

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**D-LİMONEN'İN *Escherichia coli* ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİĞİNİN METABOLOMİKS YAKLAŞIMI İLE BELİRLENMESİ**

Oya TEMİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**D-LİMONEN'İN *Escherichia coli* ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİĞİNİN METABOLOMİK YAKLAŞIMI İLE BELİRLENMESİ**

Oya TEMİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D-LİMONEN'İN *Escherichia coli* ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİĞİNİN METABOLOMİKS YAKLAŞIMI İLE BELİRLENMESİ**

Oya TEMİZ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
23AG021 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D-LİMONEN’İN *Escherichia coli* ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİĞİNİN METABOLOMİKS YAKLAŞIMI İLE BELİRLENMESİ**

Oya TEMİZ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez .../...../2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ	[imza]
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU	[imza]
Doç. Dr. Münevver AKSOY	[imza]

ÖZET

D-Limonen'in *Escherichia coli* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliğinin Metabolomiks Yaklaşımı ile Belirlenmesi

Oya TEMİZ

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji

Anabilim Dalı Danışman: Prof. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

Temmuz 2025; 68 sayfa

Bu tezde doğal bir monoterpen olan D-limonenin *Escherichia coli* (*E. coli*) üzerindeki antimikrobiyal etkileri, hedefsiz (untargeted) Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (GC-MS) tabanlı metabolomik analiz yöntemiyle araştırılmış ve bu aktif maddenin mikroorganizma üzerine potansiyel etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmalarda D-limonen'in kuyucuk difüzyon testi ile minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlenmiş ve ardından 4000 µL/L olarak belirlenen subinhibitör konsantrasyonda *E. coli*'ye uygulanarak 6, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Metabolomik analizler kapsamında *E. coli* 'de intraselüler ile ekstraselüler fraksiyonlardan metabolitler toplanarak türevlendirilmiş ve GC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler MS-DIAL yazılımı ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler MetaboAnalyst platformunda gerçekleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren metabolitler belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; biyolojik numunelerin MS-DIAL'de yapılan Kovats (EI) Kütüphane kıyaslamasında çok sayıda metabolit sinyali (feature) elde edilmiş; ancak bu veriler, RT benzerliği, toplam eşleşme skoru ve sinyal/gürültü oranı gibi kalite kriterlerine göre filtrelenmiş ve yalnızca güvenilir şekilde tanımlanan 60 metabolit istatistiksel analizlere dahil edilmiştir. D-limonen uygulaması sonucunda özellikle L-(-)-malik asit, urasil ve 3-aminopropiyonitril gibi metabolitlerde artış, buna karşılık sitrik asit, bütandioik asit (diğer adıyla süksinat), kadaverin ve ornitin gibi metabolitlerde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Örnekler arasındaki genel varyasyonu değerlendirmek amacıyla yapılan PCA ve PLS-DA skor analizlerinde, D-limonen uygulanan gruplar ile kontrol grupları arasında belirgin ayrımların olduğu saptanmıştır.

Gruplar arası metabolit değişimlerini daha detaylı değerlendirmek için gerçekleştirilen sıcak harita (heatmap) analizlerinde ise, özellikle ekstraselüler fraksiyonlarda metabolit düzeylerinde belirgin farklılıkların olduğu ortaya konulmuştur. Zenginleştirme analizleri ve yolak analizleri sonuçlarına göre D-limonenin, glisin-serin-treonin metabolizması ($p<0,001$; etki değeri=0,52), glutatyon metabolizması ($p<0,001$; etki değeri=0,06), alanin, aspartat ve glutamat metabolizması ($p<0,001$; etki değeri=0,52) ve TCA döngüsü ($p<0,001$; etki değeri=0,18) gibi temel biyokimyasal yolları anlamlı şekilde etkilediği belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca, pozitif kontrol grubu olarak kullanılan gentamisin antibiyotiği ile kıyaslamalı analizler gerçekleştirilmiş ve D-limonenin bazı metabolik etkilerinin antibiyotik benzeri mekanizmalarla örtüştüğü gözlemlenmiştir. Bu bulgular, D-limonenin yalnızca membran yüzeyinde etki göstermediğini, aynı zamanda hücresel metabolizmayı hedef alarak sistemik metabolik stres oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, D-limonenin antibiyotik benzeri çok yönlü bir etki mekanizmasına sahip olduğu ve potansiyel bir alternatif antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebileceği metabolomik yaklaşımı ile desteklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Antibakteriyel, D-limonen, *Escherichia coli*, GC-MS, Metabolomiks

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Doç. Dr. Münevver AKSOY

ABSTRACT

Determination of the Antimicrobial Activity of D-limonene on *Escherichia coli* by Metabolomics Approach

Oya TEMİZ

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

July 2025; 68 pages

In this thesis study, the antimicrobial effects of D-limonene, a natural monoterpene, on *Escherichia coli* (*E. coli*) were investigated using an untargeted Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-based metabolomics analysis method, and the potential effects of this active compound on microorganisms were evaluated.

In the studies, the minimum inhibitory concentration (MIC) value of D-limonene was determined using a well diffusion test, and then it was applied to *E. coli* at a subinhibitory concentration of 4000 $\mu\text{L/L}$ and incubated for 6, 12, and 24 hours. As part of the metabolomic analyses, metabolites were collected from intracellular and extracellular fractions of *E. coli*, derivatized, and analyzed by GC-MS. The obtained data were evaluated using the MS-DIAL software. Statistical evaluations were performed on the MetaboAnalyst platform, and metabolites showing significant differences were identified.

According to the findings; a large number of metabolite signals (features) were obtained in the Kovats (EI) Library comparison of biological samples in MS-DIAL; however, these data were filtered according to quality criteria such as RT similarity, total match score and signal/noise ratio, and only 60 metabolites that were reliably identified were included in the statistical analyses. As a result of D-limonene application, increases were observed in metabolites such as L-(-)-malic acid, uracil, and 3-aminopropionitrile, while decreases were observed in metabolites such as citric acid, butanedioic acid (also known as succinate), cadaverine, and ornithine ($p < 0.05$). In PCA and PLS-DA score analyses conducted to evaluate the overall variation between samples, significant differences were observed between the D-limonene-treated groups and the control groups.

In heatmap analyses conducted to evaluate intergroup metabolite changes in more detail, significant differences in metabolite levels were observed, particularly in the extracellular fractions. According to enrichment analysis and pathway analysis results, D-limonene was found to have a significant effect on glycine-serine-threonine metabolism ($p < 0.001$; effect value=0.52), glutathione metabolism ($p < 0.001$; effect value=0.06), alanine, aspartate, and glutamate metabolism ($p < 0.001$; effect value=0.52), and the TCA cycle ($p < 0.001$; effect value=0.18).

The study also included comparative analyses with gentamicin antibiotic, used as a positive control group, and it was observed that some of D-limonene's metabolic effects overlap with antibiotic-like mechanisms. These findings indicate that D-limonene does not merely act on the membrane surface but also targets cellular metabolism, thereby inducing systemic metabolic stress.

In conclusion, the metabolomics approach supports the notion that D-limonene possesses an antibiotic-like multifaceted mechanism of action and may be considered as a potential alternative antimicrobial agent.

KEYWORDS: Antibacterial, D-limonene, *Escherichia coli*, GC-MS, Metabolomics

COMMITTEE:

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Assoc. Prof. Dr. Münevver AKSOY

ÖNSÖZ

Lisans yıllarımdan bu yana, yüksek lisans çalışmam da dahil olmak üzere tezimin planlanmasında her türlü bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve sabırla desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün akademik kadrosunda yer alan bütün saygıdeğer hocalarıma ve deneysel çalışmalarım boyunca bana laboratuvarında eşlik eden ve çok keyifli zamanlar geçirdiğimiz, Mariem BAOALI, Muhammed TÜRKMEN, Enes GÜLMEZ, manevi desteğini esirgemeyen dostum Nazlı Can ULU ve laboratuvarımızdaki diğer bütün değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Metabolomik analiz çalışmaları konusunda benimle deneyimlerini paylaşmaktan hiç çekinmeyen arkadaşım Vedat Sarı'ya teşekkür ederim.

Bana Türkiye'de Yüksek Lisans eğitimim süresince tez çalışmalarımı yürütebilmem için maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bugüne kadar edindiğim eğitim ve öğretim hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi destek sağlayan, beni kendi özverili çalışmalarıyla cesaretlendirip ışık olan, beni bugünlere getiren, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli ailem; annem Berna TEMİZ, babam Arif TEMİZ ve bu süreçteki tüm stresimi bir bakışıyla alıp götüren patili dostum Mocha'ma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. D-Limonen Biyoaktif Maddesi ve Özellikleri.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> Bakterisinin Özellikleri	1
1.3. <i>Escherichia coli</i> ve Antibiyotik İlişkisi	2
1.4. Metabolomiks Yaklaşımının Önemi ve Kullanımı.....	2
1.4.1. Metabolik Ekstraksiyon Yöntemleri	3
1.4.2. Metabolit Tanımlama Gereçleri	4
1.4.3. Gaz Kromatografisi ve Türevlendirme	4
1.4.4. Metabolomikte Data İşleme ve İstatiksel Analizler	5
1.5. Bakteriyel Metabolomik Yaklaşımı ve Uygulama Adımları.....	6
2. KAYNAK TARAMASI.....	10
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Metot.....	17
3.2.1. Bakteri Kültürünün Yetiştirilmesi.....	18
3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Testi ve Dozaj Belirleme.....	18
3.2.3. Bakteri Kültürünün Hazırlanması ve Etkin Madde Dozlarının Uygulanması	19
3.2.4. Bakteri Metabolitlerinin Ekstraksiyonu	20
3.2.5. Metabolitlerin Türevlendirilmesi ve GC-MS Analizi	23
3.2.6. Verilerin Normalizasyonu, Data İşleme ve Metabolomik Analizler	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. D-Limonen'in <i>E. coli</i> Üzerindeki Minimum Etkin Dozu.....	27
4.2. Metabolomik Analizlerde PLS-DA ve PCA Skorları.....	29
4.3. Gruplar Arası Metabolit Trendlerinin Sıcak Harita Grafiği'nde (Heat-map) İncelenmesi	35
4.4. Metabolit Dağılımının Sıcaklık Haritası Temelli Analizi	39

4.4.1.	Sıcaklık Haritasına Göre D-Limonen Uygulanan Gruba Özgü Değişim Gösteren Metabolitler.....	41
4.4.2.	D-Limonen Uygulamasında Zaman Bağımlı Metabolit Değişimleri.....	42
4.5.	Metabolomik Yolaklar ve Zenginleştirme Analizleri.....	42
4.5.1.	Ekstraselüler Metabolitlerin Zenginleştirme ve Yolak Analizleri	48
4.6.	Enerji Metabolizmasında (TCA Döngüsü) Değişim	55
4.6.1.	2-Oksoglutarat'ın Alternatif Metabolik Yollara Sapması ve Amino Asit Metabolizmasına Etkileri	56
4.7.	Gliksilat ve Dikarboksilat Metabolizmasındaki Değişimler	57
4.8.	Glisin, Serin ve Treonin Metabolizmasındaki Değişimler	58
4.9.	Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasındaki Değişimler.....	59
4.10.	D-Limonenin Oksidatif Stres Yanıtı ve Glutasyon Metabolizmasına Etkisi..	59
5.	SONUÇ	61
6.	KAYNAKÇA.....	63
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “D-Limonen’in *Escherichia coli* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin metabolomiks yaklaşımı ile belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17/06/2025

Oya TEMİZ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler:

cfu/mL	: Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Units per Milliliter)
Da	: Dalton (moleküler ağırlık birimi)
eV	: Elektronvolt (enerji birimi)
G	: Gravite (Relative Centrifugal Force, santrifüj kuvveti birimi)
mM	: Milimol (konsantrasyon birimi)
nm	: Nanometre (dalga boyu birimi)
rpm	: Dakikada devir (Revolutions Per Minute, çalkalayıcı hızı)
v/v	: Hacimce/hacimce (volume/volume, çözelti oranı)
°C	: Derece Celsius (sıcaklık birimi)
µL	: Mikrolitre (hacim birimi)

Kısaltmalar:

ATP	: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)
BSTFA	: N,O-Bis-(trimetilsilil)-trifloroasetamid
FDR	: Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate)
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
KEGG	: Kyoto Genom ve Gen Patikaları Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (Minimum Inhibitory Concentration)
MS-DIAL	: Kütle Spektrometrisi-Veri Bağımsız Analiz (Mass Spectrometry-Data Independent Analysis)
MSTFA	: N-Metil-trimetilsililtrifloroasetamid

NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance)
OD600	: Optik Yoğunluk (600 nm dalga boyunda ölçüm)
PCA	: Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis)
PLS-DA	: Kısmi En Küçük Kareler Ayırıcı Analizi (Partial Least Squares Discriminant Analysis)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü (Tricarboxylic Acid Cycle)
TMS	: Trimetilsilil (Trimethylsilyl)

Bu çalışmada ondalık sayı ayracı olarak “virgöl” (.) kullanılmıştır.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. D-limonen'in antimikrobiyal mekanizması (Lin, H vd., 2024).....	11
Şekil 2.2. <i>E. coli</i> 'de Limonen konsantrasyonuna bağlı ATP salınımı (Gupta vd., 2021)	11
Şekil 3.1. <i>E. coli</i> mikroorganizması üzerine D-limonen etkili maddesi için hedefsiz (untargeted) metabolomiks çalışması deney akış planı.....	17
Şekil 3.2. Antibakteriyel çalışmalara ait deney akış şeması	18
Şekil 3.3. <i>E. coli</i> 'nin Nutrient agarda büyütülmesi sonrası petrideki koloni görüntüsü (a), Mueller-Hinton sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra başlangıç konsantrasyonundaki kültür görüntüsü (b).....	19
Şekil 3.4 <i>E. coli</i> 'de metabolit ekstraksiyonu deney gruplama planı.....	20
Şekil 3.5. Santrifüj ile dibe çöken ölü bakteri hücreleri ve üst fazda dışarı salınan metabolitlerini içeren sıvı besiyeri	21
Şekil 3.6. Bakteriyel metabolit ekstraksiyonu deney akış şeması	22
Şekil 3.7. Metabolomik analizlerde kullanılan GC-MS cihazı	23
Şekil 3.8. Türevlendirme ve data analizleri deney akış şeması	25
Şekil 3.9. Metabolitlerin normalizasyonu	26
Şekil 4.1. Antibiyotik ve hekzan kontrol grubu (a) ve farklı dozlarda d-limonen uygulanan grup (b)	27
Şekil 4.2. D-Limonen uygulanmış bakteride ekstraselüler metabolitlerin kromatogramı	29
Şekil 4.3. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri grupları arasında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PCA Score Plot Grafiği	30
Şekil 4.4. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri grupları arasında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PLS-DA Score Plot Grafiği	31
Şekil 4.5. Etken madde uygulanmayan, D-limonen ve gentamisin uygulanan gruplarda intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PLS-DA Score Plot Grafiği	32
Şekil 4.6. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarının ekstraselüler metabolitleri arasında PLS-DA Score Plot Grafiği	33
Şekil 4.7. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarının ekstraselüler metabolitleri arasında PLS-DA Loading Plot Grafiği.....	34
Şekil 4.8. Gentamisin, D-limonen ve kontrol gruplarında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği	36
Şekil 4.9. Farklı sürelerde D-limonene maruz kalan bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği	37
Şekil 4.10. D-limonen uygulanan ve kontrol grubu bakterilerde ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği	38
Şekil 4.11. D-limonen uygulanan ve kontrol grubu bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin zenginleştirme analizi	43
Şekil 4.12. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında ekstraselüler metabolitlerin T-test analizinin nokta grafiği ($p<0.05$)	49
Şekil 4.13. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında L-(-)-Malik Asit'in konsantrasyon farkının kutu grafiği	50
Şekil 4.14. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında Urasil'in konsantrasyon farkının kutu grafiği	50
Şekil 4.15. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında 3-Aminopropiyonitril'in konsantrasyon farkının kutu grafiği	51

Şekil 4.16 D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında ekstraselüler metabolitlerin zenginleştirme analizi grafiği	52
Şekil 4.17. D-limonen uygulaması altında <i>E. coli</i> 'de TCA döngüsünün baskılanması ve 2-oksoglutarat düzeylerinin artışına bağlı olarak aminoasit metabolizmasına yönelen metabolik akış şeması	57
Şekil 4.18. D-limonen uygulaması altında glisin, serin ve treonin metabolizmasındaki artışların, <i>E. coli</i> 'de olası etkileri.....	59



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	13
Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan sarf malzemeler	14
Çizelge 3.3 Deneylerde kullanılan cihazlar ve donanımlar	15
Çizelge 3.4. GC-MS cihazı analitik koşulları	24
Çizelge 4.1. Uygulanan D-limonen dozajları ve zon çapı milimetrik ölçümleri	28
Çizelge 4.2. Gruplar arasında metabolik değişim incelemesi.....	39
Çizelge 4.3. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin yolak analizi sonuçları.....	44
Çizelge 4.4. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu bakterilerde ekstraselüler metabolitlerin yolak analizi sonuçları	53

1. GİRİŞ

1.1. D-Limonen Biyoaktif Maddesi ve Özellikleri

Halihazırda büyük üretim rakamlarına sahip turunçgil meyvelerinde mevcut başlıca doğal biyolojik ajanlardan biri olan D-limonen maddesi ya da (+)-limonen turunçgil atıklarında (kabuk ve posa kısımlarında) yaygın olarak bulunur. Siklik bir monoterpen grubuna ait ($C_{10}H_{16}$) olan D-limonen, çeşitli izoprenik birimlerin bir araya gelmesiyle biyolojik olarak sentezlenen doğal bir bileşiktir (Marriott vd., 2001). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda D-limonenin antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Boluda-Aguilar ve Lopez, 2013; Lopresto vd., 2014). Yapılan araştırmalarda D-limonen ve metabolitlerinin hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda farklı tümörlere karşı kemopreventif ve kemoterapötik aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Del Toro-Arreola vd., 2005; Giri vd., 1999). Bu etkiler, farklı patojenler üzerinde potansiyel bir alternatif tedavi ajanı olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, D-limonen'in antimikrobiyal etkilerinin moleküler düzeydeki mekanizmaları henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, bu bileşiğin mikroorganizmalarda nasıl bir biyokimyasal yanıt oluşturduğunu anlamaya yönelik sistem biyolojisi temelli metabolomik yaklaşımlar giderek daha fazla önem kazanmıştır.

1.2. *Escherichia coli* Bakterisinin Özellikleri

Günümüzde yaygın görülen ve ciddi halk sağlığı problemlerine yol açan mikroorganizmaların eliminasyonu konusunda yapılan çalışmalar oldukça değerlidir. Tez çalışması çerçevesinde hedeflenen patojen organizma olan *E. coli*, göstermiş olduğu sağlık etkileri açısından insanlarda hastalık yapan önemli bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizma çubuk şeklinde, Gram negatif bir bakteridir ve Gammaproteobakteriler sınıfı içinde *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. *E. coli*, memeli hayvanların kalın bağırsağında bulunan bir bakteri türüdür. Doğal olarak bağırsakta yaşadığı için, çevresel sularda *E. coli*'nin bulunması genellikle dışkı kirliliğinin bir göstergesidir.

Ayrıca memeli kalın bağırsaklarında bulunmaları sebebiyle antibiyotiklere sıklıkla maruz kaldıklarından, konakçısı tarafından tüketilen antibiyotiklere karşı direnç yol açan yüksek seçilim baskısı sağlamaktadırlar (Looft vd., 2012). Bununla birlikte, *E. coli* tipleri, diğer hayvanlarda zararsızken insanlara bulaştığında oldukça tehlikeli hastalıklara sebep olabilmektedir. Bu türlerin en bilineni "koli basili" olarak tabir edilen O157 serotipidir ve kanlı ishal semptomları ile ölüme yol açabilir (Buchanan ve Doyle, 1997). Patojenik *E. coli*'nin bulaşması genellikle gübre ve diğer hayvan atıkları, mezbahalardan gelen atık sular ve atık su arıtma tesislerinden gelen atık sular yoluyla gerçekleşmektedir (Duffy, 2003). Daha önce yapılan çalışmalarda, çevrede bulunan çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşları rapor edilmiş olup, bu durum insan faaliyetlerinden kaynaklanan olası halk sağlığı risklerine işaret etmektedir. Bu sonuçlar *E. coli* bakterisinde artan ve önüne geçilemeyen antibiyotik direnci sorununa alternatif çözümler araştırılmasına teşvik oluşturmaktadır (Jang vd., 2017). Tüm bu problemler göz önüne alındığında, günümüzde sentetik ilaçların insan sağlığını olumsuz etkilemesi ve ek olarak sürdürülebilir çevre prensibinin benimsenmeye başlanmasıyla biyolojik moleküllerin patojen organizmalar üzerindeki doğal öldürücü mekanizmalarının incelenmesi konusuna artan bir ilgi vardır.

Bu nedenle *E. coli*, hem antibiyotik direnç dinamiklerinin hem de doğal bileşiklerin mikrobiyal etki mekanizmalarının incelenmesinde uygun bir model organizma olarak değerlendirilmiştir

1.3. *Escherichia coli* ve Antibiyotik İlişkisi

Günümüzde kullanılan bakterisidal antibiyotiklerin, *E. coli*'de oksidatif stres yoluyla hücresel hasara yol açan metabolik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Belenky vd., 2015). Bununla birlikte antibiyotiklerin *E. coli* üzerindeki etkilerini araştıran metabolomiks çalışmalarında, glukoz ve laktat seviyelerinde artışlar gözlemlenmiştir. Bu artışlar, enerji metabolizmasında meydana gelen bozulmaları yansıtmakta olup, ATP seviyelerinde belirgin bir düşüş yaşandığı bildirilmiştir. ATP metabolizmasındaki bu bozulmanın, bakteriyel hücrelerin hayatta kalma kapasitesi üzerinde doğrudan etkiler yarattığı ifade edilmiştir. Buna ilave olarak antibiyotiklerin *E. coli*'nin nükleik asit sentezini etkileyerek nükleotid ve nükleozid seviyelerinde önemli değişikliklere neden olduğu ve bu değişikliklerin bakteriyel stres yanıtlarıyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Zampieri vd., 2017).

Tespit edilen bu bulgular, antibiyotiklerin genetik materyal üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin bakteriyel stres yanıtlarını nasıl şekillendirdiğini anlamada önemli ipuçları sunmaktadır. Bununla birlikte, antibiyotiklerin etkilerini değerlendirmek üzere gerçekleştirilen metabolomiks analizlerinde, hücre duvarındaki peptidoglikan sentezinin bozulması sonucu glikozamin ve N-asetilglikozamin metabolitlerinin seviyelerinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir (Dörries vd., 2014). Ek olarak, antibiyotiklerin hücre zarındaki lipid bileşenleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler, lipid profillerinde belirgin farklılıklara yol açmıştır. Bu bulgular, antibiyotiklerin bakteriyel hücre zarının yapısını ve işlevini nasıl etkilediğine dair derinlemesine bilgiler sunmaktadır. Ancak günümüzde *E. coli*'nin hızlı bir şekilde çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirmeye başlaması ile D-limonen gibi alternatif biyoaktif bileşiklerin etki mekanizmalarının farklı yaklaşımlarla değerlendirilerek daha fazla araştırılması gereklilik haline gelmiştir (Poirel vd., 2018). Bu bağlamda, D-limonen gibi doğal biyoaktif bileşiklerin *E. coli* üzerindeki etkilerinin, antibiyotik benzeri veya alternatif metabolik değişimlere yol açıp açmadığı metabolomik düzeyde değerlendirilmeli ve literatüre katkı sağlanmalıdır.

1.4. Metabolomiks Yaklaşımının Önemi ve Kullanımı

D-limonen gibi doğal ajanların mikroorganizmalarda ne tür metabolik tepkiler yarattığını anlamak, klasik fenotipik yöntemlerle sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, günümüzde biyolojik mekanizmaların yalnızca moleküler düzeyde değil, aynı zamanda sistem biyolojisi perspektifiyle organizmanın bütünsel biyolojik süreçlerinin etkilerini anlamaya yönelik artan bir ilgi söz konusudur. Bu bağlamda, metabolomiks, bir fenotipleme aracı olarak öne çıkan ve bir organizmanın biyolojik süreçleri içindeki metabolit profillerini detaylı bir şekilde incelemeyi sağlayan en güçlü biyoanalitik yöntemlerden biridir (Klassen vd., 2017). Metabolomik, canlı hücrelerin ürettiği mikro düzeydeki organik molekülleri (<1,5 kD) tespit etmek, tanımlamak ve potansiyel olarak değerlendirmek için uygulanan bir teknik olarak tanımlanmaktadır (Fiehn, 2002).

Metabolomik analizler, hastalık, ilaçlar, toksinler ve genetik modifikasyon gibi faktörlerin neden olduğu biyokimyasal bozuklukları veya değişimleri ortaya koyar (Monteiro vd., 2013).

