



***MELALEUCA ALTERNIFOLIA* (MAIDEN & BETCHE) CHEEL
UÇUCU YAĞININ BİYOTRANSFORMASYONU VE
BİYOAKTİF METABOLİTLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Bilge Nur MUTLU

Eskişehir 2024

**MELALEUCA ALTERNIFOLIA (MAIDEN & BETCHE) CHEEL UÇUCU
YAĞININ BİYOTRANSFORMASYONU VE BİYOAKTİF METABOLİTLERİ**

Bilge Nur MUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Programı

Danışman: Prof. Dr. Gökalep İŞCAN

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kasım 2024

Eskişehir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bilge Nur Mutlu' nun "*MELALEUCA ALTERNIFOLIA* (MAIDEN & BETCHE) CHEEL UÇUCU YAĞININ BİYOTRANSFORMASYONU VE BİYOAKTİF METABOLİTLERİ" başlıklı tezi 18/11/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Ana Bilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Danışman):	Prof. Dr. Gökâlþ İŞCAN	
Üye :	Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ	
Üye :	Prof. Dr. Tamer AKAR	

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MELALEUCA ALTERNIFOLIA (MAIDEN & BETCHE) CHEEL UÇUCU YAĞININ BİYOTRANSFORMASYONU VE BİYOAKTİF METABOLİTLERİ

Bilge Nur MUTLU

Farmakognozi Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Programı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kasım 2024

Danışman: Prof. Dr. Gökalgp İŞCAN

Antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri nedeniyle son yıllarda çok sayıda kozmetik preparatın etken maddesi olan çay ağacı uçucu yağı (Tea Tree Oil) ticari olarak temin edilerek 15 farklı fungus türü ile mikrobiyal transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve oluşan yeni metabolitlerin antioksidan, antibakteriyel, antikandida etkileri ortaya konulmuştur.

Çay ağacı uçucu yağının yüksek verimlerle dönüşümünü katalizleyen *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Penicilium italicum* var. *italicum*, *Fusarium culmorum* ve *Alternaria eureka* fungusları ile 10 metabolit elde edilmiştir. 3 metabolitin yapıları spektroskopik yöntemler ile aydınlatılarak disk difüzyon, biyootografi ve standart sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile antibakteriyel ve antikandida etkileri belirlenmiştir. Biyotransformasyon sonucu elde edilen *p*-mentan-1,2,4-triol'ün ve diğer hidroksil türevi metabolitlerin, özellikle bazı *Candida* türlerine karşı çay ağacı yağı ile ana bileşenleri olan terpinen-4-ol ve γ -terpinenden daha güçlü inhibe edici etkiler sergilediği (MİK, 312 μ g/mL) bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Melaleuca alternifolia*, Biyotransformasyon, Antibakteriyel aktivite, Antikandida aktivite

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* (MAIDEN & BETCHE) CHEEL ESSENTIAL OIL AND EVALUATION OF BIOACTIVE METABOLITES

Bilge Nur Mutlu

Department of Pharmacognosy

Programme in Master

Graduate School of Anadolu University, November 2024

Prof. Dr. Gökalgp İŞCAN

Tea Tree Oil (TTO) has been used more frequently as a primary active ingredient in dermatological and cosmetic formulations because of its well-known antibacterial and antifungal qualities. This oil was purchased commercially and used in 15 different fungus species' microbial biotransformation experiments. The synthesized new metabolites were demonstrated to exhibit antioxidant, antibacterial, and anticandidal effects.

Fungal species such as *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Penicillium italicum* var. *italicum*, *Fusarium culmorum*, and *Alternaria eureka* were used to catalyze the TTO transformation with high efficiency, producing 10 different metabolites. 3 metabolites were structurally clarified in this study by the use of spectroscopic techniques. These metabolites' antibacterial and antifungal qualities were evaluated using disk diffusion, bioautography and standard liquid microdilution methods. The biotransformation process produced *p*-menthane-1,2,4-triol and other hydroxylated derivative metabolites, which were shown in this study to have considerably greater inhibitory effects than terpinen-4-ol and γ -terpinene, the main constituents of tea tree oil (MIC, 312 μ g/mL).

Keywords: *Melaleuca alternifolia*, Biotransformation, Antibacterial activity, Anticandidal activity

TEŞEKKÜR

Akademik yolumun başlama sebebi olarak geleceğime yön veren, tez sürecimde bilgi, tecrübe ve ahlaki değerleriyle akıl hocalığı yaparak bana önce iyi bir insan sonrasında iyi bir akademisyen olmamı öğütleyen, misyonu ve vizyonu ile yoluma ışık tutan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gökâl İŞCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin kromatografik verilerinin yorumlanmasında değerli zamanını ve bilgisini paylaşan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, NMR verilerinin yorumlanmasında verdiği destek için Sayın Prof. Dr. Hasan KIRMIZİBEKMEZ'e

Çay ağacı uçucu yağlarının ve biyotransformasyon ile ilgili kaynakların teminini sağlayan Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

GK/KS analizlerinde ve ihtiyaç duyduğum her konuda yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na,

Yüksek lisans ve tez sürecim boyunca her konuda bilgisini ve deneyimini paylaşmaktan çekinmeyen ve titizlikle yardım eden Araş. Gör. Burak TEMİZ'e,

Laboratuvar deneylerimde beni yalnız bırakmayarak deneyimlerini paylaşan Uzm. Biyolog Seda HACIOĞLU'na, analiz destekleri için sayın Uzm. Şenay ARIKAN ESER'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu yola çıkmam için beni cesaretlendirerek maddi ve manevi her türlü desteği veren sevgili anneme, babama ve kardeşime, varlığıyla hayatımı güzelleştiren, her koşulda bana inanan sevgili Ayberk UZUNOĞLU'na ve bugün olduğum kişi olmamda en büyük katkıya sahip olan ve beni büyüten canım anneanneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
Bilge Nur Mutlu

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken ChatGPT üretken yapay zekâ programından destek aldığımı beyan ederim. Tezin hazırlığı aşamasında üretken yapay zekâ programlarından bilimsel makale ve kaynaklara ulaşım desteği aldım. Üretken yapay zekâ programlarından aldığım bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi bildiririm. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
Bilge Nur Mutlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
GÖRSELLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Myrtaceae Familyasının Özellikleri.....	3
2.1.1 <i>Melaleuca</i> cinsine ait diğer türler	3
2.2 <i>M. alternifolia</i> Cheel Türünün Botanik özellikleri.....	5
2.2.1 <i>M. alternifolia</i> 'nın Halk Arasında Kullanımı	6
2.3 Uçucu Yağlar.....	7
2.3.1 <i>M. alternifolia</i> uçucu yağı	8
2.3.1.1 Kimyasal profili.....	8
2.3.1.2 <i>M. alternifolia</i> uçucu yağının farmakolojik etkileri.....	8
2.3.1.3 <i>M. alternifolia</i> uçucu yağının toksisitesi.....	9
2.4 Terpenler	10
2.4.1 Monoterpenlerin biyosentezi	10

2.5	Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon).....	11
2.5.1	Uçucu yağ biyotransformasyonları	11
2.5.2	Terpenlerin biyotransformasyonu	13
2.5.2.1	Terpinen-4-ol biyotransformasyonları	14
2.5.2.2	Alfa-terpineol biyotransformasyonları	15
2.5.2.2	Terpinolen biyotransformasyonları	16
2.5.2.3	Alfa-terpinen biyotransformasyonları.....	16
2.5.2.4	Gama-terpinen biyotransformasyonları.....	17
3	GEREÇLER VE YÖNTEM	21
3.1	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ ve Standart Maddeler	21
3.2	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler	21
3.3	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	21
3.4	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	22
3.4.1	Anisaldehit-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması	23
3.5	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi.....	23
3.6	Gaz Kromatografisi (Gk) Ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi.....	23
3.7	Biyotransformasyon Çalışmaları	24
3.7.1	Mikroorganizmaların temini ve kültür koleksiyonlarının oluşturulması	24
3.7.2	Deneylerde kullanılan besiyerleri.....	26
3.7.2.1	α -medyum besiyerinin hazırlanması.....	26
3.7.2.2	RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması.....	26
3.7.2.3	Molten agar	26
3.7.2.4	Hazır besi ortamları.....	26
3.7.3	Sterilizasyon	27

3.7.4 Biyotransformasyonda kullanılacak substrat konsantrasyonunun belirlenmesi.....	27
3.7.5 Uçucu yağın stabilite çalışmaları.....	27
3.7.6 Ön tarama deneyleri.....	27
3.7.6.1 Substrat stabilizasyonu ve kontrol grupları.....	28
3.7.6.2 Örneklem ve ekstraksiyon.....	28
3.7.7 Preparatif Amaçlı Biyotransformasyon.....	29
3.7.7.1 Mikroorganizma kültürü ve substrat ilavesi.....	30
3.7.7.2 Ekstraksiyon.....	31
3.7.7.3 Metabolitlerin izolasyonu ve karakterizasyonu	32
3.7.7.4 Kolon Kromatografisi.....	32
3.7.8 Yapı Tayini.....	33
3.7.8.1 Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi	33
3.7.8.2 NMR.....	33
3.8 Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	35
3.8.1 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi	35
3.8.1.1 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi	35
3.8.1.2 Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi	35
3.8.1.3 Biyootografi ile antibakteriyel etkinin ve etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi	36
3.8.1.3.1 Dot-blot yöntemi	36
3.8.1.3.2 Kontakt biyootografi yöntemi.....	36
İTK plaklarının hazırlanması.....	36
Mikroorganizma kültürünün hazırlanması ve aktivitenin belirlenmesi	37
3.8.2 Antikandidal aktivitenin belirlenmesi	37

3.8.2.1	Kuyu difüzyon yöntemi ile antikandida aktivitenin belirlenmesi..37	37
3.8.2.2	Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandida etkinin belirlenmesi..... 38	38
3.8.3	Biyotografi yöntemi ile antioksidan etkili bileşiklerin taranması 38	38
4	BULGULAR..... 39	39
4.1	<i>M. alternifolia</i> Uçucu Yağının GK/KS analizi..... 39	39
4.2	Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi 40	40
4.3	Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyonu 42	42
4.3.1	Ön tarama sonuçları..... 42	42
4.3.2	<i>Melaluca alterniafolia</i> uçucu yağının mikrobiyal transformasyonu 42	42
4.3.2.1	Biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler..... 43	43
4.3.2.1.1	<i>Alternaria eureka</i> ile elde edilen metabolitlerin kromatogramları ve spektrografik verileri..... 47	47
	M-1 metabolitinin spektral verileri..... 47	47
	M-2 metabolitinin spektral verileri..... 48	48
	M-3 metabolitinin spektral verileri..... 49	49
	M-4 metabolitinin spektral verileri..... 50	50
	M-5 metabolitinin spektral verileri..... 50	50
	M-6 metabolitinin spektral verileri..... 53	53
	M-7 metabolitinin spektral verileri..... 54	54
	M-8 metabolitinin spektral verileri..... 57	57
4.3.2.1.2	<i>Aspergillus africanus</i> var. <i>africanus</i> küfü ile elde edilen metabolitlerin kromatogramları ve spektrografik verileri..... 57	57
	M-9 metabolitinin spektral verileri..... 58	58
	M-5 metabolitinin spektral verileri..... 58	58
	M-10 metabolitinin spektral verileri..... 59	59
4.4	Biyolojik Aktivite Sonuçları..... 60	60

4.4.1 Ekstrelerin antibakteriyel aktivite sonuçları	60
4.4.1.1 Biyootografi dot-blot yöntemi antibakteriyel etkinin gösterilmesi.	60
4.4.1.2 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi	61
4.4.1.3 Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	62
4.4.1.4 Biyootografi yöntemi ile antibakteriyel etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi.....	63
4.4.2 Ekstrelerin antikandida aktivite sonuçları.....	67
4.4.2.1 Kuyu difüzyon yöntemi ile antikandida etkinin belirlenmesi.....	67
4.4.2.2 Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	69
4.4.3 Metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteleri.....	70
4.4.3.1 Antibakteriyel etkinin belirlenmesi.....	70
4.4.3.1.1 Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi.....	70
4.4.3.2 Antikandida etkinin belirlenmesi.....	72
4.4.3.2.1 Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandida aktivitenin belirlenmesi.....	72
4.4.4 Biyootografi yöntemi ile antioksidan etkili bileşiklerin taranması	73
5 SONUÇ VE TARTIŞMA	74
KAYNAKÇA.....	78
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Çay Ağacı Olarak Bilinen ve Kullanılan Türler	4
Tablo 2.2 Terpenlerin Biyotransformasyonları	17
Tablo 3.1 Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Uçucu Yağın Fizikokimyasal Özellikleri.....	21
Tablo 3.2 Metabolitlerin Belirlenmesinde Kullanılan Çözücü Sistemleri	23
Tablo 3.3 Biyotransformasyon Denemelerinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	24
Tablo 3.4 Antimikrobiyal Aktivitelerde Kullanılan Mikroorganizmalar	25
Tablo 4.1 Yağların Avustralya Standardı (AS 2782: 2017) ve ISO 4730: 2017'ye Göre İçermesi Gereken Bileşiklerin Minimum ve Maksimum Yüzdeleri ve Ticari TTO Numunelerinin Karşılaştırılması	39
Tablo 4.2 Ön Konsantrasyon Çalışmaları ile Çay Ağacı Uçucu Yağı için Optimal Dozun Belirlenmesi	41
Tablo 4.3 Çay Ağacı Uçucu Yağı ile Yapılan Biyotransformasyon Sonucu Ana Bileşenlerin 10. Gün Sonundaki Durumları	42
Tablo 4.4 Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve GK/KS İle Belirlenen Relatif % Miktarları	43
Tablo 4.5 M5 Metabolitinin ¹³ C (100 MHz) ve ¹ H (400 MHz) NMR Spektroskopik Verileri	51
Tablo 4.6 M7 Metabolitinin ¹³ C (100 MHz) ve ¹ H (400 MHz) NMR Spektroskopik Verileri	55
Tablo 4.7 Ekstrelerin Bakteri Suşlarına Karşı Oluşturdukları Zone Çapları (Mm)	61
Tablo 4.8 Ekstrelerin Bakteri Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları..	63

Tablo 4.9 Ekstrelerin *Candida* Suşlarına Karşı Oluşturdıkları Zone Çapları (Mm) 68

Tablo 4.10 Ekstrelerin *Candida* Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları 70

Tablo 4.11 İzole Edilen Metabolitlerin Bakteri Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları 71

Tablo 4.12 İzole Edilen Metabolitlerin *Candida* Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları 72



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 <i>Alternaria eureka</i> ile Elde Edilen Metabolit Fraksiyonlarının Kromatogramı	47
Şekil 4.2 M-1 Metabolitinin Kütle Spektrumu	48
Şekil 4.3 M-2 Metabolitinin Kütle Spektrumu	48
Şekil 4.4 <i>Alternaria eureka</i> ile Elde Edilen Metabolit Fraksiyonlarının Kromatogramı	49
Şekil 4.5 M-3 Metabolitinin kütle spektrumu	49
Şekil 4.6 M-4 Metabolitinin Kütle Spektrumu	50
Şekil 4.7 M-5 Metabolitinin Kütle Spektrumu	50
Şekil 4.8 M-5 Metabolitinin ^1H NMR Spektrumu	52
Şekil 4.9 M-5 Metabolitinin ^{13}C NMR Spektrumu	52
Şekil 4.10 M-6 Metabolitinin Kütle Spektrumu	53
Şekil 4.11 M-7 Metabolitinin Kromatogramı	53
Şekil 4.12 M-7 Metabolitinin Kütle Spektrumu	54
Şekil 4.13 M-7 Metabolitinin ^1H NMR Spektrumu	56
Şekil 4.14 M-7 Metabolitinin ^{13}C NMR Spektrumu	56
Şekil 4.15 M-8 Metabolitinin Kütle Spektrumu	57
Şekil 4.16 <i>Aspergillus africanus</i> var. <i>africanus</i> ile Elde Edilen Metabolit Fraksiyonunun Kromatogramı	57
Şekil 4.17 M-9 Metabolitinin Kütle Spektrumu	58
Şekil 4.18 M-5 Metabolitinin Kütle Spektrumu	58

Şekil 4.19 M-10 Metabolitinin Kütle Spektrumu..... 59

Şekil 4.20 Biyotransformasyon Çalışmaları Sonucunda İzole Edilerek Yapıları

Aydınlatılan Metabolitler 75



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1 <i>Melaleuca alternifolia</i> Bitkisinin Doğal Yayılışı.....	5
Görsel 2.2 <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden ve Betcher) Çeşidi	6
Görsel 2.3 (+) Terpinen-4-ol (a) ve (-)-Terpinen-4-ol (b) Molekülü.....	14
Görsel 2.4 (S)-(-)- α -Terpineol (a) ve (R)-(+)- α -Terpineol (b) Molekülü	15
Görsel 2.5 Terpinolen Molekülü	16
Görsel 2.6 α -Terpinen Molekülü	16
Görsel 2.7 γ - Terpinen molekülü	17
Görsel 3.1 Biyotransformasyon ve Fungus Büyüme Kontrol Erlenleri.....	28
Görsel 3.2 Belirlenen Günlerde İnce Tabaka Kromatografisi ile Oluşan Metabolitlerin Kontrolü	29
Görsel 3.3 Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyon Aşamaları.....	30
Görsel 3.4 Büyük Hacimlerde Biyotransformasyon Çalışmalarının Tekrarlanması.....	31
Görsel 3.5 Ekstrelerin Eldesi ve Tartımı	32
Görsel 3.6 Metabolit Karışımlarının Sıvı Kromatografisi ile Fraksiyonlama ve Ayırıştırma Çalışmaları	33
Görsel 3.7 Bruker 400 MHz Ascend Sıvı NMR Spektrometresi	34
Görsel 4.1 Funguslara Eklenecek Substrat Miktarlarının Belirlenmesi	40
Görsel 4.2 İTK Plaklarının Anisaldehit/Sülfürik Asit Reaktif Püskürtülmeden Öncesi ve Sonrası.....	44

Görsel 4.3 Fungusların Ürettikleri Metabolitlerin Gün Işığında, 254 ve 366 nm’de İTK ile Karşılaştırılması	44
Görsel 4.4 Fungusların Ürettikleri Metabolitlerin Gün Işığında ve Reaktif Püskürtüldikten Sonra 366 Nm’de İTK ile Karşılaştırılması.....	45
Görsel 4.5 <i>Alternaria eureka</i> ile Elde Edilen Metabolitler	45
Görsel 4.6 <i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i> ile Elde Edilen Metabolitler	46
Görsel 4.7 Ekstrelerin Biyootografi-Dot Blot Yöntemi ile <i>E. coli</i> ’ye Karşı Antibakteriyel Aktivitelerinin Test Edilmesi	60
Görsel 4.8 Ekstrelerin Biyootografi-Dot Blot Yöntemi ile <i>S. aureus</i> ’a Karşı Antibakteriyel Aktivitelerinin Test Edilmesi	60
Görsel 4.9 Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkisi Olan Ekstrelerin Belirlenmesi	61
Görsel 4.10 Mikrodilüsyon Yöntemi ile Ekstrelerin Antibakteriyel Etkilerinin Gösterilmesi	62
Görsel 4.11 <i>Escherichia coli</i> ’ye Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	64
Görsel 4.12 <i>Staphylococcus aureus</i> ’a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	64
Görsel 4.13 <i>Bacillus cereus</i> ’a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	65
Görsel 4.14 <i>Escherichia coli</i> ’ye Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	66
Görsel 4.15 <i>Staphylococcus aureus</i> ’a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	66

Görsel 4.16 <i>Bacillus cereus</i> 'a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi	67
Görsel 4.17 Kuyu Difüzyon Metodu ile Antikandidal Aktiviteye Sahip Ekstrelerin Belirlenmesi	68
Görsel 4.18 Mikrodilüsyon Yöntemi ile Ekstrelerin Antikandidal Etkilerinin Gösterilmesi	69
Görsel 4.19 İzole Edilen Metabolitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi ...	71
Görsel 4.20 İzole Edilen Metabolitlerin Antikandidal Aktivitelerinin Belirlenmesi	72
Görsel 4.21 DPPH Reaktif Püskürtülmesi Sonrası Antioksidan Aktiviteleri Bulunan Metabolitlerin Belirlenmesi	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

[α]D ₂₅	: 25 °C 'deki sodyum'un D çizgisinin özgül çevirme açısı
ATCC	: American type culture collection (Amerikan tipi kültür koleksiyonu)
BP	: Base peak
br	: Broad
°C	: Santigrat derece
CDCl ₃	: Döterokloroform
CFU	: Colony Forming Unit
cm	: Santimetre
d	: Doublet
dk	: Dakika
dm	: Desimetre
DMAPP	: Dimetilallil difosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH•	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EtOAc	: Etil asetat
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
IPP	: İzopentenil difosfat
İTK.	: İnce Tabaka Kromatografisi
KOH	: Potasyum hidroksit
KS	: Kütle spektrometresi
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
m/z	: Kütle/yük oranı
M+	: Moleküler iyon
Mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MHz	: Megahertz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre

Mm	: Milimolar
MS	: Kütle Spektrometresi
MVA	: Mevalonat
Na ₂ SO ₄	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NRRL	: Northern Regional Research Laboratory
PDA	: Patates Dekstroz Agar
Pre-İTK	: Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
ppm	: Parts per million (Milyonda bir birim)
<i>R_f</i>	: Alıkonma Faktörü
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Enstitüsü besiyeri
RT	: Retention Time
s	: Singlet
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
t	: Triplet
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
δ	: Kimyasal kayma

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Artan antibiyotik direnci, mevcut antimikrobiyal tedavilerin etkinliğinin azalması, çeşitli faktörlerle tetiklenen alerjik reaksiyonlar, bilim dünyasında etkili ve güvenli ilaç arayışlarını hızlandırmıştır.

