laboratuvarları'nın imkanları kullanılarak yapılmıştır.

2.1. Materyal, Kimyasal Maddeler, Aletler ve Mikroorganizmalar

2.1.1. Materyal

Bu çalışmalarda kullanılan Sedrol, *Juniperus foetidissima* (Sedir Ağacı) bitkisinden buhar distilasyonu metodu ile elde edilen uçucu yağdan izole edilmiştir.

2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- Aseton (Teknik)
- Yeast ekstrakt (Acumedia)
- Dietileter (Birpa)
- Etil alkol (Teknik)
- Etil asetat (Aldrich)
- Hekzan (Merck)
- Magnezyum sülfat (Fluka)
- Patates dekstroaz agar (Acumedia)
- Pepton (Sigma)
- Disodyumhidrojenfosfat (Merck)
- Potasyum klorür (Aldrich)
- Sabouraud dekstroaz agar (Acumedia)
- Sakkaroz (Aldrich)
- Silikajel 60F₂₅₄ (Merck 5554)
- Silikajel 60G₂₅₄ (Merck 7734)
- Sodyum klorür (Aldrich)
- Sodyum sülfat (Merck)
- Sülfirik asit (Merck)
- Vanilin (Merck)

2.1.3. Kimyasal Reaktifler

Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ve Anisaldehit-H₂SO₄ reaktifi, Sedrol ve metabolitlerinin varlığının belirlenmesinde kullanılır. Vanillin ve H₂SO₄ çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır ve plak üzerine püskürtülmeden önce (1:1) karıştırılarak kullanılır.

Vanilin reaktifi (%1'lik etanoldeki vanilin çözeltisi)

Sülfürik asit reaktifi (%5'lik etanoldeki H₂SO₄ çözeltisi)

2.1.4. Kullanılan Aletler

- Çalkalayıcı İnkübatör, (GFL, 3032)
- Çalkalayıcı, (Gerhardt LS5/RO5)
- Erime Derecesi Tayin Apareyi, (Gallenkamp)
- Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi Sistemi (GC/MS)
 - a. (GC/MS-QP 5050A)
 - b. (Hewlett Packard 5890)
- Hava Sterilizatörü, (Honeywell 11500)
- İTK Seti
- Laminar Akış Kabini, (Bio Class II, NU-425-400-E)
- Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi Sistemi (NMR), (Varian, Mercury-300)
- Otoklav, (Hirayama, HV-50)
- Öze Sterilizatörü, (PBI, 23662)
- Polarimetre, (Oriel Pol S-2 Polarimetresi)
- Rotavapor, (BIBBY, RE100B)
- Terazi, (Scaltec, SBA/61)
- UV Lamba, (Camag 254-366 nm)
- Vorteks, (Ika, SM)

2.1.5. Mikroorganizmalar

Bu çalışmalarda iki grup mikroorganizma kullanılmıştır. Biyotransformasyon amaçlı olan mikroorganizmalar Çizelge 2.1.'de, antibakteriyal aktivite tayini için kullanılan patojen mikroorganizmalar Çizelge 2.2.'de koleksiyon numaraları ile birlikte verilmektedir.

Çizelge 2.1.Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

No	Mikroorganizma	Kaynak
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATTC 9763
2	<i>Hansenula anomala</i>	ATCC 20170
3	<i>Penicillium claviforme</i>	MR 376*
4	<i>Cunninghamella elegans</i>	NRRL 9245
5	<i>Streptomyces griseus</i>	ATTC 23137
6	<i>Chephalosporium aphidicola</i>	IMI 68981*
7	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mik.***
8	<i>Fusarium solani</i>	ATCC 12820
9	<i>Cunninghamella echinulata</i>	ATCC 9224
10	<i>Trichothecium roseum</i>	CM 5060*
11	<i>Aspergillus niger</i>	ATTC 10549
12	<i>Aspergillus niger</i>	Japonya**
13	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	ATTC 76503
14	<i>Aspergillus flavus</i>	ATTC 9807
15	<i>Penicillium spinulosum</i>	Mik.***
16	<i>Fusarium moniliforme</i>	NRRL 2374
17	<i>Rhizopus stolonifer</i>	NRRL 2710
18	<i>Mucor mucedo</i>	NRRL 3654
19	<i>Mucor mucedo</i>	NRRL 1425
20	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	NRRL 3182
21	<i>Fusarium culmorum</i>	Mik.***
22	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Mik.***

Çizelge 2.2. Antibakteriyal etki için kullanılan mikroorganizmalar

No	Mikroorganizma	Kaynak
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
4	<i>Enterobacter aerogines</i>	NRL 3567
5	<i>Proteus vulgaris</i>	NRL B-123
6	<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B-4420
7	<i>Candida albicans</i>	O.G.Ü.****

2.2.Yöntem

2.2.1. Katı Besi Ortamının Hazırlanması

Mikroorganizmaların üretilmesi ve saklanması için katı besi ortamı olan Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılır. Kullanılacak besi ortamına belirlenen oranda deiyonize su katılır ve ısıtılarak karıştırılır, deney tüpüne ve petri kutularına uygun miktarda ilave edilir. Tüpler pamukla kapatılıp alüminyum folyo ile örtülür. 121°C ve 1 atm. basınçta 20 dakika

*Karachi Üniversitesi, Kimya Fakültesi, Kimya bölümünden temin edilmiştir.

**Tokushima Bunri Üniversitesi, Aile İlimleri Fakültesinden temin edilmiştir.

***Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

****Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilmiştir.

boyunca otoklavda sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi tamamlanınca tüpler eğik pozisyonda 24 saat bekletilir. Steril kabin içinde, daha önceden oda ısısına getirilmiş suşlardan 4 mm çapında kesit alınarak deney tüpüne ve 1.petri kutularına konmuş steril besi yerlerine transfer edilir.

Ekimi yapılan mikroorganizmaları uzun süre muhafaza etmek için, mikroorganizmaların bulunduğu tüp ya da petri kutuları parafilm ile iyice sarılır. Bu şekilde mikroorganizmalar buz dolabında (4°C'de) 2-3 ay kadar saklanabilir.

2.2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması

2.2.2.1. Birinci Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması (α -Medyum)

Glikoz (20g), Pepton (5g), NaCl (5g), Yeast Ekstrakt (5g) ve Na_2HPO_4 (5g) karışımı distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır [99].

2.2.2.2. İkinci Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması

Glikoz (15g), Sakkaroz (15g), Pepton (5g), K_2HPO_4 (1g) ve $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ KCl (1g) karışımı distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır [100-102].

Besi ortamı için yukarıda belirtilmiş olan maddeler distile su ile kaynama ısısına ulaşana kadar ısıtılarak karıştırılır ve biraz soğuduktan sonra erlenlere aktarılır. Erlenlerin ağızları pamukla kapatılır ve alüminyum folyo ile sarılır. 121°C ve 1 atm. basınçta 20 dakika otoklavda sterilize edilir.

2.2.3. Biyotransformasyon İşlemi

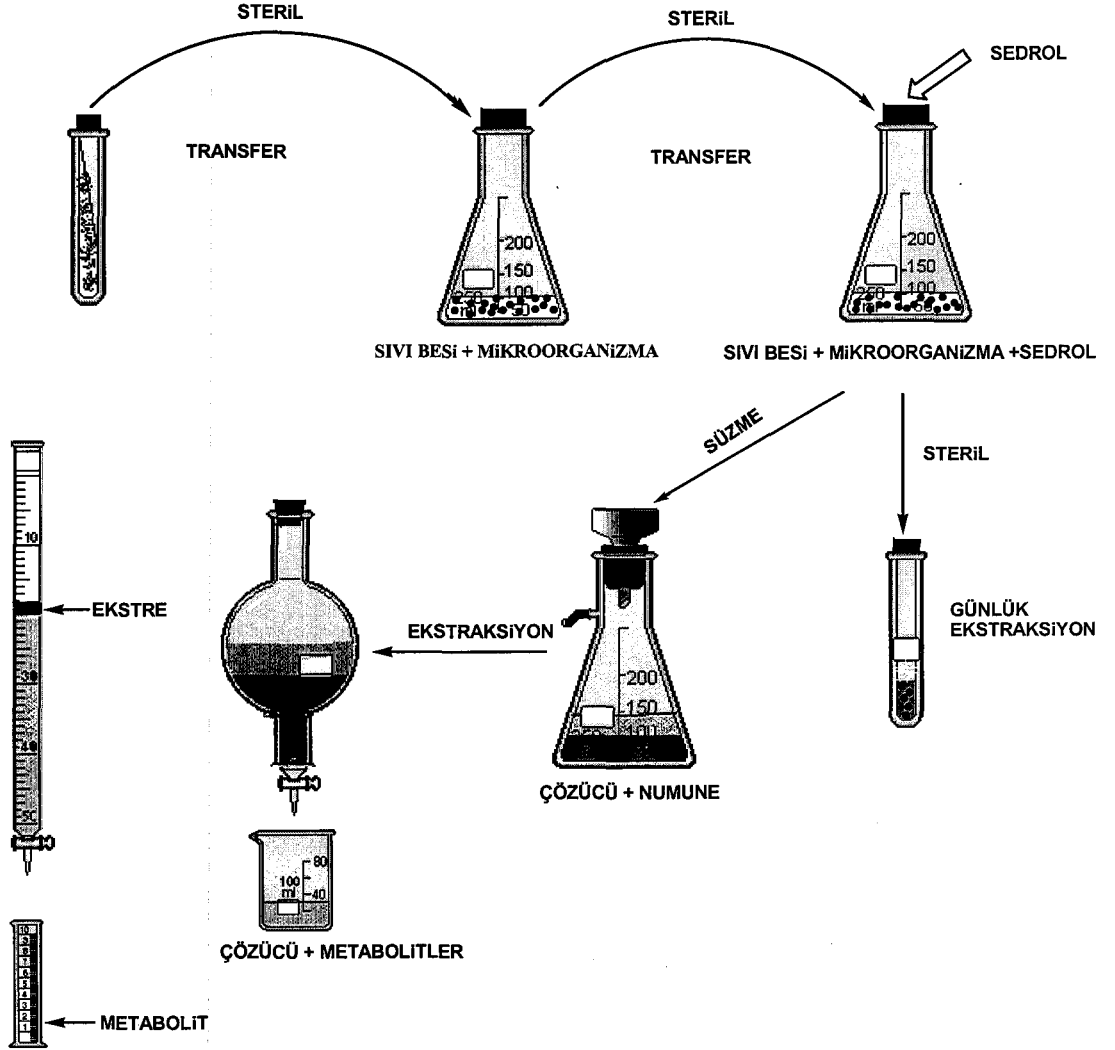
Biyotransformasyon işleminin sağlanması için, mikroorganizmalar üretilir ve üzerine Sedrol ilave edilir. Bu işlemi yapmak için iki yöntem kullanılmıştır [103].