Bu teknik, son yıllarda tıp, biyoloji, kimya ve mühendislik gibi çok çeşitli alanlarda uygulanmıştır (Villas-Bôas vd., 2007). Metabolitler biyokimyasal, fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerle doğrudan ilişkili olduklarından, belirli bir zamanda ve ortamda genlerin aktivitesini yansıtır. Bu nedenle metabolomik, genomik, transkriptomik veya proteomik gibi diğer omik yöntemleri tamamlayıcı niteliktedir (Mirsaeidi vd., 2015). Metabolomiksin hedeflediği temel amaç, biyolojik bir örnek ile ilişkili metabolit seviyeleri hakkında biyokimyasal düzeyde bilgi elde etmektir. Metabolomik çalışmalar, hastalıkların teşhisinde, tedavilere yanıtların incelenmesinde ve tedavilere verilen yanıtların analizinde günümüzde giderek daha fazla kullanılmaktadır.

1.4.1. Metabolik Ekstraksiyon Yöntemleri

Metabolomik analizlerin güvenilirliği, örnek hazırlık aşamasındaki dikkatli ekstraksiyon ve tanımlama stratejilerine doğrudan bağlıdır. Metabolizma bir hücrede durmadan devam eden reaksiyonlardan oluşur. Metabolomik yönteminde çalışılan organizma fark etmeksizin temel olarak hedeflenen ilk adım, biyolojik numunelerin metabolik olarak aktif hücreleri ve dokuların çalışmasını durdurmaktır. Burada amaç, metabolit kayıplarını en aza indirirken metabolizmayı metabolitlerin döngüsünden daha hızlı durdurmaktır. Tüm metabolitleri aynı anda ekstrakte edebilecek tek bir numune hazırlama yöntemi veya mevcut tüm metabolitleri tespit edip nicel olarak analiz edebilecek tek bir analitik teknik bulunmamaktadır.

Bunun temel nedeni, araştırmalarda kullanılan biyolojik materyallerin farklı özelliklere sahip olması ve bu materyallerden elde edilen metabolitlerin kimyasal çeşitliliğinin oldukça geniş bir perspektife yayılmasıdır. Metabolik reaksiyonun durdurulmasından sonraki adım, metabolitlerin hem intraselüler (hücre içi) hem de ekstraselüler (hücre dışı) ortamlardan ekstrakte edilmesidir. Soğuk çözücülerin (örneğin soğuk metanol ve gliserol çözeltileri) kullanımı, farklı hücre türlerinden metabolitlerin ekstraksiyonu için yaygındır. Bu ağırlıklı olarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda metabolit bozunma potansiyelindeki azalmadan kaynaklanmaktadır.

Örneğin, farklı bakteri ve mayalardan intraselüler metabolitlerin ekstraksiyonu için soğuk metanol çözeltisi ($<-20^{\circ}\text{C}$), yalnızca tek bir organik çözücü kullanan çok etkili bir ekstraksiyon çözücüsüdür, buna ek olarak çözücülerin bir buharlaştırma adımı yoluyla kolayca numuneden uzaklaştırılmasını sağlar. Bu yöntem çok çeşitli mikroorganizmalara uygulanmıştır ve polar ve orta polar metabolitlerin ekstraksiyonu için uygundur, ancak polar olmayan metabolitlerin geri kazanımının zayıf olduğu belirtilmiştir. (Villas-Bôas vd., 2005).

Metabolomik analizlerinin ekstraksiyon aşamasında solvent ekstraksiyonundan sonra yaygın olarak dondurarak kurutma, liyofilizasyon, solvent buharlaştırma veya vakumla kurutma yöntemleri kullanılmaktadır. Dondurarak kurutma çoğu kişi için tercih edilen yöntem olsa da çoğunlukla numunelerden su içeriğini çıkarmak için kullanılırken, sulu olmayan numuneler genellikle solvent buharlaştırma teknikleri kullanılarak (yani nitrojen akışı veya vakumlu santrifüj altında) konsantre edilmektedir (Pinu vd., 2017).

Liyofilizasyon, düşük sıcaklıkta dondurulan numunelerde suyun vakum altında doğrudan süblimleşmesi yoluyla uzaklaştırılmasını sağlar ve metabolit stabilitesini koruma açısından avantajlıdır. Solvent buharlaştırma, özellikle uçucu olmayan çözücülerle yapılan ekstraksiyonların ardından uygulanır ve çözücünün düşük sıcaklıkta uzaklaştırılmasını sağlar. Vakumla kurutma yöntemi ise düşük basınç altında çözücülerin uzaklaştırılması prensibine dayanır ve ısıya duyarlı metabolitlerin korunmasında etkin bir seçenektir. Bu yöntemlerin her biri, analiz öncesinde metabolitlerin kararlılığını sağlamak ve örneklerin GC-MS sistemine uygun hale getirilmesi açısından kritik rol oynamaktadır.

1.4.2. Metabolit Tanımlama Gereçleri

Teknik seçimi genellikle deneysel hedefe ve araştırılan numune türüne/matrisine bağlı olmakla beraber, kütle spektrometresi (GC-MS veya LC-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) (Nicholson ve Wilson, 2003) spektroskopisine eklenen gaz veya sıvı kromatografisi, bilimsel literatürde metabolik profillemeye için en yaygın kullanılan analitik platformlardır. Kütle spektrometresi tabanlı metabolomik, yüksek seçicilik ve hassasiyet ile kantitatif analizler ve metabolitleri tanımlama potansiyeli sunar.

1.4.3. Gaz Kromatografisi ve Türevlendirme

Bu tez çalışmasında kullanılan bir kromatografik sistem olan gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS), metabolomik temelli araştırmalarda en verimli ve iyi kullanılan analitik platformlardan biridir. GC-MS, genellikle sağlamlığı, üst düzey ayırma ve tanımlama kabiliyeti, seçiciliği, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği ile öne çıkan çok yönlü bir analitik cihaz olarak kabul edilir. Ancak, GC-MS yalnızca düşük molekül ağırlıklı (yaklaşık 50-600 da) ve uçucu bileşikleri ayırmak ve tanımlamak için kullanılabilir. GC-MS'de bileşiklerin ayrılması yüksek sıcaklıktaki bir fırında gerçekleştiğinden, bileşiklerin termal olarak kararlı ve uçucu olması gerekmektedir. (Beale vd., 2018).

Polar, ısıl olarak stabil ve uçucu olmayan metabolitlerin tespiti için analizden önce kimyasal türevlendirmenin yapılması gerekir (Wang vd., 2010). Türevlendirme, uçuculuğu, termal kararlılığı, duyarlılığı ve dedektör yanıtını artırmaktadır (Poojary ve Passamonti, 2016). Bu nedenle, GC-MS'nin avantajlarından tam olarak yararlanabilmek için analiz öncesinde uygun türevleme işlemlerinin yapılması ve doğru parametrelerin seçilmesi, metabolomik analizlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırmada kritik bir rol oynamaktadır.

Türevlendirme teknikleri, metabolitlerin analizi sürecinde analitlerin fizikokimyasal özelliklerini iyileştirerek, özellikle GC-MS gibi tekniklerde daha hassas ve doğru analiz yapılmasını sağlar. Sunulan tez çalışmasında da uygulanan iki adımlı türevlendirme aşamalarından ilki olan metoksiaminasyon, aldehit ve ketonların aldehit gruplarını korur. Metoksiaminasyonun tamamlanması reaksiyon zamanına ve sıcaklığa bağlıdır ve bu aşamada uygulanan ve literatürde farklı metoksiaminasyon koşulları rapor edilmiştir (Moros vd., 2017). Amino asitler gibi biyokimyasalların analizi esnasında COOH, -OH, -NH ve -SH gibi fonksiyonel grupların aktif hidrojenleri, çeşitli türevlendirme yöntemleriyle değiştirilebilir. Bu yöntemlerden biri ve türevlendirmenin ikinci aşaması olan sililasyon, aktif hidrojenin trimetilsilil (TMS) grubu gibi alkilsilil grupları ile değiştirilmesi esasına dayanır.

Sililasyon, analitlerin polar gruplarını TMS eterler, TMS esterler, TMS aminler veya TMS sülfürlere dönüştürerek termal kararlılığını ve uçuculuğunu önemli ölçüde artırır (Dettmer vd., 2007). Bu yöntem GC-MS analizinde daha iyi ayrışma ve daha özgül kütle spektrumları elde edilmesini sağlar. Ayrıca, sıcaklık duyarlı veya polar yapıya sahip metabolitlerin, cihazlarda ayrışma ya da bozunma riski olmadan analiz edilmesine olanak tanır.

Metabolomik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan sililasyon reaktifleri arasında BSTFA (N,O-Bis-(trimetilsilil)-trifloroasetamid) ve MSTFA (N-Metil-trimetilsililtrifloroasetamid) öne çıkmaktadır. BSTFA, oldukça uçucu bir yapıya sahiptir ve reaksiyon sırasında trifloroasetamid gibi uçucu yan ürünler oluşturarak, analitik süreçlerde parazit oluşturma riskini minimumda tutar. Bu özelliğiyle GC-MS analizinde temiz bir kromatogram elde edilmesine katkı sağlar. MSTFA ise TMS asetamidler arasında en uçucu reaktiflerden biridir ve benzer bir silil donör gücü sunarak GC-MS analizlerinde özellikle analitik performansı üst seviyeye taşır (Moros vd., 2017).

1.4.4. Metabolomikte Data İşleme ve İstatiksel Analizler

Metabolomik çalışmaların bilimsel geçerliliği ve biyolojik anlamlılığı, yalnızca analitik platformlardan elde edilen ham verilerin güvenilirliğine değil, aynı zamanda bu verilerin sistematik bir biçimde işlenmesine ve istatistiksel olarak değerlendirilmesine de bağlıdır. Bu kapsamda, kütle spektrometresi temelli verilerin değerlendirilmesinde ilk aşamayı, kromatografik piklerin tanımlanması, alıkonma süresi hizalaması ve spektral karşılaştırma gibi ön işlemler oluşturmaktadır. Bu işlemler, kütüphane eşleştirmesine dayalı olarak tanımlı metabolitlerin belirlenmesini mümkün kılar ve metabolit kimliklendirmesinde kritik bir rol oynar (Tsugawa vd., 2015). Veri setlerinin analiz öncesi dönüştürülmesi aşamasında sıklıkla uygulanan logaritmik dönüşüm (log-transformation), z-skor normalizasyonu veya pareto ölçekleme (pareto scaling) gibi yöntemler; verilerdeki varyansı dengelemeyi ve gruplar arası karşılaştırmaları istatistiksel açıdan daha anlamlı hale getirmeyi amaçlar. Çok boyutlu veri yapısına sahip metabolomik veri setlerinde, örnekler arasında oluşan genel varyasyonları görselleştirmek ve örnek kümeleri arasında anlamlı ayrışmaları tespit etmek amacıyla Temel Bileşenler Analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler Ayırma (PLS-DA) gibi çok değişkenli istatistiksel yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (Worley ve Powers, 2012). Bu analizler, gruplar arasında metabolik düzeyde farklılaşmalara neden olan biyobelirteç adaylarının belirlenmesine katkı sağlamaktadır.

Bununla birlikte, spesifik metabolitlerin istatistiksel olarak anlamlı değişimlerini saptamak amacıyla t-testi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu test düzeltmeleri kapsamında False Discovery Rate (FDR) gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır (Xia ve Wishart, 2016). İstatistiksel olarak anlamlı bulunan metabolitlerin ait olduğu biyokimyasal yolların belirlenebilmesi amacıyla, veriler sıklıkla KEGG, HMDB veya SMPDB gibi biyolojik veri tabanları ile ilişkilendirilmektedir. Bu veri tabanları aracılığıyla gerçekleştirilen yolak zenginleştirme analizleri ve topoloji temelli yolak etki analizleri, metabolitlerin biyolojik süreçlerdeki işlevsel rollerinin daha kapsamlı şekilde yorumlanmasına olanak tanır (Kanehisa vd., 2017).

Yolak analizlerinde istatistiksel değerlendirme çoğunlukla Fisher's Exact Test ile gerçekleştirilmekte olup, anlamlı metabolitlerin ilgili yolaklara dağılımı dot plot bar chart gibi grafiksel çıktılarla sunulmaktadır. Ayrıca heatmap gibi görsel temsiller, her bir metabolitin farklı örnek gruplarında gösterdiği artış veya azalış eğilimlerini renk gradyanları ile vurgulayarak gruplar arası farklılaşmayı görselleştirmede etkin bir araç sunmaktadır (Xia ve Wishart, 2016).

1.5. Bakteriyel Metabolomik Yaklaşımı ve Uygulama Adımları

Bakteriyel metabolomik, bakterilerin metabolit profillerini inceleyerek biyolojik süreçlerini ve çevresel adaptasyonlarını anlamaya yönelik disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Bu yaklaşım, bakterilerin yaşam döngüsü boyunca ürettiği veya tükettiği küçük moleküllerin (metabolitlerin) niteliksel ve niceliksel analizine odaklanır. Belirtilen yaklaşım, özellikle erken ilaç geliştirme aşamasında, bir patojene karşı sınırlı ve ölümcül olmayan aktiviteye sahip olabilecek öncü bileşikler karakterize etmek için kullanışlıdır (Aminov, 2022). Metabolomik, genomik, transkriptomik ve proteomik gibi diğer omik teknolojilerle birlikte kullanıldığında, bakterilerin fizyolojik durumları ve çevresel değişimlere verdikleri tepkiler hakkında derinlemesine bilgi sağlar (Fiehn, 2002). Biyomedikal, tarım, farmakoloji, biyoteknoloji, çevre bilimleri ve tıp gibi birçok alanda uygulanabilirliği vardır.

Özellikle ilaç endüstrisinde patojenik bakterilerin metabolik yollarının anlaşılması, antibiyotik direncinin mekanizmalarını belirlemeye ve yeni terapötik hedefler geliştirmeye olanak tanır (Han vd., 2019). Buna ek olarak, endüstriyel biyoteknolojide, metabolomik analizler bakterilerin metabolik mühendislik çalışmalarında verimliliklerini artırmak için kullanılmaktadır (Tang vd., 2020).

Temel olarak mikrobiyal metabolomik analizleri aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Çalışılan mikroorganizmanın uygun bir kültür ortamında büyütülmesi
2. Büyümenin ideal veya istenen aşamasında örnek toplama ve bakteri hücrelerinin dondurularak metabolik aktivitesinin durdurulması
3. Ekstraselüler metabolitlerin analizi için süpernatantın toplanarak bakterilerin besiyeri ortamından uzaklaştırılması (bakteri hücreleri ise intraselüler metabolit analizleri için kullanılır)
4. İntraselüler metabolitlerin ekstraksiyonu
5. Uygun bir enstrümental yaklaşım kullanılarak (NMR spektroskopisi, LC-MS, GC-MS gibi) intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin analizi (Pinu vd., 2017).

Metabolomik yaklaşım alanının önemli bir avantajı, bakterilerin doğrudan biyolojik bağlamda incelenmesine olanak sağlamasıdır. Geleneksel biyokimyasal analizler genellikle sınırlı sayıda metaboliti hedeflerken, metabolomik teknikler (örn., kütle spektrometresi ve nükleer manyetik rezonans) kapsamlı ve derinlemesine bir metabolit analizi sunar (Patti vd., 2012).

Son yıllarda, ileri veri analizi yöntemleri ve metabolit tanımlama algoritmaları, bakteriyel metabolomik çalışmalarının çözünürlüğünü ve doğruluğunu artırmıştır. Bu tez kapsamında, *E. coli* ile muamele edilen D-limonen'in hücresel metabolizma üzerindeki etkileri, bakteriyel metabolomik yaklaşımı ile kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

Literatürde D-limonen maddesinin antimikrobiyal (Han vd., 2021), antioksidan (Shah ve Mehta, 2018) ve antikanserojenik (Chebet vd., 2021) etkilerini araştıran çalışmalar oldukça yaygındır. Özellikle D-limonenin bilinen antibakteriyel etkinlik mekanizmasının yanı sıra, farklı biyoteknolojik yaklaşımlarla değerlendirilmesi, ilaç geliştirme endüstrisine yeni perspektifler kazandırmaktadır. Ancak bu etkilerin hangi biyokimyasal ve metabolik yollar üzerinden gerçekleştiğini anlamak için ileri düzey moleküler analizlere, özellikle metabolomik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim mevcut literatürde D-limonenin *E. coli* üzerindeki etkilerinin doğrudan metabolomik yöntemlerle incelendiği kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu eksiklik, sunulan tez çalışmasının alana sağlayacağı özgün katkının temelini oluşturmaktadır.

Tez çalışmasında kontrol grubu olarak kullanılan gentamisin antibiyotiğinin, bir araştırmada D-limonen ile sinerjik etki gösterdiği ve dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *E. coli* suşlarının minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini sırasıyla 13,71 µg/mL ve 30 µg/mL'den 4 µg/mL ve 20,1 µg/mL'ye düşürdüğü gözlemlenmiştir (Costa vd., 2019). Bunun yanı sıra D-limonenin *E. coli*'nin hücre solunumunu ve enerji metabolizmasını bozarak ATP üretiminde azalmaya yol açtığı, böylece bakterinin hayatta kalma kapasitesini önemli ölçüde zayıflattığı bildirilmiştir (Chueca vd., 2014).

E. coli ATCC 25922 üzerinde yapılan başka bir çalışmada, D-limonenin en az 16.000 µg/mL konsantrasyonunda uygulandığında hücre membran yapısında bozulmalara neden olduğu ve bu durumun hücresel içerik sızıntısı ile DNA hasarı gibi çoklu mekanizmalarla antimikrobiyal etki oluşturduğu öne sürülmüştür (Gupta vd., 2021). D-limonenin antimikrobiyal etkilerinin yalnızca bağırsak patojenleriyle sınırlı olmadığı, aynı zamanda cilt hastalıklarında rol oynayan *S. aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) gibi bakterilere karşı da etkili olduğu ve bu özelliğiyle dermatolojik ve kozmetik uygulamalarda potansiyel taşıdığı belirtilmiştir (Mohammed vd., 2022).

Bu bulgular, D-limonenin fenotipik düzeyde antibakteriyel etkinlik gösterdiğini açıkça ortaya koymakta, ancak bu etkinin moleküler mekanizmalarının daha derinlemesine incelenmesine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Şekil 2.1'de D-limonenin antimikrobiyal potansiyel etki mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.

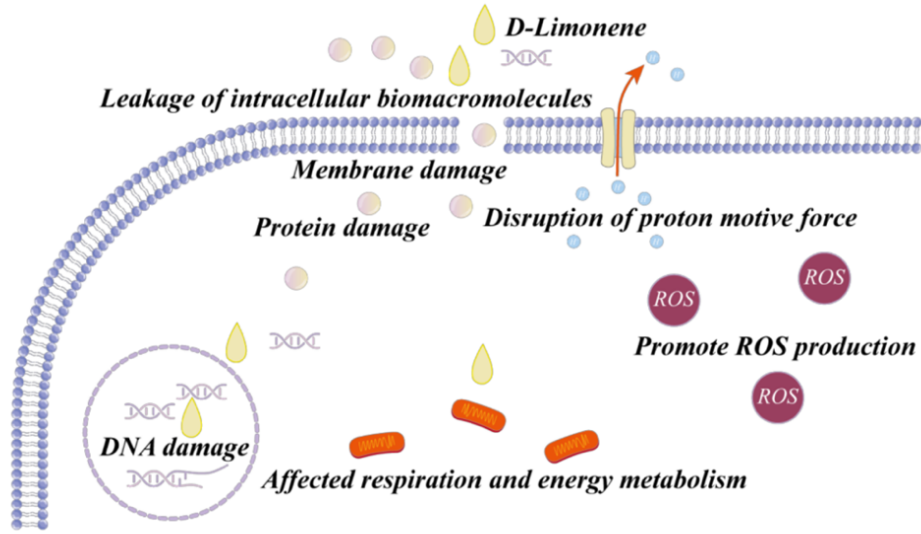
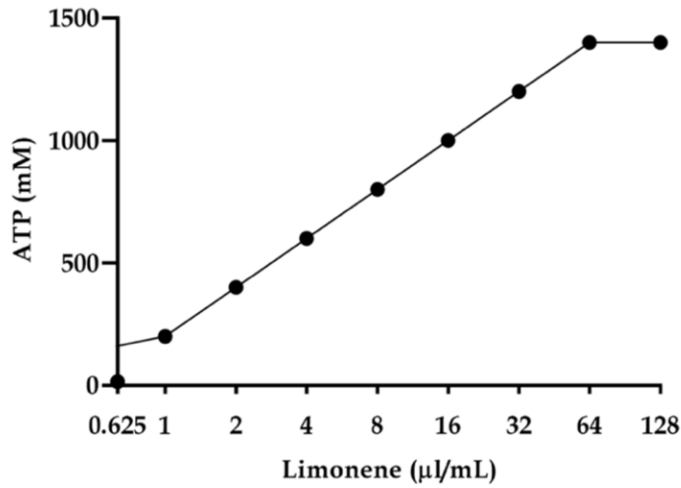


Figure 2. The antimicrobial mechanisms of D-limonene.

Şekil 2.1. D-limonen'in antimikrobiyal mekanizması (Lin, H vd., 2024)

D-limonenin antimikrobiyal etkisini açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda ATP üretiminde azalma, hücre geçirgenliğinde bozulma, protein ve lipid sızıntısı gibi bulgulara ulaşılmıştır. Buna ek olarak, *E. coli*'de yapılan çalışmada uygulanan limonen konsantrasyonuna bağlı olarak değişen ATP salınımına dair grafik Şekil 2.2'de sunulmuştur.



d. ATP release

Şekil 2.2. *E. coli*'de Limonen konsantrasyonuna bağlı ATP salınımı (Gupta vd., 2021)

Canlılarda enerji üretimi sırasında, TCA döngüsü ve elektron taşıma zinciri gibi metabolik süreçlerde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur (Galley, 2010). ROS, demir-sülfür yapılarından serbest demir açığa çıkararak Fenton reaksiyonunu tetikler; bu süreç

sonucunda oluşan hidroksil radikalleri DNA, proteinler ve hücre zarına zarar vererek hücre ölümüne yol açabilir (Kohanski vd., 2007). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, 2000 µL/L D-limonen ile muamele edilen *E. coli* hücrelerinde hidroksil radikali oluşumunun gözlemlendiği rapor edilmiştir (Chueca vd., 2014). Böylelikle bir uçucu yağ bileşiğinin, ekspanansiyel fazdaki bakterilerde ROS aracılığıyla ölümcül etki oluşturabileceği ilk kez ifade edilmiştir.

Ayrıca, uçucu yağların etkinlik süresi ve buharlaşma özelliklerinin de antimikrobiyal aktiviteyi etkileyebileceği gösterilmiştir. Linalool ve limonen gibi bileşenlerin uçuculuğu nedeniyle, uygulamadan sonraki ilk birkaç saat içerisinde maksimum etki oluşturduğu, sonrasında ise hızlı bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Fisher ve Phillips, 2008). Bu da zaman faktörünün, doğal bileşiklerle yapılan antimikrobiyal uygulamalarda dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Mevcut literatür, D-limonenin fenotipik ve biyokimyasal düzeyde güçlü bir antimikrobiyal potansiyel sunduğunu ortaya koymaktadır. Ancak bu etkinin hücresel metabolizma üzerindeki etkileri, yani hangi metabolitlerin ve metabolik yolların etkilendiği, henüz sistematik bir şekilde metabolomik yaklaşımla değerlendirilmemiştir.