Mikrobiyal transformasyon, biyoaktif doğal ve sentetik molekülerin yapılarında gerçekleştirilen değişimler aracılığıyla bir umut olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyodönüşümler hidroksilasyon, dehidroksilasyon, *O*-metilasyon, *O*-demetilasyon, glikozilasyon, deglikozilasyon, dehidrojenasyon, hidrojenasyon, benzo- γ -piron sisteminde karbon halkası bölünmesi, siklizasyon ve karbonil indirgemesi vb. birçok reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Mikrobiyal biyotransformasyonda kullanılan suşlar kolay ve büyük ölçekli üretim potansiyeli ve çevre dostu olmaları gibi avantajlar sunar (Cao ve ark 2015). Biyotransformasyon reaksiyonları, laboratuvar ölçekli kimyasal sentezle karşılaştırıldığında ılıman koşullar altında yürütülmesi, zor hatta kimyasal olarak imkansız reaksiyonların stereoselektif, regioselektif ve enantiyoselektif olarak katalizlenebilmesi gibi avantajlar sağlar. Toksik atık üretilmemesi ve doğal kaynakları substrat olarak kullanıp, doğal katalizörlerin kullanılması son ürünün de "doğal" olarak nitelendirilmesini sağlar (Sevalho ve ark., 2024).

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden narenciye kabuk yağları haricinde sadece distilasyon, yöntemleri ile elde edilen monoterpen, seskiterpen ve bunların oksijenli türevlerini içeren oda sıcaklığında sıvı ve iz bırakmadan uçabilen aromatik hidrokarbon karışımlarıdır. Bitkilerin yaprak çiçek, gövde, dal, kök tomurcuk, kabuk, meyve tohum gibi farklı organlarından elde edilen biyoaktif sekonder metabolitlerdir. Antibakterial, antifungal antiprotozoal, antiviral, analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanser etkiler göstermektedirler. Günümüzde her alanda doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte sentetik koku, ilaç ve katkı maddelerinin de doğal olanlarla mümkün olduğunca değiştirilmesi yönündeki eğilim, uçucu yağların önemini ortaya çıkarmıştır. Şu ana kadar 3000 uçucu yağ insanlığın kullanımında olup, bunlardan 300'ü ticari uçucu yağ çeşitli biyolojik ve farmakolojik kullanımlarının yanı sıra koku ve tat ham maddeleri olarak hayatımızda yerlerini almışlardır (Başer, 2015).

Melaleuca alternifolia (Maiden & Betche) Cheel Avusturalya'da 100 yılı aşkın süredir kullanılmakla birlikte dünya çapında artan kullanım sıklığı ile gerek saf halde gerekse

birçok üründe aktif bileşen olarak yer bulmaktadır. Genel olarak ciltte irritasyona neden olmaması, kolay penetre olması ve özellikle geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri dolayısıyla çeşitli kozmetik preparatlarda kullanılmaktadır (Yadav, 2017). Antibakteriyel antifungal, antiinflamatuvar ve antiviral aktiviteleri ve bu etkilerin mekanizması sayısız literatür çalışması ile incelenmiştir (Cudgen, 2007). Ancak saf çay ağacı uçucu yağının, jel, krem, losyon ve merhem gibi topikal preparatlarında kullanımına bağlı kontakt dermatit ve eritema multiforme gibi cilt hastalıkları ve oral yolla küçük hacimlerde alımı ile zehirlenme ve koma vakaları raporlanmıştır (Carson ve ark., 1998). Genel olarak güvenli kabul edilmekle birlikte yağın degradasyonu ve terpenlerin oksidasyonu sonucu toksik etkili türevlerin oluşumu ve yüksek uçuculuk gibi biyoyararlanımını ve aktivitesini etkileyen dezavantajlar kullanımını az da olsa sınırlamaktadır (Yadav, 2017).

Bu tez kapsamında geniş spektrumlu antikandidal ve antibakteriyel aktivitelere sahip değerli bir uçucu yağ olan çay ağacı uçucu yağının mikrobiyal transformasyonu ile biyolojik aktivitesi artmış metabolitlerin üretilmesi hedeflenmiştir. Yapıları aydınlatılan metabolitlerin standart maddelerden ve yağın kendisinden daha fazla bioaktivite göstermesi halinde potansiyel ilaç, koku ve tat hammaddeleri olarak sunulmaları hedeflenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Myrtaceae Familyasının Özellikleri

Myrtaceae (Mersingiller) familyası genel olarak tropikal bölgelerden güneye özellikle Güney Amerika, Avustralya ve Asya'nın tropikal kesimlerine doğru bir yayılım göstermekle birlikte familyanın üyelerine Afrika'nın çeşitli bölgelerinde rastlanmaktadır. Her mevsim yeşil çalı ve ağaç formundaki bitkilerden oluşur. Bu familyaya ait bir kısmı endemik olan yaklaşık yüz kırktan fazla cins mevcuttur (Wilson, 2010). *Eucalyptus*, *Myrtus* ve *Psidium* gibi cinsler iyi bilinen örneklerdir. *Syzygium aromaticum* (karanfil), *Pimenta racemosa* (Yenibahar) ve *Acca sellowiana* (Guava) gibi türler de yine bu familyaya ait geniş çapta tanınan türlerdir.

Âlem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Magnoliopsida (İki çenekliler)

Takım: Myrtales

Familya: Myrtaceae

Cins: *Melaleuca* L. (nom. cons.)

Tür: *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel

2.1.1 *Melaleuca* cinsine ait diğer türler

Maiden ve Betche 1905'te bitkiyi *Melaleuca linariifolia* varyetesi olarak ele almışlardır. *M. alternifolia* ve *M. linariifolia* yakın akrabadır. Cheel, 1924 yılından iki bitki arasındaki farkları inceleyerek iki türün ayrılması gerektiğini düşünmüştür. Günümüzde çay ağacı yağı (Tea tree oil: TTO) 246 farklı türden elde edilmektedir. *Leptospermum scoparium* ve *Kunzea ericoides* türlerine ait uçucu yağların bileşimi oldukça farklı olmasına rağmen yine de çay ağacı olarak anılmaktadır (Carson, 2006). *Melaleuca* cinsine ait bazı ticari bitkiler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1*Çay Ağacı Olarak Bilinen ve Kullanılan Türler*

Latince	Majör Bileşen	Adı	Biyolojik Etkisi	Kaynak
<i>M.alternifolia</i> (Maiden & Betcher) Cheel	(%30-48) Terpinen-4-ol	Çay Ağacı	Topikal antiseptik, geniş spektrumlu antimikrobiyal, antiinflamatuvar	Brophy ve ark., 2013 Lis-Balchin ve ark., 2000
<i>M. cajuputi</i> Powell	(%50-70) 1,8-sineol	Kajepüt, Bataklık çay ağacı	Solunum yolları ve genital-ürinal sistem antiseptiği Yüzey temizlik ajanı, Böcek kovucu	Brophy ve ark., 2013 Barbosa et al., 2013
<i>M. dissitiflora</i> F. Muell	1,8-sineol, α -terpineol	Çay ağacı	Antibakteriyel	Padalia, ve ark., 2015
<i>M. leucadendra</i> (L.) L.	(%64) 1,8-sineol	Beyaz Kağıt Kabuğu, Geniş yapraklı Kağıt Kabuğu	Antikonvulsant, analjezik, anestezi, kas gevşetici	Barbosa ve ark., 2013
<i>Melaleuca linariifolia</i> Smith	Metilöjenol 1,8-sineol	Çay ağacı	Süs bitkisi, antiseptik	Silva ve ark., 2010
<i>M. quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake	1,8-sineol, viridiflorol, <i>E</i> -nerolidol (kemotipe göre değişmekte)	Geniş yapraklı çay ağacı	Solunum sistemi hastalıkları, nöralji ve romatizma,	Barbosa ve ark., 2013
<i>M. viridiflora</i> C. F. Gaertn.	1,8-sineol	Nioli, Geniş yapraklı çay ağacı	Antiseptik, solunum sistemi hastalıkları böcek kovucu antiinflamatuvar	Monti ve ark., 2002
<i>Leptospermum scoparium</i> J.R.Forst. & G.Forst.	(>%60) Seskiterpenler	Manuka	Cilt ve yara bakımı Antimikrobiyal	Brophy ve ark., 1999 Porter ve Wilkins, 1999
<i>Kunzea ericoides</i> (A.Rich.) Joy Thomps.	(>%50) α -pinen	Kanuka	Antiinflamatuvar, antimikrobiyal	Porter ve Wilkins, 1999

2.2 *M. alternifolia* Cheel Türünün Botanik özellikleri

Melaleuca alternifolia (Maiden ve Betcher) Cheel (Syn. *Melaleuca linariifolia* var. *alternifolia* Maiden ve Betcher) bitkisinin doğal yayılış alanı Avustralya kıtasında, Güney Queensland'den Kuzeydoğu Yeni Güney Galler'i kapsamaktadır. Deniz seviyesinden 800 metreye kadar değişen yüksekliklerde genellikle su kaynaklarına yakın yerlerde ve bataklıklarda dağılışı göstermektedir (the Plant of World online, World Flora Online).

Görsel 2.1

Melaleuca alternifolia Bitkisinin Doğal Yayılışı



Kaynak: the Global Biodiversity Information Facility <https://www.gbif.org/species/5416091>

Melaleuca kelimesi, Yunanca mela ve leuco siyah ve beyaz kelimeleri ile türetilmiş ve bitkinin büyürken gövde kabuklarındaki renk değişimini betimlemek üzere bu şekilde adlandırıldığı düşünülmüştür. Gövde kabuğu kağıt gibi katmanlı ve pul pul dökülen yapıdadır. Bitkinin genç filizleri yumuşak tüylerle kaplı iken yaşlı dallar tüy taşımamaktadır. Tıbbi olarak kullanılan kısım olan yapraklar basit, 1-2,5 cm uzunluğunda, sivri ve derimsi olup uçucu yağ taşıyan çok sayıda salgı kanalı taşır. Sıcaklığın yüksek olduğu zamanlarda uçucu yağ miktarı artmaktadır. Ekim-Kasım aylarında dalların uçlarında beyaz-krem renkli çiçeklerini açmaktadır (Rosetto, 1999). Herdem yeşil, 7 metreye kadar boylanabilen çalıdır (Brophy ve ark., 2013).

Görsel 2.2

Melaleuca alternifolia (Maiden ve Betche) Cheel



Kaynak: the Global Biodiversity Information Facility <https://www.gbif.org/species/5416091>

2.2.1 *M. alternifolia*'nın Halk Arasında Kullanımı

M. alternifolia 1770 yılında Kaptan James Cook tarafından keşfedilmeden çok önce Avustralya Aborjinleri tarafından bilinmekte idi. Aborjinlerin sözlü tarihinde *M. alternifolia* yapraklarının zamanla düştüğü ve çürüdüğü lagünler olan şifalı göllerden bahsedilmektedir. Aborjinler, *M. alternifolia* gibi küçük yapraklı çay ağaçlarını deri hastalıklarını tedavi etmek amacıyla lapa halinde yara iyileştirici ve yaprakları ezerek elde ettikleri yağı öksürük kesici olarak kullanmışlardır (Carson, 2006; Sailer ve ark.,1998).

Cook ve gemisindeki mürettebat tarafından *Camellia sinensis* yerine Myrtaceae türüne ait başka bir bitkinin yapraklarının demlenerek tüketilmesiyle bitki ilk kez çay ağacı (Tea Tree) olarak tarihe geçmiştir (Southwell, 1999).

Botanikçi Sir Joseph Banks yolculuğu sırasında topladığı *M. alternifolia* ait yaprakların yanında daha uzun ve geniş benzer yaprakları da incelemiştir. Elde ettiği bulgular *M. leucadendron*, *M. cajuputi*, *M. quinquenervia* ve *M. viridiflora* sınıflandırılmasında yol göstermiştir.

Uçucu yağ, Dr. Arthur Penfold tarafından 1923 yılında bitkinin yapraklarından elde edilmiş ve 1925 yılında uçucu yağın antimikrobiyal etkileri ortaya çıkarılmıştır. 1930 yılında Medical Journal of Australia da etkileri gösterilmiş ilerleyen tarihlerde 2. Dünya savaşında yaralanmalardaki cilt enfeksiyonlarını azaltmak ve böcek kovucu olarak ilk yardım çantalarında kullanılmıştır (Humphery, 1930; Lis-Balchin ve ark., 2000). Antibiyotik üretimindeki güçlükler, doğal ürünlere ve uçucu yağlara olan ilginin artışı ile TTO 1960'lı yıllardan sonra popülerlik kazanmıştır (Brophy ve ark., 1989).

Avusturalya toplulukları tarafından 100 yılı aşkın süredir kullanılan TTO, günümüzde 40.000 hektarlık geniş bir alanda tarımı yapılan ve dünya çapında tarımdan veteriner hekimliğe, kozmetik ve farmasötik preparatlardan aromaterapiye kadar farklı kullanım alanları bulmuş ekonomik değeri yüksek bir uçucu yağdır (Mursleen, 2021).

2.3 Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar aromatik bitkilerden distilasyon ve sıkma yöntemleri ile elde edilen doymuş ve doymamış hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevlerinden oluşan değerli ve karakteristik kokulu sekonder metabolitlerdir. Uçucu yağlar, Mısır, Çin ve Hint medeniyetleri tarafından koku ve aroma verici olarak ayrıca tedavi edici amaçlarla 6000 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (Elshafie ve Camele, 2017; Kristen, 2023). İyi bilinen antimikrobiyal antioksidan, antienflamatuar etkilerinin yanı sıra yapılan çalışmalarda Alzheimer, kardiyovasküler sistem hastalıkları ve çeşitli ağrılarda da uçucu yağların kullanılabileceği gösterilmektedir. Ayrıca sirkadyen ritimi düzenlediği, bilinç ve öğrenme düzeylerini arttırdığı, iyilik hali (well-being) ve ruhani iyileşme haline katkı sağladığı ile ilgili çalışmalar sürmektedir (Farooqi AHA, 2000; Kennedy ve ark., 2018). Uçucu yağlar etkilerini limbik sistem ve endokrin sistemi etkileyerek göstermekte, günümüzde aromaterapi gibi birçok tamamlayıcı tedavinin ana aracı olarak popülerliğini korumaktadır (Shibamoto ve ark., 2010; Edris, 2007; Malloggi ve ark., 2022).

2.3.1 *M. alternifolia* uçucu yağı

2.3.1.1 Kimyasal profili

Günümüzde Myrtaceae familyasından *Leptospermum*, *Melaleuca* ve *Kunzea* cinslerine ait bitkiler “tea tree” olarak adlandırılmaktadırlar. Söz konusu bitkilerden uçucu yağ elde edilmesine karşın bileşimi çay ağacı uçucu yağından farklıdır. Çay ağacı uçucu yağ yapraklar ve terminal braktelerden buhar distilasyonu ile elde edilmektedir. Yağın relatif yoğunluğu 0,885 ve 0,906 arasında değişmektedir. Suda az, apolar solventler ile iyi çözünür (Carson ve ark., 2006). Çay ağacı uçucu yağının terpinen-4-ol, terpinolen ve 1,8-sineol kemotipi ve 1,8-sineolün ana bileşen olduğu farklı bileşimlerde 3 kemotiple birlikte toplam 6 kemotipi bilinmektedir (Homer ve ark., 2000). Ticari öneme sahip uçucu yağ çoğunlukla terpinen-4-ol kemotipinden elde edilmektedir.

Çay ağacı uçucu yağının ana bileşenleri hidrokarbonlu terpenler (terpinen-4-ol, α -terpineol, α -terpinen, γ -terpinen, terpinolen ve 1,8-sineol), seskiterpenler ve bunların alkollerini içeren 100’den fazla bileşikten oluşmaktadır. ISO 4730 (ISO, 2017) ticari çay ağacı uçucu yağının içermesi gereken terpinen-4-ol miktarını minimum %30 olarak verirken yağın içerebileceği maksimum 1,8-sineol miktarını %15 olarak belirlemiştir (Sharifi-Rad ve ark., 2017).

Saklama koşulları, ışık, ısı, oksijen ve nem maruziyeti gibi koşullar altında *p*-simen miktarı artarken α - ve γ -terpinen miktarlarının azalması ile TTO bileşiminde değişiklik meydana gelmektedir. Yağın stabilitesinin korunması amacıyla karanlık, soğuk ve kuru yerlerde hava miktarının sınırlı olduğu cam kaplarda saklanmalıdır.

2.3.1.2 *M. alternifolia* uçucu yağının farmakolojik etkileri

TTO’nun tarihsel olarak da ilk kullanımlarını içeren antiseptik ve antimikrobiyal özellikleri halen büyük ilgi çekmektedir. Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* ve Gram (+) *S. aureus* gibi patojen ve antibiyotiklere dirençli bakterilere ve hatta Metisilin-dirençli *S. aureus*’a (MRSA) karşı gösterdiği antibakteriyal etki ve bu etkinin mekanizması çok sayıdaki deneysel çalışmada gösterilmiştir (Cox ve ark., 2000; Halco’n ve ark., 2004; Iacovelli ve ark., 2023).

Yağın ana bileşenleri olan terpinen-4-ol, α -terpineol 1,8-sineol ve terpinolenin optimal oranları antimikrobiyal etki ve yüksek epidermal absorpsiyon için gereklidir. Uçucu yağın ana bileşenleri olan terpenler düşük molekül ağırlıklı ve lipofilik özellikte

moleküllerdir. Mikroorganizmanın çift tabakalı fosfolipit hücre mebranın akışkanlığını değiştirerek ve potasyum iyonlarının ve sitoplazmik membran içeriğinin dışarı sızmasına neden olarak antimikrobiyal etki göstermektedir. (May ve ark., 2000; Hammer ve ark., 2004).