Yöntem I: Sıvı besi ortamından 1ml alınır, inokülasyonu gerçekleşmiş katı besi ortamındaki mikroorganizma üzerine ilave edilir ve öze ile karıştırılır. Bir miktarı öze ile kazınır ve sıvı besi ortamı içeren erlene aktarılır. Aktarma işlemi bittiğinde erlenler pamukla kapatılarak çalkalayıcıya yerleştirilir. 120 rpm'de oda sıcaklığında (24-27°C) 48-72 saat çalkalanmaya bırakılır. Sıvı besi ortamındaki mikroorganizmalar yeterince geliştikten sonra, steril kabin içinde diğer sıvı besilerinin herbirine 5'er ml sıvı besi ortamı içindeki mikroorganizmalar ilave edilir. 120 rpm'de oda sıcaklığında 24 saat çalkalanmaya bırakılır. Transferden 24 saat sonra 100 ml sıvı besi ortamına (bir erlen hariç) 31.25 g Sedrol / 0.5 ml Etanol çözeltisi ilave edilir ve 120 rpm'de 14 gün süresince çalkalanmaya bırakılır.

Bu süre içerisinde her gün bir erlenin içinden 5 ml numune alınarak deney tüpüne aktarılır, üzerine 5 ml etil asetat ilave edilir ve vortekste iyice çalkalanır. Bu şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon gerçekleştirilmiş olur. İTK'de veya GC/MS'de incelenir ve Sedrol'ün dönüşümü kontrol edilir. Dönüşüm maksimuma ulaştığı zaman izolasyona başlanır. İzolasyon için etil asetat çözeltisi ilave edilir. Böylece biyotransformasyon durdurulmuş olur.

Ayrılan erlen, sadece mikroorganizma ile besiyi içerdiği için ekstraksiyon işlemi sırasında mikroorganizmalardan ve sıvı besiden çözücüye geçen istenmeyen kısımları teşhis etmekte kullanılır.

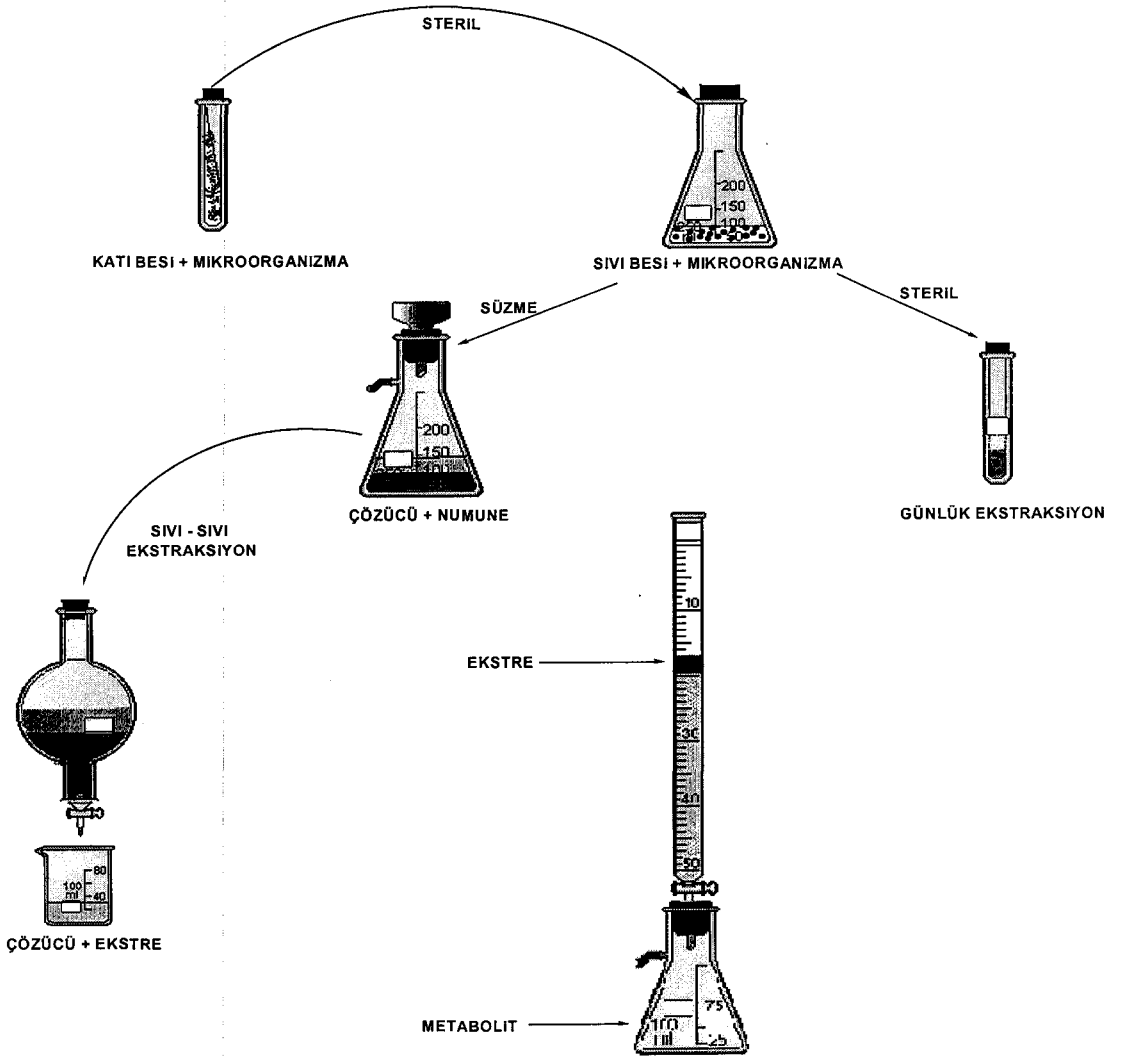
Şekil.2.1.Yöntem I (Biyotransformasyon İşlemi)



Yöntem II: Katı besi ortamındaki mikroorganizma, steril kabin içinde uygun bir şekilde steril öze ile parçalanarak sıvı besi ortamı içeren erlenlere aktarılır. Aktarma işlemi bittiğinde erlenler pamukla kapatılarak çalkalayıcıya yerleştirilir. 120 rpm'de oda sıcaklığında (24-27°C) 48-72 saat çalkalanmaya bırakılır. Sıvı besi ortamındaki mikroorganizmalar yeterince geliştikten sonra steril kabinde 30 mg Sedrol ilave edilir ve 120 rpm'de 14 gün süresince çalkalanmaya bırakılır.

Her gün erlenlerin içinden 5 ml numune (sıvı besi, mikroorganizma) alınarak deney tüpüne aktarılır ve üzerine 5 ml etil asetat ilave edilir. Vortekste iyice çalkalanır. Böylece sıvı-sıvı ekstraksiyon gerçekleştirilmiş olur. İTK'de veya GC/MS'de incelenerek Sedrol'ün dönüşüp dönüşmediği kontrol edilir. Dönüşüm maksimuma ulaştığı zaman izolasyona başlanır. İzolasyon için dietileter ilave edilir. Böylece biyotransformasyon durdurulmuş olur.

Şekil.2.2.Yöntem II (Biyotransformasyon İşlemi)



2.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemi

2 mg etken madde, 2 ml DMSO (dimetilsülfoksit)'te çözülerek 1 mg/ml (1000 µg/ml) konsantrasyonlu stok çözelti hazırlanır. 1. kuyucuğa 200 µl stok çözelti, 2-11. kuyucuklara 100 µl distile su konur. 1. kuyucuktan 100 µl stok çözelti alınarak 2. kuyucuğa aktarılır. 2. kuyucuktan itibaren 100'er µl'lik çözeltilerin 11.kuyucuğa kadar aktarılması ile seyreltme işlemi tamamlanır. 24 saat boyunca Müller-Hinton broth (MHB) besi ortamında 37°C de geliştirilmiş mikroorganizmalar, çift kuvvet sıvı besi ortamında seyreltilir. Bu mikroorganizma çözeltilerinden her kuyucuğa 100 µl ilave edilir. 12. kuyucukta etken madde çözeltisi olmaksızın mikroorganizma çözeltisi bulunur ve kontrol amaçlı olarak kullanılır.

Bu şekilde hazırlanan mikropate, 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılır, üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki konsantrasyon MIC (minimal inhibe edici konsantrasyon) değeri olarak kaydedilir.[104]

2.2.5. Süzme İşlemi:

Süzme, vakum yardımıyla içine filtre kağıdı yerleştirilmiş Buchner hunisi kullanılarak gerçekleştirilir.

2.2.6. Metabolitlerin Ekstraksiyonu, İzolasyonu ve Yapı Tayini

2.2.6.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Yöntem I: Süzüntü ayırma hunisine alınarak iyice çalkalanır, kısa bir süre bekletildikten sonra faz ayrımı oluşur, üstteki etil asetatlı faz alınır. Kalan sulu kısım en az 2 defa daha ekstre edilmelidir. Toplanan etil asetatlı kısımlar susuz Na₂SO₄' tan süzülür ve rotavaporda yoğunlaştırılır. Elde edilen ekstre az miktarda silikajelle iyice karıştırılır ve 50°C'de ısıtılıp akıcı hale gelmesi sağlanarak hazırlanmış kolonun üzerine ilave edilir.

Yöntem II: Süzüntü, ayırma hunisine alınıp üzerine dietileter ilave edilerek iyice çalkalanır. Kısa bir süre bekletildikten sonra faz ayrımı oluşur, üstteki dietileterli faz alınır. Kalan sulu kısım bir defa daha dietileterle ekstre edilip sonunda bir seferde etil asetatla ekstre edilir. Toplanan kısımlar susuz Na₂SO₄ 'dan süzülür, rotavaporda

yoğunlaştırılır. Elde edilen ekstre az miktarda silikajelle iyice karıştırılır. 50°C’de ısıtılarak akıcı hale gelmesi sağlanır ve hazırlanmış kolonun üzerine ilave edilir.

2.2.6.2.Kolon Kromatografisi (KK)

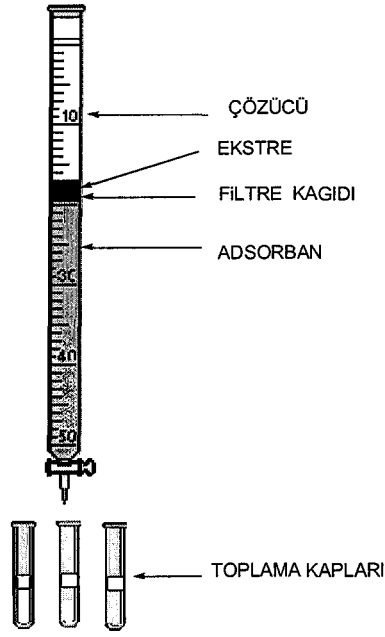
Kolon kromatografisi preparatif amaçla uygulanır. Bunu gerçekleştirmek için musluklu cam kolon ve kolon dolgu maddesi olarak silikajel kullanılır. Elüsyonda ilk kullanılacak olan çözücü ile süspansiyon haline getirilmiş olan adsorban, uygun şekilde kolona doldurulur. Daha sonra biyotransformasyon sonucu elde edilmiş ekstre, (1:2) oranında adsorbana emdirildikten sonra kolona ilave edilir. Uygun bir çözücüyle yıkamaya başlanır. Altan toplanan fraksiyonlar İTK da incelenerek benzerler birleştirilir. Kullanılan çözücüler ve çözücü sistemleri Çizelge 2.3. ve 2.4.’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. *Fusarium culmorum*’dan elde edilen metabolitin izolasyonu için kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi

Kullanılan Çözücü	Çözücü Oranı	Çözücü Miktarı (ml)	Fraksiyon No
Hekzan	-	50	1-10
Hekzan:Aseton	(9:1)	25	11-16
Hekzan:Aseton	(8:2)	75	17-32
Hekzan:Aseton	(8:3)	50	33-38
Hekzan:Aseton	(8:3)		39-44
Hekzan:Aseton	(8:4)	75	45-47
Hekzan:Aseton	(8:4)		48-54
Hekzan:Aseton	(8:6)	25	55-62
Hekzan:Aseton	(8:7)	100	63-68
Hekzan:Aseton	(8:7)		69-75
Hekzan:Aseton	(8:7)		76-82
Hekzan:Aseton	(8:8)	50	83-93
Hekzan:Aseton	(8:9)	50	94-100
Hekzan:Aseton	(2:1)	100	101-123
Hekzan:Aseton	(3:1)	50	124-140
Aseton	-	50	125-150

Çizelge 2.4. *Aspergillus niger*’den elde edilen metabolitlerin izolasyonu için kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi

Kullanılan Çözücü	Çözücü Oranı	Çözücü Miktarı (ml)	Fraksiyon No
Hekzan	-	25	1-5
Hekzan:Aseton	(9:1)	75	6-11
Hekzan:Aseton	(9:1)		12-21
Hekzan:Aseton	(9:3)	100	22-39
Hekzan:Aseton	(2:1)	250	40-56
Hekzan:Aseton	(2:1)		57-63
Hekzan:Aseton	(2:1)		64-88
Aseton	-	150	89-125



Şekil 2.3. Kolon Kromatografisi

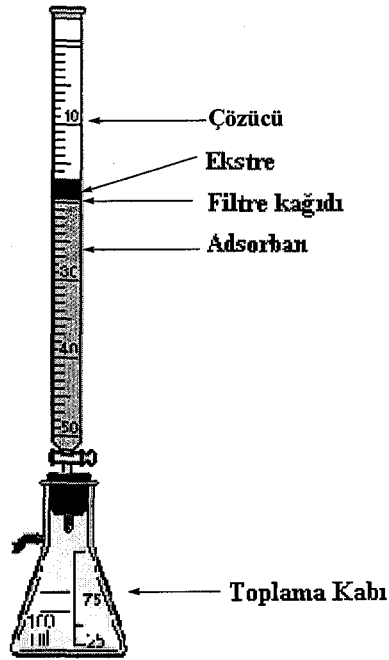
2.2.6.3. Flaş Kromatografisi (FK)

Uygulanacak madde miktarına göre farklı boyutlarda ve alt tarafında cam filtreli perkloratör tipli cam kolon kullanılır. Adsorban olarak kullanılan silikajel kolona kuru olarak doldurulur ve kolon flaş kromatografisi sistemine yerleştirilir. Adsorbanın doyurulması amacıyla kolona üstten yavaş yavaş çözücü ilave edilir ve bir süre bekletildikten sonra alttan vakum uygulanır. Vakumun etkisiyle hızla kolonu terk eden elüat alttan toplanır. Bu işleme, kolona üstten ilave edilen çözücü hacmi ile alttan toplanan çözücü hacmi birbirine eşit oluncaya kadar devam edilir. Bu şekilde adsorbanın çözücü ile tamamen doyması sağlanır.

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstre, (1:2) oranında adsorbana emdirildikten sonra kolona ilave edilir. Üstten her seferinde eşit hacimde çözücü ilave edilip alt taraftan sisteme vakum uygulanır ve eluat toplanır. Vakum uygulama işlemine elüat gelmeyinceye kadar devam edilir. Elde edilen her fraksiyon rotavaporda yoğunlaştırıldıktan sonra İTK'nde incelenir ve benzer fraksiyonlar birleştirilir. Kullanılan çözücüler ve elüasyon şartları Çizelge 2.5.'de verilmektedir.

Çizelge 2.5. *Aspergillus niger* den elde edilen metabolitlerin izolasyonu için flaş kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi

Kullanılan Çözücü	Çözücü Oranı	Çözücü Miktarı (ml)	Fraksiyon No
Hekzan	-	100	1
Hekzan:Eter	(75:25)	100	2
Hekzan:Eter	(50:50)	100	3
Hekzan:Eter	(60:40)	100	4
Hekzan:Eter	(70:30)	100	5
Hekzan:Eter	(80:20)	100	6
Eter	-	100	7
Aseton	-	100	8
Etil asetat	-	100	9



Şekil 2.4.. Flaş Kromatografisi

2.2.6.4. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Rutin kontroller için 0.25 mm kalınlıkta adsorban ile kaplanmış 20x20 cm ebatlarında cam ve alüminyum hazır plaklar kullanılır. Plaklar 1 saat süreyle 100°C' de etüvde aktive edilerek kullanılır. Developman işlemine geçmeden önce süzgeç kağıdı cam kromatografi tankına yerleştirilir. Tank çözücü sistemi ile doyurulduktan sonra developman işlemine başlanır. İşlem bittikten sonra tanktan çıkarılan İTK plakları oda ısısında kurutulduktan sonra plak üzerinde oluşan lekeler öncelikle UV lamba altında (254 nm, 364 nm) incelenerek işaretlenir. Üzerlerine Vanilin-Sülfirik asit reaktifi püskürtülür ve 100-110°C de ısıtılarak renklenmesi sağlanır.

İTK çalışmasında Çizelge 2.6.'da verilen çözücüler ve çözücü sistemleri kullanılır.

Çizelge 2.6. İTK da kullanılan çözücü sistemleri

Sistem	Çözücü Karışımı	Çözücü Oranı
Sistem I	Eter:Hekzan	(4:1)
Sistem II	Eter:Hekzan	(6:3)
Sistem III	Eter:Hekzan	(7:3)
Sistem IV	Diklorometan:Aseton	(3:1)
Sistem V	Etilasetat:Hekzan	(3:1)
Sistem VI	Etilasetat:Hekzan:Metanol	(6:3:1)
Sistem VII	Hekzan:Diklorometan:Aseton	(4:2:2)
Sistem VIII	Hekzan:Etilasetat:Metanol	(6:3:1)
Sistem IX	Hekzan:Eter	(1:1)
Sistem X	Hekzan:Eter	(9:1)

2.2.6.5. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi Sistemi(GC/MS)

Elde edilmiş olan metabolitler, Gaz Kromatografisi kolonunda ayrıldıktan sonra dedektör görevi gören Kütle Spektrometresi'nde her birinin tek tek spektrumları alınır.

Değerlendirmeler, "TBAM Uçucu Yağ Bileşikleri Kütüphanesi" ve "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data" isimli kütüphaneler kullanılarak yapılmıştır.

A) GC/MS Analiz Koşulları

Sistem:	GC/MS-QP 50501
Kolon:	CP sil 5 CB (25m x 0.25mm)
TaşıyıcıGaz:	Helyum
Akış Hızı:	1ml/dak.
Sıcaklıklar:	
Enjeksiyon:	250°C
Kolon:	60°C'de// 5°C/dak // 260°C'de 60 dak
Split Oranı:	50:1
Split Akış Hızı:	50 ml/dak

MS Koşulları:

Elektron Enerjisi:	70 eV
Kütle Aralığı:	30-400 m/z

B) GC/MS Analiz Koşulları

Sistem:	Hewlett-Packard GC/MS 5890
Kolon:	CDX-B, Beta-Cyclodextrin/OV-1701 (30m x 0.25mm)
Taşıyıcı Gaz:	Helyum
Akış Hızı:	1ml/dak.

Sıcaklıklar:

Enjeksiyon:	250°C
Kolon:	70°C'de// 10°C/dak // 230°C'de 60 dak
Split Oranı:	50:1
Split Akış Hızı:	50 ml/dak

MS Koşulları:

Elektron Enerjisi:	70 eV
Kütle Aralığı:	30-400 m/z

2.2.6.6. Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (NMR)

İzole edilen maddeler $CDCl_3$ 'de çözülerek 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları alınmıştır.

Çözücü	:	$CDCl_3$
Referans Pik	:	TMS ve çözücü
1H -Ölçümü	:	300 MHz
^{13}C -Ölçümü	:	200MHz

2.2.6.7. Optik Çevirme

İzole edilen maddelerin spesifik çevirme açıları polarimetre kullanılarak okunur. Kullanılan çözücüler ve konsantrasyonlar sonuç kısmında verilmiştir.

2.2.6.8. Erime Noktası

Kristalizasyon yöntemi ile elde edilen saf maddelerin erime dereceleri Erime Noktası Tayin cihazıyla yapılmıştır.

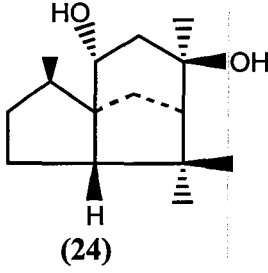
2.2.6.9. Kristalizasyon

Bir karışımda bulunan ve kristallenme özelliğine sahip maddelerin, çözünürlüğünün düşük olduğu bir çözücü içerisinde çözülüp, bir müddet bekledikten sonra çözelti içerisinde katı partiküller şeklinde çökmesi özelliğine dayanarak maddeler kristallendirilir.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu bölümde Sedrol'ün biyotransformasyonu ile oluşan türevlerin yapıları açıklanmakta, biyolojik aktivite testlerinin sonuçları verilmekte ve kaynak bilgileri ile karşılaştırılarak tartışılmaktadır.

3.1. 5- α -Hidroksisedrol



Kapalı Formül	:	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
Molekül Ağırlığı	:	238,369
Erime Noktası	:	104-105°C
[α]²⁰(CHCl₃, c 1.05)	:	- 22,6
Mikroorganizma	:	<i>Fusarium culmorum</i>
Medyum	:	α -Medyum

Fusarium culmorum ve α -medyum besi kullanılarak yapılan çalışmalarda ana türev olarak elde edilmiştir. Ekstraksiyonu bölüm 2.2.6.1'de anlatıldığı şekilde I. yöntem ile yapılmıştır. İzolasyonu, bölüm 2.2.6.2.'de açıklanan kolon kromatografisine göre gerçekleştirilmiştir (530 mg).

Bu madde GC/MS analizinde Rt 20.75 de tek bir pik olarak gözlenmiş ve molekül ağırlığının M⁺238 olması (Şekil 3.1.), Sedrol'e bir hidroksil grubu katılmış olabileceğini düşündürmüştür. ¹³C-NMR sonuçlarında (Şekil 3.3.) δ 71.6 ve 74.6 ppm de gözlenen iki karbon atomu da bu düşüncüyü doğrulamaktadır (Hidroksile komşu karbon atomu). Sedrol ve türevlerinin ¹³C-NMR spektrumlarında, 3 numaralı karbon atomu δ 75 ppm civarında gözlenmektedir. HETCOR (Şekil 3.4.) [105] tekniği ile alınan spektrumlarda C-5 ile, sinyali δ 3.95 ppm de gözlenen bir protonun ilişkisi açıkça görülmektedir. δ 3.95 ppm deki bu proton ancak hidroksile komşu olmasından dolayı bu kadar aşağı alanda yer almaktadır (Şekil 3.2.), Sedrol'de böyle bir konum olmadığı için tüm protonlar maksimum δ 1.9 ppm'e kadar dağılım göstermektedir. Bu bulgular, maddenin 5- α -Hidroksisedrol yapısında olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Kaynak taramalarında, Sedrol'ün biyotransformasyon ürünlerinin oluşumunda hidroksilasyon için uygun konumlar sıralanırken 7, 8, 9, 4, 5 ve 15 numaralı pozisyonlar verilmekte, 7 ve 15'in predominant pozisyonlar olduğu vurgulanmaktadır

[5,85]. Sedrol ile daha önce yapılan biyotransformasyon çalışmalarında 5-Hidroksisedrol elde edildiği bildirilmektedir [92].