Metabolomiks yaklaşımı özellikle bir organizmanın metabolit profili, farklı koşullar altında organizma hakkında kapsamlı bilgi sağladığından, antimikrobiyal direnç mekanizmalarının anlaşılması, antibiyotik direnç sorununun aşılmasında yeni yollar sunmaktadır (Koçak ve Özkul, 2020). Bu nedenle, bu tez çalışması ile D-limonenin *E. coli* üzerindeki metabolik etkilerinin GC-MS tabanlı bakteriyel metabolomik yöntem ile kapsamlı şekilde incelenmesi, alandaki önemli bir boşluğu doldurmayı hedeflemektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.1, sarf malzemeler Çizelge 3.2 ve cihazlar Çizelge 3.3 aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Materyal	Marka/Model	Üretim Yeri	Kullanım Amacı
D-limonen	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, ABD	Test edilen biyoaktif madde
n-Hekzan	Merck	Darmstadt, Almanya	D-limonen'in çözgeni
Nutrient Agar	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, ABD	Bakteri üretimi için katı besiyeri
Müeller-Hinton Agar	Merck	Darmstadt, Almanya	Antimikrobiyal duyarlılık testi
Müeller-Hinton Broth	Merck	Darmstadt, Almanya	Sıvı besiyeri, inkübasyon
Genta 160 mg / 2 mL	Menarini	İstanbul, Türkiye	Pozitif kontrol antibiyotik
Piridin	Merck	Darmstadt, Almanya,	Türevlendirme çözgeni
Metoksiamin hidroklorür	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, ABD	Türevlendirme reaktifi (ilk adım)
N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoro acetamide (MSTFA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, ABD	Türevlendirme reaktifi (sililasyon)
Metanol	Merck	Darmstadt, Almanya	Metabolit ekstraksiyonu için çözücü

Devamı Arkada

Çizelge 3.1'in devamı

Sıvı Azot	Habaş	Antalya, Türkiye	Metabolik reaksiyonun dondurulması
Helyum Gazı	Habaş	Antalya, Türkiye	GC-MS mobil fazı
Etanol	Merck	Darmstadt, Almanya	Çalışma ortamının genel sterilizasyonu
Saf su	Milli-Q	Burlington, Massachusetts, ABD	Besiyeri hazırlama

Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan sarf malzemeler

Materyal	Marka/Model	Ülke/Şehir	Kullanım Amacı
500 mL Beher	Isolab	Wertheim, Almanya	Bakterilerin büyütülmesi
1000 mL Cam Şişeler	Isolab	Wertheim, Almanya	Besiyeri hazırlama
Mezür	Isolab	Wertheim, Almanya	Kimyasal Hazırlama
Nitril Eldiven	Beybi	İstanbul, Türkiye	Sterilizasyon
Petri Kabı	Isolab	Wertheim, Almanya	Bakterilerin yetiştirilmesi
Demir Öze	Borox	İstanbul, Türkiye	Agar kuyucuklarının delinmesi
Ekim Çubuğu	Borox	İstanbul, Türkiye	Bakteri ekimi
Santrifüj Tüpleri	Isolab	Wertheim, Almanya	Metabolit ayrımı

Devamı Arkada

Çizelge 3.2'nin devamı

Insert Vial	Sigma	St. Louis, Missouri, ABD	GC-MS analizleri
Mikropipet Uçları	Sigma	St. Louis, Missouri, ABD	Kimyasal enjeksiyonu
Eppendorf Tüpler	Isolab	Wertheim, Almanya	Metabolitlerin toplanması
HPLC Vial	Sigma	St. Louis, Missouri, ABD	GC-MS analizleri

Çizelge 3.3 Deneylerde kullanılan cihazlar ve donanımlar

Cihaz	Marka/Model	Ülke	Kullanım Amacı
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3-18K	Osterode, Almanya	Metabolit ayrımı
Spektrofotometre	AccuSkan GO Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, ABD	OD600 ölçümü
Isıticılı Çalkalayıcı	MaxQ 4450, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, ABD	Bakteri inkübasyonu
Isıticılı Mikrotüp Çalkalayıcı	PCMT Plus Thermo-Shaker, Grant Instruments	Cambridge, İngiltere	Türevlendirme inkübasyonu
GC-MS Sistemi	7890A GC-System, 5975C MSD, Agilent Technologies	Santa Clara, California, ABD	Kromatografik analiz
Liyofilizatör	Pard Mühendislik, Deep Dryer	Konya, Türkiye	Metabolit kurutma

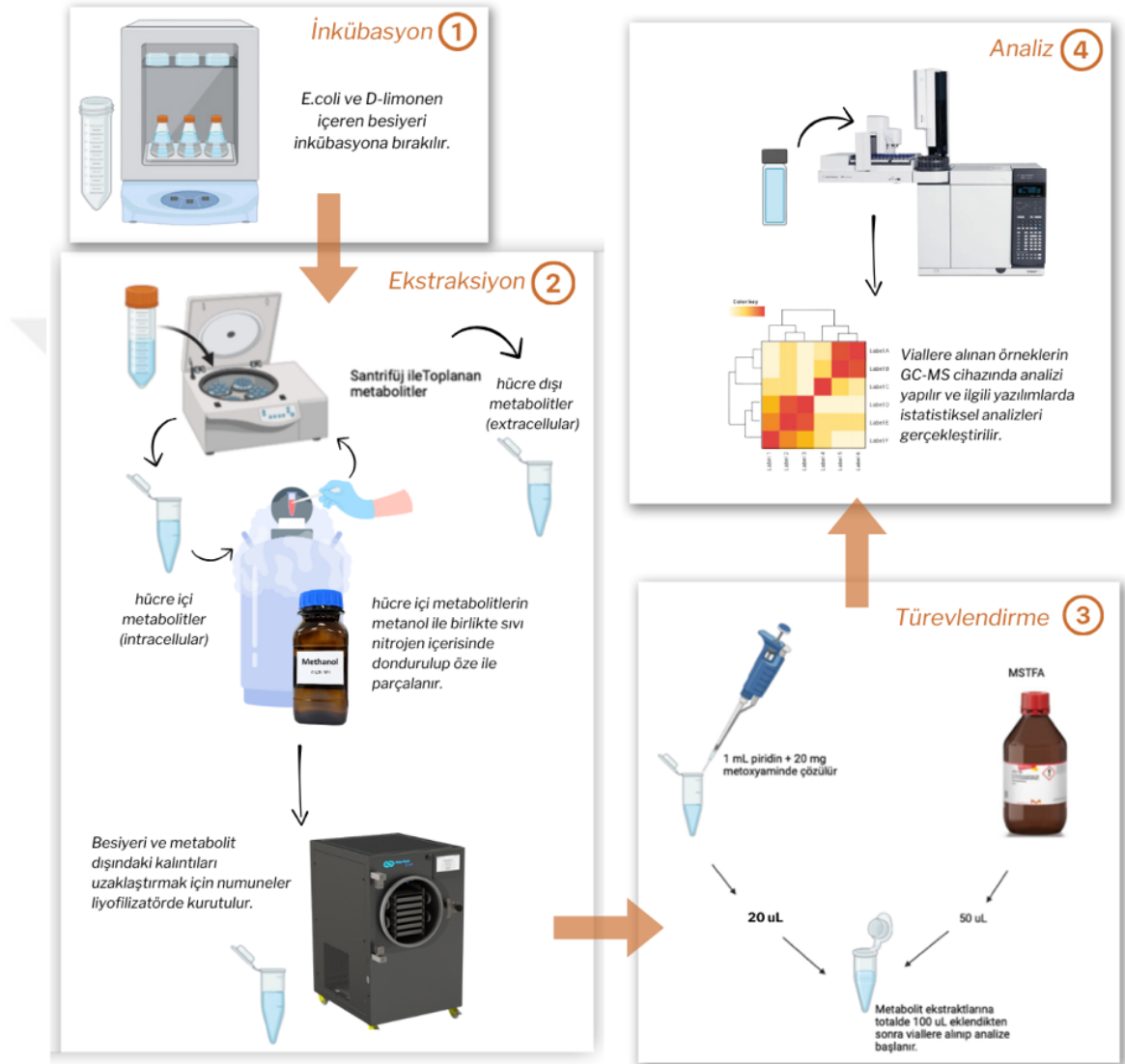
Devamı Arkada

Çizelge 3.3'ün devamı

Mikropipetler	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, ABD	Numune alım/dağıtım
İnkübatör	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, ABD	Bakteri yetiştirme
Otoklav	Tomy SX Series	Tokyo, Japonya	Sterilizasyon
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	MS300HS, MTOPS	Seul, Güney Kore	Besiyeri hazırlama
Ultra Saf Su Sistemi	MP Minipure BASIC M UP, MES	İstanbul, Türkiye	Besiyeri hazırlama/sterilizasyon
Hassas Terazî	Pioneer PX224/E, Ohaus	Greifensee, İsviçre	Kimyasal tartım
Derin Dondurucu - 80°C	Forma 900 Series, Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, ABD	Numune muhafazası

3.2. Metot

Tez çalışmaları kapsamında yapılan analitik çalışmalar Şekil 3.1’de sunulmaktadır.



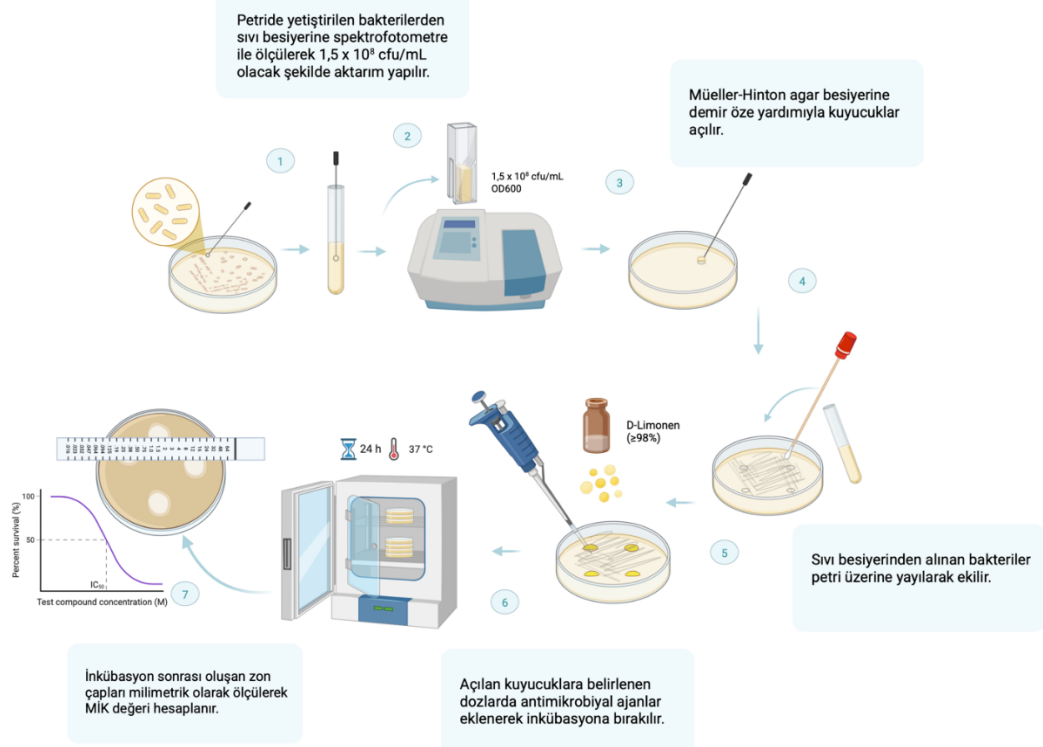
Şekil 3.1. *E. coli* mikroorganizması üzerine D-limonen etkili maddesi için hedefsiz (untargeted) metabolomiks çalışması deney akış planı

3.2.1. Bakteri Kültürünün Yetiştirilmesi

Soğuk ortamda muhafaza edilen (-80°C) *E. coli* numune stokları Nutrient agar (Sigma-Aldrich, ABD) içeren petrilere yayma ekim yapılarak etüvde 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılacak olan tüm malzemeler ve besiyerleri öncesinde otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Testi ve Dozaj Belirleme

D-limonen analitik standartının *E. coli* ATCC 25922 üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin araştırılması doğrultusunda kuyucuk difüzyon metodu ile negatif kontrol olarak belirlenen antibiyotiğin etkisinin kıyaslanması amaçlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testinin belirlenmesinde kullanılan Müeller-Hinton Agar besiyerine (Merck, Almanya) *E. coli* ekimi yapılmıştır. Ardından ucunun çapı 6 mm olarak ayarlanan demir öze bek alevinde steril edildikten sonra besiyerinde 6 cm aralıklarla 4 kuyucuk açılmıştır. Daha sonra sırasıyla 2000, 4000, 8000 ve 10000 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenen D-limonen $\mu\text{g/mL}$ dozajları D-limonen analitik standartının N-hekzan (Merck, Almanya) organik solventi ile seyreltilmesiyle hazırlanarak kuyucuklara sırasıyla 50 μL enjekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak organizmaya spesifik olan gentamisin antibiyotik ve negatif kontrol olarak n-hekzan solventi uygulanmıştır. 24 saat 37°C etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra zon çapları cetvel yardımıyla milimetrik olarak (mm) ölçülerek MİK değerleri belirlenmiştir. Antibakteriyel çalışmalara ait illüstrasyon şeması Şekil 3.2'de sunulmaktadır.



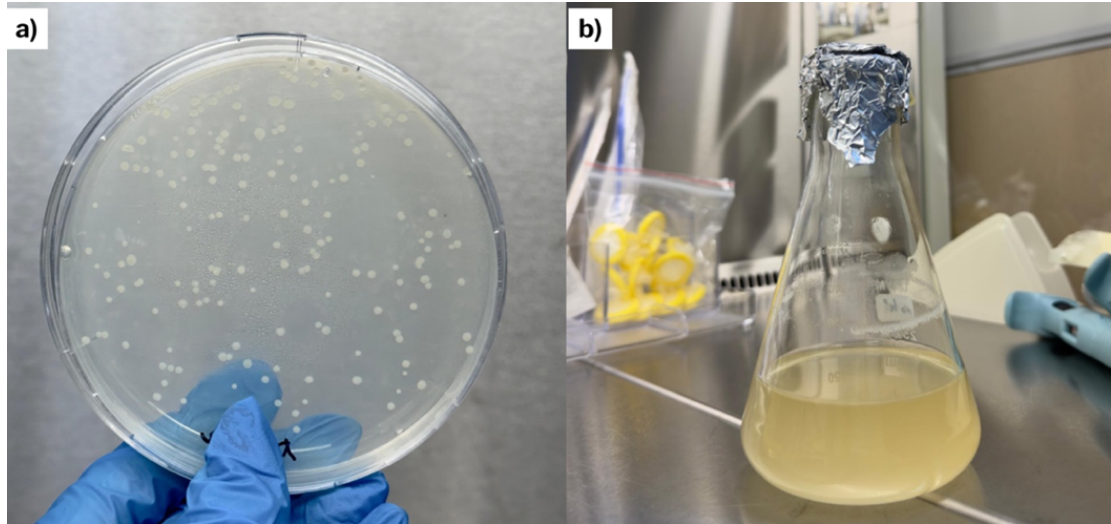
Şekil 3.2. Antibakteriyel çalışmalara ait deney akış şeması

3.2.3. Bakteri Kültürünün Hazırlanması ve Etken Madde Dozlarının Uygulanması

Derin dondurucuda muhafaza edilen (-80°C) *E. coli* bakteri stoğundan Nutrient agar besiyerine ekim yapılarak bakteri canlandırılmıştır. Daha sonra mikroorganizma süspansiyonu, başlangıç konsantrasyonu $1,5 \times 10^8$ cfu/mL bakteri olacak şekilde spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, ABD) OD600 değerleri ölçülerek Müeller-Hinton sıvı besiyerine aktarılmıştır.

Bakteri içeren tüpler, katı ortamdan sıvı ortama geçişte adaptasyonun sağlanması için 37°C 'de, ısıtıcı çalkalayıcıda 225 rpm hızında ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada herhangi bir etken madde ilave edilmemiştir. Burada metabolit analizi sırasında farklı ortam koşullarının yaratacağı stres faktörünün minimize edilmesi amaçlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra tekrar bakteri konsantrasyonu $1,5 \times 10^8$ cfu/mL olacak şekilde OD600 değerleri ölçülerek taze broth besiyerlerine alt kültür edilmiştir.

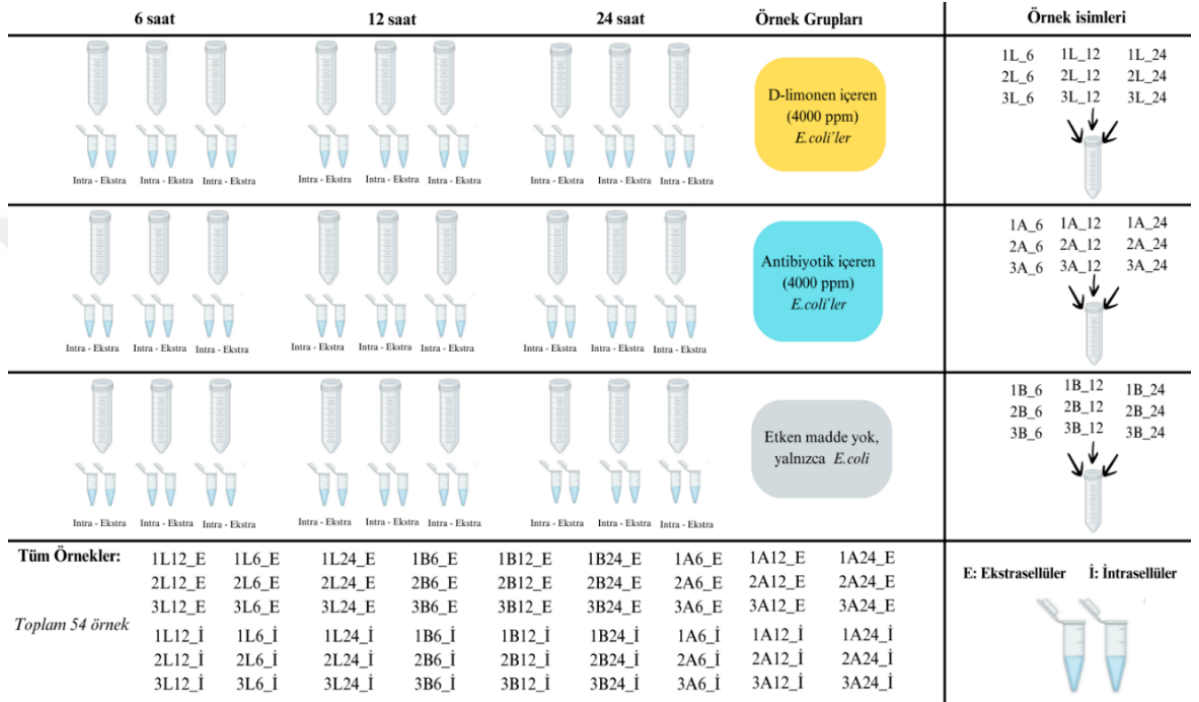
Hazırlanan bakteri kültürüne metabolomik deneyler için hesaplanan D-limonen'in yarım inhibitör konsantrasyonu ($1/2$ MİK değeri) olan $4000 \mu\text{L/L}$ olacak şekilde D-limonen eklenmiştir. Kontrol deneyleri olarak negatif kontrol (yalnızca bakteri kültürü) ve pozitif kontrol (gentamisin antibiyotiği uygulaması) denemeleri gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol çalışmasında D-limonenin çözgeni olarak kullanılan hekzanın antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında etkinlik göstermemesi nedeni ile çalışmanın devamında değerlendirmeye alınmamıştır. Metabolomik analizler için bakterilerin biyoaktif maddeye farklı maruz kalma sürelerinin oluşturması beklenen metabolik etki farkının kıyaslanabilmesi amacıyla farklı inkübasyon sürelerinde (1. grup için 6 saat ve 2. grup için 12 saat, 3. grup için 24 saat) üstel olacak şekilde 37°C 'de 225 rpm ısıtıcı çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Deneyler, üç biyolojik tekrar olarak yapılmıştır. Bakteri kültürüne ait görseller Şekil 3.3'te sunulmaktadır.



Şekil 3.3. *E. coli*'nin Nutrient agarda büyütülmesi sonrası petrideki koloni görüntüsü (a), Mueller-Hinton sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra başlangıç konsantrasyonundaki kültür görüntüsü (b)

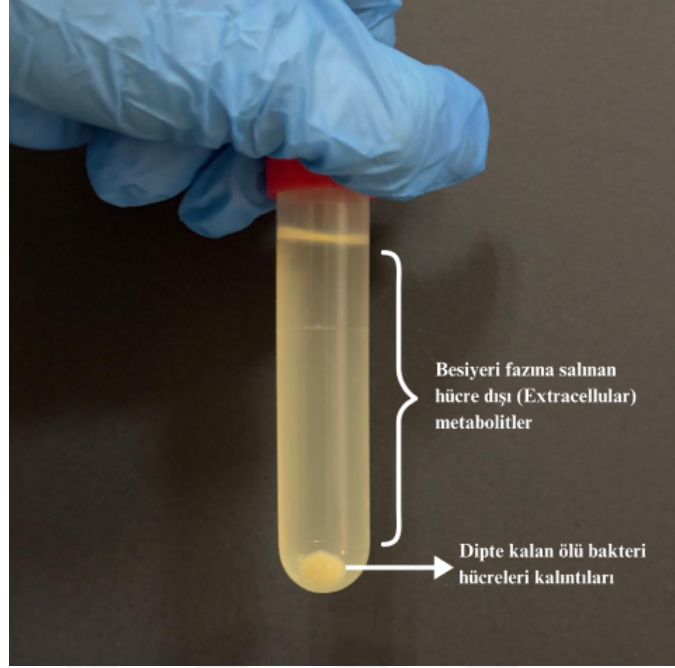
3.2.4. Bakteri Metabolitlerinin Ekstraksiyonu

Hazırlanan bakteri süspansiyonlarına subinhibitör konsantrasyonunda D-limonen uygulanmış ve süspansiyonlar deneme planına uygun şekilde santrifüj tüplerine alınmıştır. Tüpler farklı sürelerde (6, 12 ve 24 saat) inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda oluşturulan deneme planı Şekil 3.4'te özetlenmektedir.



Şekil 3.4 *E. coli*'de metabolit ekstraksiyonu deney gruplama planı

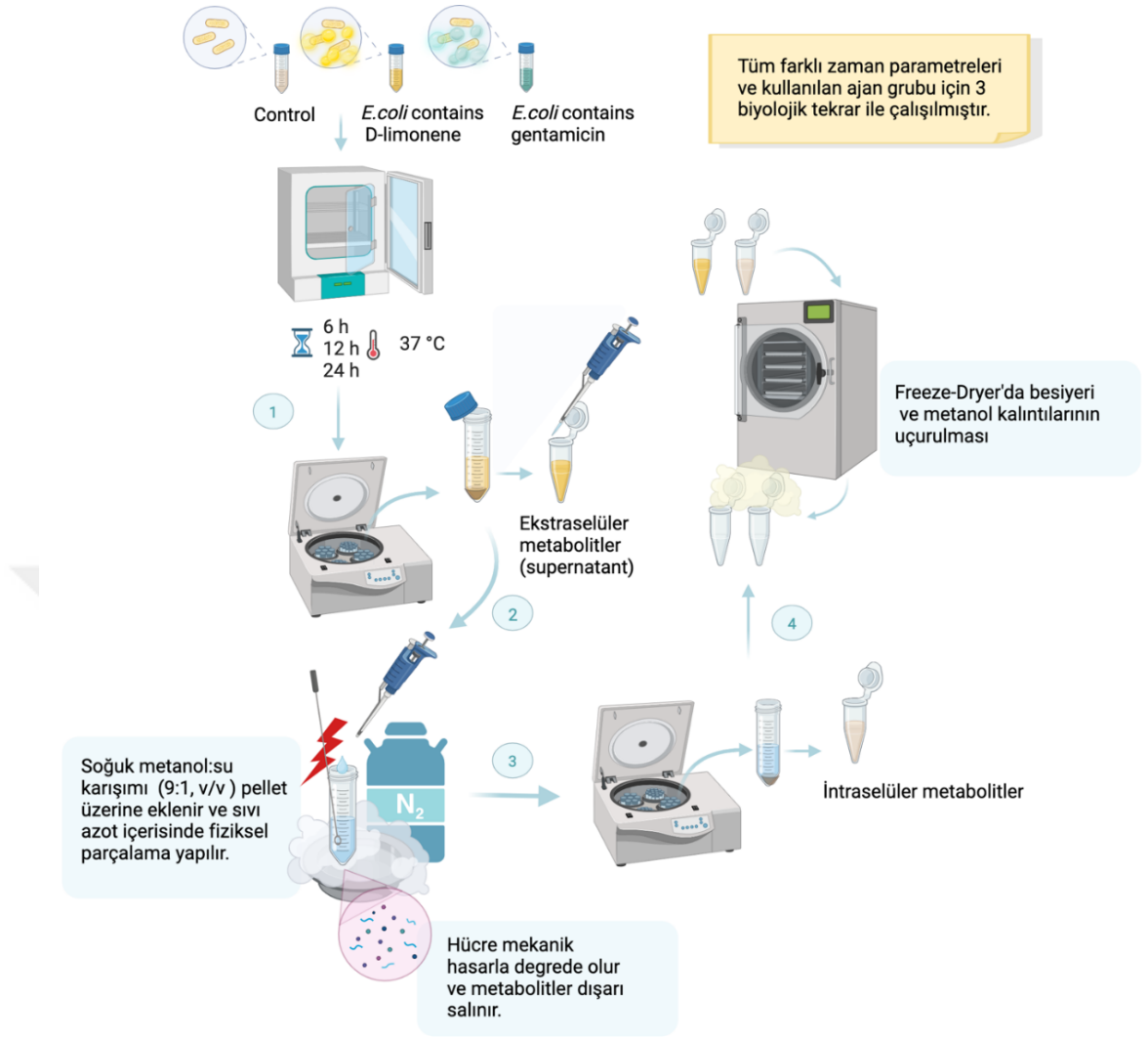
Şekil 3.4'te sunulan deneme planında inkübasyon sonrası mikroorganizma içeren broth besiyerleri santrifüje alınmış ve 15.000G kuvvetinde 15 dakika 4°C'de santrifüj (Sigma Laboratory Centrifuges, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrası dibe çöken bakterilerin üst fazından 1 mL alınarak eppendorflara eklenmiş ve elde edilen bu materyal ekstraselüler (hücre dışı) metabolitler olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar çerçevesinde elde edilen örnek bir santrifüj tüpü görsel Şekil 3.5'te sunulmaktadır.