Antiinflamatuvar (Brand, 2001; Khalil, 2004), antioksidan (Nikolić, 2012), antiviral (Garozzo, 2011; Schnitzler, 2001), özellikle oral, vajinal ve sistemik inatçı kandida enfeksiyonların ana etmeni olan *Candida albicans* ve diğer kandida türlerine karşı antifungal etki göstermekle birlikte biyofilm oluşumunu önleyici etkileri de bulunmaktadır (Borotová, 2022; Souza ve ark., 2017). Çay ağacı uçucu yağı, ektoparazitlere ve bunların sebep olduğu ikincil enfeksiyonlara karşı umut vaat eden bir alternatiftir (Bezabp, 2022).

2011 yılında Ulusal Tamamlayıcı ve İntegratif Sağlık Birimi (NCCIH) ve 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün raporlarında TTO'nun antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri doğrulanmış, tinea pedis, onikomikoz ve akne rozada (gül hastalığı) etkili olabileceği ancak cilt tahrişi ve alerjik reaksiyon riski bulunduğu vurgulanmıştır (Cao ve ark., 2015).

Literatürde melanoma hücreleri üzerinde antitümoral ve proapoptotik aktiviteleri (Martile ve ark. 2021) ve %10 TTO/DMSO ile hazırlanan formülasyonun topikal kullanımla AE17 tümör hücre hattının deri altında büyümesini engellediği (Ireland ve ark., 2012) gösterilmiştir. Ayrıca TTO'nun MCF-7 meme kanseri hücre hattına (Asmmanna ve ark., 2018) sitotoksik etkileri ve etkinin mekanizması aydınlatılmıştır. Antikanser aktivite çalışmaları sürmekte ve yeni formülasyonlar ile yağın stabilitesi ve biyoyararlanımı artırılmaya çalışılmaktadır.

2.3.1.3 *M. alternifolia* uçucu yağının toksisitesi

Topikal olarak deri irritasyonu, alerjik kontakt dermatit, sistemik kontakt dermatit, eritema multiforme benzeri reaksiyonlar hipersensivite ve anidiyopatik prepubertal jinekomasti yüksek konsantrasyonda TTO kullanımına paralel olarak raporlanmıştır (Pazyar, 2013). Dermal uygulama sonrası evcil hayvanlarda hipotermi, dehidrasyon, titreme ve koordinasyon kaybı belirtileri gözlenirken sıçanlarla yürütülen deneylerde LD₅₀ değerleri 1.9-2.6 ml/kg olarak belirlenmiştir (Biskoff, 1998).

Dahilen kullanımı yetişkinler ve özellikle çocuklarda tehlikelidir. Çocuklarda düşük

miktarlarda alımlarda bile koma görülebilir. Oral olarak ≤ 1.5 g/kg TTO alımı ile letarjik ve ataksik etkiler raporlanmıştır (Russel, 1999). Literatür verilerinde yüksek dozlarda toksik etkilere rastlanmıştır ancak yağ kullanımına bağlı ölüm ve genotoksisite gösterilmemiştir. İnhalasyon ile solunum sistemi hastalıklarında kullanımına bağlı burun ve boğaz irritasyonu görülebilir (Hammer ve ark., 2006)

İrritant etkiler yağın seyreltilerek kullanıldığı ve iyi formülize edilmiş preparatlar ile azaltılabilir. İrrite edici etkilere 1,8-sineol'ün neden olduğunun gösterildiği çok az çalışma bulunmakla birlikte söz konusu etki muhtemelen uygun olmayan saklama koşulları nedeniyle oluşan oksidasyon ürünlerinden kaynaklanmaktadır. TTO içeren topikal preparatlar kullanım talimatlarına uyulduğu ve saklama koşullarına dikkat edildiği takdirde kullanımları güvenli olarak değerlendirilebilir. İlaç ve gıda katkı maddeleri olarak oral kullanımları bulunmamaktadır (Kasujja, 2021).

2.4 Terpenler

2.4.1 Monoterpenlerin biyosentezi

Terpen ve izoprenoidler, sinyal üretimi, üreme, iletişim, iklim koşulları ve diğer çevresel stres faktörlerine (pH, toprak özellikleri vb.) uyum yeteneği ve savunma sağlama amaçlarıyla ürettikleri izopren (C_5H_8) ünitelerinden oluşan sekonder metabolizma bileşikleridir.

Bir veya yüzlerce tekrarlayan beş karbonlu izopentenil difosfat (IPP) ve izomeri dimetilalil difosfattan (DMAPP), asetil CoA'dan hareketle sitoplazmada mevalonik asit (MVA) yolağı veya plastisitlerde metileritritol fosfat (MEP) yolağı aracılığıyla oluşurlar. Substrat spesifitesine ve diferansiyel enzimlerin çeşitliliğine ek olarak ikincil modifikasyonlar ile çok çeşitli terpenlerin üretimi mümkün olmaktadır. Üretilen bu bileşikler spesifik bir familyaya veya cinse özgü olabileceği gibi bir bitki türü içindeki dokuya da özgü olabilir. Bitkilerdeki hayatta kalma ve adaptasyon gibi önemli fonksiyonlarının yanında ürettikleri antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, antikanser etkili terpenoitler onları potansiyel ilaç hammaddeleri haline getirmektedir (Tholl, 2015).

2.5 Biyotransformasyon (Mikrobiyal Transformasyon)

Dünyadaki mikrobiyal hücrelerin sayısının yaklaşık olarak bir nonilyon (10^{30}) olduğu tahmin edilmekte ve bu sayının evrendeki tahmin edilen yıldız sayısından fazla olduğu düşünülmektedir (Lennon ve Locey, 2016). Mikroorganizmalar, gezegenin her köşesine kolonize olarak biyosferi etkiler ve birçok kimyasal süreci kataliz ederek ekosistemin devamlılığını sağlar. Denizler, tatlı sular, atık sular, toprak ve bitkisel kaynaklı ortamlar gibi çeşitli habitatlarda, organik ve inorganik bileşiklere, uç sıcaklık, pH ve ozmotik basınç değişimlerine ve hatta yüksek radyasyona kadar zorlu çevre koşullarına direnç göstererek hayatta kalabilirler (Chamberg ve Valencia, 2016). Mikroorganizmalar çoğalmak için karbon kaynaklarına ihtiyaç duyarlar ve bulundukları ortamdaki kendileri için toksik bileşikler de dahil olmak üzere farklı karbon kaynaklarını metabolize edilme özellikleri onları biyotransformasyon reaksiyonları için vazgeçilmez biyokatalistler haline getirmektedir (Gavrilescu, 2010).

Mikroorganizmaların sahip olduğu enzim çeşitliliği ve çevresel tolerans, insan ve çevre yararına kullanılmakta ve bu sürdürülebilir bir gelecek için kritik bir rol oynamaktadır.

1900'lerin başlarında şekerin fermentasyon ile alkol ve aside dönüştürülmesi ve Alexander Fleming'in 1928'de penisilini keşfetmesiyle mikroorganizmaların belirli amaçlar için kullanılabileceğini gösteren deneyler biyotransformasyonun ilk uygulamalarıdır. 1940'lardan sonra kimyasal olarak zor sentezlenen steroidlerin üretimi ve *Nocardia* türleri kullanılarak progesteronun kortizona dönüşümü ile biyotransformasyon süreçlerine olan ilgi artmıştır. 1980'lerin başında biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, biyokatalist kavramını ortaya çıkarmış spesifik enzimlerin eldesi ve ekspresyonu, biyotransformasyon süreçlerini daha kontrollü ve verimli hale getirmiştir. Günümüzde hücre sistemleri, enzim sistemleri ve doku sistemlerinin omik teknolojileri ile (genomik, proteomik, metabolomik) entegrasyonu, mikrobiyal dönüşümlerin anlaşılmasını ve geniş ölçekli uygulamalarını beraberinde getirmiştir (Charney ve Herzog, 2014; Chamberg ve Valencia, 2016).

2.5.1 Uçucu yağ biyotransformasyonları

Uçucu yağların bileşimlerindeki çeşitli terpen molekülleri, hoş ve aromatik kokuları ile aroma ve parfüm endüstrilerinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Terpenler ve izoprenoit molekülleri, farmasötik ve nutrasötik moleküller, sentetik kimyasallar, koku ve aroma bileşenleri, endüstriyel biyoyakıtlar ve biyomateryaller gibi hammadelerin

üretimlerinde substrat olarak kullanılmaktadır (Mittal ve ark., 2022). Bu değerli moleküllerin üretimi ve eldesinde bitkilerle karşılaştırıldığında mikroorganizmalar, daha kolay fermente edilebilme, tekrarlanabilir üretim kapasiteleri ve genetik manipülasyonlara daha fazla esneklik sağlama gibi avantajlara sahiptir. Mikroorganizmalar, sürdürülebilir ve ılıman koşullarda, yüksek verimli ve tekrarlanabilir reaksiyonlarla değerli biyokatalistler olarak biyoteknolojik uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kant ve ark., 2023).

Bunların yanında biyotransformasyon süreçlerinde saf bir molekülün veya standart bir kimyasal maddenin tek başına kullanımı yerine uçucu yağın bütün olarak kullanımı çeşitli avantajlar sunmaktadır.

Uçucu yağlar, %20-%95 konsantrasyon aralığında majör bileşen, %1-%20 konsantrasyon aralığında minör bileşen ve <%1'den az miktarlardaki bileşenleri kapsayan 20-200 arasında değişen çeşitlerde kompleks molekül içermektedirler. Sahip oldukları bu eşsiz molekül çeşitliliği ve bileşiklerin yağdaki oranları, sinerjik etkiler göstererek biyolojik aktiviteyi izole edilmiş standart maddelere kıyasla arttırmaktadır (Bunse ve ark., 2022; Bassolé ve Juliani, 2012). Örneğin çay ağacı uçucu yağının bileşimindeki terpenlerin arasındaki etkileşim, terpinen-4-ol'ün tek başına kullanılması ile gözlenmeyen daha güçlü bir antibakteriyel ve antikandida etki göstermektedir (Johansen ve ark., 2022).

Biyotransformasyon süreçlerinde uçucu yağın substrat olarak kullanılması, mikroorganizmaların birden fazla bileşiğe maruz kalması ve metabolize etmesi ile daha geniş bir biyoaktif metabolit yelpazesi üretmelerine olanak tanır. Bu süreç, mikroorganizmaların yağdaki çeşitli moleküllerle etkileşime girmesi sonucu daha fazla metabolit çeşitliliği ile potansiyel teröpotik etkili moleküllerin keşfini mümkün kılar.

Standart maddelerin eldesi oldukça zahmetli ve pahalı saflaştırma süreçlerini içermekte, sentetik olarak üretilmelerinde ise çoğu zaman kontrol edilemeyen kimyasal reaksiyonlar sonucu rasemik bileşikler oluşmaktadır. Uçucu yağın bütün halde kullanımı, izole edilmiş standart bileşiklerin kullanımına kıyasla daha ekonomik ve pratiktir. Oluşan metabolitin kaynağını belirlemek zor olsa da, yeni metabolit keşfine olanak sağlayan bir seçenektir.

Uçucu yağlar ilaç, kozmetik ve gıda endüstrilerinde bütün olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla yağın stabilitesini, çözünürlüğünü ve biyolojik aktivitesini arttırmak, yan etki profillerini değerlendirmek amacıyla tüm yağın biyotransformasyon süreçlerine dahil edilmesi pratik uygulamalar ile güvenilir veriler sunmaktadır (Wińska ve ark., 2019).

2.5.2 Terpenlerin biyotransformasyonu

Doğada var olan terpenlerin büyük bir çoğunluğu kimyasal olarak sentezlenememekte biyoteknolojik alternatif teknolojiler ile üretimleri mümkün olmaktadır. Mikroorganizmaların seçici manipülasyonları ile bakteriler, yeşil mikroalgler (*Chlamydomonas reinhardtii*), siyanobakteriler (*Synechocystis* ve *Synechococcus*) gibi fotosentetik mikroorganizmalar (Tetali, 2018), *Aspergillus* spp. (Parshikov ve ark., 2014; Sanchez ve ark., 2012), *Penicillium* spp. (Toghueo ve ark., 2020) ve *Fusarium* spp. (Pessôa ve ark., 2017) gibi fimanentli funguslar ayrıca *Spodoptera litura* gibi larvalar, tavşan, sıçan ve insan sitokrom enzimleri ile biyotransformasyon reaksiyonları katalizlenmektedir.

Terpen biotransformasyonlarında en büyük avantaj enzimatik süreçlerin kimyasal sentezlere kıyasla enantiyospesifik olarak gerçekleşmesi iken dönüşüm reaksiyonlarını sınırlandıran ana etken substratın uçuculuğu ve mikroorganizmalara olan toksisitesi olmaktadır. Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak mikroorganizmalar, uygulama amacına ve kullanılan substrata göre seçilmelidir. Ön tarama deneyleri ile metabolik çeşitlilik, enzim aktivitesi, substrat uygunluğu, üretim verimliliği ve kültür koşulları değerlendirilmelidir. Fermentasyon şekli ve süresi, kullanılan besiyerinin içeriği, fermentasyon sıcaklığı, nem, pH, oksijenlenme/rotasyon hızı (rpm), substratın miktarı ve çözünürlüğü ve ko-faktörlerin kullanımı gibi birçok parametre ürün verimini ve metabolik çeşitliliği etkileyebilir (Qin ve Dong, 2023). Özellikle ortam pH'sı, mikroorganizmaların fizyolojisini ve hücre zarı morfolojisini değiştirerek besin alımını, enzim aktivitelerini, oksidatif-redüktif reaksiyonları dolayısıyla biyotransformasyon süreçlerini etkilemektedir (Vaingankar ve Juvekar, 2014). Mikroorganizmaların optimum üretim koşullarının belirlenmesi ve bu koşulların sürdürülmesi oldukça kritiktir.

Son yıllarda ekonomik ve çevre dostu uygulamalar ile düşük molekül ağırlığına sahip mono-, seski- ve diterpenlerin üretimleri üzerine yoğunlaşmıştır. Terpenlerin biyosentezinde biyotransformasyon, etkili bir üretim aracı olarak özellikle ilaç ve koku endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Biyokataliz, bazı ilaçların veya ara ürünlerin sentezini basitleştirebilir. Kimyasal sentezle karşılaştırıldığında karmaşık ayrıştırma ve saflaştırma basamaklarını ortadan kaldırarak nispeten ılıman koşullarda yürütülen deneylerle hedeflenen moleküllerin basit, hızlı ve ucuz üretimlerine olanak tanır.

İlaç etken maddeleri, gıda katkı maddeleri ve koku hammaddeleri gibi özel kimyasalların

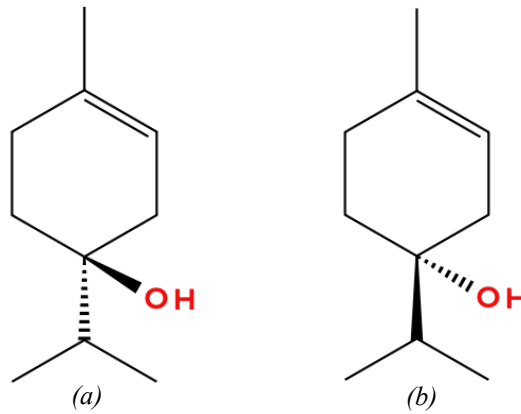
dönüşümü ve üretimin sağlanması, yapı etki ilişkilerinin araştırılması için türevlendirmelerin kolaylıkla yapılabilmesi, seçici kimyasal türevlerin (enantyospesifik, stereospesifik vb) üretimi, rasemik karışımların selektif olarak ayrımı, biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanabilmesi, hastalık biyobelirteçlerinin üretimi, hormonların sentezi (örn:steroidler), pestisitlerin, organik atıkların ve kirletici ajanların biyolojik olarak parçalanması veya modifikasyonu gibi biyoteknolojik uygulamalar günümüzde biyotransformasyon reaksiyonları ile hızlı ve güvenilir olarak gerçekleştirilmektedir. Ucuz, hızlı ve kolay üretimler ile yüksek verimli bileşiklerin üretiminin yanında daha az atık ve yan ürün üretimi ve çevre dostu (yeşil kimya ve teknoloji) uygulamalar biyoteknolojik manipülasyonların sunduğu diğer avantajlardandır (Cano-Flores ve ark., 2020).

Gelecekte özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerdeki sentez yollarının ayrıntılı olarak aydınlatılması, terpen ve izoprenoidlerden hareketle sentezlenen doğal aktif metabolitlerin üretiminin ve bu bileşiklerin insan sağlığındaki ve biyoenerji alanlarındaki kullanımlarının kapılarını açacaktır.

2.5.2.1 *Terpinen-4-ol biyotransformasyonları*

Görsel 2.3

(+) *Terpinen-4-ol* (a) ve (-)-*Terpinen-4-ol* (b) Moleküllü



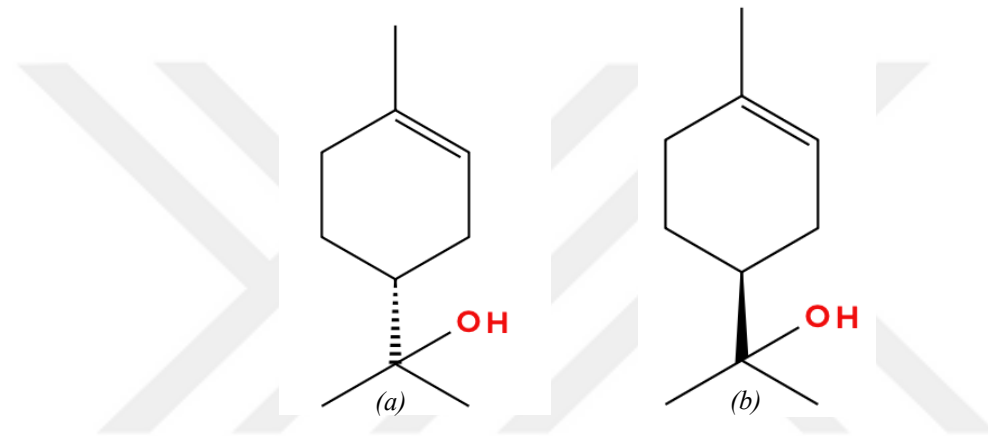
Yapılan literatür taramalarında *Spodoptera litura*'nın, (+) ve (-) terpinen-4-ol'ü katalizleyerek (+) ve (-)-*p*-ment-1-en-4,7-diol dönüştürdüğü rapor edilmiştir (Miyazawa ve Kumagae, 2001). *Gibberella cyanea* DSM 62719 ile yapılan bir başka çalışmada (Abraham ve ark., 1986) (+)-terpinen-4-ol'den hareketle (1*S*,2*S*,4*S*)-*p*-mentan-1,2,4-triol, 6-*p*-menten-2,4-diol ve (1*R*,2*R*,4*S*)-2-hidroksi-1,4-sineol olmak üzere 3 farklı metaboliti elde edilmiştir. İnsan karaciğer mikrozomları ile yapılan bir başka çalışmada (-)-

terpinen-4-ol'ün CYP1A2, CYP2A6 ve CYP3A4 enzimleri tarafından $(-)-(1S,2R,4R)$ -1,2-epoksi-*p*-mentan-4-ol'e ve CYP3A4 enzimi tarafından $(-)-(1R,2S,4R)$ -1,2-epoksi-*p*-mentan-4-ol'e dönüştürüldüğü gösterilmiştir (Miyazawa ve Haigou, 2011). (+)-Terpinen-4-ol ile yapılan çalışmada ise $(+)-(1R,2S,4S)$ -1,2-epoksi-*p*-mentan-4-ol, $(+)-(1S,2R,4S)$ -1,2-epoksi-*p*-mentan-4-ol, $(4S)$ -*p*-ment-1-en-4,8-diol insan karaciğer hücrelerindeki P450 enzimleri ile dönüştürüldüğü sonuçlarına ulaşılmıştır (Haigou ve Miyazawa, 2012).