GC/MS (70eV)

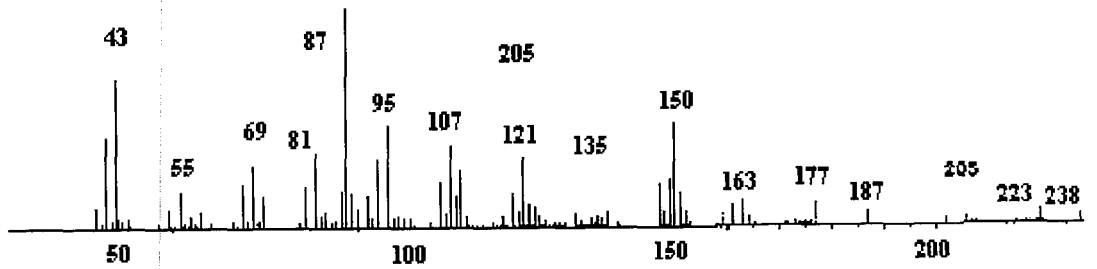
238M, 223(5), 205(5), 177(4), 162(24), 151(60), 133(27),
121(29), 107(32), 93(100), 79(26), 69(20), 55(30)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz)

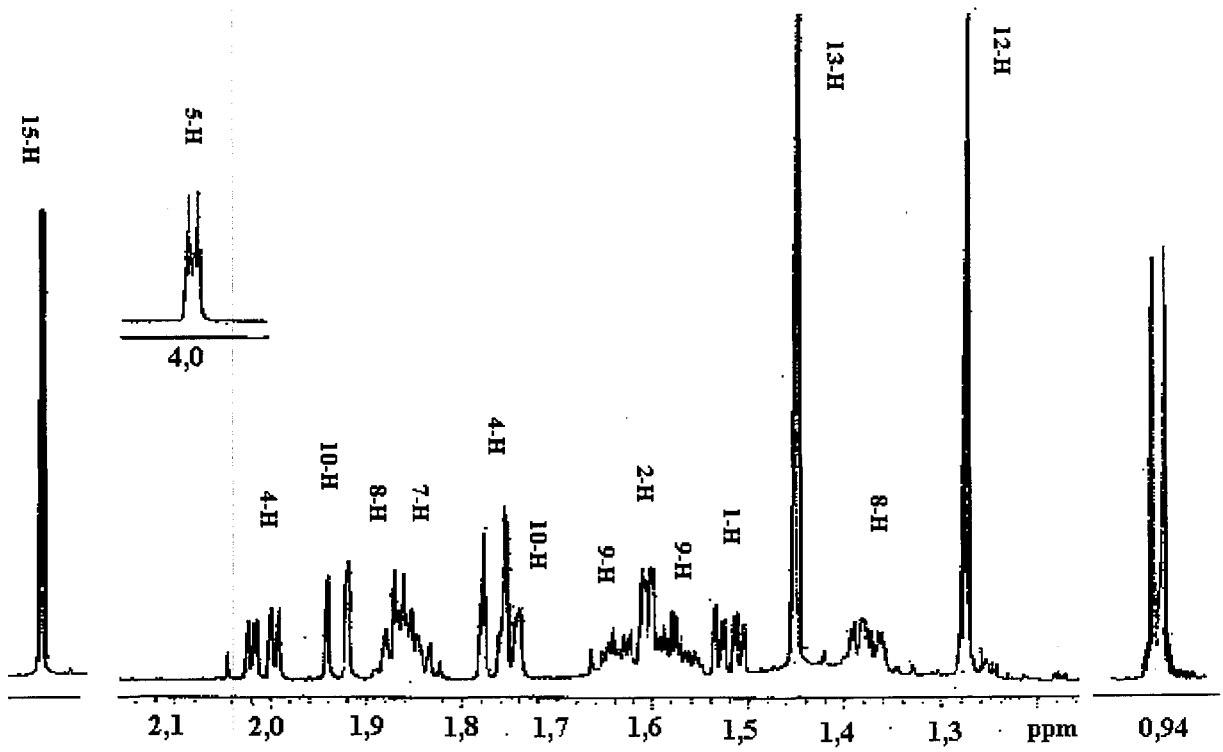
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz)

C	δ (ppm)
1	34.6
2	59.7
3	74.6
4	43.6
5	71.6
6	60.1
7	37.8
8	34.2
9	23.9
10	53.5
11	44.2
12	28.4
13	29.1
14	15.4
15	32.4

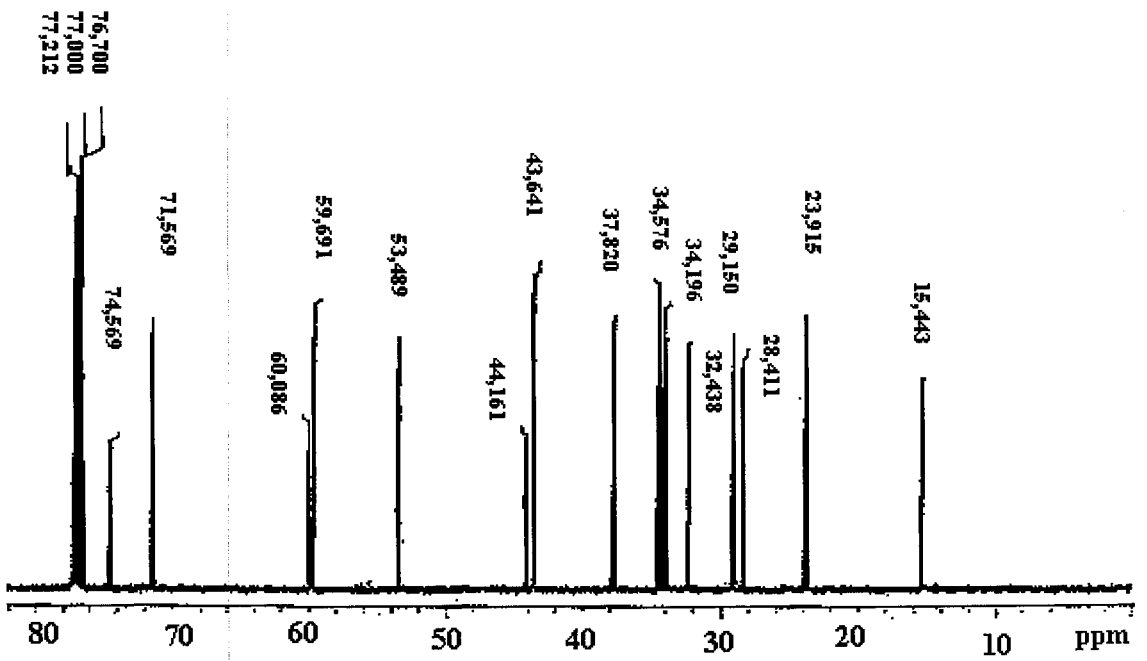
H	δ (ppm)	J (Hz)
CH-1 α	1.52	1H, dddd
CH-1 β	1.92	1H, dd
CH-2	1.60	1H, dd
CH-4	2.01	1H, dd
CH-4	1.76	1H, dt
CH-5	3.95	1H, dd
CH-7	1.86	1H, m
CH-8	1.38	1H, m
CH-9	1.57	1H, m
CH-9	1.63	1H, m
CH-10	1.74	1H, d
CH-12	1.28	3H, s
CH-13	1.45	3H, s
CH-14	1.03	3H, s
CH-15	1.45	3H, s



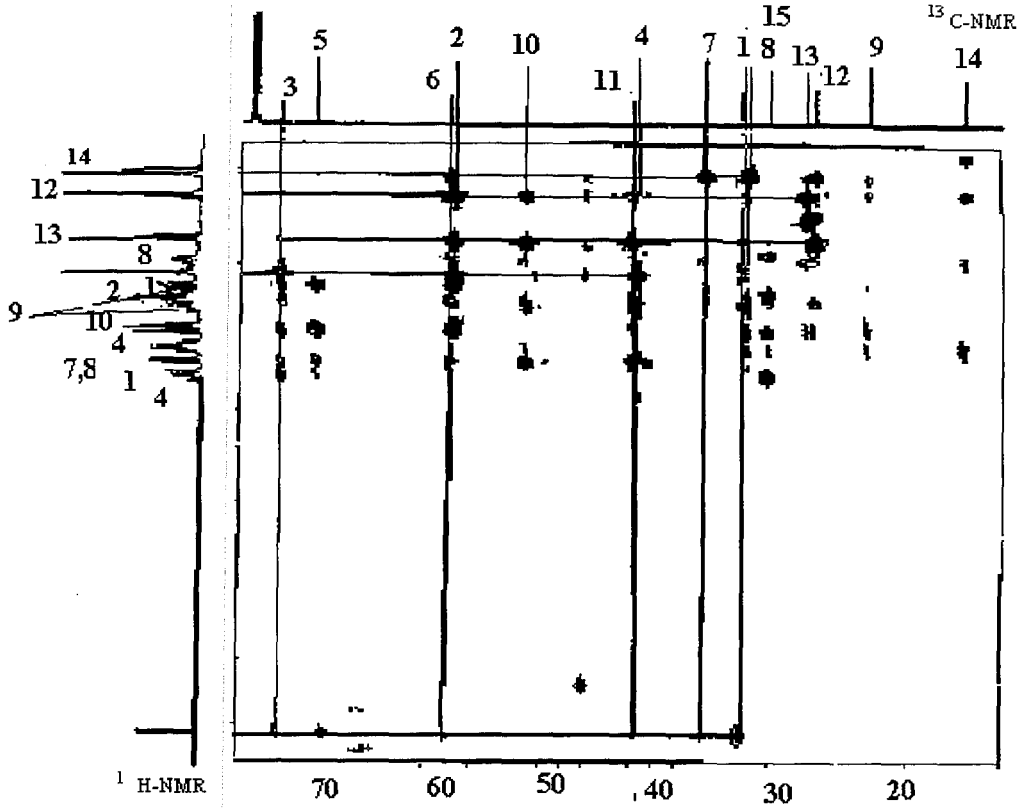
Şekil 3.1. 5- α -Hidroksisedrol'ün Kütle Spektrumu



Şekil 3.2. 5- α -Hidroksisedrol'ün ^1H -NMR Spektrumu

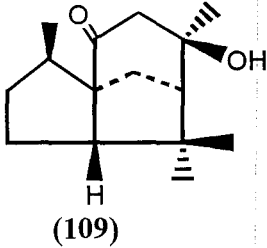


Şekil 3.3. 5- α -Hidroksisedrol'ün ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.4. 5- α -Hidroksisedrol'ün HETCOR Spektrumu

3.2. 5-Oksosedrol



Kapalı Formül	:	$C_{15}H_{24}O_2$
Molekül Ağırlığı	:	236,353
Mikroorganizma	:	<i>Fusarium culmorum</i>
Medyum	:	α -Medyum

GC/MS (70eV)

236[M], 220(29), 203(20), 193(9), 177(20), 167(51), 150(67), 149(71),
121(57), 112(53), 109(100), 93(89), 79(44), 69(42), 55(44), 43(40)