Şekil 3.5. Santrifüj ile dibe çöken ölü bakteri hücreleri ve üst fazda dışarı salınan metabolitlerini içeren sıvı besiyeri

Ekstraselüler fazın alınmasından sonra tüplerin üst fazındaki medium kısmı boşaltılarak dipte bakteriler bırakılmış, kalan bakterilerin üzerine 3 mL soğuk (-20°C) metanol:su karışımı (9:1, v/v) ilave edilmiş ve sıvı azotta dondurularak öze ile fiziksel parçalama yapılmıştır. Bu işlemden sonra santrifüj tüpleri tekrar 15.000G kuvvetinde 15 dakika 4°C 'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem ile üst metanol fazına salınmış olan metabolitlerden 1 mL alınarak eppendorflara eklenmiştir. Elde edilen bu faz intraselüler (hücre içi) metabolitler olarak adlandırılmıştır.

Eppendorflara alınan ekstraselüler ve intraselüler metabolit örnekleri liyofilizatörde (Pard Mühendislik, Türkiye) 24 saat 10°C 'de kurutulmuştur. Örneklerde daha temiz bir ekstraksiyon elde edebilmek ve besiyeri gibi interferans unsurlarından uzaklaştırmak için kurutma işleminden sonra tekrar 1 mL soğuk metanol:su karışımı (9:1, v/v) eklenmiş ve tekrar liyofilizatörde kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise kurutulan örnekler türevlendirileceği zamana kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Bakteriyel metabolit ekstraksiyonu çalışmasına ait illüstrasyon şeması Şekil 3.6'da sunulmuştur.



Şekil 3.6. Bakteriyel metabolit ekstraksiyonu deney akış şeması

3.2.5. Metabolitlerin Türevlendirilmesi ve GC-MS Analizi

Elde edilen ekstraselüler ve intraselüler metabolit örneklerinin türevlendirilmesi için 20 µL metoksiamin hidroklorür (piridin içerisinde 20 mg/mL) hazırlanmış ve numunelere eklendikten sonra 30°C'de 90 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Çalışmanın devamında 50 µL %1 trimetilklorosilanlı N-metil-N-(trimetilsilil)-trifloroasetamid çözeltisi (MSTFA) ilave edilmiş ve örnekler 37°C'de 30 dakika süreyle ısıtıcılı çalkalayıcıda (Thermo Fisher Scientific, ABD) tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Türevlendirme işlemi tamamlandıktan sonra GC-MS sistemine (Agilent Technologies, ABD) 1 µL numune enjekte edilmiştir. Analizler kapsamında laboratuvarımızda kullanılan GC-MS cihazına ait görsel Şekil 3.7 ve metabolomiks çalışması için belirlenen optimum GC-MS koşulları Çizelge 3.4'de sunulmuştur.



Şekil 3.7. Metabolomik analizlerde kullanılan GC-MS cihazı

Çizelge 3.4. GC-MS cihazı analitik koşulları

Gaz Kromatografi Cihazı Modeli	Agilent Technologies 7890A GC-System
Kütle Dedektörü Cihazı Modeli	Agilent Technologies 5975C inert MSD with Triple Axis- Detector
Akış Hızı	3 mL/dak. Helyum
Enjektör Sıcaklığı	250°C
Split Oranı	100:1
Dedektör	MS Dedektör
Kütle Aralığı	50-650 amu
MS Sıcaklık	230°C
Elektron Enerjisi	70 eV
Enjekte Edilen Hacim	1µL
Fırın sıcaklığı programı	60°C’de 1 dakika, 10°C/dk rampa ile 325°C, 325°C’de 8 dakika
Kolon	OV-5ms, 30m x 0.25mm
Toplam Analiz Süresi	35,5 dakika

3.2.6. Verilerin Normalizasyonu, Data İşleme ve Metabolomik Analizler

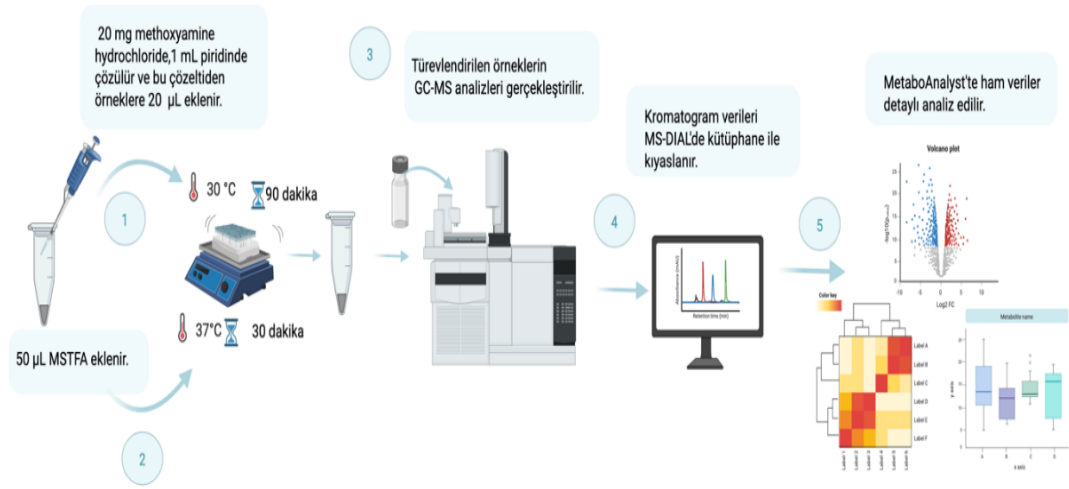
Kütle parçalanma spektrumları, Agilent Technologies MSD Productivity ChemStation yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve NIST 17 kütüphanesi ile eşleştirilerek bileşik tanımlamaları yapılmıştır. Daha sonra ham GC-MS verileri, ABF Converter aracı (<http://www.reifycs.com/AbfConverter/index.html>) kullanılarak “.abf” formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen kromatografik veriler, MS-DIAL (sürüm 5.2.240424.3) yazılımı ile ayrıştırılmış; Kovats Alıkonma İndeksi referans alınarak metabolitlerin tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Parametre ayarlarında analizler kütle aralığı 0-1000 Da (mass-range), alıkonma zaman toleransı 0,5 dakika (Retention time tolerance), Tanımlama skor kesme değeri %70 (Identification score cut-off), minimum pik yüksekliği tanımlama genişliği 1000 (Minimum peak height for peak detection), elektron iyonizasyon (EI) modunda ve retansiyon zamanına göre (RT) gerçekleştirilmiştir. Alignment ve filtreleme işlemleri tamamlandıktan sonra, pik yüksekliği (peak height) bazlı matris verisi dışa aktarılmıştır.

İstatistiksel analizler ve veri normalizasyonu, MetaboAnalyst 6.0 platformunda gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, örnek isimleri ve gruplamalar düzenlendikten sonra veri seti otomatik ölçeklendirme ile normalize edilmiştir. Normalize edilen metabolitlere ait görsel Şekil 3.9’da sunulmuştur. Farklı gruplar arasındaki varyasyonları değerlendirmek üzere temel bileşen analizi (PCA) uygulanmış; ardından gruplar arası ayrışmanın belirginliğini değerlendirmek ve ayrımı sağlayan önemli metabolitleri belirlemek amacıyla en küçük kareler ile diskriminant analiz (PLS-DA) yapılmıştır.

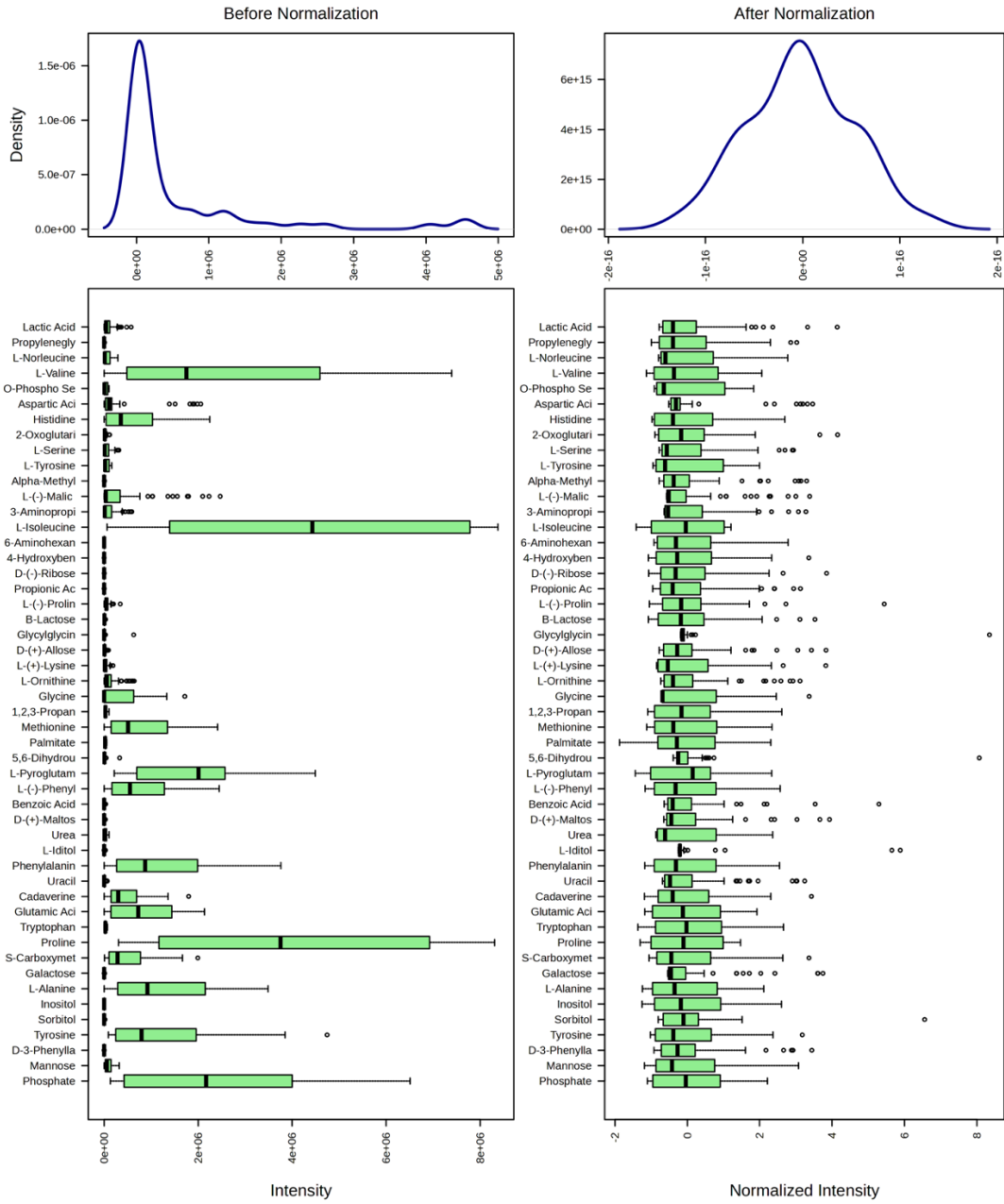
D-limonen uygulanan bakteriler ile kontrol grubu bakterilerin ekstraselüler metabolit profilleri de ayrıca PLS-DA analizi ile değerlendirilmiştir. Metabolit yoğunlukları, sıcaklık haritası (heat map) kullanılarak görselleştirilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar renk gradyanlarıyla karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Örnekler arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek amacıyla veriler t-testi veya ANOVA ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir. Anlamlı bulunan metabolitler için zenginleştirme analizi (Enrichment analysis) ve nokta grafiği (Dot Plot) oluşturularak, bu metabolitlerin ait oldukları metabolik yollar belirlenmiştir. Bu aşamada yolk analizlerinde Fisher’s Exact Test uygulanmış ve KEGG veri tabanı kullanılarak *E. coli K-12 MG1655* referans organizması ile eşleştirme yapılmıştır.

Örneklerin türevlendirilmesi ve analiz sürecine ait deney akış illüstrasyonu Şekil 3.8’de sunulmuştur.



Şekil 3.8. Türevlendirme ve data analizleri deney akış şeması



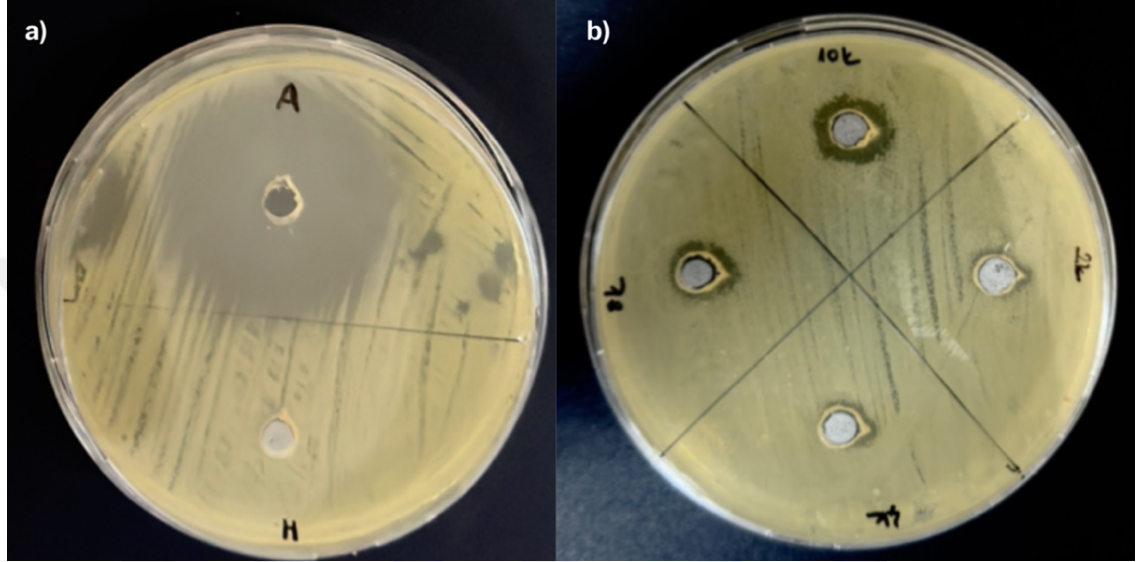
Şekil 3.9. Metabolitlerin normalizasyonu

Yukarıdaki grafikte üst bölümde, normalize edilmemiş verilerin sağa çarpık bir dağılım sergilediği; normalizasyon sonrası ise dağılımın daha simetrik hale geldiği görülmektedir. Alt bölümde yer alan kutu grafiklerinde (box-plot) ise bazı metabolitlerin baskın etkisinin azaldığı ve verilerin daha dengeli bir dağılım gösterdiği izlenmektedir. Bu durum, gruplar arası karşılaştırmaların daha güvenilir şekilde yapılmasına olanak sağlamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. D-Limonen'in *E. coli* Üzerindeki Minimum Etkin Dozu

Yapılan antimikrobiyal aktivite testinde, D-limonenin *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerindeki etkisine dair belirgin doza bağımlı bir etki gözlemlenmiştir. Bu kapsamda ilgili uygulamaya ait görsel veriler Şekil 4.1'de, uygulanan doz ve oluşan zon çaplarını gösterir tablo Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Antibiyotik ve hekzan kontrol grubu (a) ve farklı dozlarda d-limonen uygulanan grup (b)

Çizelge 4.1. Uygulanan D-limonen dozajları ve zon çapı milimetrik ölçümleri

Deneme No	D-Limonen Dozajları (µg/mL)			
	2000	4000	8000	10000
1	0	0	8	10
2	0	0	7	11
3	0	0	8	10
4	0	0	10	13
5	0	0	10	12
6	0	0	7	10
7	0	0	7	10
8	0	0	10	12
9	0	0	10	12
10	0	0	8	10
11	0	0	7	10
Mean	0	0	8,36	10,90
SD	0	0	1,36	1,13

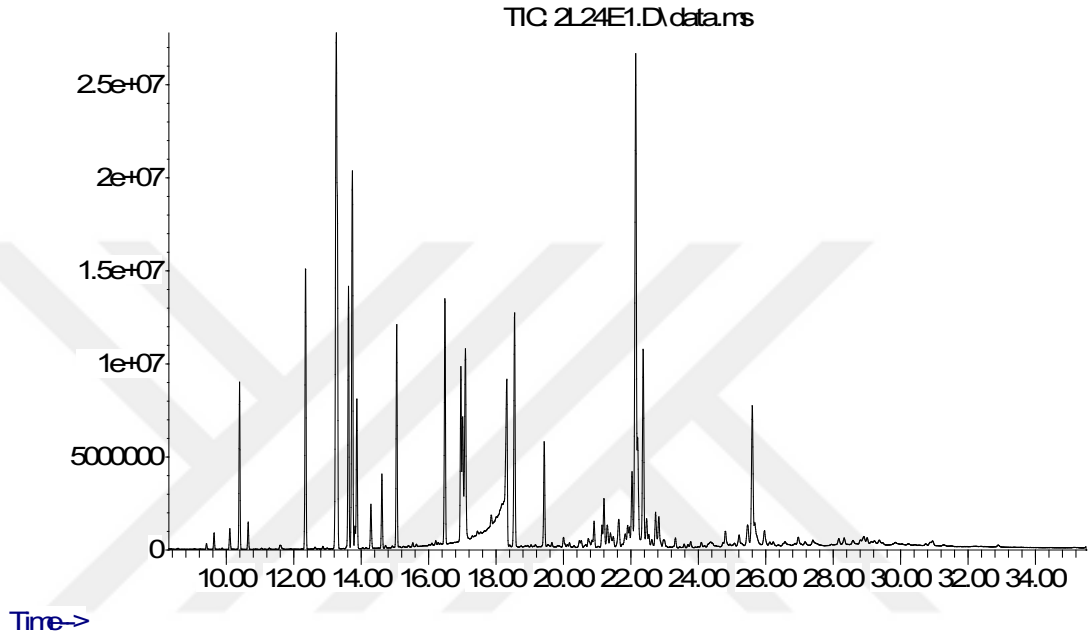
Çizelge 4.1’de sunulan kuyucuk difüzyon testleri sonuçlarına göre; D-limonenin 2000 ve 4000 µL/L konsantrasyonlarında uygulandığı petri kaplarında inhibisyon zonu oluşmazken, 8000 µL/L’de ortalama 7–10 mm ve 10.000 µL/L’de ise 10–13 mm çapında inhibisyon zonları gözlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan gentamisin antibiyotiği ise 45 mm çapında geniş bir inhibisyon zonu oluşturarak, testin doğruluğunu desteklemiştir. Öte yandan negatif kontrol grubu olan n-hekzan, tek başına uygulandığında inhibisyon zonu oluşturmayarak çözen etkisinin antibakteriyel aktiviteye katkı sağlamadığını göstermiştir. Bu bulgular doğrultusunda D-limonenin *E. coli* üzerinde etkinliğinin 8000 µL/L ve üzeri konsantrasyonlarda başladığı, daha düşük konsantrasyonlarda ise inhibisyon etkisinin gözlenmediği belirlenmiştir. Bu nedenle metabolomik analizlerde kullanılmak üzere subinhibitör konsantrasyon olarak ½ MİK değeri olan 4000 µL/L tercih edilmiştir.

D-limonen ve turunçgil esansiyel yağlarının *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkilerini inceleyen farklı çalışmalarda, antibakteriyel denemeler sonucunda MİK değeri 200 µg/mL’e kadar düşmüştür. Benzer şekilde, %56 D-limonen içeriğine sahip Citrus türlerinden elde edilen limon kabuğu uçucu yağı, antibiyotiğe dirençli *E. coli*’ye karşı 250 µg/mL MİK değeriyle antibakteriyel aktivite göstermiştir (Septama vd., 2023). Ek olarak, *P. aeruginosa*’ya karşı yapılan turunçgil ekstraktı çalışmalarında ise, 512 µL/L’lik bir MİK değeri belirlenmiş ve *E. coli*’ye karşı gentamisin ile birleştiğinde sinerjik etkiler gözlemlendiği bildirilmiştir (Costa vd., 2019). Tez çalışmasında elde edilen bulgular, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, çeşitli turunçgillerden elde edilen esansiyel yağların *E. coli*’ye karşı daha düşük dozlarda dahi güçlü bir doğal antibakteriyel ajan potansiyeline sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

4.2. Metabolomik Analizlerde PLS-DA ve PCA Skorları

D-limonen aktif maddesinin *E. coli* üzerine subinhibitör konsantrasyonda (4000 $\mu\text{L/L}$) uygulaması sonucu elde edilen ekstraselüler materyalde gerçekleştirilen hedefsiz (untargeted) metabolom analizine ait GC-MS örnek kromatogramı Şekil 4.2’de verilmiştir.

Abundance

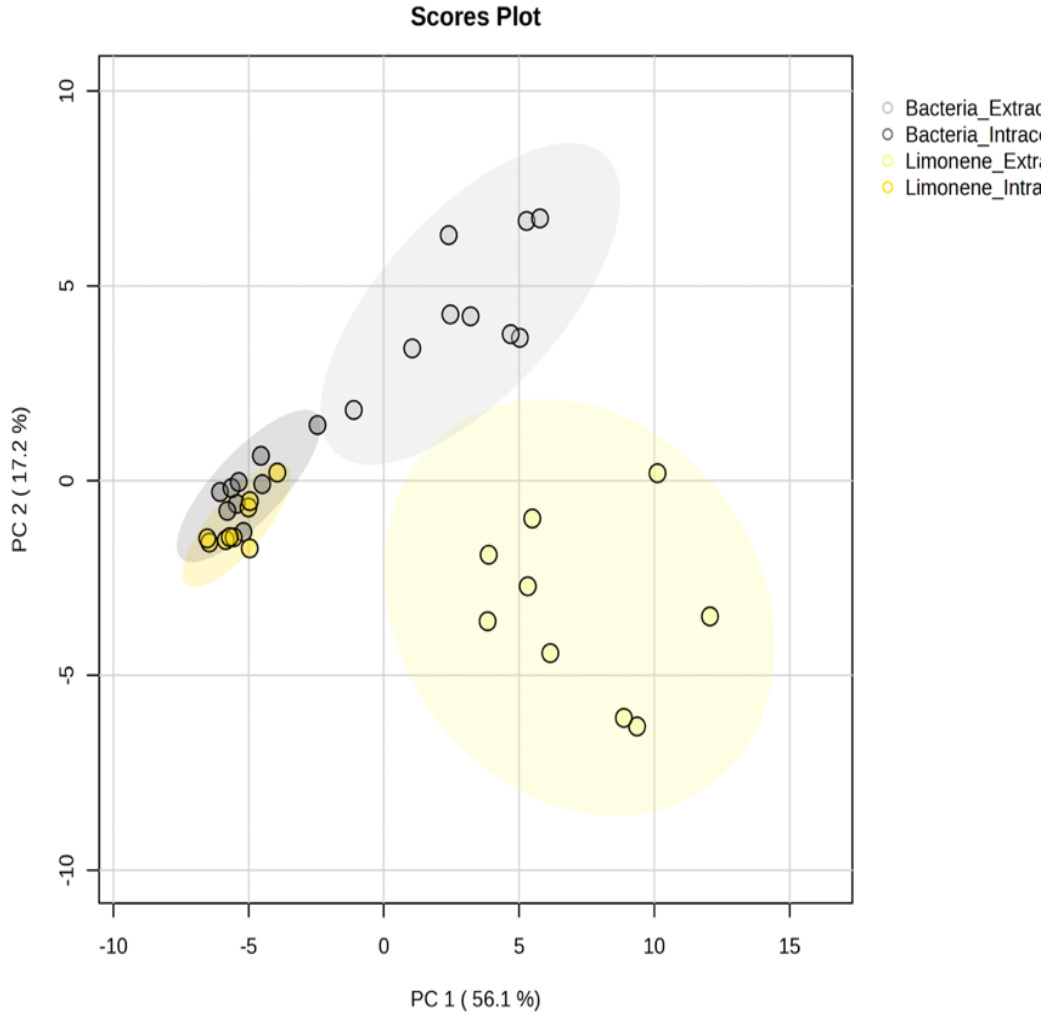


Şekil 4.2. D-Limonen uygulanmış bakteride ekstraselüler metabolitlerin kromatogramı

Şekil 4.2’de, D-limonen uygulanmış *E. coli* hücrelerinden elde edilen ekstraselüler fraksiyona ait toplam iyon kromatogramı (TIC) sunulmaktadır. Bu kromatogram, GC-MS analizinde elde edilen tüm iyon sinyallerinin zaman eksenindeki yoğunluk profilini göstermektedir.