2.5.2.2 Alfa-terpineol biyotransformasyonları

Görsel 2.4

$(S)-(-)\alpha$ -Terpineol (a) ve $(R)-(+)\alpha$ -Terpineol (b) Molekülü

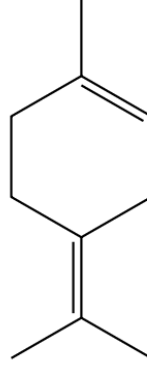


$R-(+)\alpha$ -Terpineol tipik leylak kokulu iken $(S)-(-)\alpha$ -terpineol kozalak kokusuna sahip bileşiklerdir. α -Terpineol'ün, koku endüstrilerindeki yaygın olarak kullanımı, hoş ve aromatik kokusuna ek olarak kimyasal olarak kolay sentezlenmesi ve ticari kullanımlarda düşük maliyetlerle elde edilebilmesinden ileri gelmektedir. α -Terpineolün *Alternaria alternata* ile biyotransformasyonu ile 4*R*-oleuropeik asit, $(1S,2R,4R)$ -*p*-mentan-1,2,8-triol ve 7-hidroksi- α -terpineol elde edilmiştir (Mei ve ark., 2020).

2.5.2.2 Terpinolen biyotransformasyonları

Görsel 2.5

Terpinolen Molekülü

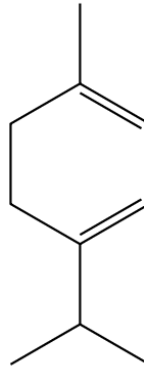


Terpinolen *Pinus* türlerinde yaygın olarak bulunan ve 1 ve 4. konumda iki çift bağ içeren monosiklik terpendir. Koku endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Ito ve Ito, 2013). Terpinolenin *A. niger* ile yapılan dönüşümlerinde (1*R*)-8-hidroksi-3-*p*-menten-2-on, (1*R*)-1,8-dihidroksi-3-*p*-menten-2-on ve 5β-hidroksifenkol elde edilmiştir (Asakawa ve ark., 1991).

2.5.2.3 Alfa-terpinen biyotransformasyonları

Görsel 2.6

α-Terpinen Molekülü

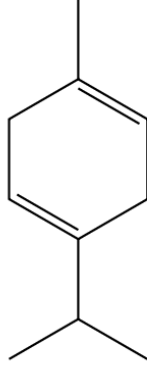


Çay ağacı uçucu yağının antioksidan aktivitesinden sorumlu bileşenlerden biri olan α-terpinen, ısı, hava ve ışık maruziyetinde kolayca oksitlenebilmektedir (Bakkali ve ark., 2008). α-Terpinen ile yürütülen biyotransformasyon çalışmalarında *S. litura* ile yapılan dönüşümlerde α-terpinen -7-oik asit ve *p*-simen-7-oik asit (kuminik asit) elde edilmiştir (Miyazawa ve ark., 1995).

2.5.2.4 Gama-terpinen biyotransformasyonları

Görsel 2.7

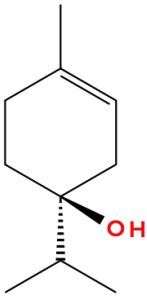
γ - Terpinen molekülü



γ -Terpinen, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* ve *Melaleuca alternifolia* uçucu yağlarının bileşimlerinde bulunan sikloheksan halkası ve iki çift bağ içeren bir monoterpendir (Burt, 2004). Terpenlerin biyotransformasyonları ile elde edilen metabolitler Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

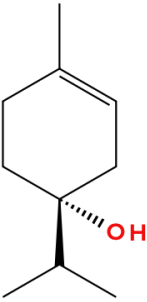
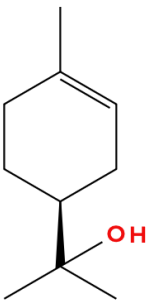
Tablo 2.2

Terpenlerin Biyotransformasyonları

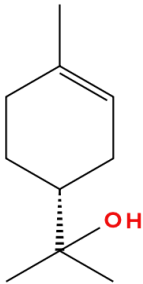
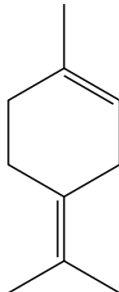
Bileşik	Metabolit	Kaynak
 (+)-Terpinen-4-ol 154 g/mol	<i>S. litura</i> > (+)-Terpinen-4-ol	
	(+)- <i>p</i> -ment-1-en-4,7-diol (170g/mol)	Miyazawa ve Kumagae, 2001
	<i>Giberella cyanea</i> DSM 62719>(S)-Terpinen-4-ol	
	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)- <i>p</i> -mentan-1,2,4-triol (188g/mol)	Abraham ve ark., 1986
	6- <i>p</i> -menten-2,4-diol (170 g/mol)	
	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroksi-1,4-sineol (170 g/mol)	
	İnsan karaciğer P450 enzimleri>(+)-Terpinen-4-ol	
	(4 <i>S</i>)- <i>p</i> -ment-1-en-4,8-diol (170 g/mol)	Haigou ve Miyazawa, 2012
	(+)-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1,2-epoksi- <i>p</i> -mentan-4-ol, (170 g/mol)	
	(+)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1,2-epoksi- <i>p</i> -mentan-4-ol (170 g/mol)	

Tablo 2.2

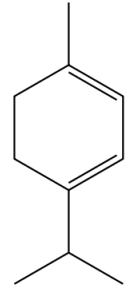
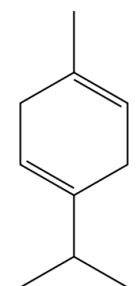
(Devam) Terpenlerin Biyotransformasyonları

(-)Terpinen-4-ol  154 g/mol	<i>S. litura</i> > (-)Terpinen-4-ol (-)(1<i>S</i>,2<i>R</i>,4<i>R</i>)-1,2-epoksi-<i>p</i>-mentan-4-ol (170 g/mol) (4<i>R</i>)-<i>p</i>-ment-1-en-4,7-diol (170 g/mol) Kumagae ve Miyazawa, 1999
	<i>Giberella cyanea</i> DSM 62719 > (-)Terpinen-4-ol 2<i>α</i>-hidroksi-1,4-sineol (170 g/mol) 1-<i>p</i>-menten-4<i>α</i>, 6-diol (170g/mol) Abraham ve ark., 1986
	<i>Aspergillus niger</i> > (-)Terpinen-4-ol 2<i>α</i>, hidroksi-1,4-sineol (170 g/mol) (+)-<i>p</i>-mentan-1 <i>β</i>,2<i>α</i>,4<i>α</i> triol (188 g/mol) Noma ve Asakawa, 2007
	CYP1A2, CYP2A6 ve CYP3A4 > (-)Terpinen-4-ol (-)(1<i>S</i>,2<i>R</i>,4<i>R</i>)-1,2-epoksi-<i>p</i>-mentan-4-ol (170g/mol) (-)(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>R</i>)-1,2-epoksi-<i>p</i>-mentan-4-ol(170g/mol) Miyazawa ve Haigou, 2011
	CYP102A1 > (-)Terpinen-4-ol 1,4-dihidroksi-<i>p</i>-menth-2-en(170 g/mol) Kim ve ark., 2024
(+) <i>α</i>-Terpineol  154 g/mol	<i>Pseudomonas pseudomonalli</i> > (+) <i>α</i>-Terpineol 8,9-epoksi-<i>p</i>-mentan-1-ol (170g/mol) Hayashi ve ark., 1972
	<i>S. litura</i> > (+) <i>α</i>-Terpineol 4-izopropil-1,3-sikloheksadienmetanol (152 g/mol) 4-izopropil-1,3-sikloheksadienoik asit (166 g/mol) Kumik alkol (150 g/mol) Kumik asit (164 g/mol) Miyazawa ve ark., 2000
	<i>S. litura</i> > (+) <i>α</i>-Terpineol 7-hidroksi-<i>R</i>-terpineol (170g/mol) oleuropeik asit (8-hidroksi-<i>p</i>-ment-1-en-7-oik asit (184 g/mol) Miyazawa ve Ohsawa, 2002
	<i>Alternaria alternata</i> > (+) <i>α</i>-Terpineol 4<i>R</i>-oleuropeik asit (184 g/mol) (1<i>S</i>,2<i>R</i>,4<i>R</i>)-<i>p</i>-menthan-1,2,8-triol (188 g/mol) 7-hidroksi-<i>α</i>-terpineol (170 g/mol) Mei ve ark., 2020

Tablo 2.2*(Devam) Terpenlerin Biyotransformasyonları*

(-)α -Terpineol	<i>Giberella cyanea</i> DSM 62719> α-Terpineol	
	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)- <i>p</i> -mentan-1,2,8-triol(188 g/mol) (4 <i>S</i>)-1,2-epoksi- α -terpineol (170 g/mol) (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroksi-1,8-sineol (170 g/mol) (-)- <i>trans</i> -sobrerol (170 g/mol) (-)- <i>cis</i> -sobrerol (170 g/mol) (4 <i>S</i>)-1- <i>p</i> -menthen-7,8-diol (170 g/mol) (4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-karveol (152 g/mol) (4 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-karveol (152 g/mol)	Abraham ve ark.,1986
154 g/mol		
Terpinolen	<i>Aspergillus niger</i> > Terpinolen	
	1,7-dihidroksi- <i>p</i> -ment-3-en-2-on (184 g/mol) (1 <i>R</i>)-8-hidroksi-3- <i>p</i> -menten-2-on, (168 g/mol) (1 <i>R</i>)-1,8-dihidroksi-3- <i>p</i> -menten-2-on(184 g/mol) 5 β -hidroksifenkol (170 g/mol)	Asakawa ve ark., 1991
136 g/mol		
	<i>Corynespora cassicola</i>> Terpinolen	
	Terpinolen-1,2- <i>trans</i> -diol (170 g/mol)	Abraham ve ark., 1986
	<i>Diplodia gossypina</i> ATCC 10936> Terpinolen	
	1- <i>p</i> -menten-4,8-diol (170 g/mol) (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-4(8)- <i>p</i> -menten-1,2-diol (170g/mol) 2,8-dihidroksi-1,4-sineol (186 g/mol)	Abraham ve ark. 1986
	Tavşan> Terpinolen	
	Terpinolen-9-ol (154 g/mol) Terpinolen-10-ol (154 g/mol)	Asakawa ve ark., 1983
	<i>Spodoptera litura</i>> Terpinolen	
	1- <i>p</i> -menten-4,8-diol (170 g/mol) Kuminik asit (164 g/mol) Terpinolen-7-oik-asit (166 g/mol)	Miyazawa ve ark., 1995

Tablo 2.2*(Devam) Terpenlerin Biyotransformasyonları*

α- Terpinen	<i>S. litura</i>> α-Terpinen	
 136 g/mol	4-izopropil-1,3-siklohekza-dienmetanol, (152 g/mol)	Miyazawa ve ark.,1996
	4-izopropil-1,3-sikloheksadienoik asit(166 g/mol)	
	Kumik alkol (150 g/mol)	
	Kumik asit (164 g/mol)	
γ -terpinen	<i>Corynespora cassicola</i> DSM 62474> α-Terpinen	Abraham ve ark., 1886
 136 g/mol	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-3-menten-1,2-diol (170 g/mol)	
	(1 <i>R</i>)-2-okso-3- <i>p</i> -mentenol-1 (168 g/mol)	
	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-3- <i>p</i> -menten-1,2-diol (170 g/mol)	
	<i>Corynespora cassicola</i> DSM 62474> γ-Terpinen	Abraham ve ark., 1986
	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-4- <i>p</i> -menten-1,2-diol (170 g/mol)	
	7-hidroksi-simen (152 g/mol)	Miyazawa ve Wada, 2000
	<i>S. litura</i>> γ-Terpinen	
	γ -terpinen-7-oik asit (166 g /mol)	
	<i>p</i> -simen-7-oik asit (kuminik asit) (164 g/mol)	

3 GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu kısımda biyotransformasyon çalışmalarında ve aktivite deneylerinde kullanılan madde ve malzemeler, mikroorganizma kültürleri ve protokollere detaylı olarak yer verilmiştir.

3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ ve Standart Maddeler

Farmakope kalitesindeki *M. alternifolia* uçucu yağı Augustus Oils LTD. firmasından ve tez çalışmasında kullanılan standartlar terpinen-4-ol (Sigma-Aldrich, $\geq$ %95) ve γ -terpinen (Sigma-Aldrich, $\geq$ %95) ticari olarak temin edilmiştir. Kontrol amaçlı İTK, GK, GK/KS analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1

Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Uçucu Yağın Fizikokimyasal Özellikleri

Analiz	Değerler
Görünüş	Berrak, akışkan
Renk	Renksiz veya açık sarı
Koku	Karakteristik
Refraktif index (20°C)	1,4784 (1,4750-1,4820)
Optik rotasyon (20°C)	+9.1 (+7°- +12°)
Spesifik ağırlık (20°C)	0,8970 (0.8850-0,9060)

3.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler

Deneyisel yöntem içinde kullanımı belirtilen diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich, Merck, ve Fluka tarafından satın alınmıştır.

3.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Analitik terazi (Radwag AS 310.R2)
- Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific Excella E25)
- Rotary evaporatör (Heidolph)
- Gaz kromatografisi (Shimadzu)
- Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi (GK/KS, Shimadzu 2000)

- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR 3001)
- McFarland densitometre (DEN-1B, Biosan)
- Nükleer manyetik rezonans spektrometresi (Bruker 400 MHz Ascend sıvı NMR)
- Otoklav (Hirayama HV50L)
- Otomatik ince tabaka kromatografi örnekleme cihazı (Camag ATS4)
- Otomatik ve multikanal pipetör seti (Eppendorf)
- Pastör fırını (Ecocell)
- pH-Metre (Heidolph, Germany)
- Steril Kabin (Heal Force)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Sonorex)
- Ultraviyole ışık kabini (Camag)
- Vakumlu konsantratör (Labconco)
- Vorteks (Ika Genius 3)

3.4 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Sabit faz için alüminyum destek üzerine silikajel 60 GF254 20x20 ebatlarında hazır plaklar (Merck) ve mobil faz olarak 7 farklı çözücü sistemi kullanılmıştır . Lekelerin tespiti için, UV 254 ve 366 nm lambda kullanılmıştır. UV absorpsiyonu olmayan maddeler, anisaldehit/sülfürik asit püskürtülmesi sonrası 100-105 °C’de 5 dakika ısıtılması ile (Heidolph, MR 3001) görülebilir hale getirilmiştir (Abraham ve ark. 1986). Anisaldehit/sülfürik asit reaktifi ile maddelerin görünür hale getirilmesi sonrasında tekrar UV 366 nm’de bakılarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Tablo 3.2’de metabolitlerin belirlenmesinde kullanılan çözücü sistemleri gösterilmiştir.

Tablo 3.2*Metabolitlerin Belirlenmesinde Kullanılan Çözücü Sistemleri*

Mobil faz	Oran
Toluen/ etil asetat /formik asit	19:3:1
Toluen/ etil asetat /formik asit	17:3:1
Diklorometan/aseton	9:1
Hekzan:etilasetat	3:1
Hekzan:etilasetat	1:1
Etilasetat/metanol	2:1
Etilasetat	

3.4.1 Anisaldehit-sülfürik asit reaktifinin hazırlanışı ve uygulaması

Anisaldehit-sülfürik asit reaktifinin hazırlanması için 0,5 mL anisaldehit, 10 mL glasiyel asetik asit, 85 mL metanol ve 10 mL derişik sülfürik asit yavaş ve dikkatli bir şekilde eklenerek (ekzotermik reaksiyon oluşturmaktadır) hazırlanmış ve +4 °C karanlıkta saklanmıştır (Sakar ve Taner, 1991).

3.5 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Preparatif İTK yönteminde alüminyum destek üzerine silikajel 60 GF₂₅₄ plaklar kullanılmıştır. Öncesinde metanol ile 2 kere yıkanarak kurutulmuş ve 120°C aktive edilmiş plaklar üzerine izole edilecek maddelerin bulunduğu ekstratlar bant şeklinde uygulanmıştır. İzole edilecek maddelerin plaktaki yerleri anisaldehit/sülfürik asit reaktifi plağın kenarına bir şerit halinde uygulanarak veya UV absorbans veren lekeler için UV 254 veya 366 nm’de belirlendikten sonra plaktan kazınarak izole edilmiştir. Silikajel içinde bulunan maddeler aseton ile çözülmüş ve cam yünü ve bir miktar silika eklenmiş Pasteur pipetlerinden süzülerek silikajelden arındırılmıştır. Azot gazı yardımı ile çözücüsü uzaklaştırılarak tartımları alınmış ve deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.6 Gaz Kromatografisi (Gk) Ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi

Substrat olarak kullanılacak olan çay ağacı uçucu yağı dahil diğer çay ağacı uçucu yağlarının, standart maddelerin ve metabolitlerin kütle spektrumlarının alınması amacıyla 2 farklı sistem kullanılmıştır.

SHIMADZU GC-2010 Plus High-end Gaz Kromatogram sistemine bağlı, CP-Sil 5 CB (30 m x 0.25 mm Ø, 0.25 mm film kalınlığı) kolon kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C'dir. Uygulanan sıcaklık programı, 60°C de 10 (dk), 4°C/dk artışla 270°C (10 dk)'dir. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0.99 ml/dak) kullanılmıştır. Kütle aralığı m/z 35-450'dir. Split oranı 50:1, elektron enerjisi, 150 eV'dir. Diğer sistemde Agilent 7890B Gaz Kromatogram sistemine bağlı Agilent HP-Innowax (60 m x 0.25 mm iç çap x 0.25 Ø m film kalınlığı) kolon kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C'dir. Uygulanan sıcaklık programı, 60°C de (10 dak), 4 °C/dk artışla 220 °C (10 dk), 1°C/dk 240°C, toplam 80 dakikadır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0.7 mL/dk) kullanılmıştır. Kütle aralığı m/z 35-450'dir. İyon kaynağı sıcaklığı 230 eV'dir. Bileşiklerin belirlenmesinde Wiley ve Adams-LIBR (TP) Kütüphane tarama yazılımlarından yararlanılmıştır. Relatif tutunma indislerinin (RRI) hesaplanmasından *n*-alkan serisi referans alınmıştır (McLafferty, 1989; Boelens, M., 1999).