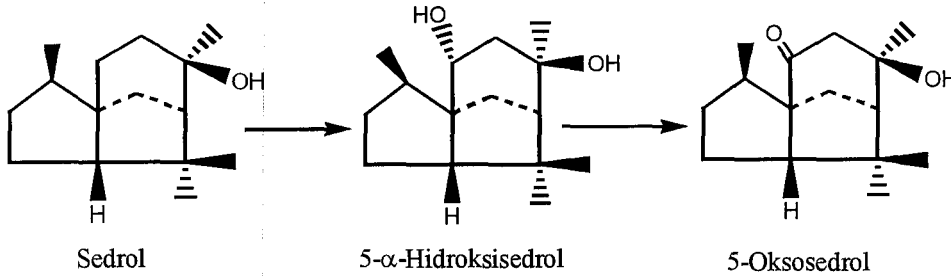
Fusarium culmorum ve α -medyum besisi kullanılarak yapılan biyotransformasyon araştırmalarında elde edilmiştir. Ekstraksiyonu bölüm 2.2.6.1.'de anlatıldığı şekilde I. yöntem ile ve izolasyonu bölüm 2.2.6.2.'de açıklanan kolon kromatografisi yöntemine göre yapılmıştır. (9 mg)

GC/MS analizinde Rt 20.47 de gözlenen pikin molekül ağırlığı M^+ 236 olarak belirlenmiştir. Sedrol ile molekül ağırlıkları arasında 14 fark bulunması molekülde bir

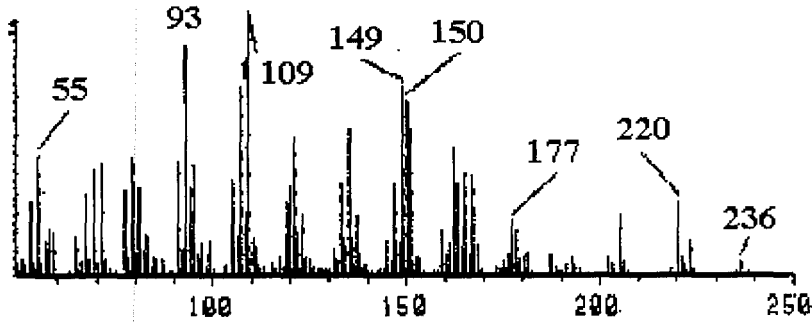
keton grubunun yer aldığı düşünmüştür. Aynı besiden izole edilerek yapısı aydınlatılan 5- α -Hidroksisedrol'ün 5-Oksosedrol'e dönüşme olasılığının yüksek olduğu göz önüne alınarak bu şekilde isimlendirilmiştir.

Kaynak taramaları bu maddenin doymuş hidrokarbonların fonksiyonelliği konusunda yapılan bir dizi sentez çalışması sırasında Sedrol'ün oksidasyonu ile meydana geldiğini göstermiştir [18, 89].

Biyotransformasyonla oluşan tüm ürünler doğal kabul edildiği için, doğal olarak bulunuşu ilk kez duyurulmaktadır.

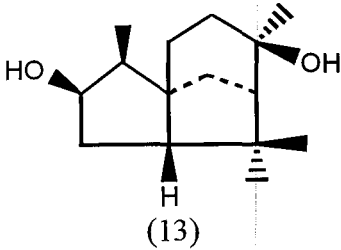


Şekil.3.5. Sedrol'ün biotransformasyon ürününün diğerine dönüşümü



Şekil 3.6. 5-Oksosedrol'ün Kütle Spektrumu

3.3. 8-Hidroksisedrol



Kapalı Formül	:	$C_{15}H_{26}O_2$
Molekül Ağırlığı	:	238,369
$[\alpha]^{20}(CHCl_3, c 1,04)$:	- 26.4
Mikroorganizma	:	<i>Aspergillus niger</i>
Medyum	:	II.Medyum

Aspergillus niger ve II.medyum adı verilen besi kullanılarak yapılan deneyler sonucu elde edilmiştir. Ekstraksiyonu bölüm 2.2.6.1.'de açıklandığı şekilde II. yöntem ile, izolasyonu ise bölüm 2.2.6.3.'de açıklanan flaş kromatografisi yöntemine göre yapılmıştır (350 mg).

GC/MS analizinde Rt 21.25'de gözlenen pikin molekül ağırlığı M^+238 olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlıklarındaki m/z 16'lık fark Sedrole bir hidroksil grubu daha katılmış olma ihtimalini düşündürmüştür. Diğer hidroksilleme ürünü 5- α -Hidroksisedrol ile Rt ve Rf değerlerindeki farklılıklar hidroksillemenin kuvvetle muhtemel olduğu diğer pozisyonlara dikkat çekmektedir. ^{13}C -NMR sonuçları δ 74.9 ve 79.9 ppm'de mevcut iki karbon atomuna OH bağlı olduğunu açıkça göstermektedir.

Bunlardan δ 74.9 ppm'deki karbon atomun DEPT spektrumunda kuarterner karbon olarak görülmekte, bu da 3 no'lu karbon atomuna karşılık gelmektedir. δ 79.9 ppm'de beliren karbon atomu ve ^1H -NMR değerleri tümüyle 8. konumda OH taşıyan türevlere uygunluk göstermektedir [85-87, 92].

14 Numaralı metil grubunun δ 9.5 ppm gibi yukarı alanda olması 8. konumundaki hidroksil gurubunun α pozisyonunda olabileceğini düşündürmektedir [92].

GC/MS (70eV)

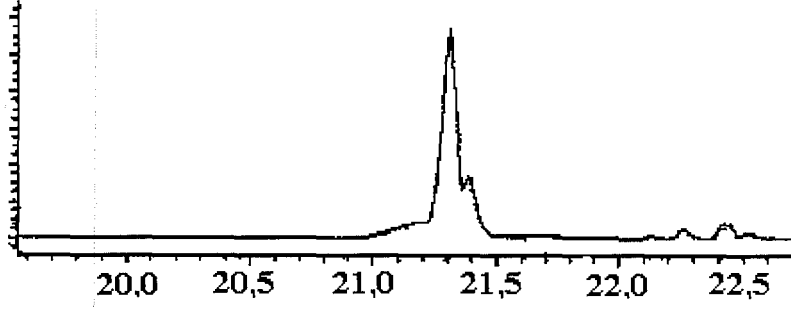
238[M](3), 223(5), 205(5), 177(4), 162(24),151(60), 133(27), 121(29), 107(32), 93(100),79(26), 69(20), 55(30)

^{13}C NMR (CDCl₃ 200 MHz)

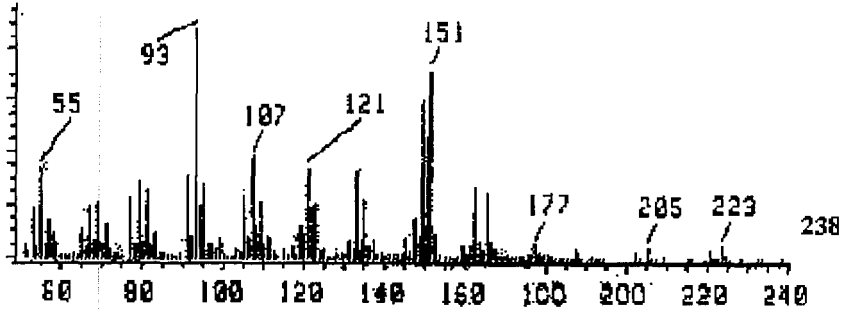
C	ppm
1	32.6
2	61.4
3	74.9
4	33.8
5	42.4
6	52.6
7	42.8
8	79.9
9	34.8
10	54.2
11	45.9
12	27.4
13	29.0
14	9.5
15	30.1

^1H NMR (CDCl₃ 300 MHz)

H	δ (ppm)	J (Hz)
CH-2	1.64	1H, s
CH-8	4.39	1H, dd
CH-9	1.60	1H, d
CH-9	1.66	1H, s
CH-10	2.15	1H, t
CH-12	1.10	3H, s
CH-13	1.47	3H, s
CH-14	0.92	3H, d
CH-15	1.54	3H, s

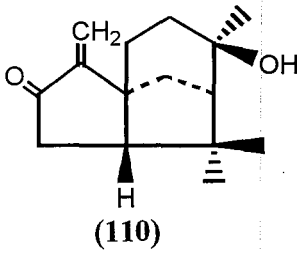


Şekil 3.7. 8-Hidroksisedrol Gaz Kromatogramı



Şekil 3.8. 8-Hidroksisedrol Kütle Spektrumu

3.4. 8-Okso-7:14-didehidrosedrol



Kapalı Formül	:	$C_{15}H_{22}O_2$
Molekül Ağırlığı	:	234
Mikroorganizma	:	<i>Aspergillus niger</i>
Medyum	:	II. Medyum

Aspergillus niger ve II-medyum adı verilen besi kullanılarak yapılan deneyler sonucu elde edilmiştir. Ekstraksiyonu bölüm 2.2.6.1.'de açıklandığı şekilde II. yöntem ile, izolasyonu ise bölüm 2.2.6.3.'de açıklanan flaş kromatografisi yöntemine göre yapılmıştır.

GC/MS analizi sonucunda molekül ağırlığı M^+ 238 olarak belirlenen bu maddenin, sedrolden bir fazla oksijen taşıdığı anlaşılmıştır. Hidrojen sayısının sedrolden 4 tane eksik olması ise çifte bağların oluştuğunu düşündürmüştür.

^{13}C -NMR'ı incelendiği zaman δ 208.5 ppm de keton grubunu taşıyan bir katerner C atomunun varlığı görülmekte, δ 152.5 ppm de yine katerner bir karbon

atomunun alken'e komşu olduğu görülmektedir. δ 116.9 ppm de beliren CH₂ piki ise alken yapısını pekiştirmektedir.

UV spektrumu, α ve β . doymamış bir keton varlığını ortaya koymaktadır. Sedrol ve diğer türevlerde gözlenen 4 metil sinyaline karşılık, ¹H-NMR spektrumunda 3 metil piki görülmekte, diğer türevlerde genellikle δ 9.15 ppm arasında görülen 14 no'lu konumdaki metil karbonuna ¹³C-NMR'da rastlanmamaktadır. Bu durum 14 no'lu konumda CH₂ grubunun oluştuğunu ve α - β doymamışlık tarifine uygun olarak keton grubunun 8 numaralı karbon atomunda olması gerektiğini ortaya koymaktadır.

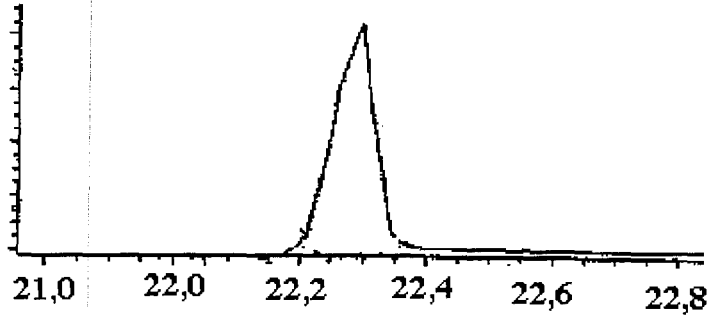
Bu sonuçlara göre diğer türevlere uygun tarzda, bu yeni madde 8-Okso-7-14-didehidrosedrol olarak isimlendirilmiştir.