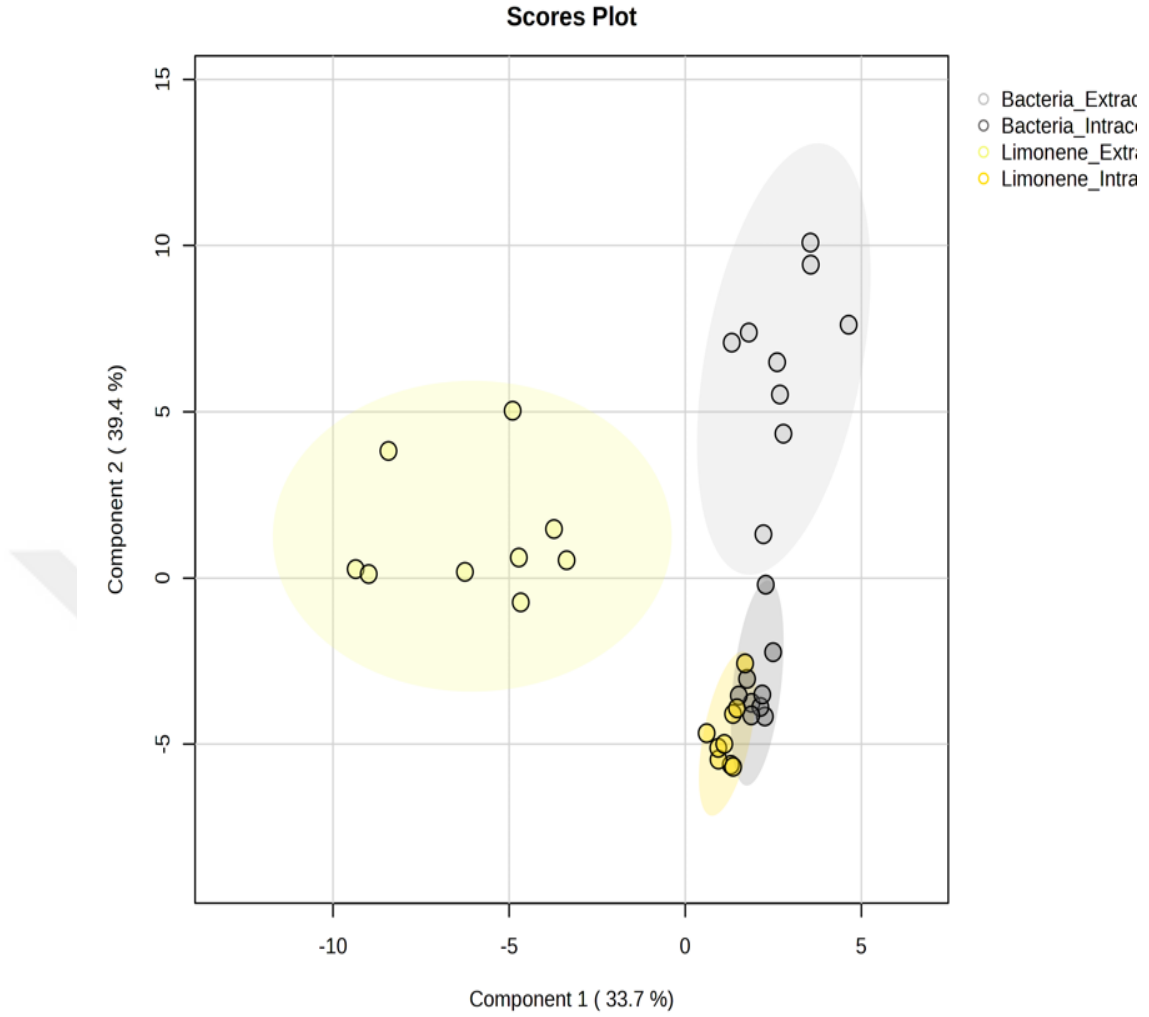
GC-MS analizleri sonucunda elde edilen veriler, MS-DIAL yazılımı ile işlenmiş ve Kovats alıkonma indeksine göre doğrulanan toplam 58 metabolit tanımlanmıştır. Ardından bu veriler MetaboAnalyst 6.0 platformuna aktarılmış, normalize edilmiş ve çok değişkenli istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Bu kapsamda PCA ve PLS-DA analizleri uygulanarak, D-limonen uygulanan bakteriler ile kontrol grubu arasında anlamlı ayrışmalar gözlemlenmiştir. Ayrıca gentamisin uygulanan grup da karşılaştırmaya dahil edilmiş ve ayırt edici metabolitler belirlenmiştir.

Analizler hem hücre içi hem de hücre dışı metabolitler düzeyinde gerçekleştirilmiş, her bir grubun metabolit profiline etkileri değerlendirilmiştir. Aşağıdaki şekillerde bu analizlere ait skor ve yükleme grafikleri sunulmakta olup, ilgili değerlendirmeler şekil açıklamaları ile verilmiştir. (Şekil 4.3–4.7)



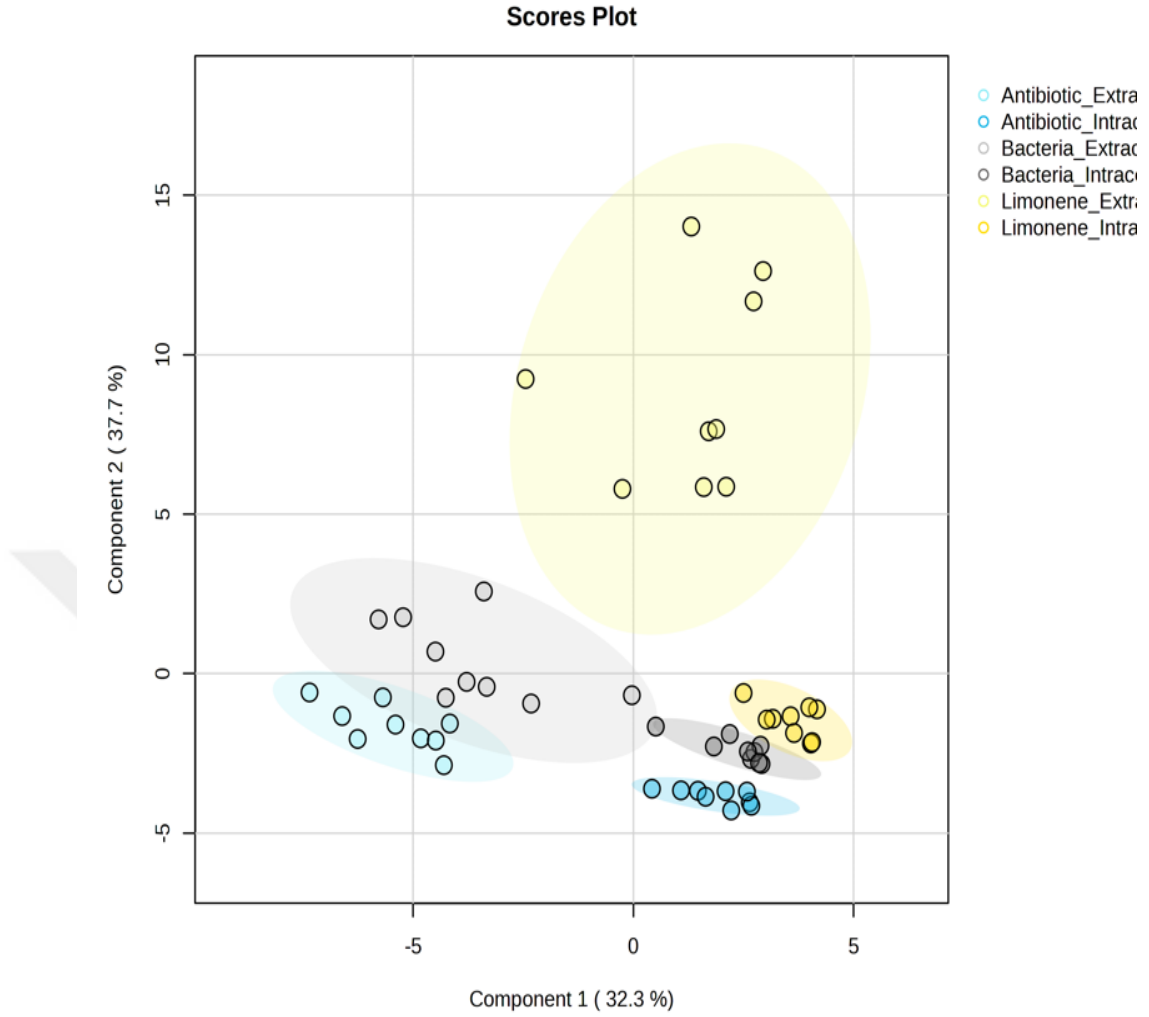
Şekil 4.3. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri grupları arasında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PCA Score Plot Grafiği

Şekil 4.3, D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış *E. coli* gruplarına ait intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PCA skor grafiğini göstermektedir. PCA analizi sonucunda, uygulama grupları ile kontrol grubu arasında özellikle ekstraselüler gruplar arasında anlamlı bir ayrışma gözlenmiştir.



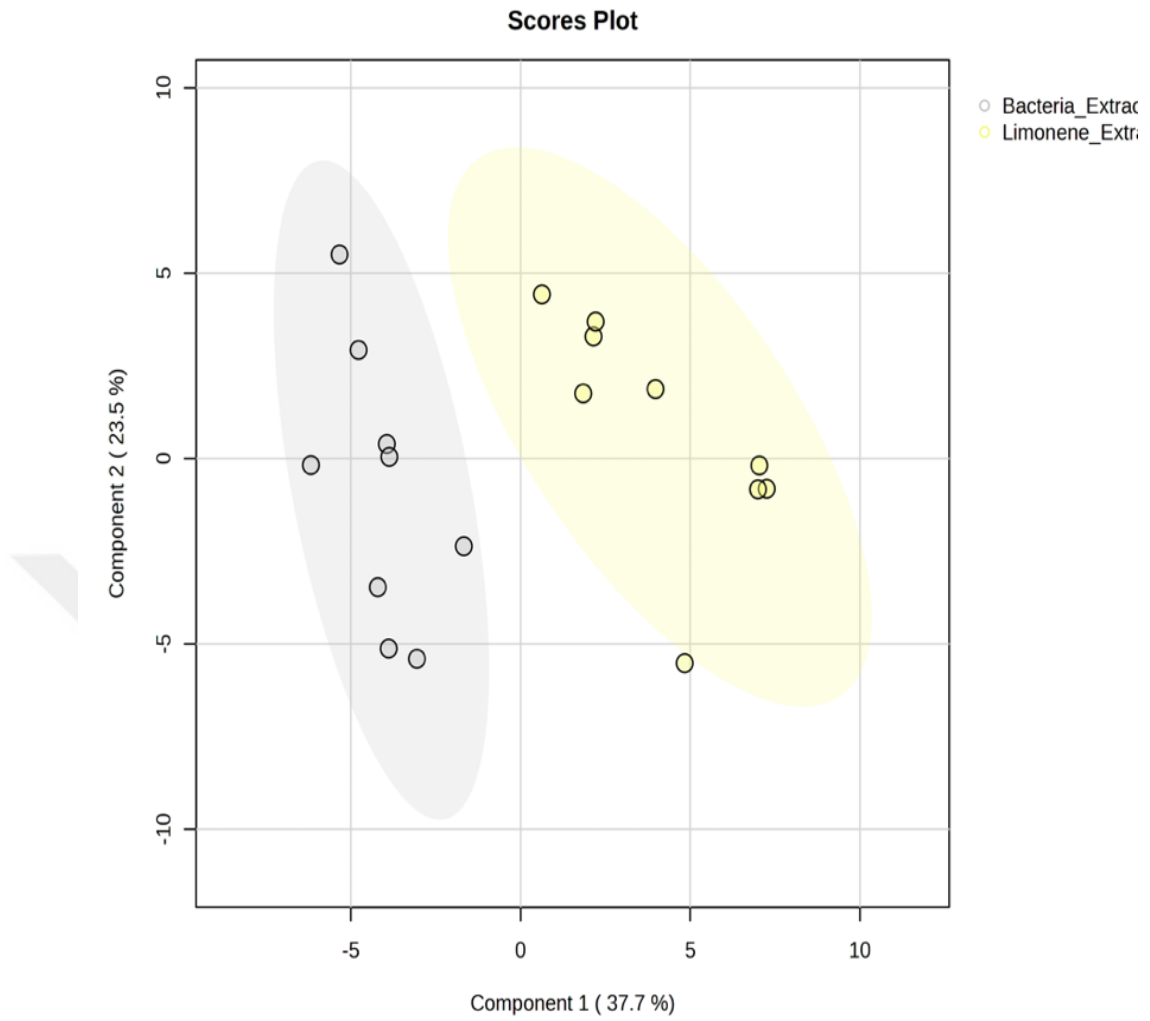
Şekil 4.4. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri grupları arasında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PLS-DA Score Plot Grafiği

Şekil 4.4, intraselüler ve ekstraselüler metabolitler temelinde D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış grupların PLS-DA skor grafiğini göstermektedir. İlgili grafikte, gruplar arasında belirgin bir ayrım sağlandığı görülmektedir. PLS-DA analizi, grupları ayıran metabolitlerin katkı düzeyini artırarak, PCA'ya kıyasla ayrışmayı daha keskin biçimde göstermektedir.



Şekil 4.5. Etken madde uygulanmayan, D-limonen ve gentamisin uygulanan gruplarda intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin PLS-DA Score Plot Grafiği

Şekil 4.5, D-limonen, gentamisin ve kontrol gruplarının hem intraselüler hem de ekstraselüler metabolit profilleri üzerinden PLS-DA skorlarını karşılaştırmaktadır. Üç grubun birbirinden belirgin şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, hem D-limonenin hem de gentamisinin *E. coli* metabolizmasında ayırt edici etkilere sahip olduğunu ve her iki ajanın da farklı metabolik tepkiler oluşturduğunu öne sürmektedir.



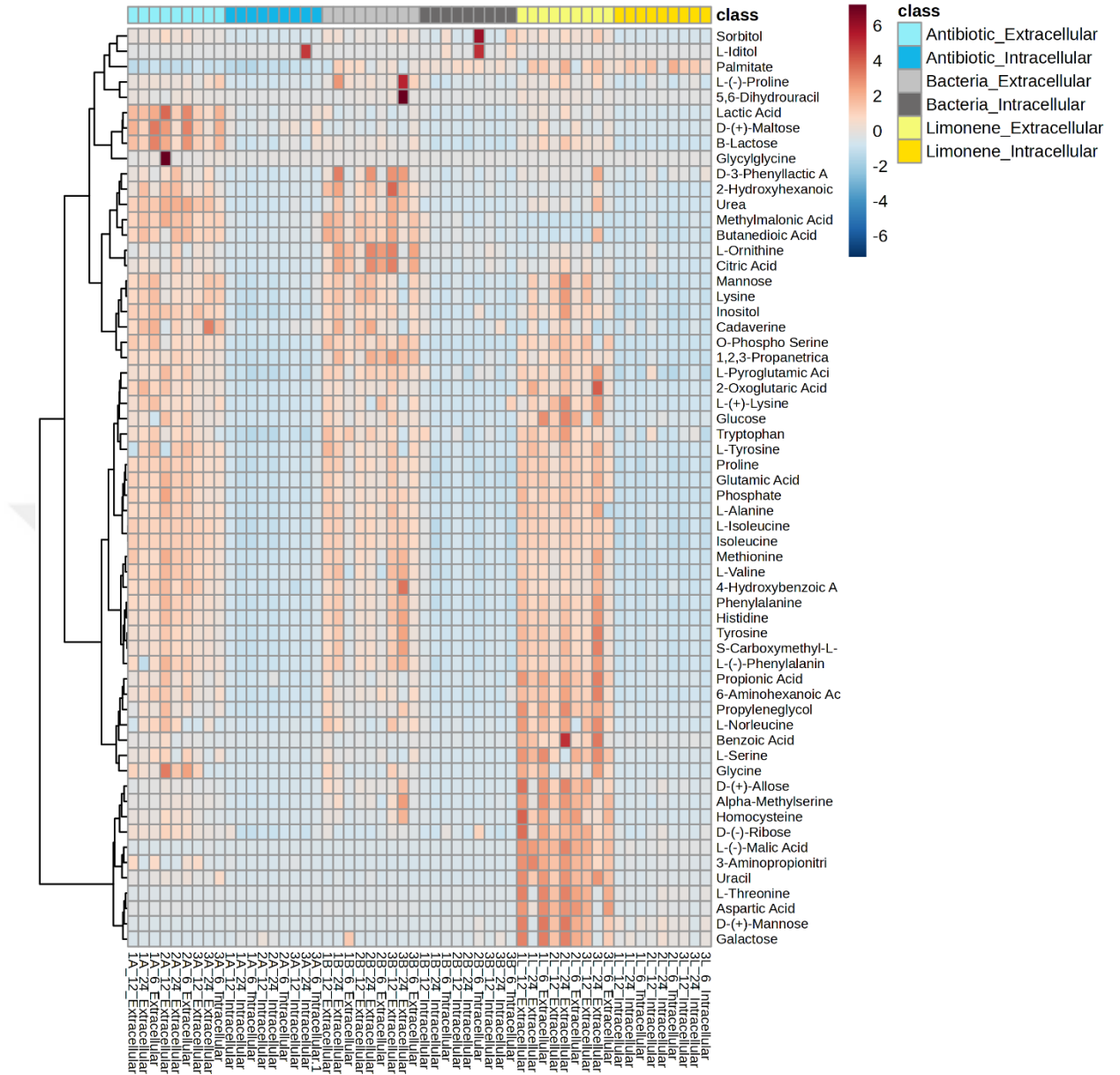
Şekil 4.6. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarının ekstraselüler metabolitleri arasında PLS-DA Score Plot Grafiği

Şekil 4.6, yalnızca ekstraselüler metabolitler dikkate alınarak gerçekleştirilen PLS-DA skor grafiğini göstermektedir. D-limonen uygulanan bakteriler ile kontrol grubuna ait örneklerin birbirinden ayrıldığı görülmektedir.

Örneğin, enoksasin adlı bir antibiyotiğin alt-inhibitör dozlarına maruz kalan *E. coli* hücrelerinde metabolit profili dramatik biçimde değişmiş ve PCA analizi altında stres uygulanan ve uygulanmayan gruplar tamamen ayrı kümelerine ayrılmıştır (Koçak ve Özkul, 2021). Sunulan tez çalışmasında da limonen uygulanmış hücrelerin metabolik profili, kontrol hücrelerinden belirgin bir uzaklıkta konumlanmıştır. PLS-DA analizi sonuçları, grupları ayıran başlıca metabolitleri ortaya koymuştur. Bu metabolitler enerji metabolizması, amino asit birikimi ve poliamin düzeylerindeki farklılıklar ile ilişkilidir. Ayrıca, metabolik değişimlerin zaman bağımlı olduğu gözlemlenmiştir: D-limonen uygulamasının erken evrelerinde hücreler ani bir şok ve enerji kaybı yaşarken, ilerleyen saatlerde toparlanma veya adaptasyon girişimleri metabolik profilde yeni değişiklikler ortaya çıkarmıştır. Literatürde, stres uygulamasını takiben erken dönemde metabolit düzeylerindeki değişimlerin daha özgün olduğu, zaman ilerledikçe ise hücrelerin ortak bir stres adaptasyon yoluna girdikleri belirtilmektedir (Jozefczuk vd., 2010).

4.3. Gruplar Arası Metabolit Trendlerinin Sıcak Harita Grafiği'nde (Heat-map) İncelenmesi

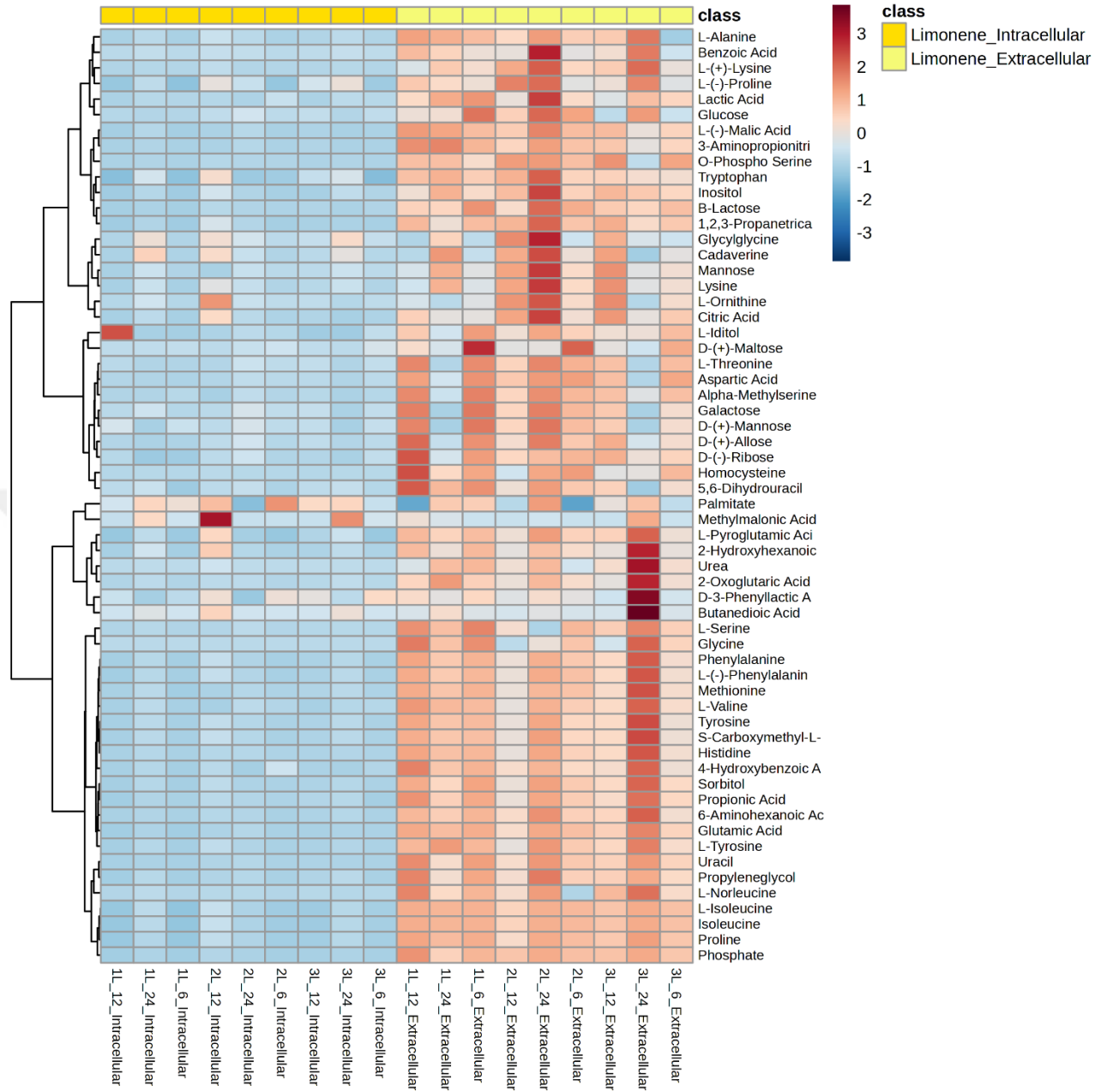
Negatif kontrol, D-limonen uygulanan ve gentamisin uygulanan *E. coli* kültürlerinin intraselüler ve ekstraselüler metabolit profillerine ait sıcaklık haritası Şekil 4.8'de sunulmuştur. İlgili grafik, metabolit yoğunluklarını renk gradyanlarıyla karşılaştırmalı olarak göstermektedir.



Şekil 4.8. Gentamisin, D-limonen ve kontrol gruplarında intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği

Şekil 4.8’de sunulan grafiğe göre; özellikle D-limonen ve gentamisin uygulanan gruplarda belirli metabolitlerin düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiş; özellikle D-limonenin etkisinin gentamisine benzer bazı metabolik tepkileri tetiklediği izlenmiştir.