3.7 Biyotransformasyon Çalışmaları

3.7.1 Mikroorganizmaların temini ve kültür koleksiyonlarının oluşturulması

Mueller-Hinton Broth (Merck), Mueller Hinton Agar (Fluka), Patates Dekstroz Agar (Merck), hazır olarak temin edilerek besi ortamları kutu üzerindeki tarife uygun olarak sulandırılarak hazırlanmış ve otoklavda steril edilerek kullanılmıştır. Katı ve sıvı besiyerleri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C, 1,5 atm basınç altında 20 dakika boyunca steril edilmiştir. Petri kaplarına besiyeri dökülmesi işlemi steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Petriler en fazla 2 hafta süreyle saklanmış, kullanılacağı güne kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3

Biyotransformasyon Denemelerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

No	Mikroorganizmalar	Suş
F11	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549
F15	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9807
F24	<i>Fusarium culmorum</i>	Fen Fak., Biyoloji
F25	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NRRL Y-8279
F27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
F37	<i>Trichoderma harzianum</i>	Fen Fak., Biyoloji

Tablo 3.3*(Devam) Biyotransformasyon Denemelerinde Kullanılan Mikroorganizmalar*

F62	<i>Aspergillus flavus</i>	DA 198
F65	<i>Penicillium expansum</i>	DA 120
F72	<i>P. italicum</i> var. <i>italicum</i>	DA izolat
F82	<i>Absidia blakesleeana</i>	NRRL 1306
F93	<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i>	Fen Fak., Biyoloji
F99	<i>Glomerella cingulata</i>	Abraham
F102	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ATCC 66034
F130	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 113
F135	<i>Alternaria eureka</i>	Fen Fak., Biyoloji

Tablo 3.4*Antimikrobiyal Aktivitelerde Kullanılan Mikroorganizmalar*

No	Mikroorganizma Adı	Suş
F2	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
F4	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y-900
F52	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
F127	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750
F128	<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019
F129	<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
B1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008
B2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
B6	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
B7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228
B18	<i>Serratia marcescens</i>	NRRL B-2544
B40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027

3.7.2 Deneylerde kullanılan besiyerleri

3.7.2.1 *α -medyum besiyerinin hazırlanması*

20 gram glukoz 5 gram pepton, 5 gram maya ekstresi, 5 gram NaCl, 5 gram Na₂HPO₄ tartılarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Ön tarama deneylerinde asidik pH (pH=6) ve nötr pH (pH=7) 'larda metabolit çeşitliliği ve verimler *Aspergillus africanus* ve *Alternaria eureka* suşları için kontrol edilmiştir. pH=6 üzerinden NaOH ve HCl ile ayarlama yapılarak biyotransformasyon çalışmaları sürdürülmüştür (Vaingankar ve Juvekar, 2014).

3.7.2.2 *RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması*

Antikandidal aktivite deneyleri için RPMI 1640 besiyeri 250 mL olarak hazırlanmıştır. İlk olarak 2,6 gram toz halindeki RPMI 1640 tartılmış ve 210 mL distile su içinde çözünmesi sağlanmıştır. 8,63 gr 0,165 M MOPS (3-N-morfolinopropanesulfonic acid) (Wisent Inc. Multicell, Kanada, ABD) ile tamponlanmıştır. NaOH solüsyonu yavaş yavaş eklenerek pHmetre ile besiyeri pH'sı 7,0'ye ayarlanmıştır. Toplam hacim 250 mL olacak şekilde steril distile su ile tamamlanmıştır. Enjektör filtreleri (Sartorius) yardımıyla steril şişeye süzülerek kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.7.2.3 *Molten agar*

Biyootografi deneylerinde kullanılmak üzere molten agar hazırlanmıştır. Hazır olarak satın alınan MHB besiyeri uygun miktarlarda tartılmıştır. %1,5 g/mL oranında agar agar ilavesi sonrası besiyeri kaynatılmıştır. Tüplere 9 mL oranında porsiyonlanarak otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.7.2.4 *Hazır besi ortamları*

Deneylerde Mueller-Hinton Broth (Fluka), Mueller-Hinton Agar (Fluka), Sabouraud Dekstroz Broth, Sabouraud (Fluka) Dekstroz Agar (Fluka), Patates Dekstroz Broth (Merck), Patates Dekstroz agar (Merck) gibi besiyerleri hazır olarak satın alınarak tarife uygun olarak hazırlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. Petri kaplarına besiyeri dökülmesi işlemi steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Kullanım zamanına kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.7.3 Sterilizasyon

Hazırlanan besiyerleri ve aseptik şartlarda yürütülen aktivite deneylerinde kullanılacak tüm malzemeler otoklavda 121°C, 1,5 atm basınçta 20 dakika süresince steril edilmiştir.

3.7.4 Biyotransformasyonda kullanılacak substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

Mikrobiyal transformasyon çalışmalarında kullanılacak substrat miktarını belirlemek amacıyla Sabouroud Dekstrozu Broth steril koşullar altında kapaklı 4 tüpe 10 mL porsiyonlanmıştır. Bir gün öncesinde Sabaroud Dektrozu agarda geliştirilmiş funguslar tüplere ekilmiştir ve inkübasyona bırakılmıştır. İlk tüp funguslar için üreme kontrolü amacıyla kullanılmıştır. 2. 3. ve 4. tüplere sırasıyla 10, 20 ve 40 mikrolitre çay ağacı uçucu yağı eklenmiştir. Tüplerin ağzı pamuk ile kapatılarak çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca 28°C 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların gelişimleri kontrol edilerek üreme durumları değerlendirilmiştir ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak uygun substrat miktarı belirlenmiştir. Diğer substratlar ve mikroorganizmalar da benzer yöntem ile test edilmiştir (İşcan, 2009).

3.7.5 Uçucu yağın stabilite çalışmaları

Alfa-medyum besiyerine 100 mikrolitre uçucu yağ eklenerek 1., 3., 7., 10. ve 14. günlerde 3 mL örnek alınmıştır. Örneklerin üzerine 3 mL etil asetat eklenerek 45 saniye vortekslenmiştir. Üstte kalan etilasetat fazı dikkatli bir şekilde başka bir tüpe alınarak yoğunlaştırılmıştır. İTK plağına terpinen-4-ol bileşik standardı da eklenmiştir. Uçucu yağın ve terpinen-4-ol ün besiyerinde kalıcılığı kontrol edilmiştir.

3.7.6 Ön tarama deneyleri

Öncesinde PDA besiyerine saflık kontrolü amacıyla ekilen kültürler 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ortalama 4-5 günlük sürede yeterli olgunluğa erişen taze kültürlerden içinde 100 mL *a*-medyum besiyeri içeren erlenlere, küfün büyüme kontrolü erleni ve biyotransformasyonun yapılacağı erlen olmak üzere çift ekim yapılmıştır. 5 günlük adaptasyon sonucu logaritmik büyüme fazına ulaşan kültürlerden biyotransformasyon erlenine öncesinde belirlenen doz aseton içinde 100 mikrolitre aşılanmıştır.

Görsel 3.1

Biyotransformasyon ve Fungus Büyüme Kontrol Erlenleri



3.7.6.1 *Substrat stabilizasyonu ve kontrol grupları*

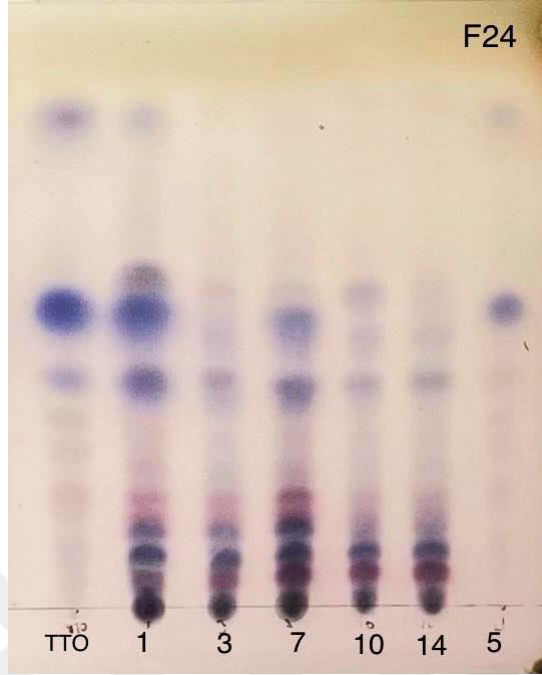
Biyotransformasyon erleni ve fungus kontrol erlenine ek olarak α -medyum besiyerinin ve besiyeri içinde ilave edilen uçucu yağın belirlenen süre içindeki kompozisyonun kendiliğinden değişimini incelemek amacıyla TTO eklenerek aynı şartlar altında 14 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Substratın ve besiyerinin inkübasyon süresi boyunca değişimlerini gözlemlemek amacıyla belirlenen günler ve saatlerde örnek alınarak kromatografik yöntemlerle stabilite kontrolleri yapılmıştır.

3.7.6.2 *Örnekleme ve ekstraksiyon*

25 °C ve sabit şartlarda sürdürülen inkübasyon periyodunda 1. 3. 7. 10. ve 14. günlerde 3 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerle 3 mL etilasetat ilave edilerek her bir örnek 30 saniye vortekslenmiştir. Etilasetat fazına geçen metabolitlerin yeterli ölçüde alınabilmesi amacıyla işlem üç kez tekrarlanmıştır. Etilasetat fazı cam tüpe aktararak oda sıcaklığında alçak basınçta Centrivab (Labconco) ile yoğunlaştırılmıştır. Besiyeri kontrolü, substrat kontrolü, fungus kontrolü ve biyotransformasyon kontrol erleni belirtilen şekillerde ekstre edilerek ince tabaka kromatografisi ile kontrolleri yapılmıştır (Görsel 3.2).

Görsel 3.2

Belirlenen Günlerde İnce Tabaka Kromatografisi ile Oluşan Metabolitlerin Kontrolü

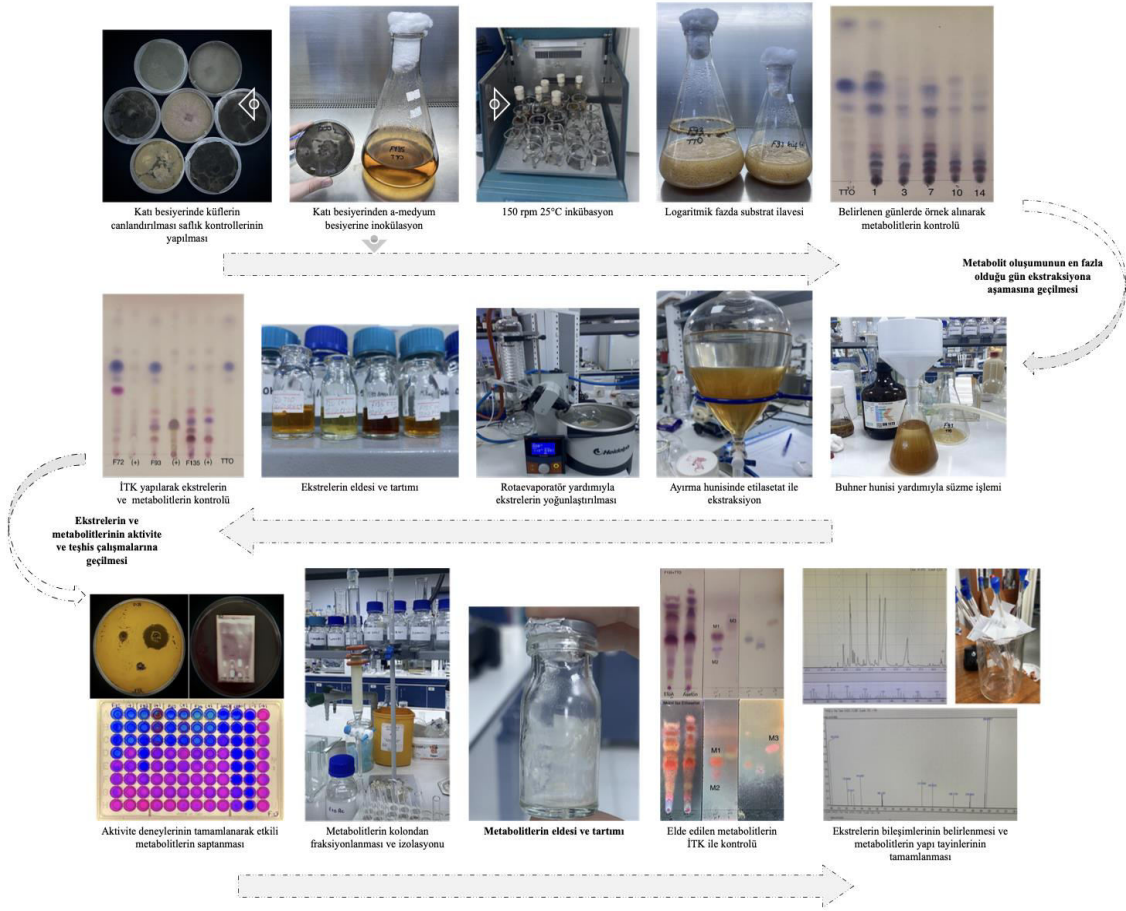


3.7.7 Preparatif Amaçlı Biyotransformasyon

Ön tarama deneylerinde küçük ölçekli denemeler ile metabolit ürettikleri İTK ile belirlenen fungusların ürettikleri metabolitlerin eldesi için büyük hacimlerde hazırlanan erlenlerde biyotransformasyon çalışmaları tekrarlanmıştır. Görsel 3.3’de çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyon prosedürü özetlenmiştir.

Görsel 3.3

Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyon Aşamaları

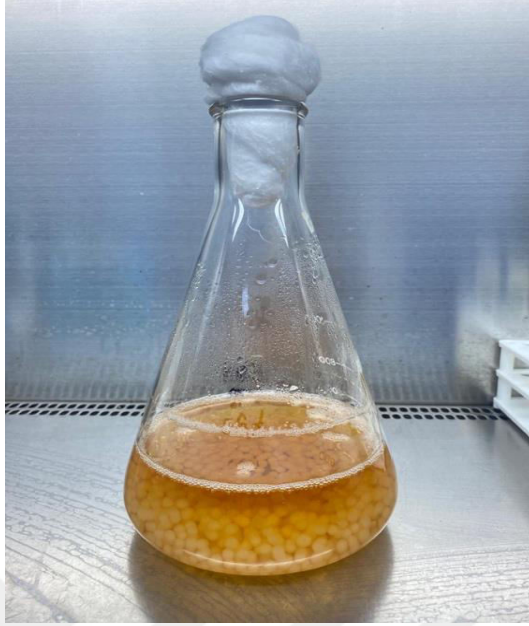


3.7.7.1 Mikroorganizma kültürü ve substrat ilavesi

1000 mL *alfa*-medyum besiyerine *Penicilium italicum* var. *italicum*, *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Alternaria eureka* ve *Fusarium culmorum* fungusları önceden belirtilen koşullarda ekilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından yeterli büyüme fazına ulaşmış funguslara (Görsel 3.4) 800 mikrolitre çay ağacı uçucu yağı aseton ile çözülerek eklenmiştir. Erlenler, çalkalayıcıda 150 rpm'de 28°C'de tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

Görsel 3.4

Büyük Hacimlerde Biyotransformasyon Çalışmalarının Tekrarlanması

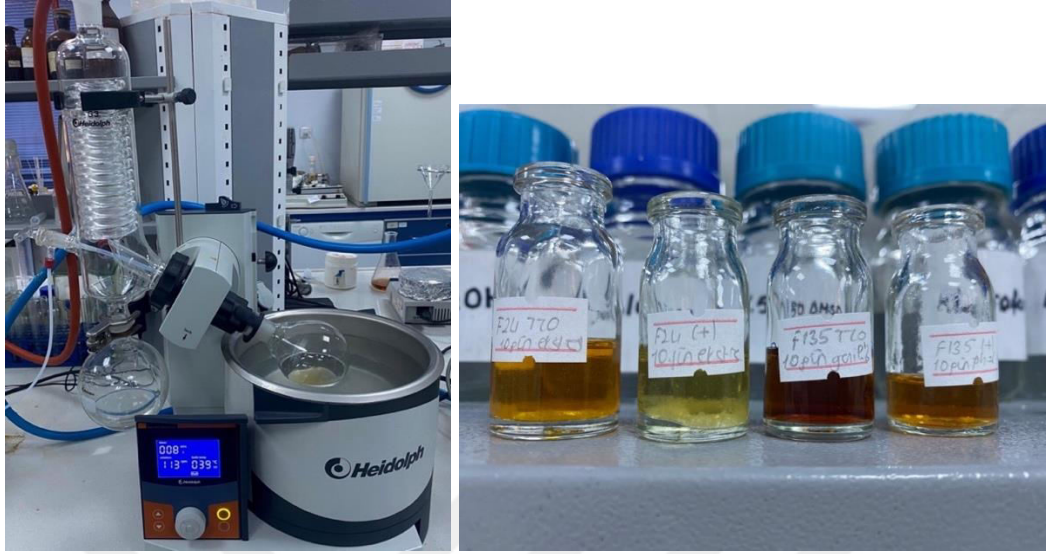


3.7.7.2 Ekstraksiyon

Metabolitlerin en yoğun olarak var olduğu gözlenen günler İTK aracılığıyla belirlenmiştir. *Penicilium italicum* var. *italicum* için 7. gün, *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Alternaria eureka* ve *Fusarium culmorum* küfleri için 10. gün inkübasyon işlemine son verilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda etil asetat ile ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Besiyerindeki kolonilerin Buchner erleni ve hunisi ile vakum altında filtrelenmesi ardından süzüntü, hacmi kadar etil asetat ile 3 defa ekstre edilmiş birleştirilen ekstreler susuz Na₂SO₄'tan geçirilerek düşük basınç altında ve sıcaklıkta 35-40°C'de yoğunlaştırılmıştır (Görsel 3.5). Metabolit karışımını içeren ekstrelerin, substratı ile karşılaştırmalı ince tabaka kromatogramları incelenmiştir. Dönüşüm gözlenen ekstelerin GK/KS analizleri gerçekleştirilmiştir.

Görsel 3.5

Ekstrelerin Eldesi ve Tartımı



3.7.7.3 Metabolitlerin izolasyonu ve karakterizasyonu

İTK ve GK/KS analiz sonuçlarının yorumlanmasıyla verimli dönüşümü olan metabolitlerin yüksek miktarda üretimi için mikrobiyal transformasyonu deney prosedüründe açıklanan yöntemle çok sayıda erlen ile gerçekleştirilmiş ve metabolitler, preparatif İTK ile toluen:etilasetat:formik asit,17:3:1 çözücü sistemi kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan metabolitler kromatografik (İTK ve GK) ve spektroskopik (GK/MS ve NMR) olarak analiz edilmiştir.

3.7.7.4 Kolon Kromatografisi

GK/KS analizleri ve İTK ile metabolit içerdiği belirlenen ekstrelerden metabolitlerin saf halde yeterli miktarlarda elde edilebilmesi ve biyoaktivite çalışmaları için kolon kromatografisi planlanmıştır. Bu amaçla 10 x200 mm ve 20x400 mm ebatlarında kolonlar kullanılmıştır. Kolona önce hekzan koyulup, çözücüde disperse edilen silikajel ile ıslak biçimde doldurulmuştur. Ekstre hekzan:etilasetat 10:1 karışımı içinde çözülerek az miktar silikajele emdirilmiş, karışımdaki çözücü oda sıcaklığında spatül ile karıştırılarak uçurulmuş, tamamen kuru hale gelince kolona yüklenmiştir. Ekstrenin üstüne kalınlığı 1cm olacak şekilde temiz deniz kumu ilave edilmiştir. *n*-Hekzandan başlayarak etilasetat ile gradiyent elüsyon yapılmıştır (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, EtOAc ve MeOH). 3 mL olacak şekilde toplanan fraksiyonlar İTK ile eş zamanlı olarak kontrol edilmiştir. Kolon en son metanol ile yıkanmıştır (Görsel 3.6). Metabolitleri en saf halde içeren fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır.

Görsel 3.6

Metabolit Karışımlarının Sıvı Kromatografisi ile Fraksiyonlama ve Ayrıştırma Çalışmaları



3.7.8 Yapı Tayini

3.7.8.1 Gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi

Biyotransformasyon süreleri sonunda ekstre edilen metabolit karışımları ve kolon kromatografisi ile izole edilen metabolitler kütle spektrumlarının alınması amacıyla gaz kromatografisi kütle spektrometrisi kullanılarak Bölüm 3.6’da verildiği şekilde analiz edilmiştir. Bileşiklerin belirlenmesinde Wiley ve Adams- LIBR (TP) Kütüphane tarama ve yazılımları kullanılmıştır. Relatif tutunma indislerinin (RRI) hesaplanmasından *n*-alkan serisi referans alınmıştır.