GC/MS (70eV)

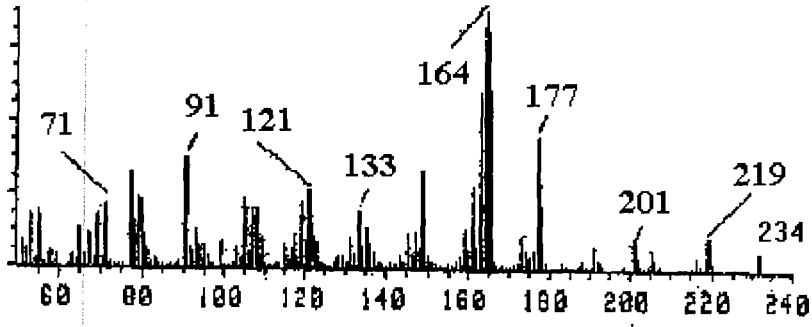
238[M](6), 219(11), 201(8), 191(9), 177(49), 164(100), 149(37), 133(33), 121(11), 105(27), 91(42), 77(35), 71(24), 55(24)

¹³C NMR (CDCl₃ 200mHz)

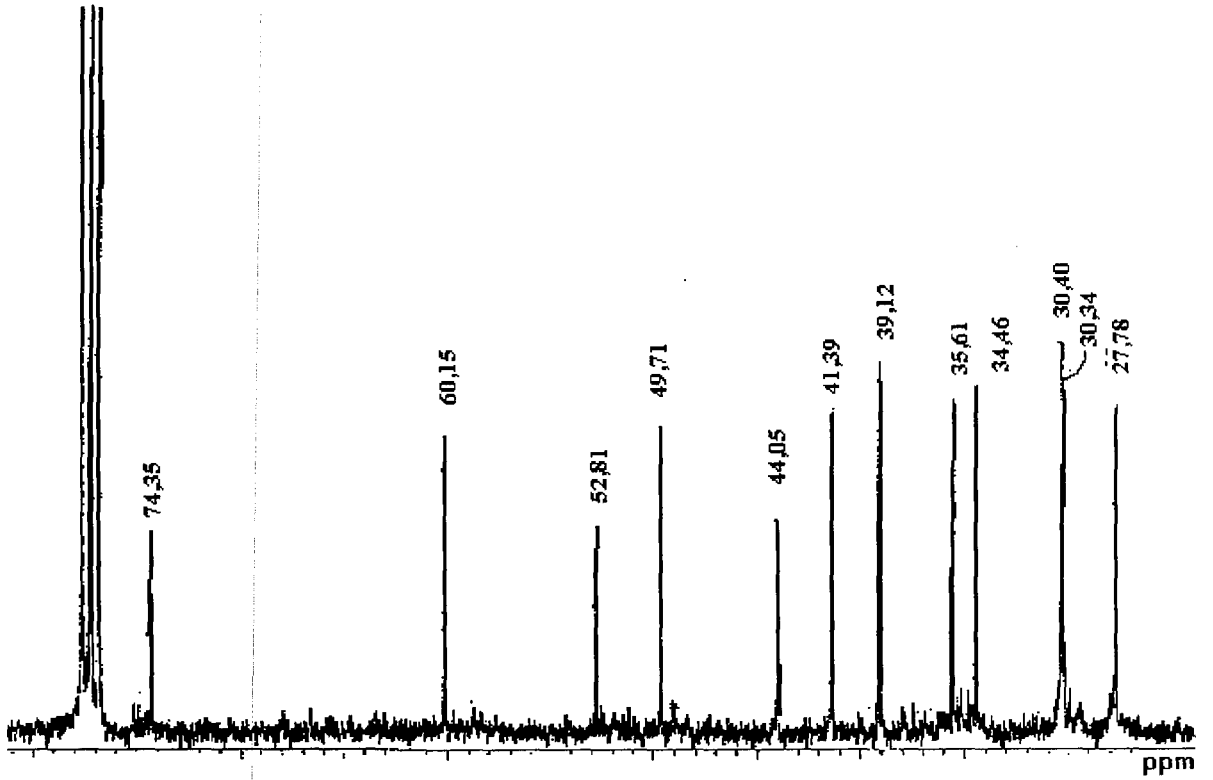
C	δ (ppm)
1	41.4
2	52.8
3	74.4
4	39.1
5	34.5
6	60.1
7	152.5
8	208.5
9	34.5
10	49.7
11	44.0
12	27.8
13	30.3
14	116.9
15	30.4



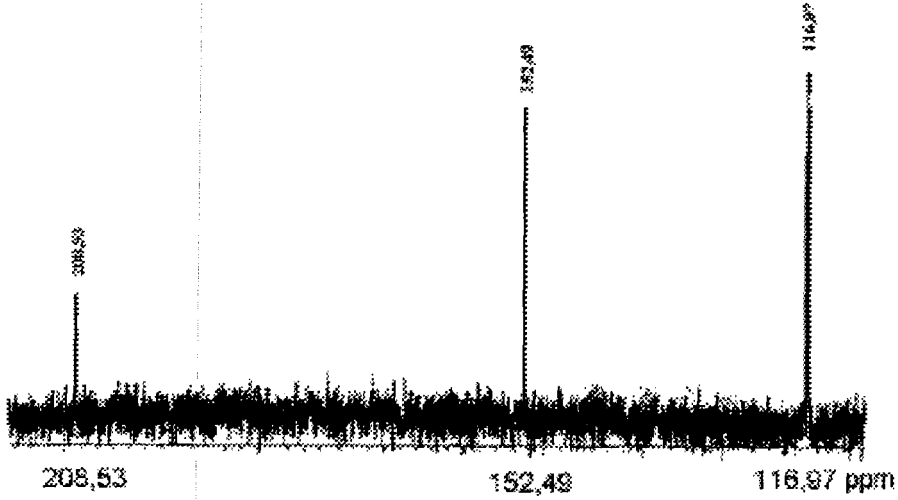
Şekil 3.9. 8-Okso,7:14-didehidrosedrol'ün Gaz Kromatogramı



Şekil 3.10. 8-Okso,7:14-didehidrosedrol'ün Kütle Spektromu



Şekil 3.11. 8-Okso,7:14-didehidrosedrol'ün ¹³C-NMR Spektromu (0-80 ppm)



Şekil 3.11.(Devamı) 8-Okso,7:14-didehidrosedrol'ün ¹³C-NMRSpektrumu (110-210 ppm)

3.5. Biyolojik Aktivite Araştırmalarının Sonuçları

3.5.1. Antibakteriyal ve Antifungal Aktivite Sonuçları

Sedrol'ün biyotransformasyonu sonucu elde edilen 5- α -Hidroksisedrol ve 8-Hidroksisedrol'ün insan ve hayvan patojeni olan 6 farklı (Çizelge 2.2.) mikroorganizmaya karşı antibakteriyal ve antifungal aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuçlar MIC değeri (minimum inhibisyon konsantrasyonu) cinsinden Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Antibakteriyal ve Antifungal Aktivite Sonuçları

Mikroorganizmalar	1	2	3	Kontrol
<i>Escherichia coli</i>	125 μ g	125 μ g	125 μ g	62.25 μ g*
<i>Staphylococcus aureus</i>	125 μ g	125 μ g	125 μ g	7.81 μ g*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.25 μ g	125 μ g	250 μ g	250 μ g*
<i>Enterobacter aerogines</i>	125 μ g	62.25 μ g	125 μ g	125 μ g*
<i>Proteus vulgaris</i>	125 μ g	62.25 μ g	125 μ g	125 μ g*
<i>Salmonella typhimurium</i>	125 μ g	125 μ g	250 μ g	250 μ g*
<i>Candida albicans</i> ***	62.25 μ g	62.25 μ g	125 μ g	125 μ g**

1: Sedrol, 2: 5- α -Hidroksisedrol, 3: 8-Hidroksisedrol, *Kloranfenikol süksinat, **Ketokonazol, ***Fungus

3.6. Tartışma

Sedrol, bilhassa *Juniperus* uçucu yağlarında (Sedir Yağı) ana bileşik olarak rastlanan bir seskiterpendir. Aroma kimyasalları içinde önemli bir yeri olan Sedrol, son yıllarda hızla artan biyotransformasyon araştırmaları için de ilginç bir ham madde olmuştur.

Üniversitemizin Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi'nde daha önce yapılan bir doktora çalışması sırasında Sedrol bol miktarda kristalleştirilmiştir. Aynı zamanda adı geçen Merkez bünyesinde kurulmuş olan Mikrobiyal Biyotransformasyon Laboratuvarı'nda başlatılan araştırmalar için uygun bir hammadde oluşturmuştur.

Ön denemeler Çizelge 2.1.'de listelenmiş olan 22 mikroorganizma ile gerçekteştirilmiştir. Oluşan ürünler İTK ve GC ile karşılaştırılmış ve belli metabolitleri daha bol ürettiği belirlenen iki mikroorganizma ile araştırmalar büyük ölçekte tekrarlanmıştır.

Fusarium culmorum ile Sedrol biyotransformasyonu ilk kez araştırılmaktadır. Bu çalışma sonucu izole edilen ve yapısı aydınlatılan bileşikler 5-Hidroksisedrol (15) ve 5-Oksosedrol'dür (109). 5-Hidroksisedrol *Bacillus cereus* [87] ve *Streptomyces bikiniensis* [92] ile meydana gelmiştir. Bir başka bitkiden ya da uçucu yağdan izolasyonuna rastlanmamıştır.

5-Hidroksisedrol'ün *Enterobacter aerogines* ve *Proteus vulgaris* üzerinde Sedrol'den iki kat daha fazla antibakteriyal etki göstermesi, bu patojenler için kullanılabilirliğini düşündürmektedir. *Enterobacter aerogines* üzerindeki etki kloramfenikolünkinden iki kat fazladır. *Candida albicans*'ta da aynı şekilde ketokonazol'den iki kat daha etkili olduğu görölmüştür (Çizelge 3.1.).

5-Oksosedrol'e kaynak taramaları süresince sadece bir sentez çalışmasında rastlanmıştır. Adı geçen çalışmada Sedrol'ün (CF₃CO)₂O ile oksidasyonu amaçlanmış ve birçok türev yanında 5-Oksosedrol'ün de oluştuğu bildirilmiştir [18]. İzole edilen miktar yeterli olmadığı için aktivite çalışmaları henüz gerçekteştirilememiştir.

Aspergillus niger ile yapılan araştırmalarda 8-Hidroksisedrol'ün (13) oluştuğu kaynaklarda görölmüştür [89]. Bu çalışmada da aynı bileşik ana madde olarak izole edilmiştir. Aynı bileşik *Cephalosporium aphidicola* [85], *Glomerella cingulata* [86], *Beauveria sulfurescens* [89, 92] ve *Bacillus cereus* [87] ile de elde edilmiştir. Antibakteriyal etkisi *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogines*,

Proteus vulgaris adlı patojenler üzerinde Sedrol'e eşit olarak belirlenmiştir. *Enterobacter aerogines* üzerindeki etki kloramfenikolünkinee eşittir. *Candida albicans* üzerindeki antifungal etkisinde ketakonazol'e eşit olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1.).

Aspergillus niger ile yapılan biyotransformasyonlarda izole edilen ikinci türev 8-Okso-7:14-didehidrosedrol (110) ise bilim dünyası için yeni bir bileşiktir. Bu yapıya kaynak taramaları sırasında rastlanmamıştır. İzole edilen miktar yeterli olmadığı için henüz antimikrobiyal aktivitesi incelenememiştir.