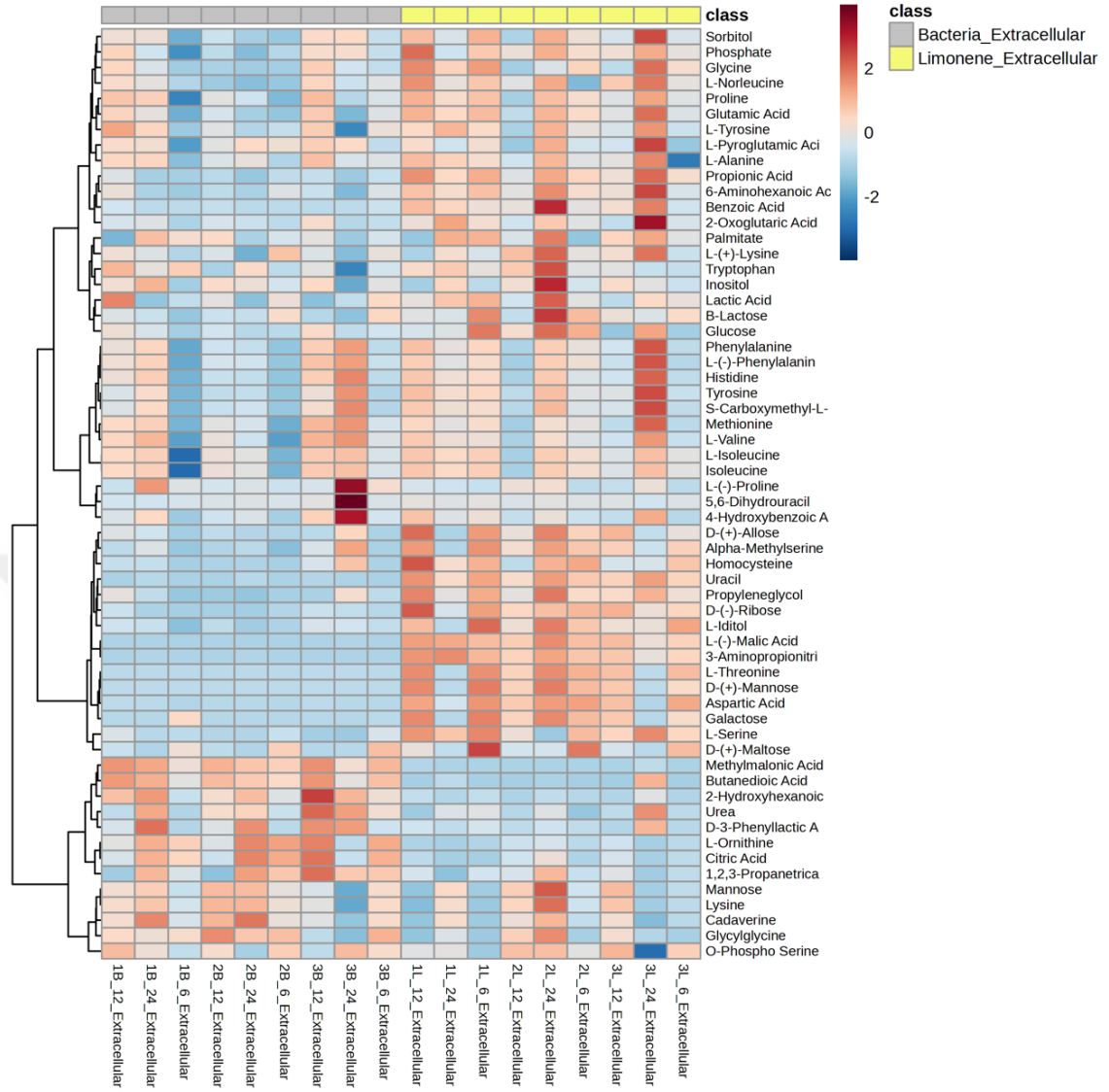
D-limonenin metabolit düzeylerinde oluşturduğu etkiler hem intraselüler hem de ekstraselüler fraksiyonlar için gruplanarak ayrı ayrı değerlendirilmiş ve Şekil 4.9’da görselleştirilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı sürelerde D-limonene maruz kalan bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği

Şekil 4.9’da sunulan grafik, hücre içi ve dışı ortamların D-limonene verdiği metabolik yanıtları karşılaştırmalı olarak göstermektedir. İlgili grafikte özellikle bazı amino asitler, organik asitler ve şeker türevlerinde anlamlı düzey değişimlerinin olduğu dikkat çekmektedir.

Ekstraselüler metabolitlerde gözlenen yoğun değişim nedeniyle bu fraksiyona özel analizler yapılmış, D-limonen uygulamasının dış ortam metabolitleri üzerindeki etkileri Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.10. D-limonen uygulanan ve kontrol grubu bakterilerde ekstraselüler metabolitlerin sıcak harita grafiği

Şekil 4.10’da sunulan grafikte, D-limonen uygulaması ile birçok metabolit düzeyinde artış veya azalış gözlenmiş; bu da dış çevredeki metabolik yanıtın da en az hücre içi kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

4.4. Metabolit Dağılımının Sıcaklık Haritası Temelli Analizi

Çizelge 4.2’de, D-limonen, antibiyotik (gentamisin) ve kontrol gruplarındaki başlıca metabolitlerin göreceli değişimleri (artış ↑ / azalış ↓ / – kontrol sabiti) özetlemektedir. Tablo, özellikle ekstraselüler fraksiyonlar dikkate alınarak heatmap ve ANOVA ($p<0,05$) analizlerine dayalı olarak oluşturulmuş olup ilgili etkileşime göre potansiyel olasılıkları değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Gruplar arasında metabolik değişim incelemesi

Metabolit İsimleri	D-Limonen Grubu	Antibiyotik Grubu	Kontrol Grubu	Potansiyel Olasılık
L-(-)-Malik Asit	↑	–	–	TCA döngüsü dışında artış; glioksilat şantı aktivitesi ihtimali
Urasil	↑	–	–	Nükleotid metabolizmasının etkilenme olasılığı
Sitrik Asit	↓	↓	–	TCA ara ürünü baskılanmış; enerji üretiminin zayıflaması
Aspartik Asit	↑	–	–	Amino asit metabolizmasında artış ihtimali
Glisin	↑	↑	–	Stres yanıtı; glutatyon üretimiyle ilişki ihtimali
Glutamik Asit (Glutamat)	↑	↑	–	Stres yanıtı; glutatyon üretimiyle ilişkisi
L-Serin	↑	–	–	Amino asit ve glutatyon senteziyle ilişkili artış ihtimali
D-(-)-Riboz	↑	↑	–	Nükleik asit metabolizmasında artış ihtimali

Devamı Arkada

Çizelge 4.2'nin devamı

Benzoik Asit	↑	—	—	Limonene özel artış; antimikrobiyal etki ihtimali
Bütandioik Asit	↓	—	—	TCA ara ürünü baskılanmış; enerji üretimi zayıflamış
Propiyonik Asit	↑	—	—	Stres kaynaklı fermentatif yanıt ihtimali
Galaktoz	↑	—	—	Limonene özel artış; antimikrobiyal etki ihtimali
Kadaverin	↓	—	—	Poliamin sentezinde baskılanma ihtimali
L-Ornitin	↓	↓	—	Poliamin ve azot metabolizmasında baskılanma ihtimali
L-Norlösin	↑	—	—	Limonen grubuna özgü metabolit aktivasyonu ihtimali
D-(+)-Alloz	↑	—	—	Enerji metabolizmasının etkilenmesi ihtimali
D-(+)-Mannoz	↑	—	—	Karbon metabolizmasının etkilenme ihtimali
Alfa-Metilserin	↑	—	—	Geçici adaptif artış
Homosistein	↑	—	—	Strese karşı hücrel yanıt ihtimali
3- Aminopropiyonitril	↑	—	—	Stres yanıtı göstergesi
L-Treonin	↑	—	—	Protein biyosentezi artışı

L-Ornitin ve sitrik asit gibi metabolitlerin her iki uygulama grubunda da (D-limonen ve gentamisin uygulanan gruplar) azalma göstermesi dikkat çekicidir. Sitrik asit, TCA döngüsünün temel ara ürünlerinden biridir ve seviyesindeki bu azalma, enerji metabolizmasında döngüsel akışın baskılandığını; dolayısıyla intraselüler ATP üretiminin zayıfladığını düşündürmektedir. L-ornitin ise poliamin ve arjinin metabolizmasında kilit rol oynar; bu metabolitteki düşüş, hücrelerin stres koşullarında bu yolları bilinçli olarak baskıladığına işaret edebilir (Tkachenko vd., 2012). Buna karşılık glutamik asit ve glisin gibi metabolitlerde iki uygulama grubunda da artış gözlemlenmiştir.

Bu metabolitlerin hem antibiyotik hem de D-limonen uygulaması sonrasında benzer yönlerde değişim göstermesi, her iki ajanın farklı kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen benzer metabolik hedeflere yönelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Böylelikle, D-limonenin antibiyotik benzeri etki mekanizmalarına sahip olabileceği ve alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak potansiyel taşıdığı ortaya konmaktadır.

4.4.1. Sıcaklık Haritasına Göre D-Limonen Uygulanan Gruba Özgü Değişim Gösteren Metabolitler

D-limonen uygulanan gruplarda, yalnızca bu gruba özgü belirgin artış gösteren bazı metabolitler de dikkat çekicidir. Bu metabolitlerden bazıları Propiyonik asit, Propilen glikol, L-Norlösin, Benzoik asit, L-Serin, D-(+)-Alloz, Alfa-Metilserin, Homosistein, D-(-)-Riboz, L-(-)-Malik Asit, 3-Aminopropiyonitril, Urasil, L-Treonin, Aspartik asit, D-(+)-Mannoz ve Galaktozdur (Şekil 4.8). Bunun yanı sıra, 2-Hidroksiheksanoik asit, Üre, Metilmalonik asit, Bütandioik asit, Kadaverin gibi metabolitlerde yalnızca limonen uygulanan gruplara spesifik bir azalma söz konusudur.

Kadaverin metabolitinin, limonen içeren gruplarda oldukça düşük seviyelerde bulunması dikkat çekicidir. Limonen uygulamasının bu metabolitin üretimini baskılamış olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi kadaverin, asidik stres koşullarında artış gösteren bir poliamindir ve bu bulgu, limonenin bazı özgül stres yanıt yollarını farklı şekillerde etkilediğini göstermektedir. L-Ornitin arjinin biyosentezinin ve poliamin üretiminin bir ara ürünüdür. Poliamin gruplarından kadaverin maddesinin de aynı şekilde azalma göstermesi poliamin üretiminin genel olarak inhibe olduğunu ve ornitinin hem az sentezlendiğini hem de hızlı kullanıldığını düşündürmektedir (Shah ve Swiatlo, 2008).

Zamana bağlı salınım desenleri incelendiğinde, kontrol grubundaki bakterilerin ekstraselüler fraksiyonlarında metilmalonik asit, bütanedioik asit, 2-hidroksiheksanoik asit, üre, L-ornitin ve sitrik asit metabolitlerinin 6, 12 ve 24. saatlerde çok düzensiz seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, limonen uygulanan gruplarda bu metabolitlerin ekstraselüler fraksiyonlarda neredeyse hiç salgılanmadığı gözlenmiştir.

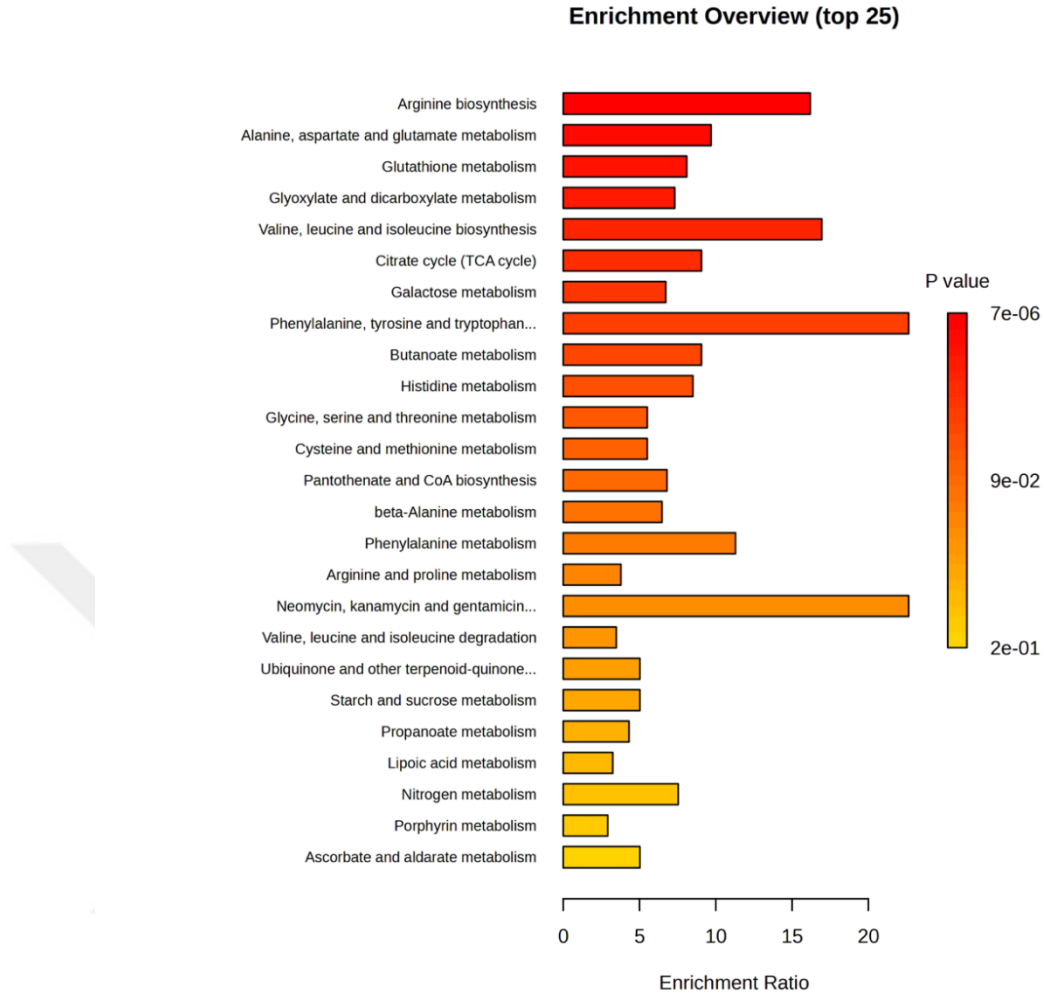
Bu farklılık, limonenin bakterilerin sekresyon kapasitesini veya metabolik akışlarını önemli ölçüde baskıladığını düşündürmektedir.

4.4.2. D-Limonen Uygulamasında Zaman Bağımlı Metabolit Değişimleri

D-(+)-Alloz, alfa-metilserin, homosistein, D-(+)-mannoz, galaktoz, L-treonin, aspartik asit ve D-(-)-riboz gibi bazı metabolitler, D-limonen uygulanan kültürlerde 6. ve 12. saatte görece olarak yüksek seviyelerde tespit edilmiş; ancak 24. saate gelindiğinde bu metabolitlerin yoğunluklarında düşüş gözlenmiştir. Bu desen, bazı metabolitlerin D-limonene karşı erken fazda aktive edilebildiğini; fakat bu artışların tüm örnekler boyunca tutarlı olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, zaman bağımlı bir adaptif yanıtın varlığını desteklemekle birlikte, bu bulgunun daha ileri çalışmalarda istatistiksel doğrulama ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

4.5. Metabolomik Yolaklar ve Zenginleştirme Analizleri

Örnek grupları arasında gerçekleştirilen zenginleştirme analizine (Enrichment analysis) ait görsel aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.11)



Şekil 4.11. D-limonen uygulanan ve kontrol grubu bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin zenginleştirme analizi

Şekil 4.11’de, D-limonen uygulanan ve kontrol gruplarındaki ekstraselüler ve intraselüler metabolitler arasında anlamlı farklılık gösterenler, ANOVA testi ($p < 0.05$) ve sonrasında uygulanan Fisher’s LSD yöntemi ile belirlenmiştir. Anlamlı bulunan bu metabolitlerin dahil olduğu ilk 25 metabolik yolak için zenginleştirme oranları (enrichment ratio) ve p-değerleri hesaplanarak, sonuçlar renk skalasıyla görselleştirilmiştir. Özellikle amino asit metabolizması (özellikle alanin, aspartat ve glutamat metabolizması), glutatyon metabolizması, arjinin biyosentezi, TCA döngüsü ve glisin-serin-treonin metabolizması gibi temel biyokimyasal yollaklarda değişimler gözlenmiştir. D-limonen uygulaması, hücresel enerji ve antioksidan dengesini düzenleyen metabolik süreçlerde istatistiksel olarak anlamlı etkiler yaratmıştır. Bu grafiğe göre, D-limonenin çoklu metabolik hedefleri etkilediğini ve sistemik metabolik stres yanıtlarını tetiklediğini desteklemektedir.

Yolak analizlerinde, D-limonen uygulanan ve uygulanmayan *E. coli* örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösteren çok sayıda metabolik yolak belirlenmiştir. Çizelge 4.3'te bu yollara ait p değerleri, FDR düzeltmeleri ve yolak etki (impact) değerleri sunulmaktadır. Bu analizlerde kullanılan p değeri, gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını göstermekte olup, $<0,05$ düzeyindeki değerler anlamlı kabul edilmiştir. $-\log_{10}(p)$ değeri, p-değerinin logaritmik dönüşümünü ifade eder ve grafiksel sunumlarda anlamlılığın görselleştirilmesine katkı sağlar. False Discovery Rate (FDR), çoklu test düzeltmesi kapsamında yanlış anlamlılık olasılığını azaltmak için kullanılmaktadır. Etki değeri (impact value) ise, ilgili yolak üzerindeki biyolojik etkinin derecesini yansıtarak, metabolik bozulmanın yolak düzeyindeki önemini ortaya koyar. Bu parametreler birlikte değerlendirildiğinde hem istatistiksel hem de biyolojik anlamlılık açısından güçlü bir yorumlama zemini oluşturulmaktadır. Bu tez kapsamında, yolak analizlerinde FDR $<0,05$ ve etki değeri $>0,10$ olacak şekilde eşik değerler esas alınmıştır.

Çizelge 4.3. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu bakterilerde intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerin yolak analizi sonuçları

Metabolik Yolaklar	Toplam	Beklenen	p	$-\log_{10}(p)$	FDR	Etki
Glisin, serin ve treonin metabolizması	33	1,11	$<0,001$	3,25	0,01	0,52
Glutasyon metabolizması	22	0,74	$<0,001$	3,23	0,01	0,06
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	22	0,74	$<0,001$	3,23	0,01	0,52
Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	37	1,24	0,001	2,97	0,01	0,18
D-amino asit metabolizması	25	0,84	0,001	2,96	0,01	0,08
Arginin biyosentezi	16	0,54	0,001	2,82	0,02	0,18
Siyanamino asit metabolizması	17	0,57	0,001	2,71	0,02	0

Devamı Arkada

Çizelge 4.3'ün devamı

Folat aracılığıyla tek karbon havuzu	20	0,67	0,003	2,44	0,03	0,22
Sitrik asit döngüsü (TCA döngüsü)	20	0,67	0,003	2,44	0,03	0,24
Lisin yıkımı	22	0,74	0,005	2,28	0,04	0,24
Diğer karbon fiksasyon yolları	24	0,81	0,007	2,14	0,05	0,15
Metan metabolizması	26	0,87	0,009	2,01	0,07	0,32
Sistein ve metiyonin metabolizması	42	1,41	0,011	1,94	0,07	0,28
Kükürt metabolizması	20	0,67	0,027	1,56	0,16	0,08
Aminobenzoat yıkımı	8	0,27	0,027	1,56	0,16	0
Streptomisin biyosentezi	9	0,30	0,034	1,46	0,18	0
Valin, lösin ve izölösün biyosentezi	22	0,74	0,035	1,45	0,18	0
Galaktoz metabolizması	39	1,31	0,038	1,41	0,18	0,30
Fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi	23	0,77	0,039	1,40	0,18	0
Pantotenat ve Koenzim A biyosentezi	24	0,81	0,043	1,35	0,19	0

Devamı Arkada

Çizelge 4.3'ün devamı

Pirüvat metabolizması	27	0,91	0,059	1,22	0,25	0,13
Lisin biyosentezi	13	0,43	>0,05	1,16	0,25	0
Tirozin metabolizması	13	0,43	>0,05	1,16	0,25	0
Beta-Alanin metabolizması	13	0,43	>0,05	1,16	0,25	0
Arginin ve prolin metabolizması	29	0,97	>0,05	1,15	0,25	0,04
Nikotinat ve nikotinamid metabolizması	15	0,50	>0,05	1,05	0,30	0
Karbapenem biyosentezi	3	0,10	>0,05	1	0,31	0
Novobiyosin biyosentezi	3	0,10	>0,05	1	0,31	0
Fenilalanin metabolizması	35	1,18	>0,05	0,95	0,33	0
Bütanoat metabolizması	18	0,60	>0,05	0,91	0,35	0,05
Valin, lösin ve izölösün yıkımı	22	0,74	>0,05	0,77	0,46	0
Nişasta ve sükroz metabolizması	22	0,74	>0,05	0,77	0,46	0,45
Çeşitli bitki ikincil metabolitlerinin biyosentezi	6	0,20	>0,05	0,72	0,50	0
Propanoat metabolizması	26	0,87	>0,05	0,66	0,57	0,04

Devamı Arkada

Çizelge 4.3'ün devamı

Monobaktam biyosentezi	8	0,27	>0,05	0,61	0,58	0
İnositol fosfat metabolizması	8	0,27	>0,05	0,61	0,58	1
Lipoik asit metabolizması	28	0,94	>0,05	0,61	0,58	0
Triptofan metabolizması	10	0,33	>0,05	0,53	0,68	0
Azot metabolizması	11	0,37	>0,05	0,50	0,72	0
Histidin metabolizması	12	0,40	>0,05	0,46	0,75	0
Selenobileşik metabolizması	15	0,50	>0,05	0,39	0,87	0
Amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması	44	1,48	>0,05	0,35	0,93	0
Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	18	0,60	>0,05	0,33	0,95	0,02
Tiamin metabolizması	23	0,77	>0,05	0,25	1	0
Ubiquinon ve diğer terpenoid-kinonların biyosentezi	23	0,77	>0,05	0,25	1	0,05
Pentoz fosfat yolu	26	0,87	>0,05	0,22	1	0
Glikoliz veya Glukoneogenez	29	0,97	>0,05	0,19	1	0
Fruktoz ve mannoz metabolizması	33	1,11	>0,05	0,16	1	0

Devamı Arkada

Çizelge 4.3'ün devamı

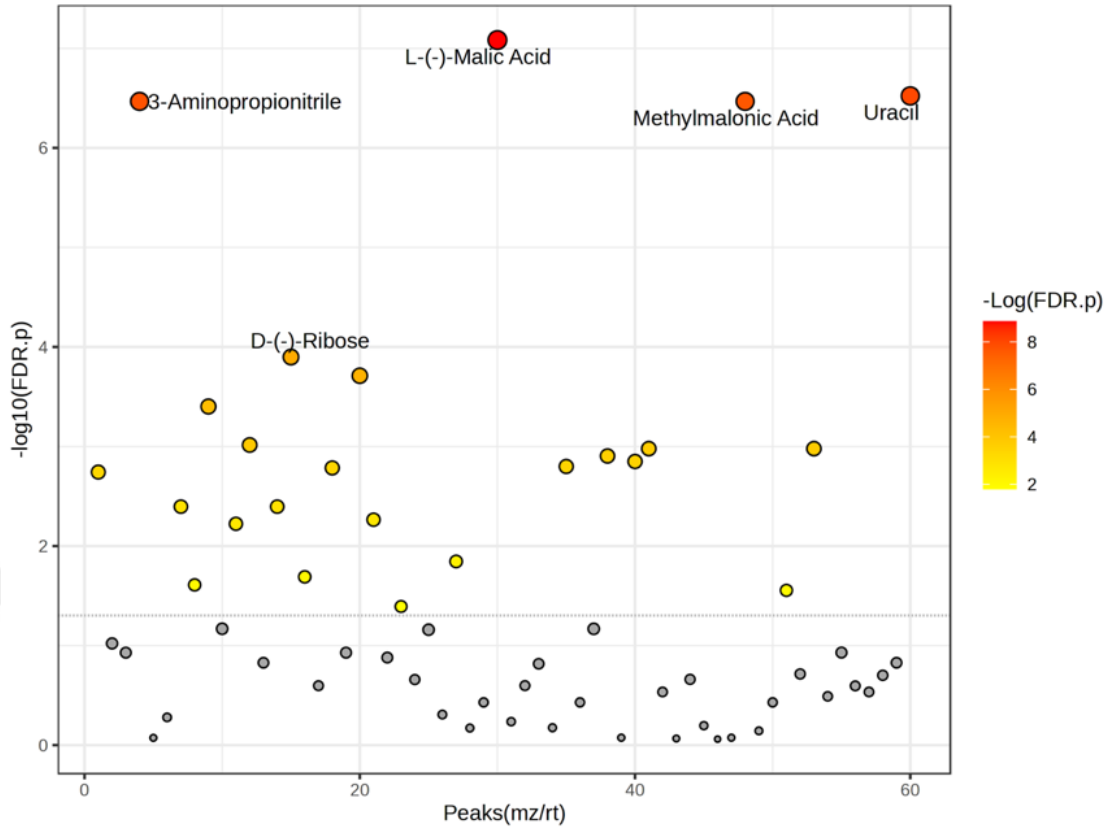
Porfirin metabolizması	35	1,18	>0,05	0,15	1	0
Pirimidin metabolizması	51	1,72	>0,05	0,07	1	0,13
Pürin metabolizması	76	2,56	>0,05	0,03	1	0

Çizelge 4.3'te sunulan verilere göre intraselüler ve ekstraselüler metabolitler birlikte değerlendirildiğinde, glisin, serin ve treonin metabolizması ($p < 0,001$, FDR = 0,01, etki = 0,52), glutatyon metabolizması ($p < 0,001$, FDR = 0,01, etki = 0,06), alanin, aspartat ve glutamat metabolizması ($p < 0,001$, FDR = 0,01, etki = 0,52) ve glioksilat ve dikarboksilat metabolizması ($p = 0,001$, FDR = 0,01, etki = 0,18) gibi yolaklarda anlamlı değişiklikler gözlenmiştir.