3.7.8.2 NMR

1D- (^1H ve ^{13}C -NMR) ve 2D- (COSY, HSQC, HMQS ve HMBC) NMR analizleri Anadolu Üniversitesi BİBAM, Eskişehir’de yapılmıştır. İzole edilen maddeler döterokloroform (CDCl_3) veya dötero-dimetilsülfoksit ($\text{CD}_3\text{-SO-CD}_3$) içerisinde çözülerek maddelerin 1D- ve 2D-NMR spektrumları Bruker 400 MHz Ascend sıvı NMR spektrometresiyle kaydedilmiştir (Görsel 3.7). Kimyasal kayma değerleri ppm olarak verilmiştir.

Görsel 3.7

Bruker 400 MHz Ascend Sıvı NMR Spektrometresi



3.8 Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Çay ağacı uçucu yağı, substratlar (terpinen-4-ol ve γ -terpinen) ile ekstre edilen metabolit karışımlarının ve izole metabolitlerin antioksidan (biyootografi), antibakteriyel ve antikandidal (kuyu difüzyon, mikrodilüsyon yöntemi ve biyootografi(dot-blot ve kontakt) yöntemi) etkileri incelenmiştir.

3.8.1 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

3.8.1.1 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Ekstreler, *Escherichia coli* NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens* NRRL B-2544 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. 9 cm'lik petrilere Muller Hinton agar (MHA) 25 mL porsiyonlanmıştır. %0,085 steril salin solüsyonunda McFarland 0.5'e göre ayarlanan kültürlerden 200 mikrolitre eklenerek Drigalski yardımıyla petrinin yüzeyine eşit şekilde yayılmıştır. Besiyerlerinin kuruması için 20 dakika beklenmiştir. 6mm çapındaki diskler petri yüzeyine steril pens yardımıyla yerleştirilmiştir. 20 mg/mL dozunda tartılan ekstreler 30 mikrolitre olacak şekilde disklere emdirilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür. Bakteriler için kontrol olarak kloramfenikol 128 mikrogram/mL dozda kullanılmıştır (Zaidan ve ark., 2005).

3.8.1.2 Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Ekstreler, *E. coli* NRRL B-3008, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis*, ATCC 12228, *B. cereus* NRRL B-3711 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. Deneyde kullanılacak bakteriler -85 °C'de %50'lik steril gliserol solüsyonu içerisinde muhafaza edilmiştir.

Test edilecek örnekler kısmen modifiye edilmiş “Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü”nün yayımladığı CLSI (NCCLS) M7-A7 protokolü uyarınca yapılmıştır. Bir gün önceden Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarında canlandırılan bakteriler McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre 10^6 KOB/mL olacak şekilde bulanıklık ölçer (BIOSAN) kullanılarak ayarlanmıştır. Numuneler 20 mg tartılmış, 1 ml steril DMSO (%100)'da homojen biçimde çözünmesi sağlanmış ve testlerde kullanılmıştır. Steril U tabanlı, 96 kuyucuklu (well) mikropalaklara MHB besiyeri 100'er μ l pipetlenmiştir. Numuneler voktekslenerek iyice çözünmesi sağlanmış plaklara 100'er μ l eklenerek çift kat seri dilüe edilmiştir. Ayrıca DMSO kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü ve

kloramfenikol pozitif kontrol ajanı olarak test edilmiştir. Daha önce McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri multikanal otomatik pipet yardımıyla her bir sütuna 20'şer µl pipetlenmiş ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda resazurin ile boyanarak minimum inhibitor konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Kloramfenikol (Sigma) standart antibakteriyel ajan olarak 128 mikrogram/mL dozda kullanılmıştır (CLSI (NCCLS) M7-A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh Edition, 2006).

3.8.1.3 Biyootografi ile antibakteriyel etkinin ve etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi

3.8.1.3.1 Dot-blot yöntemi

Biyotografi Dot-blot yöntemi kullanılarak ekstrelerin ve izole edilen edilen metabolitlerin, *Escherichia coli* NRRL B-3008 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538'a karşı antibakteriyel etkileri test edilmiştir. Mueller Hinton agar besiyeri 13 cm'lik steril petrilere 20 mL dökülmüştür. Öncesinde metanol ile yıkanıp kurutulmuş ve 7x7 kesilmiş silikajel GF254 plaklara 10mg/ml konsantrasyondaki örneklerden Drummond kılcalları ile 5 mikrolitre uygulanmıştır. Yürütme yapılmadan doğrudan steril pens yardımıyla petrilere yerleştirilmiştir. Bir gün önceden MHA ile canlandırılan kültürler %0,085 NaCl solüsyonunda McFarland No:0,5'e göre ayarlanmıştır. Öncesinde 9 mL olarak porsiyonlanan Molten agar (%1,5 agar) üzere mikroorganizmaların canlılığını koruyabileceği uygun sıcaklığa geldiği anda 1 mL eklenerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Besiyerinin katılaşmasına izin verilmeden İTK plaklarının yerleştirildiği petrilere dökülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tetrazolium tuzu (distile su %0,25) püskürtmüş ve tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olduğu alanlar beyaz silikajel plağı üzerinde kırmızı zonlar şeklinde gözlemlenmektedir (Sherma, 2018).

3.8.1.3.2 Kontakt biyootografi yöntemi

İTK plaklarının hazırlanması

5x9 cm ebatlarında kesilmiş silikajel GF254 plaklara 10 mg/mL konsantrasyondaki örneklerden Drummond kılcalları ile 5 mikrolitre uygulanmıştır. Öncesinde toluen:etilasetat:formik asit: 17:3:1 ile doyurulmuş tanka steril pens yardımı ile ekstrelerin tatbik edilmiş olduğu plakalar yerleştirilmiştir. Develope işlemi sonrasında

steril kabinin içinde mobil fazın tamamen uzaklaşması için 45 dk beklenmiştir. Öncesinde aynı boyutlarda hazırlanmış ve aynı koşullar altında yürütme işlemi tamamlanmış referans plak, anilin/sülfürik asit reaktifi ile renklendirilerek metabolitlerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Mikroorganizma kültürünün hazırlanması ve aktivitenin belirlenmesi

Ekstrelerin gösterdiği antibakteriyel etkiden sorumlu metabolitlerin belirlenmesi amacıyla biyootografi çalışmaları *Escherichia coli* NRRL B-3008 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538' a karşı yürütülmüştür. Mueller Hinton agar besiyeri 13 cm'lik steril petrilere 20 mL dökülmüştür. Develope edilmiş plaklar steril pens yardımıyla petrilere yerleştirilmiştir. Bir gün önceden MHA ile canlandırılan kültürler %0,085 NaCl solüsyonunda McFarland No:0.5'e göre ayarlanmıştır. Öncesinde 9 mL olarak porsiyonlanan Molten agar (%1.5 agar) üzerine mikroorganizmaların canlılığını koruyabileceği uygun sıcaklığa geldiği anda 1 mL eklenerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Besiyerinin katılaşmasına izin verilmeden dikkatlice İTK plaklarının yerleştirildiği petrilere dökülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tetrazolium tuzu (distile su %0,25) püskürtülerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olduğu alanlar beyaz silikajel plağı üzerinde kırmızı zonlar şeklinde gözlemlenmektedir (Dewanjee ve ark., 2015).

3.8.2 Antikandidal aktivitenin belirlenmesi

3.8.2.1 Kuyu difüzyon yöntemi ile antikandidal aktivitenin belirlenmesi

Ekstreler, *Candida albicans* ATCC 90028, *C. utilis* NRRL Y-900 ve *C. krusei* ATCC 6258'ye karşı test edilmiştir. 9 cm'lik petrilere Sabouraud Dekstroza Agar (SDA) 25 mL porsiyonlanmıştır. %0,085 steril salin solüsyonunda McFarland No.0.5'e göre ayarlanan kültürlerden 200 µL aktarılarak Drigalski yardımıyla petrinin yüzeyine eşit şekilde yayılmıştır. Besiyerlerinin kuruması için 20 dakika beklenmiştir. Besiyerinde 6 mm çapında açılan kuyulara 20 mg/mL dozunda tartılan ekstreler 30 µL olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür. Mayalar için pozitif kontrol olarak ketokonazol 160 µg/mL dozda kullanılmıştır (Magaldi ve ark., 2004)

3.8.2.2 Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi

Ekstreler *C. albicans*'ın iki suşu *C. albicans* ATCC-10231 ve *C. albicans* ATCC 90028, *C. utilis* NRRL Y-900, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* NRRL Y- 12696 ve *C. krusei* ATCC 6258 karşı test edilmiştir. Deneyde kullanılacak mayalar -85 °C'de %50'lik steril gliserol solüsyonu içerisinde saklanmıştır. Test edilecek örnekler kısmen modifiye edilmiş “Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü”nün yayımladığı CLSI (NCCLS) M27-A2 protokolü uyarınca yapılmıştır. Bir gün önceden Patates Dekstroz Agar (PDA) plaklarında canlandırılan *Candida* kültürlerinden koloniler seçilerek steril salin solüsyonu (0,085%) içinde konsantrasyonu McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre 10^6 KOB/mL olacak şekilde bulanıklık ölçer (BIOSAN) kullanılarak ayarlanmıştır. Ekstreler 20 mg olarak tartılmış, 1 mL steril DMSO (Dimetilsülfoksit)'da çözülerek testlerde kullanılmıştır. Steril U tabanlı, 96 kuyucuklu (well) mikrolateler'e RPMI 1640 besiyeri 100'er µL eklenmiştir. Ayrıca DMSO çözücü kontrolü, besiyerinin sterilite kontrolü ve ketokonazol de pozitif kontrol antibiyotiği olarak test edilmiştir. Daha önceden McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri multikanal otomatik pipet yardımıyla her bir sütuna gelecek şekilde 100'er µL pipetlenmiştir ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda sonuçların daha net gözlemlenmesi amacıyla mavi renkli resazurin boyası her bir kuyucuğa 20'şer µL eklenmiştir ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Resazurin canlı hücrelerde enzimatik reaksiyonlarla resorufine indirgenerek pembe renk almaktadır. Rengin mavi olarak kaldığı son kuyucuk minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiştir. Ketokonazol (Sigma) standart antifungal ajan olarak kullanılmıştır (NCCLS, 2002; İşcan, 2009; (CLSI (NCCLS) M27-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition; 2002).

3.8.3 Biyootografi yöntemi ile antioksidan etkili bileşiklerin taranması

Ekstreler (10 mg/mL) İTK plaklarına 5'er µL uygulanarak toluen:etilasetat:formik asit: 17:3:1 mobil fazında yürütülmüştür. Plağın tamamen kuruması beklendikten sonra askorbik asit (1 mg/mL) 3 µL tatbik edilmiştir. DPPH metanol (%0,04) reaktifi hazırlanarak plağın yüzeyine homojen şekilde püskürtülmüştür. Plak karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve antioksidan etkilere sahip olabilecek ekstre ve metabolitler tespit edilmiştir (Sherma, 2018).

4 BULGULAR

4.1 *M. alternifolia* Uçucu Yağının GK/KS analizi

Farklı markalardan temin edilen 5 farklı uçucu yağın bileşimi GK ve GK/KS analizi ile belirlenmiştir. Deneylerde kullanılan uçucu yağın ve piyasadan temin edilen diğer çay ağacı yağlarının kompozisyonu Tablo 4.1’de verilmiştir. ISO standartları ve Avrupa Farmakopesi (11.0)’de çay ağacı uçucu yağı kromatografik profiline tam olarak uygun olduğu belirlenen, major bileşik olan terpinen-4-ol’ü (%40,8) ve yağın diğer ana bileşikleri olan α -terpineol, α -terpinen ve γ -terpinen’i de yüksek miktarda içeren ‘E kodlu’ uçucu yağ, biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tablo 4.1

Yağların Avustralya Standardı (AS 2782: 2017) ve ISO 4730: 2017’ya Göre İçermesi Gereken Bileşiklerin Minimum ve Maksimum Yüzdeleri ve Ticari TTO Numunelerinin Karşılaştırılması

Bileşik	Minimum%	Maksimum%	A	B	C	D	E*
α -Pinen	1.0	4.0	2,4	2,3	2,4	2,4	2,2
Sabinen	<i>tr</i>	3.5	0,1	0,1	0,4	0,2	0,5
α -Terpinen	6.0	12.0	8,3	8,0	10,0	-	8,2
Limonen	0.5	1.5	0,9	0,9	1,0	2,1	1,0
<i>p</i> -Simen	0.5	8.0	4,7	4,0	3,9	22,3	2,6
1,8-Sineol	<i>tr</i>	10.0	3,5	4,0	3,9	2,6	2,7
γ -Terpinen	14.0	28.0	16,1	15,4	18,4	2,07	17,1
Terpinolen	1.5	5.0	3,3	3,1	3,7	0,4	3,2
Terpinen-4-ol	35.0	48.0	36,9	38,6	37,3	37,3	40,8
α -Terpineol	2.0	5.0	3,7	4,2	3,9	3,6	7,7
Aromadendren	0.2	3.0	2,2	2,1	1,4	1,7	1,9
Leden	0.1	3.0	2,6	2,6	2,3	0,4	3,8
δ -Kadinen	0.2	3.0	2,9	2,9	2,2	0,6	3,2
Globulol	<i>tr</i>	1.0	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
Viridiflorol	<i>tr</i>	1.0	0,5	0,5	0,3	0,9	1,7

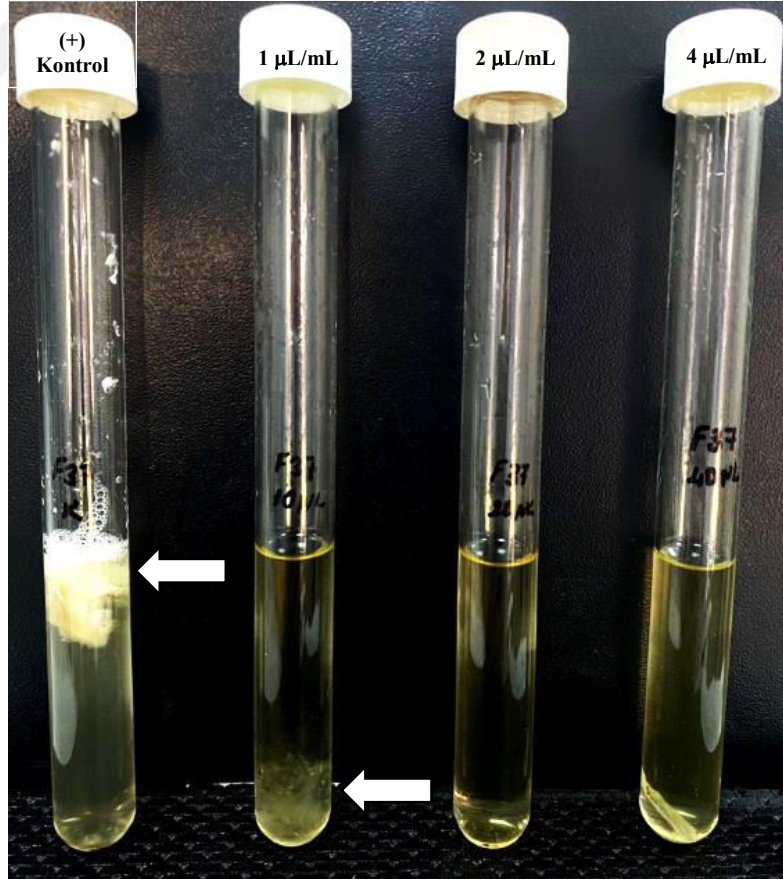
Not:Piyasadan temin edilen farklı markalardaki çay ağacı uçucu yağları: A,B,C,D,E, E*:. Biyotransformasyon deneylerinde kullanılan uçucu yağ (Carson, 2006)*

4.2 Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Uçucu yağın besiyerinde kalıcılığının belirlenmesi amacıyla 1., 3., 7. ve 10. ve 14. gün örnekler alınmış, substrat olarak kullanılacak uçucu yağın besiyerinde 14 gün boyunca korunduğu belirlenmiştir. Çay ağacı uçucu yağının bilinen bir antifungal etkisi olduğundan seçilen 15 farklı mikroorganizma ile substrat konsantrasyon çalışmaları yürütülmüştür (Terzi ve ark., 2007). Literatürde TTO'nun filamentli funguslara karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun %0.004 ile %0.25 ve minimum fungisidal konsantrasyonun ise %0.03 ile %8.0 arasında değiştiği gösterilmiştir (Hammer ve ark., 2002). Makrodilüsyon yöntemi ile her bir küf için inhibitör konsantrasyon belirlenmiştir (Tablo 4.2). 2 µL/mL TTO konsantrasyonunda bazı küflerin inhibe olduğu saptandığından (Görsel 4.1) biyotransformasyon çalışmalarında bu konsantrasyondan daha düşük değerler kullanılmıştır.

Görsel 4.1

Funguslara Eklenecek Substrat Miktarlarının Belirlenmesi



Tablo 4.2*Ön Konsantrasyon Çalışmaları ile Çay Ağacı Uçucu Yağı için Optimal Dozun Belirlenmesi*

Mikroorganizmalar	Kontrol	1 µL/mL	2 µL/mL	4 µL/mL
<i>Aspergillus niger</i>	+++	++	+	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+++	++	-	-
<i>Fusarium culmorum</i>	+++	++	+	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+++	++	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	++	+	+
<i>Trichoderma harzianum</i>	+++	++	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+++	++	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	+++	++	-	-
<i>P. italicum</i> var. <i>italicum</i>	+++	++	+	-
<i>Absidia blakesleeana</i>	+++	++	+	+
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i>	+++	++	+	-
<i>Glomerella cingulata</i>	+++	++	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+++	++	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+++	-	-	-
<i>Alternaria eureka</i>	+++	++	+	-

Yapılan literatür taramalarında metabolik çeşitlilik, enzim aktivitesi (özellikle oksidazlar, redüktazlar, hidrolazlar gibi enzimlerin varlığı ve aktiviteleri), küflerin biyotransformasyon süreçlerinde kullanılacak substratla uyumluluğu ve kültür koşulları (küflerin optimum büyüme koşullarında dönüşüm yapabilmesi ve süreçlerin tekrar edilebilmesi) gibi parametreler dikkate alınmıştır (Zhao ve ark., 2023; Liang ve ark., 2021)

Biyokimyasal değişikliğe uyum sağlayabilen ve çeşitli enzim sistemlerine sahip önceki çalışmalarda farklı substratlar ile özellikle terpenler ile metabolit elde edilebilmiş ve aynı zamanda çay ağacı uçucu yağını 1 µL/mL ve 2 µL/mL dozlarda tolere edebilen *Penicillium italicum* var. *italicum*, *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Alternaria eureka* ve *Fusarium culmorum* küflerine öncelik verilmiştir.