Bu sonuçlar Mikrobiyal biyotransformasyon laboratuvarının ilk sonuçlarıdır. İzolasyonu gerçekleştirilen ancak yapısı henüz aydınlatılmayan birçok türev de bulunmaktadır. Bu yapıların aydınlatılması ve diğer metabolitlerin izolasyonu ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

Yapısı aydınlatılan bu türevler ve izolasyonu ya da yapı tayini gerçekleştirilecek diğer türevler, aktivite ve koku özellikleri tam olarak değerlendirilip toksisiteleri de belirlendikten sonra mikrobiyal biyotransformasyon çalışmaları amacına ulaşacak ve bu türevler umuyoruz ki ilaç ve aroma kimyasalları içinde yerlerini alacaktır.

KAYNAKLAR

1. ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., ve TYLER, V.E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Williams and Wilkins, A Waverly Comphany, Baltimore, USA (1996).
2. TELEFONCU, A., *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir (1995).
3. BULL, A.T., HOLT, G. ve LILLI, M.D., *Biyoteknoloji Uluslararası Eğilimler ve Görüşler*, Çev. Metin BARA, İstanbul Üniversitesi Yayın No. 3419, Fen Fakültesi Yayın No. 197, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul (1987).
4. FOGARTY, W.M. ve KELLY, C.T., *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd ed., Elsevier, New York, USA (1990).
5. BERGER, R.G., *Aroma Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany (1995).
6. KITCHENS, G.C., DORSKY, J. ve KAISER, K., *Cedarwood Oil and Derivatives*, Givaudanian, 2, 9-10 (1971).
7. TUNALIER, Z., *Juniperus foetidissima Wild.* Odun Uçucu Yağları, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Farmakognozi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, (1999)
8. NEIDELMAN, S.L., *Enzymes and Microbes as a Source of Chemical Diversity*, in, High Throyghput screening, Ed.J.P.Devlin, pp. 77-98, Marcel Dekker, INC, New York, USA (1997).
9. CONNOLLY, J.D., GOURISSON, D.J., RAPHAEL, R.A., MORI, K. ve SHAMMA, M., *Dictionary of Natural Products*, Vol. 7, Chapman & Hall, London (1994).
10. DAVID, E.K., *Comprehesive Natural Products Chemistry*, Vol.2, Isoprenoids, Caretenoids, and Steroids, Elsevier, Oxford (1999).
11. GUENTHER, E. , *The Constituents of Essential Oils*, 284-286, Robert E. Kriger Publishing Company, New York (1975).
12. BAUER, K., GARBE, D. ve SURBURG, H., *Common Fragrance and Flavor Materials*, Wiley-VCH pp.176 (1997).
13. SHANKER, P.S. ve RAO, G.S.R.S., *Total Synthesis of (±)-allo- Cedrol*, Tetrahedron Lett., 35, (28), 5055-5058 (1994).

14. NATHAN, P.J., GUTIERREZ, A., HERNANDEZ, J.D., ROMAN, L.U. ve SANTILLAN, R.L., ¹³C-NMR Studies of Cedranolides, J. Nat. Prod., 49, 79-89 (1986).
15. NATHAN, P.J., SANTILLAN, R.L. ve GUTIERREZ, A., ¹³C-NMR Study of Cedrol, 6-Isocedrol, and α -Cedrene, J. Nat. Prod., 47, (6), 924-933 (1984).
16. XAN, B.A., PANKRISNA, N.A., GATILOV, L. ve YU.V., Mono i Seskiterpenoidi Zivici Abies nephrolepis, Kristaliceskaya Struktura (+)- β -Cedrola, Kemiya Prirodnih Nauki, 539, 26.(1984).
17. DEVON, T.K. ve SCOOT, A.I., Naturally Occurring Compounds (Volume II Terpenes), Academic Press New York and London (1972).
18. DEREK, H.R.B., BELOEIL, J.C., BILLION, A., BOIVIN, J., LALLEMAND, J.Y., LELANDAIS, P. ve MERGUI, S., Oxidation of Cedrol, β - and γ -Eudesmol, Sclareol, Manoyl Oxide, 1.9-Deoxyforskolin, Methyl trans -Dihydrojasmonate, and Tetrahydrolinalool by the Gif System, Helvetica Chimica Acta, 70, 2187-2200, (1987).
19. MAZZA, G., Gas Chromatographic and Mass Spectrometric Studies of the Constituents of the Rhizome of the Calamus. I. The Volatile constituents of the Essential Oil, J.Chromatogr 3281, pp.179-194 (1985).
20. ZYGADLO, J.A., LAMARQUE, A.L., MAESTRI, D.M., GUZMAN, C.A., LUCINI, E.I., GROSSO, N.R. ve ARIZA-ESPINAR, L., Volatile Constituents of Aloysia triphylla (L'herit.) Britton., J. Essent. Oil Res., 64, 407-409 (1994).
21. WANG, H.F. ve YOU, X.Q., Determination of Aroma Components of Ampelopsis grossedentata by Gas Chromatography, Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, 84, 47-50 (1996).
22. ALKHATHALAN, H.Z., AL-ZOMAN, M.M., BASHA, R.M., MOUSA, A.A. ve AL-HAZIMI, H.M.G., Essential Oils of Some Saudi Pulicaria and Artemisia species. Orient J. Chem., 74, 204-209 (1991).
23. KAMEOKA, H., KUBO, K. ve MIYAZAWA, M., Volatile Flavor Components of Malabar-Nightshade (Basella Rubra L.), J. Food Compos. Anal., 44, 315-321 (1991).
24. STASHENKO, E., MARTINEZ, J.R., MACKU, C. ve SHIBAMOTO, T., Hr-Gc and Gc-Ms Analysis of Essential Oil From Colombian Ylang-Ylang (Cananga Odorata Hook fil. et Thomson, Forma Genuina). J High Resolut Chromatogr. Suppl., 16, 441-444 (1993).

25. LIN, T.C., FANG, J.M. ve CHENG, Y.S., *Terpenes and Linans from Leaves of Chamaecyparis formosensis*, *Phytochemistry*, 516, 793-801 (1999).
26. YATAGAI, M., SATO, T., ve TAKAHASHI, T., *Terpenes of Leaf Oils from Cupressaceae*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 134, 377-385 (1985).
27. OZAKI, N., HASEGAWA, S. ve HIROSE, Y., *Terpenoids from the Seed of Chamaecyparis obtusa*, *Phytochemistry*, 228, 1771-1773 (1983).
28. ZHU, L.F., LU, B.Y. ve LI, Y.J., *Studies on Chemical Constituents of Essential Oil from Leaves of Jianc-Zhang*, *Chih Wu Hsueh Pao*, 266, 639-643 (1984).
29. NAGAHAMA, S., TAZAKI, M., KOBAYASHI, H. ve SUMIMOTO, M., *Sesquiterpene Alcohols from Cryptomeria japonica and C. fortunei Leaf Oil*, *Phytochemistry*, 334, 879-882 (1993).
30. CHENG, Y.S. ve LIN, C.S., N19100 *Study of the Extractive Constituents From the Wood of Cunninghamia konishii.*, *J. Chin. Chem. Soc.(Taipei)*, 26, 169-172 (1979).
31. SHIEH, J.C. ve SUMIMOTO, M., *Identification of the Volatile Components in the Leaves and Wood of Cunninghamia lanceolata*, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 363/4, 301-310 (1992).
32. DODD, R.S. ve RAFII, Z.A., *Chemical and Ecological Variability of Cupressus bakeri on Goosenest Mountain, California*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 224, 393-400 (1994).
33. PIOVETTI, L. ve DIARA, A., *Sesquiterpenes of Cupressus dupreziana*, *Phytochemistry*, 16, 103-106 (1977).
34. LOUKIS, A, TSITSA-TZARDI, E ve KOULADI, M., and MA, Y.M., *Composition of the Essential Oil of Cupressus sempervirens cones from Greece*, *J. Essent. Oil Res*, 25, 363-364 (1991).
35. RUSSELL, G.B., HUNT, M.B., BOWERS, W.M., ve BLUNT, J.W., *Sesquiterpenoid ant Repellent From Dysoxylum spectabile*, *Phytochemistry*, 356, 1455-1456 (1994).
36. FESTER, G A., MARTINUZZI, E.A. ve RICCIARDI, Y., *Rev. Fac. Ing. Quim, Volatile Oils. Vol.*, 20, 21, (1951).
37. HOLEMAN, M., ROMBOURG, M., FECHTAL, M., GORRICHON, J.P. ve LASSAIGNE, G., *Eucalyptus astringens Maiden Eucalyptus Blakelyi Maiden et Eucalyptus bosistoana. F. Muell. A New Chemotype*, *Plant. Med. Phytother.*, 214, 311-316 (1987).

38. BAYTOP, A., *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul (1991).
39. LWANDE, W., HASSANALI, A., WANYAMA, O.B., NGOLA, S. ve MWANGI, J.W., *Constituents of the Essential Oil of Helichrysum odoratissimum (L.) Less*, J. Essent. Oil Res., 51, 93-95 (1993).
40. ADAMS, R.P., *Investigation of Juniperus Species of the United States For New Sources of Cedarwood Oil*, Econ.Botany, 41, 48-54 (1987).
41. LINSKENS, H.F. ve JACKSON, J.F., *Essential Oils and Waxes* (Modern Methods of Plant Analysis New Series 12), Springer-Verlag, Berlin, pp.131-157, 159-173, (1991).
42. PETTERSON, E. ve RONEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXIX. Heartwood Constituents of Juniperus procera Hochst. and Juniperus californica L.*, Acta Chem.Scand., 15, 713-20 (1961).
43. FANG, J.M., CHEN, Y.C., WANG, B.W. ve CHENG, Y.S., *Terpenes from Heartwood of Juniperus chinensis*, Phytochemistry, 41, 1361-1365 (1996).
44. PILO, C. ve RONEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXV. Heartwood Constituents of Juniperus chinensis L.*, Acta Chem.Scand., 14, 353-58 (1960).
45. ADAMS, R.P., ZANONI, T.A. ve HOGGE, L., *The Volatile Leaf Oils of the Junipers of Guatemala and Chiapas, Mexico: Juniperus comitana, Juniperus gamboana, and Juniperus standley*. J. Nat. Prod., 484, 678-681 (1985).
46. BREDENBERG, J.B., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXXVI. The Ethereal Oil of the Wood of J. communis L.*, Acta Chem.Scand., 15, 961-66 (1961).
47. RONEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXXV. Heartwood Constituents of Juniperus foetidissima L.*, Acta Chem.Scand., 15, 721-726 (1961).
48. KUO, Y.H., WU, T.R., CHENG, M.C. ve WANG, Y., *Five New Compounds from the Heartwood of J. formosana Hayata.*, Chem.Pharm.Bull., 38, 3195-201 (1990).
49. KUO, Y.H., LIN, N. ve LIN, Y.T., *Two New Diterpene Phenols-7 α -Methoxydeoxocryptojaponol and 7 β -Hydroxydeoxocryptojapono.*, J.Chin.Chem.Soc., 27, 19-22 (1980). CA:93:41506h (1980).