4.5.1. Ekstraselüler Metabolitlerin Zenginleştirme ve Yolak Analizleri

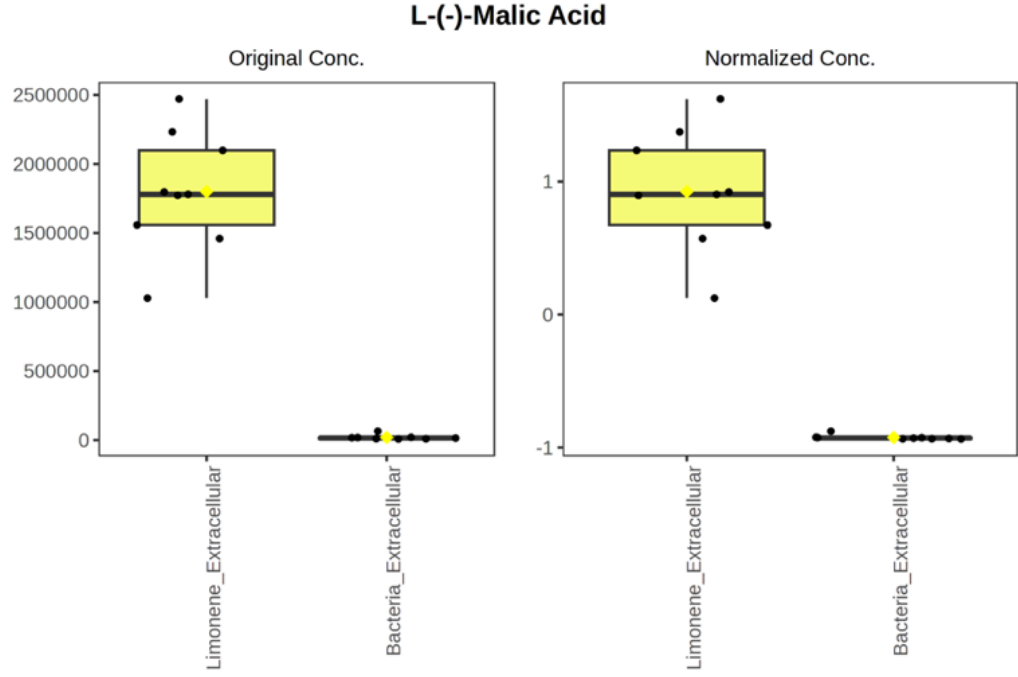
D-limonen uygulanan örneklerde bazı metabolitlerin ekstraselüler ortamda biriktiği görülmektedir. Bu durum, hücre zarı bütünlüğünün bozulması sonucu iç bileşenlerin dışarı sızdığını düşündürmektedir. Nitekim, benzer stres koşullarında *E. coli*'nin hayatta kalma stratejisi olarak glutamat gibi molekülleri dışarı pompaladığı da bilinmektedir (Carvalho vd., 2019).

Bu bağlamda, ekstraselüler metabolit profillerinde gözlenen farklılıkların daha belirgin olması nedeniyle D-limonen uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında yalnızca ekstraselüler metabolitlere özel zenginleştirme ve yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. T-test yöntemiyle yapılan karşılaştırmalar sonucunda toplam 24 anlamlı metabolit tespit edilmiştir. D-limonen uygulamasına özgü bu 24 anlamlı ve yalnızca ekstraselüler metabolitlerin yer aldığı T-test nokta grafiği Şekil 4.12'te sunulmuştur.

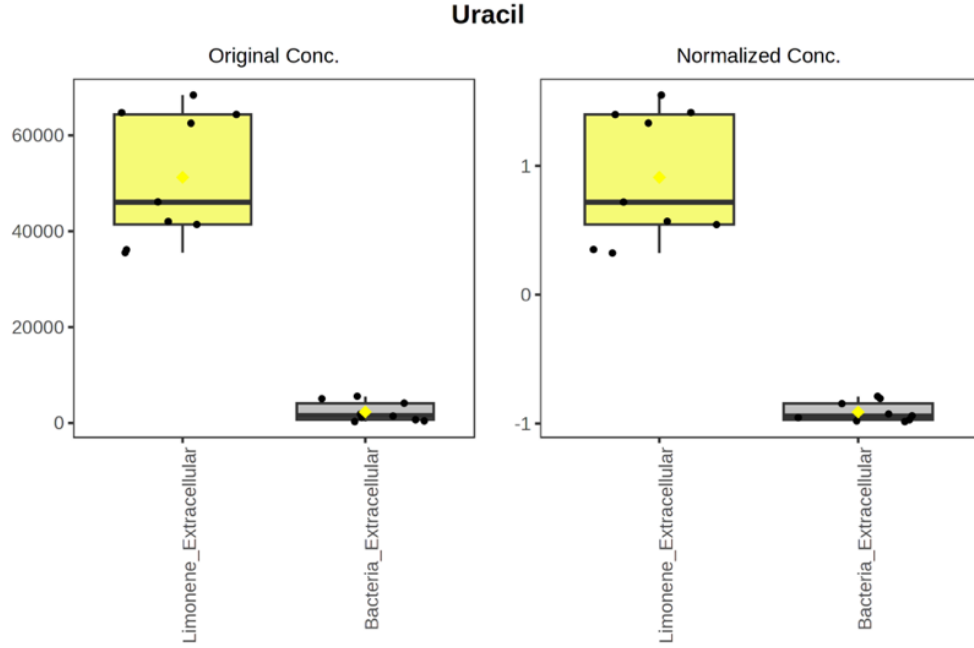


Şekil 4.12. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında ekstraselüler metabolitlerin T-test analizinin nokta grafiği ($p < 0.05$)

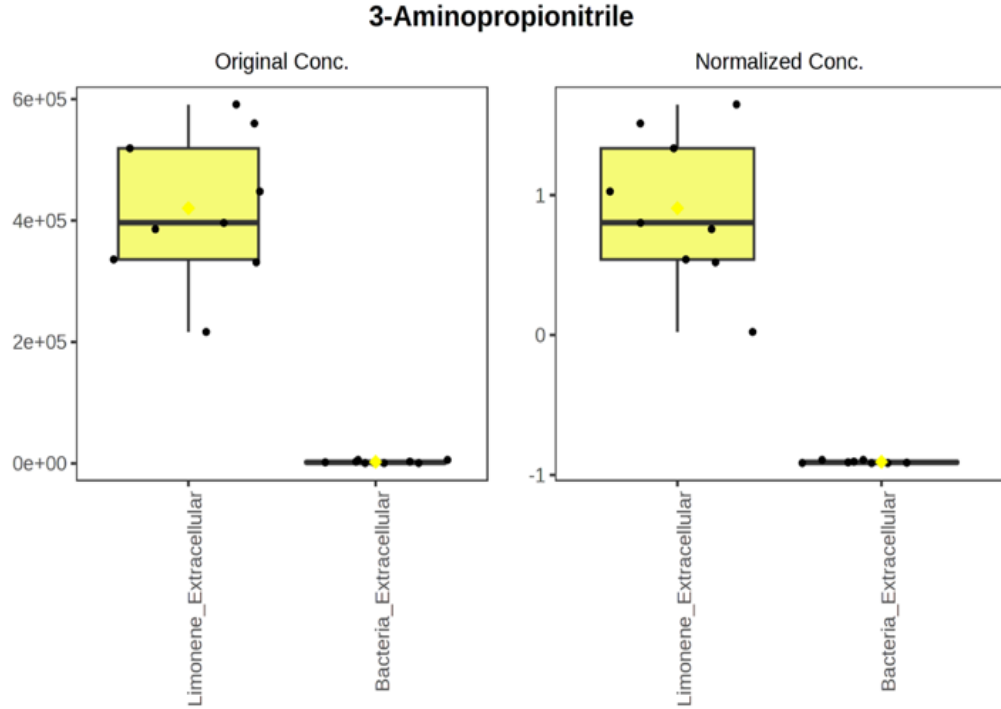
Şekil 4.12’de sunulan grafikte tespit edilen metabolitler arasında konsantrasyon farkı en yüksek olan ilk üç metabolit olan L-(-)-malik asit, urasil ve 3-aminopropionitril, D-limonen uygulaması sonrasında anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p < 0,05$). Bu değişimlere ait kutu grafikleri sırasıyla 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’te sunulmuştur.



Şekil 4.13. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında L-(-)-Malik Asit'in konsantrasyon farkının kutu grafiği



Şekil 4.14. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında Urasil'in konsantrasyon farkının kutu grafiği

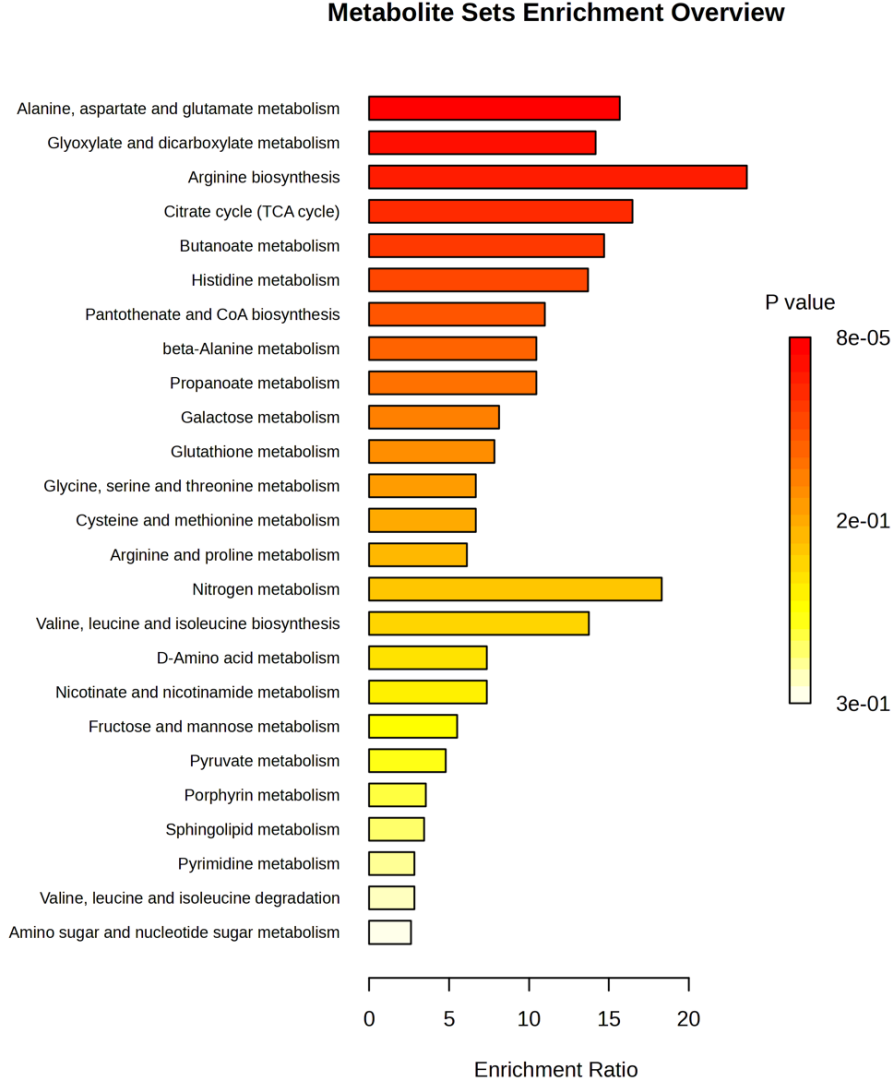


Şekil 4.15. D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında 3-Aminopropiyonitril'in konsantrasyon farkının kutu grafiği

Yukarıdaki kutu grafiklerinde sunulan verilere göre, D-limonen uygulanan gruplarda özellikle L-(-)-malik asit, urasil ve 3-aminopropiyonitril metabolitlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. L-(-)-Malik asitte gözlenen bu artış, D-limonenin enerji metabolizmasına etkileriyle ilişkilendirilebilir olup, bu bulgu ilerleyen bölümlerde glioksilat şantı ve TCA döngüsü bağlamında detaylı olarak ele alınacaktır (bkz. Bölüm 4.6 ve 4.7). Urasil düzeylerindeki artış, nükleotid metabolizmasında meydana gelen genel bir dengesizliğe ya da hücrel stres koşullarına bağlı olarak DNA/RNA yapı taşlarının dış ortama sızmasına işaret edebilir. Bu yorum, antibiyotik stresine maruz kalan *E. coli* hücrelerinde nükleotid metabolizmasında gözlenen bozulmalarla paralellik göstermektedir (Zampieri vd., 2017). Benzer şekilde, 3-aminopropiyonitrildeki yükseliş, amino asit katabolizmasında denge kaybına veya nitril bileşiklerinin birikimine bağlı olarak gelişebilecek bir stres göstergesi olarak değerlendirilebilir. Literatürde, D-limonen gibi biyoaktif ajanların *E. coli*'de metabolik stresi tetiklediği ve bu durumun alışılmadık ara ürünlerin birikimine yol açabildiği belirtilmiştir (Cheng vd., 2019).

Bu üç metabolitteki paralel artışlar, D-limonenin *E. coli* hücrelerinde yalnızca enerji üretimini değil, aynı zamanda nükleotid ve azot metabolizması gibi temel biyolojik süreçleri de etkileyen çok yönlü bir metabolik stres yanıtı oluşturduğunu göstermektedir.

D-limonen uygulanan ve uygulanmayan gruplarda yalnızca ekstraselüler metabolit profillerine ait zenginleştirme analizi grafikleri Şekil 4.16’da sunulmuştur.



Şekil 4.16 D-Limonen uygulanan ve kontrol bakteri gruplarında ekstraselüler metabolitlerin zenginleştirme analizi grafiği

Şekil 4.16’da sunulan zenginleştirme grafikleri, yalnızca ekstraselüler profilleri ele alarak D-limonen uygulanan ve kontrol grubu bakterileri ele almaktadır. Anlamlı olarak etkilenen ilk 25 metabolik yolak için zenginleştirme oranlarını (enrichment ratio) ve p-değerlerini renk skalasıyla birlikte sunmaktadır. Özellikle amino asit metabolizması (özellikle alanin, aspartat ve glutamat metabolizması), glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, TCA döngüsü ve arjinin biyosentezi gibi biyokimyasal yollarda değişimler gözlenmiştir.

İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu bakterilerde ekstraselüler metabolitlerin yolak analizi sonuçları Çizelge 4.4'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.4. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen D-limonen uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu bakterilerde ekstraselüler metabolitlerin yolak analizi sonuçları

Metabolik Yolaklar	Toplam	Beklenen	p	-log10(p)	FDR	Etki
Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	37	0,50	<0,001	4,10	0	0,17
Arginin biyosentezi	16	0,21	0,001	2,98	0,03	0,18
Siyanoamino asit metabolizması	17	0,23	0,001	2,89	0,03	0
Sülfür metabolizması	20	0,27	0,002	2,68	0,03	0,08
Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	20	0,27	0,002	2,68	0,03	0,20
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	22	0,30	0,002	2,56	0,04	0,45
Diğer karbon sabitleme yolları	24	0,32	0,003	2,45	0,04	0,15
D-Amino asit metabolizması	25	0,34	0,003	2,39	0,04	0
Glisin, serin ve treonin metabolizması	33	0,45	0,008	2,05	0,08	0,26
Beta-Alanin metabolizması	13	0,17	0,012	1,90	0,11	0
Nikotinat ve nikotinamid metabolizması	15	0,20	0,016	1,78	0,12	0
Sistein ve metiyonin metabolizması	42	0,57	0,017	1,76	0,12	0,14

Devamı Arkada

Çizelge 4.4'ün devamı

Bütanoat metabolizması	18	0,24	0,023	1,62	0,16	0,05
Folat tarafından bir karbon havuzu	20	0,27	0,028	1,54	0,18	0,10
Glutasyon metabolizması	22	0,30	0,034	1,46	0,20	0,01
Karbapenem biyosentezi	3	0,04	0,040	1,39	0,21	0
Pantotenat ve CoA biyosentezi	24	0,32	0,040	1,39	0,21	0
Propanoat metabolizması	26	0,35	0,047	1,32	0,22	0,04
Piruvat metabolizması	27	0,36	0,050	1,29	0,22	0,09
Arginin ve prolin metabolizması	29	0,39	0,057	1,24	0,24	0,04
Galaktoz metabolizması	39	0,53	>0,05	1,01	0,38	0,27
Monobaktam biyosentezi	8	0,10	>0,05	0,98	0,38	0
Aminobenzoat bozunması	8	0,10	>0,05	0,98	0,38	0
Azot metabolizması	11	0,15	>0,05	0,84	0,50	0
Lisin biyosentezi	13	0,17	>0,05	0,78	0,54	0
Tirozin metabolizması	13	0,17	>0,05	0,78	0,54	0
Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	18	0,24	>0,05	0,65	0,70	0,02

Devamı Arkada

Çizelge 4.4'ün devamı

Valin, lösin ve izölösün biyosentezi	22	0,30	>0,05	0,57	0,78	0
Lisin bozunması	22	0,30	>0,05	0,57	0,78	0
Fruktoz ve mannoz metabolizması	33	0,45	>0,05	0,43	1	0
Fenilalanin metabolizması	35	0,47	>0,05	0,41	1	0
Porfirin metabolizması	35	0,47	>0,05	0,41	1	0
Amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması	44	0,60	>0,05	0,33	1	0
Pirimidin metabolizması	51	0,69	>0,05	0,28	1	0,13

Ekstraselüler metabolitlere özel yapılan yolak analizi sonuçları Çizelge 4.4'de sunulmakla birlikte, Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması ($p < 0,001$, FDR = 0, etki = 0,17), Arginin biyosentezi ($p = 0,001$, FDR = 0,03, etki = 0,18) ve Siyanoamino asit metabolizması ($p = 0,001$, FDR = 0,03, etki = 0) gibi temel biyolojik süreçlerde bozulmalar olabileceğini düşündürmektedir.

4.6. Enerji Metabolizmasında (TCA Döngüsü) Değişim

Limonen uygulanan *E. coli* hücrelerinde bütandioik asit ve sitrat düzeylerinin belirgin şekilde azalması, TCA (Krebs) döngüsünün normal akışının bozulduğunu göstermektedir. Zenginleştirme analizi sonuçlarımız da bu bulguyu desteklemektedir (Şekil 4.11). Benzer şekilde, karvakrol biyoaktif bileşiğinin *E. coli* üzerindeki metabolomik etkisini inceleyen bir çalışmada da bütandioik asit ve sitrat seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (Picone vd., 2013). Ayrıca, klortetrasiklin stresine maruz bırakılan *E. coli* hücrelerinde de TCA döngüsünün aşağı regüle olduğu rapor edilmiştir (Lin vd., 2014). Nitekim gentamisin uygulanan gruplarda da kontrol grubuna kıyasla sitrat düzeylerinde düşüş gözlemlenmiş ve D-limonen etki mekanizmasıyla paralellik göstermiştir (Şekil 4.8)

TCA döngüsü bakteriler için temel enerji üretim mekanizmasıdır. Bu sürecin aksaması, ATP üretiminin azalmasına ve dolayısıyla enerji metabolizmasının sekteye uğramasına yol açabilir. Nitekim limonenin bakteri solunum zincirini hedef alarak ATP sentezini engelleyebildiği gösterilmiştir (Chueca vd., 2014; Han vd., 2020).

Sitrat ve bütandioik asit gibi TCA ara ürünlerindeki düşüş, limonenin enerji metabolizmasını bozduğunu ve hücrenin enerji üretimini kısıtladığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, limonenin zar geçirgenliğini artırarak intraselüler metabolit kaybına neden olması, bakterilerin enerji dengesini sürdürememesine yol açabilir. Bu durum, limonenin antimikrobiyal etkisinin bir mekanizması olarak değerlendirilebilir.

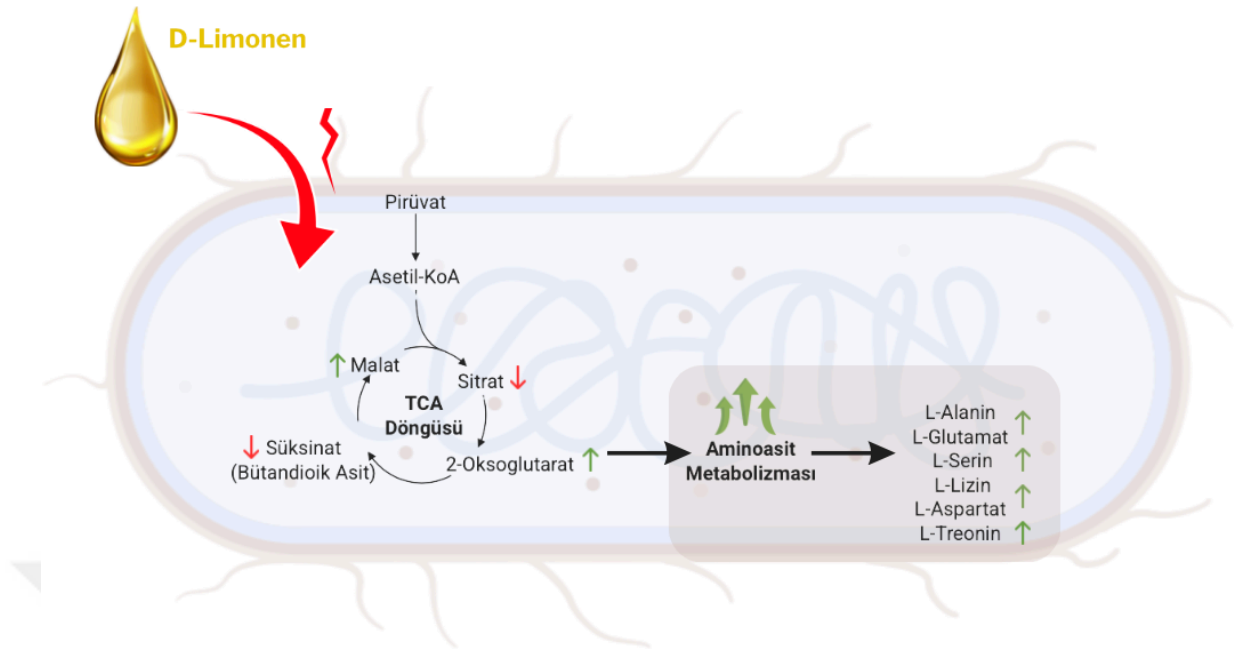
Öte yandan, TCA döngüsüne ait bir diğer ara ürün olan L-malik asit (malat) seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. İlk bakışta bu durum, malat döngü baskılanırken seviyesinin neden yükseldiği sorusunu akla getirir de bu artış glioxylate şantı gibi alternatif yolların aktive olmasıyla açıklanabilir. *E. coli*'nin karbon sınırlaması ya da metabolik stres altında, izositratın glioxylate ve bütandioik asit'e parçalanması sonucu oluşan glioxylate molekülü, asetil-CoA ile birleşerek malata dönüşebilir. (Ornston & Ornston, 1969) Böylece TCA döngüsü tam anlamıyla işlemese de hücre, malat üretimini sürdürebilir. Bunun yanı sıra, malat hücre dışına yeterince atılamamışsa ya da redoks homeostazı amacıyla birikmişse, hücre içindeki konsantrasyonu artabilir. Bu durum malat düzeyindeki artışı enerji üretiminden ziyade stres adaptasyonu ve metabolik yön değiştirme bağlamında değerlendirmeyi gerekli kılmaktadır.

4.6.1. 2-Oksoglutarat'ın Alternatif Metabolik Yollara Sapması ve Amino Asit Metabolizmasına Etkileri

2-Oksoglutarat (2-OG), trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün kritik bir ara maddesi olup, aynı zamanda azot asimilasyonu için temel bir karbon iskeleti görevi görür. Deneysel verilerimiz, 2-OG seviyelerinin hücre dışında özellikle 24. saatlerde belirgin artış gösterdiğini desteklemektedir. TCA döngüsü yavaşladığında veya tamamlanamadığında, 2-OG birikerek farklı metabolik yollara yönlendirilebilir. Özellikle transaminasyon reaksiyonları aracılığıyla amino asit sentezine kaydırılması mümkündür.

E. coli'de 2-OG, glutamat dehidrojenaz veya glutamat sentaz aracılığıyla glutamat sentezine girebilmektedir. Bu reaksiyonlar, 2-OG'yi amonyum ve glutamin ile birleştirerek glutamat üretimini sağlar (Huergo ve Dixon, 2015). Literatürde, oksaloasetat seviyelerinin yüksek olduğu durumlarda 2-OG dehidrojenaz kompleksinin (OGDH) inhibe olduğu ve bunun 2-OG'nin glutamat üretimine yönlendirilmesine yol açtığı gösterilmiştir (Frank vd., 2007). Bu bulgu, TCA akışının kesintiye uğradığında hücrenin 2-OG'yi glutamat ve diğer amino asitlerin sentezine yönlendirerek metabolik adaptasyon sağladığını ortaya koymaktadır.

D-limonen uygulaması altında *E. coli*'de TCA döngüsünün baskılanması ve 2-oksoglutarat düzeylerinin artışına bağlı olarak aminoasit metabolizmasına yönelen metabolik akış şeması Şekil 4.17'de sunulmaktadır.