4.3 Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyonu

4.3.1 Ön tarama sonuçları

Seçilen 15 farklı mikroorganizma ile yürütülen biyotransformasyon çalışmalarında 1. 3., 7. 10. ve 14. günlerde alınan örneklerle yapılan İTK'lar karşılaştırılarak mikroorganizmaların metabolit oluşturup oluşturmadıkları ve birbirlerinden farklı metabolitlerin farklılığı göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır. *Penicilium italicum* var. *italicum* için 7. günde en yoğun metabolit oluşumu gözlenirken, *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Alternaria eureka* ve *Fusarium culmorum* suşları için 10. Gün oluşan metabolit çeşitliliğinin ve yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

4.3.2 *Melaluca alterniafolia* uçucu yağının mikrobiyal transformasyonu

TTO'nun besiyerinde 10. günün sonundaki değişimi ve küflerle belirtilen sürelerdeki inkübasyonları sonucu elde edilen ekstratlar ile küf kontrolleri gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen ekstratların bileşimlerinin değişimi Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3

Çay Ağacı Uçucu Yağı ile Yapılan Biyotransformasyon Sonucu Ana Bileşenlerin 10. Gün Sonundaki Durumları

RRI	Bileşik	TTO	BY +TTO	F93 +TTO	F72 +TTO	F135 +TTO	F24 +TTO
927	α -Pinen	+	-	-	-	-	-
961	Sabinen	+	-	-	-	-	-
1005	α -Terpinen	+	-	-	-	-	-
1009	p-Simen	+	-	-	-	-	-
1017	1,8-Sineol	+	-	-	-	-	-
1021	Limonen	+	-	-	-	-	-
1054	γ - Terpinen	+	-	-	-	-	-
1061	Terpinen 4-ol	+	+	+	+	+	+
1079	Terpinolen	+	-	-	-	-	-
1169	α -Terpineol	+	+	+	+	-	+
1423	Aromadendren	+	-	-	-	-	-

Not*:BY: besiyeri , F93: *Aspergillus terreus* var. *africanus*, F72: *Penicilium italicum* var. *italicum*, F135: *Alternaria eureka*, F24: *Fusarium culmorum*, RRI: Relative retention index

4.3.2.1 Biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler

Tablo 4.4’de biyotransformasyon süreçleri sonucunda elde edilen metabolitlerin GK/KS sonuçlarına göre relatif miktarları, tutunma zamanları ve relatif tutunma indeksleri gösterilmiştir.

Tablo 4.4

Çay Ağacı Uçucu Yağının Biyotransformasyonu Sonucu Oluşan Metabolitler ve GK/KS İle Belirlenen Relatif % Miktarları

Mikroorganizma	Metabolit	RRI	Rt(dk)	BP (m/z)	(m/z) ^a	%	Kütle Spektrumu
<i>Alternaria eureka</i> +TTO	M-1	1189	20,3	108	170	%1	Şekil 4.2
	M-2	1239	22,2	43	170	%3	Şekil 4.3
	M-3	1268	23.4	74	170	%10	Şekil 4.5
	M-4	1275	23,7	97	170	%3	Şekil 4.6
	M-5*	1358	26.8	109	184	%16	Şekil 4.7
	M-6	1425	29,2	71	168	%11	Şekil 4.10
	M-7*	1459	30,3	127	188	%31	Şekil 4.12
	M-8	1594	34,6	123	184	%8	Şekil 4.15
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanus</i> +TTO	M-9	1236	22.1	109	170	% 2,35	Şekil 4.17
	M-5	1358	26.6	109	184	% 3,25	Şekil 4.18
	M-10	1419	29,0	69	170	% 5,74	Şekil 4.19

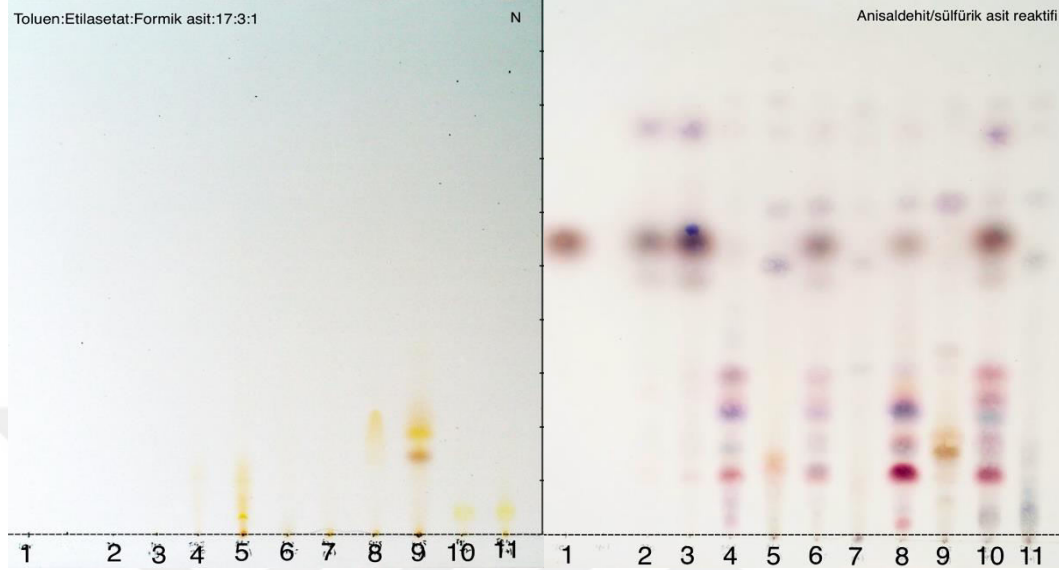
Not*:RT: alıkonma zamanı, dk: dakika, BP: temel pik, ^aspektrumda gözlenen en ağır m/z değeri %: yapılan analiz ortalamalarının göreceli yüzde miktarı (%1’den düşük olan metabolit oluşumları dikkate alınmamıştır.) *: NMR analizi yapılan metabolitler

Terpinen-4-ol standardı, çay ağacı uçucu yağı, 10 gün süresince uçucu yağın besiyerindeki değişimlerinin gözlenmesi için aynı şartlarda inkübasyona bırakılmış ve ekstre edilmiş çay ağacı uçucu yağı kontrolü, biyotransformasyon süreçleri sonunda metabolitleri içeren ekstreler ve küf kontrol ekstreleri 10 mg tartılarak aseton ile son konsantrasyon 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile gün ışığında ve anisaldehit/sülfürik asit reaktifi püskürtülmesi sonrası (Görsel 4.2), UV 254 ve 366 nm’de (Görsel 4.3) ve anisaldehit/sülfürik asit reaktifi püskürtülmesi sonrası 366 nm’de (Görsel 4.4) incelenerek oluşan metabolitlerin kontrolleri sağlanmış, küf

ekstreleri ve çay ağacı uçucu yağı kontrol ekstreleri ile karşılaştırılmıştır.

Görsel 4.2

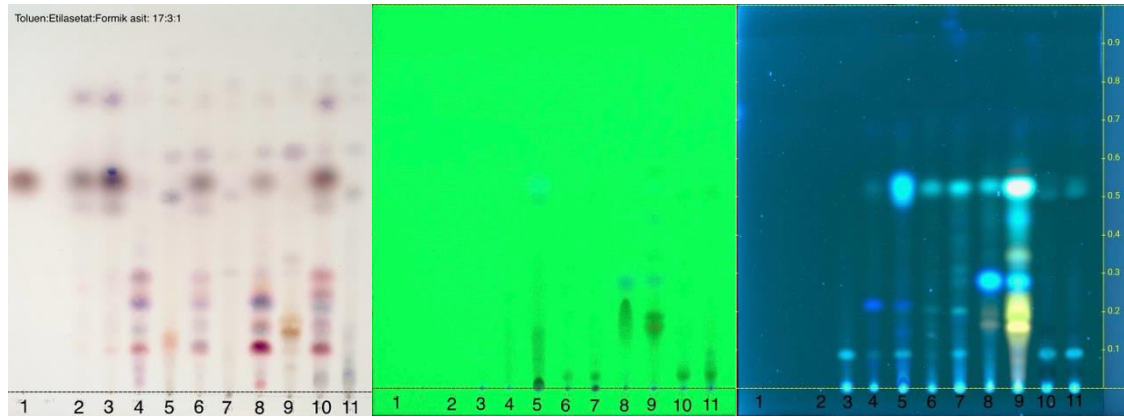
İTK Plaklarının Anisaldehit/Sülfürik Asit Reaktif Püskürtülmeden Öncesi ve Sonrası



Not*:1: Terpinen-4-ol, 2: TTO, 3: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, 4: *Aspergillus terreus* var. *africanus* metabolitleri 5: *Aspergillus terreus* var. *africanus* küf kontrolü, 6: *Penicilium italicum* var. *italicum* metabolitleri, 7: *Penicilium italicum* var. *italicum* küf kontrolü, 8: *Alternaria eureka* metabolitleri, 9: *Alternaria eureka* küf kontrolü, 10: *Fusarium culmorum* metabolitleri, 11: *Fusarium culmorum* küf kontrolü

Görsel 4.3

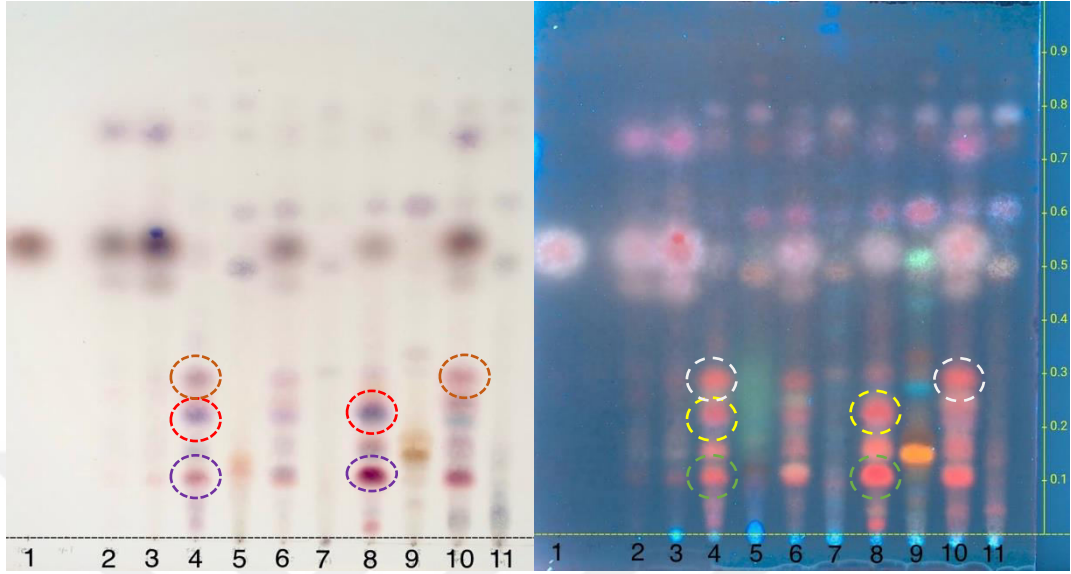
Fungusların Ürettikleri Metabolitlerin Gün Işığında, 254 ve 366 nm'de İTK ile Karşılaştırılması



Not*:1: Terpinen-4-ol, 2: TTO, 3: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, 4: *Aspergillus terreus* var. *africanus* metabolitleri 5: *Aspergillus terreus* var. *africanus* küf kontrolü, 6: *Penicilium italicum* var. *italicum* metabolitleri, 7: *Penicilium italicum* var. *italicum* küf kontrolü, 8: *Alternaria eureka* metabolitleri, 9: *Alternaria eureka* küf kontrolü, 10: *Fusarium culmorum* metabolitleri, 11: *Fusarium culmorum* küf kontrolü

Görsel 4.4

Fungusların Ürettikleri Metabolitlerin Gün Işığında ve Reaktif Püskürtüldükten Sonra 366 Nm'de İTK ile Karşılaştırılması



Not*:1: Terpinen-4-ol, 2: TTO, 3: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, 4: *Aspergillus terreus* var. *africanus* metabolitleri 5: *Aspergillus terreus* var. *africanus* küf kontrolü, 6: *Penicilium italicum* var. *italicum* metabolitleri, 7: *Penicilium italicum* var. *italicum* küf kontrolü, 8: *Alternaria eureka* metabolitleri, 9: *Alternaria eureka* küf kontrolü, 10: *Fusarium culmorum* metabolitleri, 11: *Fusarium culmorum* küf kontrolü

Fungusların pH 6'da benzer metabolitler ürettikleri kütle spektrometrisi verileri ile tespit edilmiştir. Aktivite deneyleri ve yapı tayini için *Alternaria eureka* (Görsel 4.5) ve *Aspergillus terreus* var. *africanus*'dan (Görsel 4.6) elde edilen metabolitler izole edilmiştir. Gaz kromatografisi ile saptanan metabolitler 10 mg/mL dozlarında tartılarak ince tabaka kromatografisi küf kontrolleri ve yağın kendisi ile karşılaştırılarak ile kontrol edilmiştir.

Görsel 4.5

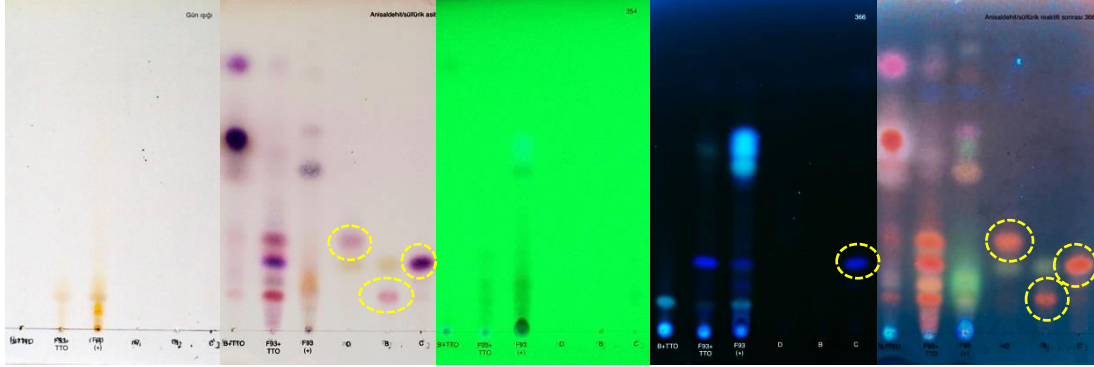
Alternaria eureka ile Elde Edilen Metabolitler



Not*: B+TTO: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, F135: TTO'nun *Alternaria eureka* küf ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstre, F135(+): *Alternaria eureka* küf kontrolü, A: M-1 metaboliti, B: M-7 metaboliti, C: M-5 metaboliti

Görsel 4.6

Aspergillus terreus var. *africanus* ile Elde Edilen Metabolitler



Not*: B+TTO: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, F93: TTO'nun *Aspergillus terreus* var. *africanus* küfö ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstre, F93(+): *Aspergillus terreus* var. *africanus* küfö kontrolü, D: M-3 metaboliti, B: M-7 metaboliti, C: M-5 metaboliti

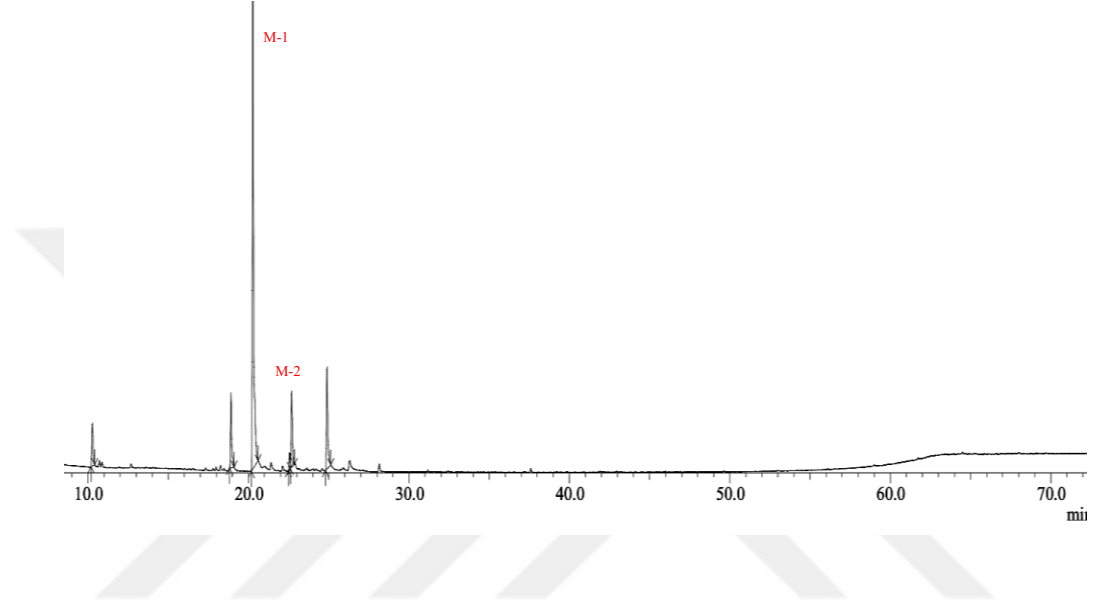
Çay ağacı uçucu yağı ile gerçekleştirilen mikrobiyal transformasyon sonuçlarına göre *Alternaria eureka* (135) ve *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93) funguslarının M5 ve M7 metabolitlerini yüksek oranlarda ürettikleri belirlenmiştir. *Alternaria eureka* fungusuna ait ekstreten M5 ve M7 metabolitleri kolon kromatografisi ve preparatif İTK ile 10 mg izole edilerek saflık kontrolleri yapılmış ve ekstredeki diğer majör metabolitler ile birlikte GK/KS ile kütle spekturumları alınmıştır. Daha sonra izole edilen maddelerden M5, dötero-kloroform (CDCl₃), M7, dötero-dimetilsülfoksit (CD₃-SO-CD₃ ile çözülerek ¹H ve ¹³C-NMR ve 2D-(COSY, HSQC, HMQS ve HMBC) NMR spekturumları çekilmiştir.

4.3.2.1.1 *Alternaria eureka* ile elde edilen metabolitlerin kromatogramları ve spektrografik verileri

Çay ağacı uçucu yağının *Alternaria eureka* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit fraksiyonlarına ait kromatogramlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Şekil 4.1

Alternaria eureka ile Elde Edilen Metabolit Fraksiyonlarının Kromatogramı



M-1 metabolitinin spektral verileri

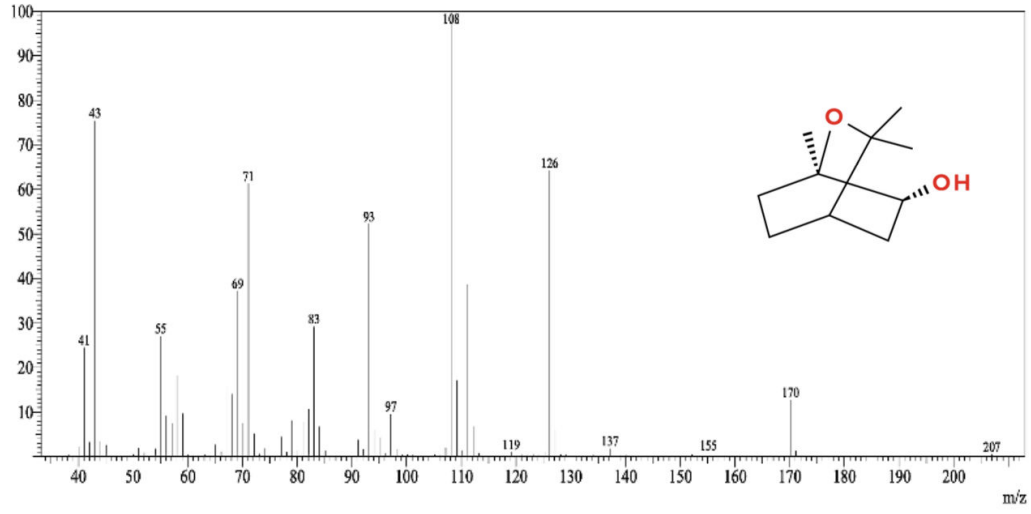
M1 metabolitinin spekturumu NIST ve Başer kütüphanesi ve literatür verileri ile karşılaştırılmış ve 2-hidroksi-1,8-sineol olduğu gösterilmiştir.

2-hidroksi-1,8-sineol EI/MS m/z: 170(12)[M]⁺ 126 (63), 108 (100), 97(10), 93(52), 83(29), 71 (61), 69(37), 55(27), 43(76)

2-ekso-hidroksi-1,8-sineol'ün *Vitis vinifera* bitkisinin 'Sauvignon' çeşidinin meyvelerinde doğal olarak bulunmakta ve (+)-(R)- α -terpineolün asit katalizörlüğündeki epoksidasyonu ile elde edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Bitteur ve ark., 1990). Literatürde 1,8-sineol açısından zengin *M. linariifolia* ile beslenen böcek türleri ile yapılan çalışmada (Southwell ve ark., 2003) ve α -terpineol'den hareketle *Giberella cynaea* DSM 62719 ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında 2-hidroksi-1,8-sineol elde edildiği gösterilmiştir (Abraham ve ark.,1986).