50. KAPAHI, B.K., AGGARWAL, S.G., THAPPA, R.K. ve SARIN, Y.K., *Essential Oil of Juniperus macropoda Leaf*. Indian Perfum 22, 182-184 (1978).
51. KITSHENS, G.C., DORSKY, J. ve KAISER, K., *Cedarwood Oil and Derivatives*, Givaudanian, 1, 3-9 (1971).
52. BOUCARD, G.R. ve SERTH, R.W., *A Continuous Steam Stripping Process for the Distillation of Essential Oils*, Perfum.Flav., 16, 1-8 (1991).
53. ADAMS, R.P., VON RUDLOFF, E., HOGGE, L. ve ZANONI, T.A., *The Volatile Terpenoids of Juniperus monticola, F. monticola, F. compacta, and F. orizabensis*, J. Nat. Prod. 433, 417-419 (1980).
54. BARRERO, A.F., OLTRA, J.E., ALTAREJOS, J., BARRAGAN, A. ve LARA, A., *Minor Components in the Essential Oil of J. oxycedrus L. Wood.*, Flavour Fragr.J., 8, 185-9,(1993)
55. CHALCHAT, J.C., GARRY, R.P.,MICHET, A. ve PEYRON, L., *Chemical Composition of Natural and Emphyreumatic Oils and Extracts From J. oxycedrus and J. phoenicea Wood.*, J.Essent.Oil Res., 2, 231-6 (1990).
56. GUENTHER, E., *The Essential Oils*, Van Nostrand Co.,Vol.6, New York, 353-390 (1975).
57. ODA, J., ANDO, N., NAKAJIMA, J. ve INOUYE, Y., *Studies on Insecticidal Constituents of J. recurva Buch*, Agric.Biol.Chem., 41, 201-4 (1977).
58. KUO, Y.H., YANG, I.C., CHEN, C.S. ve LIN, Y.T., *Five New Sesquiterpenes from the Heartwood of J. squamata Lamb.*, J.Chin.Chem.Soc., 34, 125-34 (1987). CA: 108: 52837w (1988).
59. KUO, Y.H., YANG, I.C., CHEN, C.S. ve LIN, Y.T., *The Structure of 4-Ketocedrol*. Experientia 32, 686-7 (1976).
60. RUNEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXIX. Heartwood Constituents of Juniperus thurifera L.*, Acta Chem.Scand., 14, 1985-90 (1960).
61. RUNEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXVII. Heartwood Constituents of Juniperus utahensis L.*, Acta Chem.Scand., 14, 797-804 (1960).
62. LAWRENCE, B.M., *Cedarwood Oil*, Perfum.Flav., 16, 75-82 (1991).
63. TERHEIDE, R., VISSER, J., VAN DER LINDE, L.M. ve VAN LIER, F.P., *On The Chemical Composition of Cedarwood Oil (J. virginiana L.)*, In:

- Flavours and Fragrances: A World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, 16-20 November 1986 Washington USA, Eds. B.M. Lawrence, B.D. Mookherjee, B.J. Willis, Netherlands, 627-639 (1988).
64. RUNEBERG, J., *The Chemistry of the Natural Order Cupressales XXVIII. Constituents of J.virginiana L.*, Acta Chem.Scand., 14, 1288-1294 (1960).
 65. GUENTHER, E., *The Essential Oils*, Vol.1, Van Nostrand Co. 6, New York, 330 (1975).
 66. BASLAS, R.K. ve SAXENA, S., *Constituents of the Essential Oil of Cedar Wood*, Herba Hung. 24, 27-29 (1985).
 67. LAWRENCE, B.M., *New Trace Constituents In The Oil of Mentha piperita*, Acad Brasil Cienc, 44S, 191 (1972).
 68. BAŞER, K.H.C., KIRIMER, N., ÖZEK, T. ve TÜMEN, G., *Essential Oil of Micromeria carminea* P.H.Davis. J. Essent. Oil Res., 74, 457-458 (1995).
 69. FUJIMORI, T., KASUGA, R., MATSUSHITA, H., KANEKO, H. ve NOGUCHI, M., *Neutral Aroma Constituents in Burley Tobacco*, Agr. Biol. Chem., 40 ,303- (1976).
 70. XIONG, W.S., ZHU, C.Q. ve LUO, Y.M., *Studies on the Hydrophobic Constituents of Nyssa sinensis*, Zhongguo Zhongyao Zazhi, 2011, 678-679 (1995).
 71. MI, H.M., LI, C.G., SU, Z.W., WANG, N.P., ZHAO, J.X. ve JIANG, Y.G., *Studies on Chemical Constituents and Antifungal Activities of Essential Oil from Oplopanax elatus Nakai*, Yao Hsueh Hsueh Pao, 227, 549-552 (1987).
 72. LOHANI, H., JOSHI, P., PANT, A.K., MATHELA, D.K. ve MATHELA, C.S., *Chemical Composition of Essential Oil of Pimpinella achilleifolia*, Fitoterapia, 566, 351-354 (1985).
 73. GOPALAKRISHNAN, M., MENON, N., PADMAKUMARI, K.P., JAYALEKSHMY, A. ve NARAYANAN, C.S., *Gc Analysis and Odor Prolifes of Four New Indian Genotypes of Piper nigrum L.*, J. Essent. Oil Res., 5, 247-253 (1993).
 74. AL_YAHYA,, M.A. ve HIFNAWY, M.S.,*Essential Oil of Plectranthus teniflorus (Vatke) Agnev., Aromatic Plants of Saudi Arabia.*, Part 7, Proc, Saudi Biol Soc 1985, 147-153 (1985).
 75. PYANG,S., *The Constituents of Essential Oil of Guava Leaves*.Thesis-Ms-Chulalongkorn Univ 1981, 81 (1981).

76. FESTER, G. A., MARTINUZZI, E. A., RETAMAR, J. A. ve RICCIARDI, Y., *The Essential Oils of Cordoba and San Luis Argentina*. Bol, Acad. Nac. Cienc. 39, 375 (1956).
77. ROMANUK, M., HEROUT, V. ve SORM, F., *Terpenes. XCII. Composition of Costus Oil*. Chem., 52, 1969 (1958).
78. HASSAN, M. M. A., MUHTADI, F. J. ve AL-BADR, A. A., *Glc-Mass Spectrometry of Teucrium polium Oil*, J. Pharm. Sci., 68, 800-801 (1979).
79. CHEN, Y., LI, S., YANG, L., JIANG, Z. ve CUI, N., *Comparative Study on Chemical Constituents of Essential Oils From Several Parts of Platycladus Orientalis*, Linchan Hua Hsueh Yu Gong Yi, 41, 1-11 (1984).
80. GREEN, C. L., WOOD, A. B. ve ROBINSON, J. M., *Re-Examination of Mulanje Cedarwood Oil (Widdringtonia Whytei Rendle)*, Flavour Fragrance J., 33, 105-108 (1988).
81. MANN, J., *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Oxford University Press, New York, (1994).
82. CROTEAU, R., *Biochemistry of Monoterpenes and Sesquiterpenes of the Essential Oils*, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, (1996).
83. MANITTO, P., *Biosynthesis of Natural Products*, Department of Chemistry, University of Reading, Harwood Limited, England, (1981).
84. TORSSELL, K. B. G., *Natural Product Chemistry*, Apotekarsocieteten, Sweden (1997).
85. HANSON, J. R. ve NASIR, H., *Biotransformation of the Sesquiterpenoid, Cedrol, by Cephalosporium aphidicola*, Phytochemistry, 33, 835-837 (1993).
86. MIYAZAWA, M., NANKAI, H. ve KAMEOKA, H., *Biotransformation of (+)-Cedrol by Plant Pathogenic Fungus, Glomerella cingulata*, Phytochemistry, 40, 69-72 (1995).
87. SHARKAWY, S. E., AFIFI, M. S. ve ROSAZZA, J. P. N., *Microbial Transformation of Cedrol*, J. Nat. Prod., 56, 1039-1050 (1993).
88. ABRAHAM, W. R., *Phylogenetic Influences in Microbial Hydroxylation of Terpenoids*, World J. of Mic. & Biotech., 10, 88-92 (1994).

89. LAMARE, V. ve FURSTOSS R., *Bioconversion of Sesquiterpenes*, Tetrahedron, 46, 4109-4132 (1990).
90. BRAULIO, F.M., RICARDO, G., HANSON, J.R. ve ALMAZ, T., *Biotransformation of Cedrol and Related Compounds by Mucor plumbeus*, Phytochemistry 42 (6), pp.1583-1586.(1996)
91. ABRAHAM, W.R., ERNST,L., STUMPF, B. and ARFMANN, H.A, *Microbial Hydroxylations of Bicyclic and Tricyclic Sesquiterpenes*, J.Essent. Oil.Res. 1(1),19-27, (1989) CA:112:18504 (1989).
92. ABRAHAM, W.R., PETER, W. ve KEISLICH, K., *Microbial Hydroxylation of Cedrol and Cedren*, Z. Naturforsch., 42, (4), (1987),112,
93. RAHMAN, A., YAQOOB, M.,FAROOQ, A., ANJUM, S. ve ASIF, F., and CHOUDHARY, M.I., *Fungal Transformation of (1R,2S,5R)-(-)- Menthol by Cephalosporium aphidicola*, J. Nat. Prod., 61, 1340-1342, (1998).
94. CHAPMAN & HALL, Chemical Dictionaries on CD-ROM, Dictionary of Natural Products, (1999).
95. NAPLES, J.M., CHIFF, C.J. ve ROSLER, K.H., *Schistoma mansoni Cercaricidal Effects of Cedarwood Oil and Various its Components*, J. Trop. Med. Hyg., 95 (6), 390-396 (1992).
96. ODA, J., ANDO, N., NAKAJIMA, Y. ve INOUYE, Y., *Studies on Insecticidal Constituents of Juniperus recurva*, Agr. Biol. Chem., 41, 201, (1997).
97. YANG, H.O., SUH, D.Y. ve HAN, B.H., *Isolation and Characterization of Platelet-Activating Factor Receptor Binding Antagonists from Biota orientalis*, Planta Med., 61(1) 37-40 (1995).
98. SHEI, J.C. ve SUMIMOTO, M., *Antifungal Component of Cunninghamia lanceolata Wood*, Mokuzai Gakkaishi, 38 (5) 482-489 (1992).
99. ABOURASED, E.A., CLARK, A.M ve HUFFORD,C.D.,*Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review*, Current Medicinal Chemistry, 6, 395-374 (1999).
100. BAJAJ, Y.P.S., NOMA, Y. ve ASAKAWA, Y., *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 33: Medicinal and Aromatic Plants 7, 5, Aspergillus ssp.:Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds*, Y. Noma, Y. Asakawa, Springer-Verlag Berlin, Germany Vol. 33, pp.62-95 (1995).
101. NOMA, Y. ve ASAKAWA, Y.,*Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds by Microorganisms - Production of Biologically active*

Substances in Essential oils, In: Basic and Applied Research, 27. ISEO, , (Ch. Franz, A. Mathe, and G Buchbauer, ed.), Proceedings (1996), Allured Pub., Vienna, pp120-124, (1997).

102. NOMA, Y. ve ASAKAWA, Y., *Metabolic Pathways of Monoterpenoids by Microorganisms*, Current Med. Chem., (2000).
103. DEMAIN, A.L. ve DAVIES, J.E., *Industrial Microbiology and Biotechnology*, ASM Press, Washington D.C., (1999).
104. CONEMANN, E.W., et al., *Colour Atlas Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, p785, (1997).
105. BALCI, M., *Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi*, METU Press, Ankara, (2000).