Şekil 4.17. D-limonen uygulaması altında *E. coli*'de TCA döngüsünün baskılanması ve 2-oksoglutarat düzeylerinin artışına bağlı olarak aminoasit metabolizmasına yönelen metabolik akış şeması

Tez çalışmasında D-limonen varlığında 2-OG seviyelerinde artış ve bununla birlikte amino asit metabolizmasında yer alan çeşitli metabolitlerde (L-Alanin, L-Glutamat, L-Aspartat, L-Serin, L-Lizin), artış gözlemlenmiştir. Bu durum, TCA döngüsünden amino asit metabolizmasına yönelen olası bir akış değişikliğini düşündürmektedir (Şekil 4.17). Kontrol grubunda 2-OG seviyelerinin düşük olması, limonenin bu metabolik akışı etkileyebileceğini göstermektedir. *E. coli* normal koşullarda 2-OG'yi hızla TCA döngüsüne dahil ederek enerji üretimini sürdürür. Ancak limonen varlığında bu süreç yavaşlamış; bunun sonucunda bütandioik asit ve sitrat gibi TCA ara ürünlerinin seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Böylece limonenin hücrel metabolizmayı nasıl yeniden düzenlediği literatür verileriyle uyumlu bir şekilde açıklanmaktadır.

4.7. Gliksilat ve Dikarboksilat Metabolizmasındaki Değişimler

Gliksilat metabolizması, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün bir varyantı olup, asetil-CoA'nın karbon kaybı olmaksızın dört karbonlu bileşiklere dönüştürülmesini sağlayan alternatif bir metabolik yoldur. Bu yol, özellikle karbon sınırlaması ya da enerji üretiminin klasik yollarla sürdürülemediği durumlarda devreye girer. Gliksilat şantı, izositratın gliksilat ve bütandioik asit'e parçalanmasını ve sonrasında gliksilatın asetil-CoA ile birleşerek malat üretimini içerir. Böylece, karbon tasarrufu sağlanarak enerji üretimi sürdürülebilir (Ornston ve Ornston, 1969).

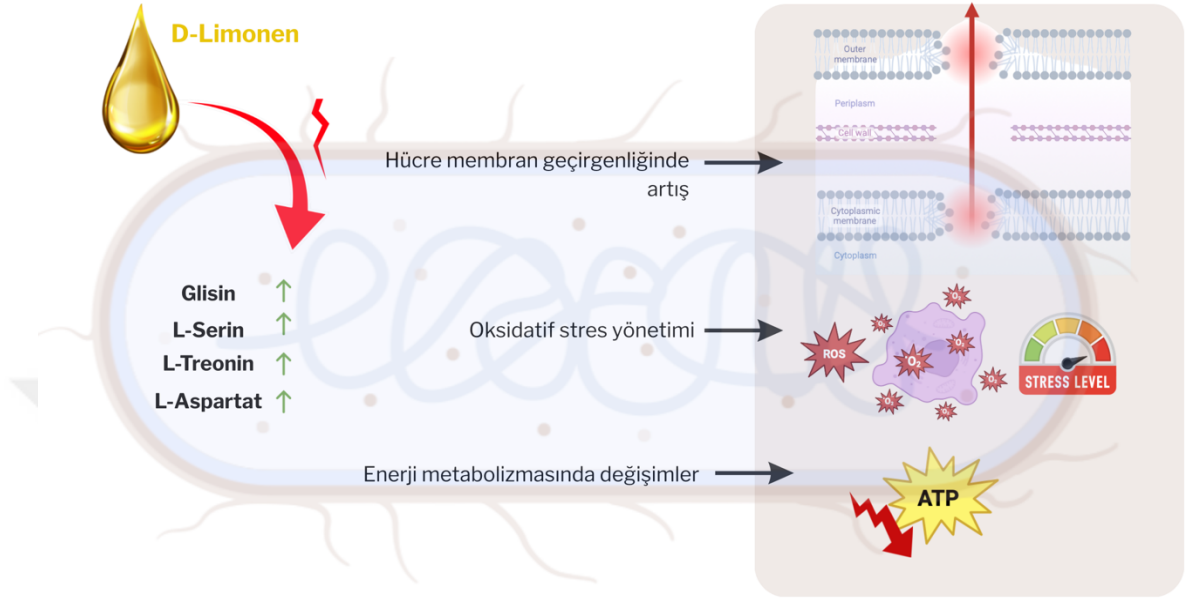
Tez kapsamında elde edilen bulgular, D-limonen uygulanan *E. coli* gruplarında glisin, L-serin, glutamat ve malat gibi metabolitlerde artış; bütandioik asit ve sitrat düzeylerinde ise azalma olduğunu göstermektedir. Bu karşıt değişim deseni, glioksilat ve dikarboksilat metabolizmasının D-limonen kaynaklı stres koşullarında aktive olduğunu düşündürmektedir. Özellikle malat düzeylerindeki artış, glioksilat yolunun devreye girerek hücrenin TCA döngüsü baskılanmasına rağmen malat üretimini sürdürmeye çalıştığına işaret etmektedir. Bu durum, limonenin neden olduğu metabolik stresin hücrede enerji dengesini korumak amacıyla alternatif metabolik yollara yönelimi tetiklediğini göstermektedir. Bütandioik asit seviyelerindeki azalma ise, bu yolların dengesiz veya sınırlı çalışabileceğine işaret etmekte, aynı zamanda bu ara ürünün hızla başka yollarla tüketildiğini de düşündürmektedir. Sonuç olarak, glioksilat metabolizmasındaki bu değişiklikler, hücresel düzeyde önemli bir adaptif yanıtı temsil etmektedir.

4.8. Glisin, Serin ve Treonin Metabolizmasındaki Değişimler

Glisin, serin ve treonin metabolizması, *E. coli*'de protein sentezi, nükleotid biyosentezi ve redoks dengesi gibi temel hücresel süreçlerde rol oynayan önemli bir metabolik yoldur (Stauffer, 2004). D-limonen uygulaması hem ekstraselüler hem de intraselüler metabolit profillerinde anlamlı değişikliklere yol açmıştır. Özellikle glisin, serin, treonin ve aspartat gibi amino asitlerin seviyelerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu değişimler, limonenin *E. coli* hücreleri üzerindeki etkisinin süreye bağlı olarak arttığını ve metabolik yönlerde kademeli bir değişim yarattığını göstermektedir. 6 saatlik maruziyette küçük artışlar gözlemlenirken, 12 ve 24 saatlik sürelerde bu değişimlerin daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Literatürde, özellikle oksidatif stres ve antibiyotik uygulamaları gibi bakteriyel stres koşulları altında, bu amino asit metabolitlerinin seviyesinde benzer artışların olduğu rapor edilmiştir (Koçak ve Özkul, 2020; Carmel-Harel ve Storz, 2000).

Ayrıca, glisin düzeylerindeki artışın *E. coli*'de enerji metabolizmasını, zar geçirgenliğini ve bağışıklık sistemiyle etkileşimini etkileyebildiği gösterilmiştir. Cheng vd., (2019) dış ortamdan glisin takviyesinin, glisin metabolizmasının baskılandığı serum dirençli *E. coli* suşlarında bu direnci kırdığını ve hücre zarını bağışıklık saldırılarına karşı daha geçirgen hale getirdiğini bildirmiştir.

Bu bilgiler ışığında Şekil 4.18’de sunulduğu üzere tez çalışmasında incelenen D-limonen’ takiben gözlenen glisin, serin ve treonin seviyelerindeki artışın, yalnızca bir stres yanıtı değil, aynı zamanda hücre zarında yapısal veya fonksiyonel bir hassasiyetin geliştiğini de düşündürmektedir.



Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması

Şekil 4.18. D-limonen uygulaması altında glisin, serin ve treonin metabolizmasındaki artışların, *E. coli*'de olası etkileri

Bu metabolitlerdeki artışlar, hücresel metabolizmanın enerji dengesi sağlamak, oksidatif stresi azaltmak ve hücresel hasarı minimize etmek için gerçekleştirdiği adaptif bir strateji olabilir. Ancak bu etkinin spesifik olarak D-limonen tarafından tetiklenmesi, söz konusu metabolik yolların potansiyel hedefler olarak daha detaylı araştırılması gerektiğini göstermektedir.

4.9. Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasındaki Değişimler

Bu metabolik yolak, prokaryotlarda azot metabolizması ve enerji dengesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (Reitzer, 2004; Van Heeswijk vd., 2013). Literatürde, antibiyotik stres koşulları altında bu yolun değiştiği gösterilmiştir (Zampieri vd., 2017). Çalışmamızda, D-limonen ve gentamisin uygulanan gruplarda bu yoldaki metabolitlerin (L-Aspartat, L-Alanin, Glutamat) yukarı regüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Buna karşılık, bu yol ile ilişkili olan arjinin metabolizmasında L-Ornitin seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum, limonenin metabolik akışı yönlendirdiğini ve arjinin biyosentezinin etkilenebileceğini düşündürmektedir.

4.10. D-Limonenin Oksidatif Stres Yanıtı ve Glutasyon Metabolizmasına Etkisi

Alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasındaki değişimlere eşlik eden bir diğer önemli bulgu, D-limonen uygulamasının *E. coli* hücrelerinde oksidatif stres yanıtını tetiklemesidir.

Glutasyon metabolizması, serbest radikallerin (ROS) zararlı etkilerine karşı intraselüler dengeyi korumada görev yapan başlıca savunma mekanizmalarından biridir. Bu sistem, aynı zamanda antioksidan kapasitenin de biyolojik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Páez vd., 2010).

Sunulan tez çalışmasında glutasyon ve ilgili metabolitlerin (Glisin, Glutamat) D-limonen uygulanan gruplarda belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, artan ROS seviyelerine karşı hücrelerin glutasyon üretimini artırarak adaptif savunma mekanizmalarını devreye soktuğunu düşündürmektedir. Glutasyon biyosentezinin öncülleri olan glisin ve glutamat düzeylerindeki artış, bu adaptasyonun metabolik yansıması olarak değerlendirilebilir. Literatürde de benzer şekilde, oksidatif stres koşullarında glutasyon sentezinde görevli enzimlerin ve redoks sistemlerinin aktivitesinde artış olduğu, bu sistemlerin intraselüler redoks dengesinin korunmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Carmel-Harel ve Storz, 2000). Bunun yanı sıra, glutasyon sisteminin yalnızca koruyucu değil, aynı zamanda antibiyotik duyarlılığını şekillendiren bir faktör olduğu da bilinmektedir. Örneğin, harici glutasyon uygulamasının *E. coli*'de β -laktam antibiyotiklere karşı duyarlılığı artırarak MİK değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir (Goswami ve Jawali, 2007). Benzer şekilde, çalışmamızda da gentamisin ile muamele edilen gruplarda glisin ve glutamat düzeylerinde artışlar gözlemlenmiş olup, bu değişimler D-limonen grubuyla benzer bir oksidatif stres yanıtını yansıtmaktadır (Şekil 4.8). Nitekim, Koçak ve Özkul (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. coli*'ye uygulanan ofloksasin antibiyotiği sonrasında glutasyon metabolizmasında yer alan glisin ve glutamat düzeylerinde benzer şekilde anlamlı artışlar rapor edilmiştir. Bu paralellikler, D-limonenin oksidatif stres mekanizmasını antibiyotiğe alternatif bir biçimde tetiklediğini ve hücrel savunma sistemlerini aktive ettiğini göstermektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, D-limonenin *E. coli* üzerindeki metabolomik etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiş ve antibiyotik benzeri bir etki mekanizması sergilediği ortaya konmuştur. Özellikle glisin, serin ve treonin metabolizması, glutatyon metabolizması, poliamin biyosentezi ve enerji metabolizması gibi temel hücresel yanıt yollarında belirgin değişiklikler tespit edilmiştir. Sitrik asit ve süksinik asit gibi TCA döngüsü ara ürünlerinde gözlenen azalmalar, enerji üretiminde aksamalara ve oksidatif solunumun baskılandığına işaret etmektedir. D-limonen uygulaması, yalnızca intraselüler metabolik akışı yeniden şekillendirmekle kalmamış, aynı zamanda ekstraselüler sekresyon profillerinde de ciddi farklılıklar oluşturmuştur. Bu etkiler, gentamisin ile örtüşen metabolik değişimlerle birlikte değerlendirildiğinde, D-limonenin klasik antibiyotiklere benzer biyokimyasal hedeflere yöneldiği ve potansiyel bir alternatif antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Literatürde, bakterisidal antibiyotiklerin neden olduğu oksidatif stres karşısında *E. coli*'nin poliamin üretimini artırdığı ve ornitin dekarboksilaz enzim ekspresyonunun yükseldiği bildirilmektedir (Belenky vd., 2015; Chattopadhyay vd., 2003). Ancak bu çalışmada, hem D-limonen hem de gentamisin uygulanan gruplarda ornitin ve kadaverin düzeylerinde bir düşüş saptanmıştır. Bu durum, uygulanan ajanların yüksek dozda veya uzun süreli olması nedeniyle klasik stres yanıtlarının bloke olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, gentamisinin translasyonel inhibisyon etkisinin, ornitin dekarboksilaz gibi kritik enzimlerin üretimini sınırlayarak poliamin sentezini baskılamış olabileceği değerlendirilmektedir. Ornitin düzeylerindeki azalma aynı zamanda metabolik öncüllerin farklı biyokimyasal yollara yönlendirilmiş olabileceğini de göstermektedir. Elde edilen bulgular, antibiyotiklerin ve biyoaktif ajanların hücresel metabolizma üzerindeki etkilerinin yalnızca hedef enzimlerle sınırlı kalmadığını, aynı zamanda geniş çaplı sistemik metabolik yanıtları da tetiklediğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, D-limonenin *E. coli* hücrelerinde oluşturduğu metabolik değişimleri hem intraselüler hem de ekstraselüler düzeyde eş zamanlı olarak değerlendiren ilk GC-MS tabanlı metabolomik araştırmalardan biridir. Uygulanan çift aşamalı türevlendirme stratejisi sayesinde hem polar hem de uçucu metabolitlerin yüksek doğrulukla analiz edilebilmesi sağlanmış ve bu yönüyle platformun kapsamı genişletilmiştir. Ancak, D-limonenin etkilerini yalnızca metabolit düzeyinde incelemek yeterli değildir; gelecekteki araştırmalarda transkriptomik ve genomik analizlerin de entegre edilerek, gen ekspresyon düzeyinde oluşan biyolojik yanıtların değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylece D-limonenin hücresel işleyiş üzerindeki etkileri çok katmanlı bir omik bakış açısıyla daha kapsamlı şekilde ortaya konabilir.

Ayrıca, bu çalışmada D-limonenin etkileri farklı inkübasyon sürelerinde (6, 12 ve 24 saat) incelenmiş olsa da zamana bağlı metabolit değişimlerinin istatistiksel olarak tutarlı bir örüntü sunmadığı gözlenmiştir. Bu durum, bakteriyel metabolitlerin çevresel koşullara ve bozunma süreçlerine karşı oldukça hassas olmasından kaynaklanmış olabilecektir. Özellikle ekstraselüler ortama salınan metabolitlerin enzimatik degradasyona, oksidasyona veya reuptake mekanizmalarına maruz kalması, süre bazlı analizlerde stabil sonuçların elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle zaman serisi çalışmalarında, metabolit stabilitesini maksimum düzeyde koruyacak daha hassas ve zamanlaması optimize edilmiş deneysel tasarımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile D-limonenin yalnızca hücre zarında etkili bir antimikrobiyal ajan olmadığı, aynı zamanda intraselüler metabolik süreçleri hedef alarak çok yönlü sistemik stres yanıtlarını tetikleyen bir biyolojik düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Bu kapsamda, D-limonen hem alternatif hem de tamamlayıcı bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilmesi gereken doğal bir bileşik olup, gelecekte yapılacak farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalarda dikkate değer bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmada yalnızca *E. coli* suşu ile sınırlı kalınmış olsa da D-limonenin farklı patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkileri ile konakçı hücre sistemlerinde meydana getirebileceği biyokimyasal yanıtların da omik teknolojiler kullanılarak değerlendirilmesi, bu doğal bileşiğin antimikrobiyal spektrumu ve hücre düzeyindeki sistemik etkileri hakkında daha kapsamlı bilgiler sunacaktır.



6. KAYNAKÇA

- Aminov, R. (2022). Metabolomics in antimicrobial drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 17(9), 1047-1059.
- Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., ... & Dias, D. A. (2018). Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, 14, 1-31.
- Belenky, P., Jonathan, D. Y., Porter, C. B., Cohen, N. R., Lobritz, M. A., Ferrante, T., ... & Collins, J. J. (2015). Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell reports*, 13(5), 968-980.
- Boluda-Aguilar, M., & López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial crops and products*, 41, 188-197.
- Buchanan, R. L., & Doyle, M. P. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*.
- Carmel-Harel, O., & Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, 54, 439–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.439>
- Carvalho, S. M., Marques, J., Romão, C. C., & Saraiva, L. M. (2019). Metabolomics of *Escherichia coli* treated with the antimicrobial carbon monoxide-releasing molecule CORM-3 reveals tricarboxylic acid cycle as major target. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10), 10-1128.
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., & Tabor, H. (2003). Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2261-2265.
- Chebet, J. J., Ehiri, J. E., McClelland, D. J., Taren, D., & Hakim, I. A. (2021). Effect of d-limonene and its derivatives on breast cancer in human trials: a scoping review and narrative synthesis. *BMC cancer*, 21, 1-11.
- Cheng, Z. X., Guo, C., Chen, Z. G., Yang, T. C., Zhang, J. Y., Wang, J., ... & Peng, X. X. (2019). Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing. *Nature communications*, 10(1), 3325.
- Chueca B, Pagán R, García-Gonzalo D (2014) Differential Mechanism of *Escherichia coli* Inactivation by (+)-Limonene as a Function of Cell Physiological State and Drug's Concentration. *PLOS ONE* 9(4): e94072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094072>

- Costa, M. D. S., Rocha, J. E., Campina, F. F., Silva, A. R., Da Cruz, R. P., Pereira, R. L., ... & Coutinho, H. D. (2019). Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of D-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128, 158-161.
- Del Toro-Arreola, S., Flores-Torales, E., Torres-Lozano, C., Del Toro-Arreola, A., Tostado-Pelayo, K., Ramirez-Dueñas, M. G., & Daneri-Navarro, A. (2005). Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *International immunopharmacology*, 5(5), 829-838.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- Dörries, K., Schlueter, R., & Lalk, M. (2014). Impact of antibiotics with various target sites on the metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(12), 7151-7163.
- Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94(s1), 94-103.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1-2), 155-171.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156–164. doi:10.1016/j.tifs.2007.11.006
- Frank, R. A., Price, A. J., Northrop, F. D., Perham, R. N., & Luisi, B. F. (2007). Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *Journal of molecular biology*, 368(3), 639–651. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.080>
- Galley H. F. (2010). Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Critical care (London, England)*, 14(4), 230. <https://doi.org/10.1186/cc9098>
- Giri, R. K., Parija, T., & Das, B. R. (1999). d-limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. *Oncology reports*, 6(5), 1123-1130.
- Goswami, M., & Jawali, N. (2007). Glutathione-mediated augmentation of β -lactam antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 184–185. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm177>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021). Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 11(1), 13816. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92843-3>

- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2019). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5930.
- Han, Y., Chen, W., & Sun, Z. (2021). Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety*, 41(5), e12918.
- Han, Y., Sun, Z., & Chen, W. (2020). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 25(1), 33. <https://doi.org/10.3390/molecules25010033>
- Huergo, L.F., & Dixon, R. (2015). The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 419 - 435.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570-581.
- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhauser, D., Selbig, J., & Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*, 6, 364. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.18>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*, 45(D1), D353-D361.
- Klassen, A., Faccio, A. T., Canuto, G. A. B., da Cruz, P. L. R., Ribeiro, H. C., Tavares, M. F. M., & Sussulini, A. (2017). Metabolomics: definitions and significance in systems biology. *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications*, 3-17.
- Koçak, E., & Ozkul, C. (2021). GC-MS-based metabolic profiling of *Escherichia coli* exposed to subinhibitory concentration of enoxacin. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 78(3), 307-316.
- Koçak, E., & Ozkul, Ceren. (2020). Metabolic response of *Escherichia coli* to subinhibitory concentration of ofloxacin. *Journal of Research in Pharmacy*, 24(4).
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C., & Tang, J. (2024). D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. *Applied Sciences*, 14(11), 4605. <https://doi.org/10.3390/app14114605>

- Lin, X., Kang, L., Li, H., & Peng, X. (2014). Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress. *Molecular BioSystems*, 10(4), 901-908.
- Looft, T., & Allen, H. K. (2012). Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut microbes*, 3(5), 463-467.
- Lopresto, C. G., Petrillo, F., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., & Calabrò, V. (2014). A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology*, 137, 13-20.
- Marriott, P. J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of chromatography A*, 936(1-2), 1-22.
- Mirsaeidi, M., Banoei, M. M., Winston, B. W., & Schraufnagel, D. E. (2015). Metabolomics: applications and promise in mycobacterial disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(9), 1278-1287.
- Mohammed, M. S. O., Babeanu, N., CORNEA, C. P., & Radu, N. (2022). Limonene-a biomolecule with potential applications in regenerative medicine. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 26(2).
- Monteiro, M. S., Carvalho, M., Bastos, M. L., & Guedes de Pinho, P. (2013). Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Current medicinal chemistry*, 20(2), 257-271.
- Moros, G., Chatziioannou, A. C., Gika, H. G., Raikos, N., & Theodoridis, G. (2017). Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Bioanalysis*, 9(1), 53-65. doi:10.4155/bio-2016-0224
- Nicholson, J. K., & Wilson, I. D. (2003). Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 668-676.
- Ornston, L. N., & Ornston, M. K. (1969). Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 98(3), 1098-1108.
- Páez, P. L., Becerra, M. C., & Albasa, I. (2010). Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 303(1), 101-105.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263-269.
- Picone, G., Laghi, L., Gardini, F., Lanciotti, R., Siroli, L., & Capozzi, F. (2013). Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using 1H-NMR spectroscopy. *Food chemistry*, 141(4), 4367-4374.

- Pinu, F. R., Villas-Boas, S. G., & Aggio, R. (2017). Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols. *Metabolites*, 7(4), 53.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4), 10-1128.
- Poojary, M. M., & Passamonti, P. (2016). Improved conventional and microwave-assisted silylation protocols for simultaneous gas chromatographic determination of tocopherols and sterols: Method development and multi-response optimization. *Journal of chromatography. A*, 1476, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.064>.
- Reitzer, L. (2004). Biosynthesis of Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine. *EcoSal Plus*, 1.
- Septama, A. W., Yuandani, Y., Khairunnisa, N. A., Nasution, H. R., Utami, D. S., Kristiana, R., & Jantan, I. (2023). Antibacterial, bacteriolytic, antibiofilm, and synergistic effects of the peel oils of *Citrus microcarpa* and *Citrus x amblycarpa* with tetracycline against foodborne *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 76(11), ovad126
- Shah, B. B., & Mehta, A. A. (2018). In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. *Asian J. Pharm. Pharmacol*, 4(6), 883-887.
- Shah, P., & Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular microbiology*, 68(1), 4-16.
- Stauffer, G. V. (2004). Regulation of serine, glycine, and one-carbon biosynthesis. *EcoSal Plus*, 1(1), 10-1128.
- Tang, X., Feng, H., & Huang, M. (2020). Advances in metabolic engineering of microbial hosts for the production of aromatic compounds. *Biotechnology Advances*, 39, 107479.
- Tkachenko, A.G., Akhova, A.V., Shumkov, M., & Nesterova, L.Y. (2012). Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Research in microbiology*, 163 2, 83-91.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods* **12**, 523–526 (2015). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., & Boogerd, F. C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(4), 628–695. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-13>

- Villas-Boas, S. G., Nielsen, J., Smedsgaard, J., Hansen, M. A., & Roessner-Tunali, U. (2007). *Metabolome analysis: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*, 24(5), 613-646.
- Wang, J. H., Byun, J., & Pennathur, S. (2010). Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. In *Seminars in nephrology* (Vol. 30, No. 5, pp. 500-511). WB Saunders.
- Worley, B., & Powers, R. (2012). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1 1, 92-107.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 55(1), 14-10.
- Zampieri, M., Zimmermann, M., Claassen, M., & Sauer, U. (2017). Nontargeted metabolomics reveals the multilevel response to antibiotic perturbations. *Cell reports*, 19(6), 1214-1228.

ÖZGEÇMİŞ

Oya TEMİZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2023-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2023	Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya

ESERLER

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

12th International Drug Chemistry Congress, 2024 Poster Presentation	Temiz O., Babacan Ü., Vedat S., Cengiz M.F., “Effects on Supercritical-CO2 Extraction and Antimicrobial Activity of Fresh Thyme Dried at Different Temperatures and Times” 12th International Drug Chemistry Congress, Antalya, Turkey, 7-10 March 2024
8th International Cosmetic Congress, 2024 Oral Presentation Awarded 3rd Prize*	Temiz O., Cengiz M.F., “Obtaining D-Limonene from Citrus Wastes by Biotechnological Methods for Use in Cosmetics” 8th International Cosmetic Congress (KÜAD), Antalya, Turkey, 16-18 December 2024