Şekil 4.2

M-1 Metabolitinin Kütle Spektrumu

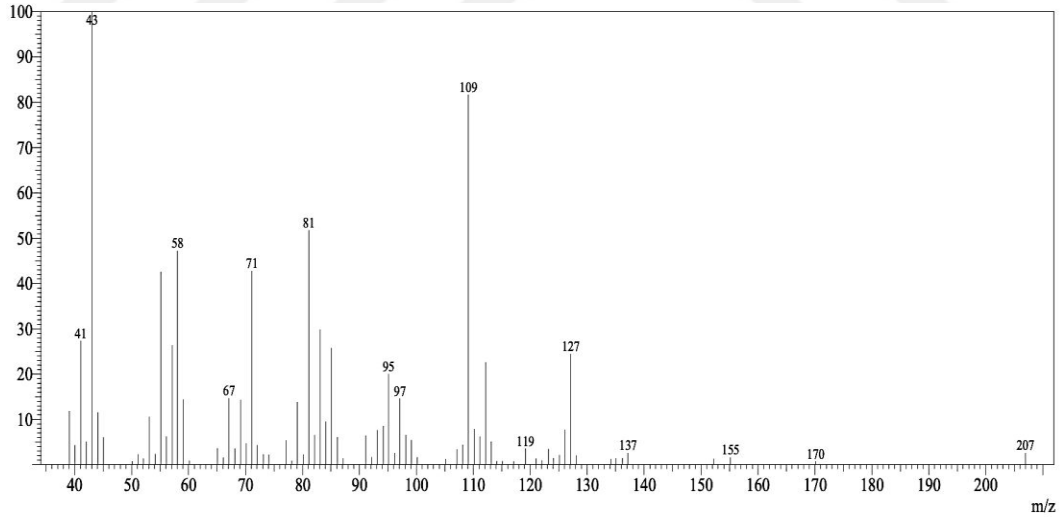


M-2 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170(1)[M]⁺ 155(1) 137(3), 127 (22), 109(79), 95(9), 83(30), 81(51), 71(42), 67(15), 58(46), 43(100), 41(26)

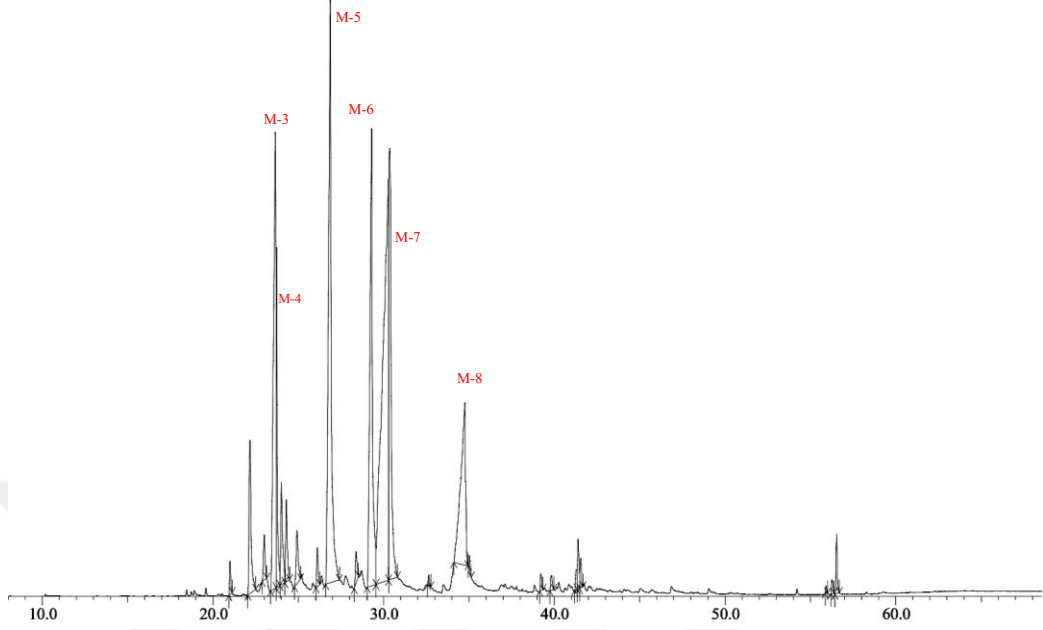
Şekil 4.3

M-2 Metabolitinin Kütle Spektrumu



Şekil 4.4

Alternaria eureka ile Elde Edilen Metabolit Fraksiyonlarının Kromatogramı

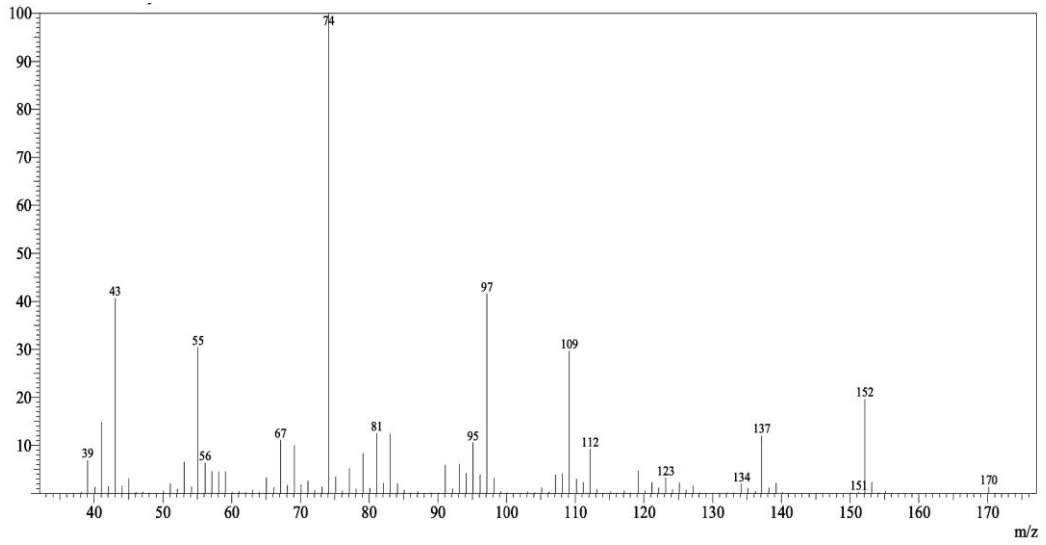


M-3 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170(1) $[M]^+$, 152(20), 137(12), 123 (3), 112(7) 109(30), 97(40), 81(13), 74(100), 55(30), 43(40), 41(14)

Şekil 4.5

M-3 Metabolitinin kütle spektrumu

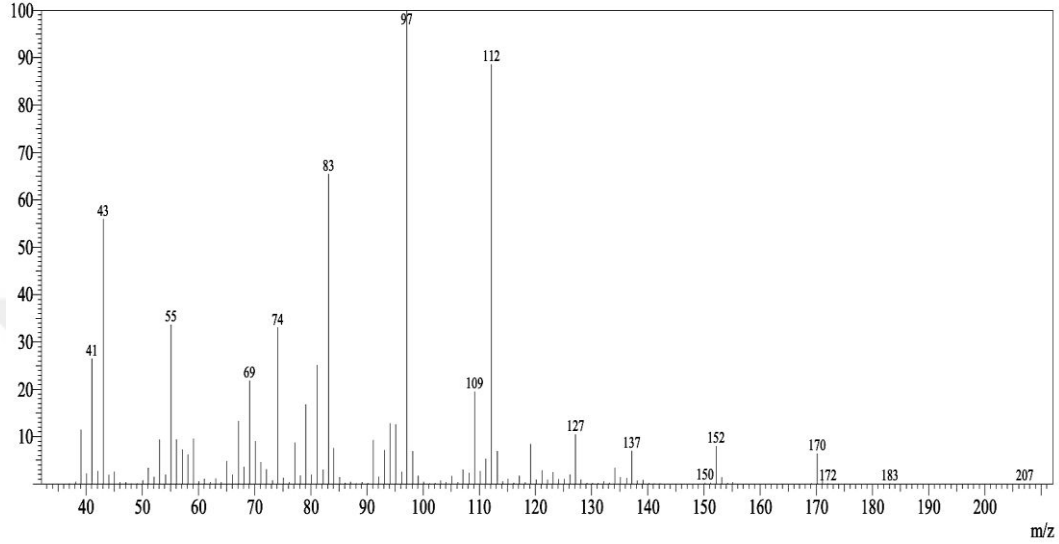


M-4 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170 (6)[M]⁺, 152(8), 137(7), 127(10), 112(89), 109(20), 97(100), 83(65), 74(33), 69(22), 55(34), 43(56), 41(26)

Şekil 4.6

M-4 Metabolitinin Kütle Spektrumu



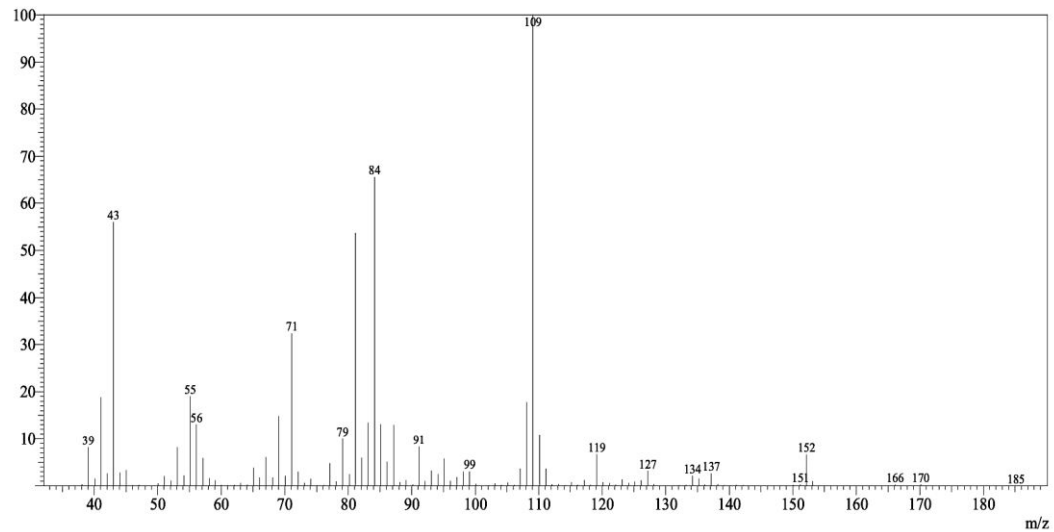
M-5 metabolitinin spektral verileri

M5 metabolitinin kütle spektrumu (Şekil 4.7) ve NMR analizine ait spektral verileri Tablo 4.5'te verilmiştir.

EI/MS m/z: 170(1)[M]⁺ 152(7), 137(3), 127(3) 119 (7), 109(100), 91(8), 84(65), 81(54), 71(32), 55(19), 43(56), 41(19)

Şekil 4.7

M-5 Metabolitinin Kütle Spektrumu



Tablo 4.5*M5 Metabolitinin ¹³C (100 MHz) ve ¹H (400 MHz) NMR Spektroskopik Verileri* (Kloroform)*

Pozisyon	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), J (Hz)
1 (C)	129.25 s	-
2 (CH)	139.56 d	7.04
3 (CH ₂)	37.0	1.72 (m, 1H) 1.76 (M, 1H)
4 (C)	71.72	-
5 (CH ₂)	30.93	1.9 (m, 1H) 2.0 (m, 1H)
6 (CH ₂)	16.75	2.47 (m, 1H) 2.34 (m, 1H)
7 (CH ₃)	163.92	-
8 (CH)	35.3	1.72 (m, 1H)
9 (CH ₃)	20.92	0.94 (s, 3H)
10 (CH ₃)	20.0	0.98 (s, 3H)

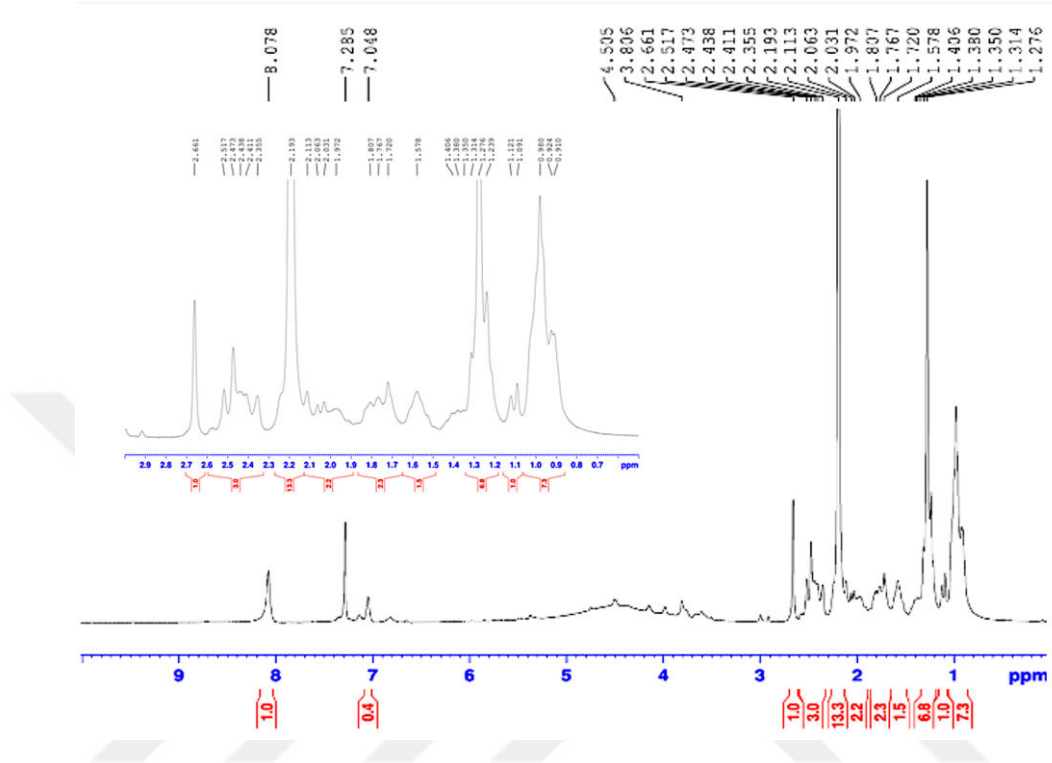
*M5 metabolitine ait HMBC, COSY ve HSQS spektrumları **EKLER** kısmında verilmiştir.

Literatürde α -terpineol'ün *Alternaria alternata* ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında 4*R*-oleuropeik asit oluşumu gösterilmiştir (Mei ve ark., 2020). 4*R*-oleuropeik asit molekülündeki hidroksil 8. karbondaki bulununmaktadır. NMR spektrumları karşılaştırıldığında yapının benzer olduğu görülmekle birlikte M5 metabolitinin yapısındaki hidroksilin bağlı olduğu karbon kesin olarak tayin edilememiştir. Bu maddenin yapı tayininin gerçekleştirilmesi için çalışmalarımız sürmektedir.

^1H NMR

Şekil 4.8

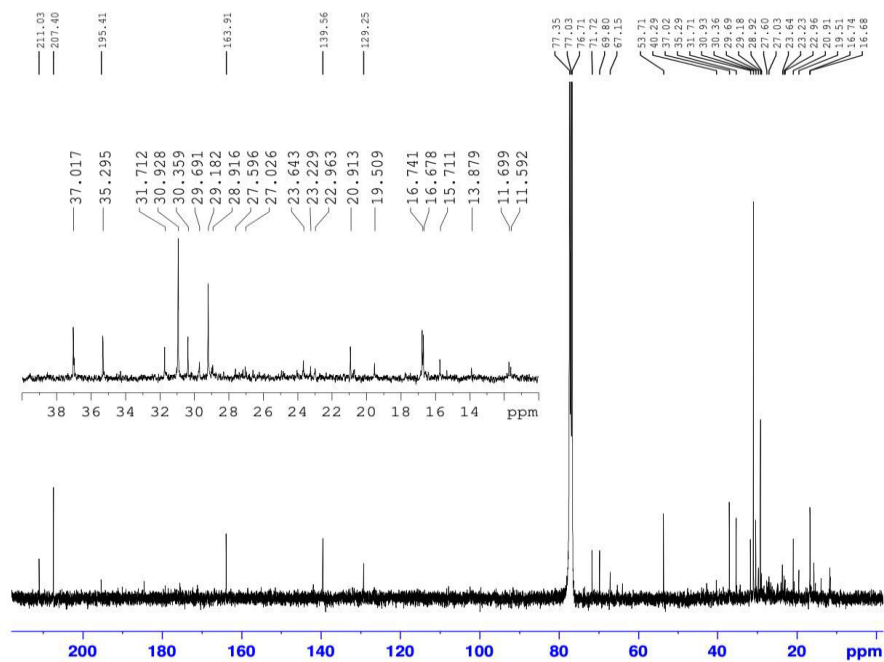
M-5 Metabolitinin ^1H NMR Spektrumu



^{13}C NMR

Şekil 4.9

M-5 Metabolitinin ^{13}C NMR Spektrumu

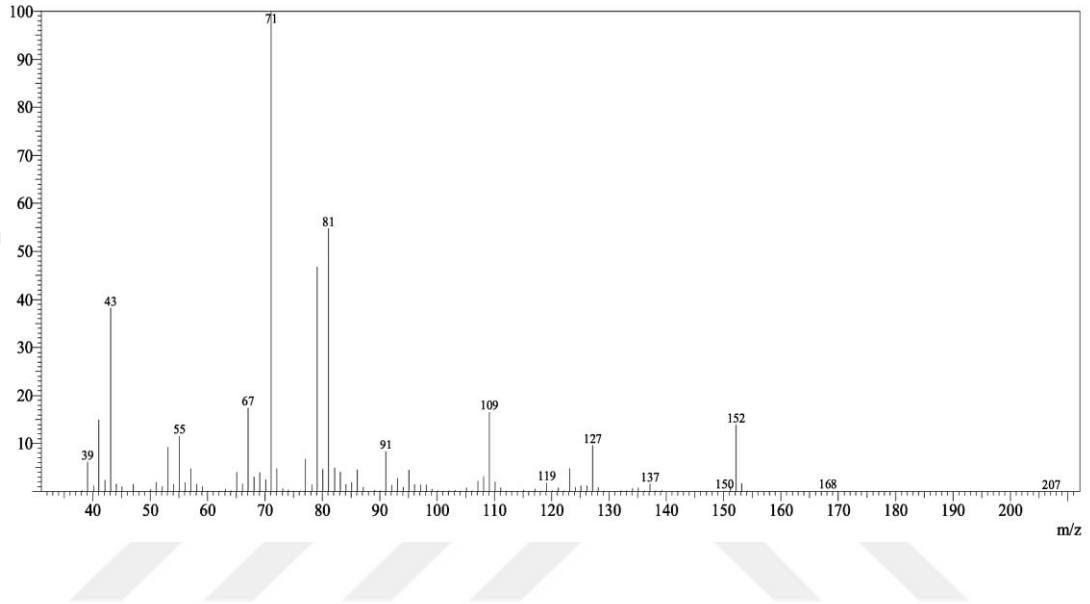


M-6 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 168(1)[M]⁺ 152(14), 127(10) 119 (2), 109(16), 91(8), 81(54),79(47), 71(100), 67(18), 55(11), 43(38), 41(15)

Şekil 4.10

M-6 Metabolitinin Kütle Spektrumu

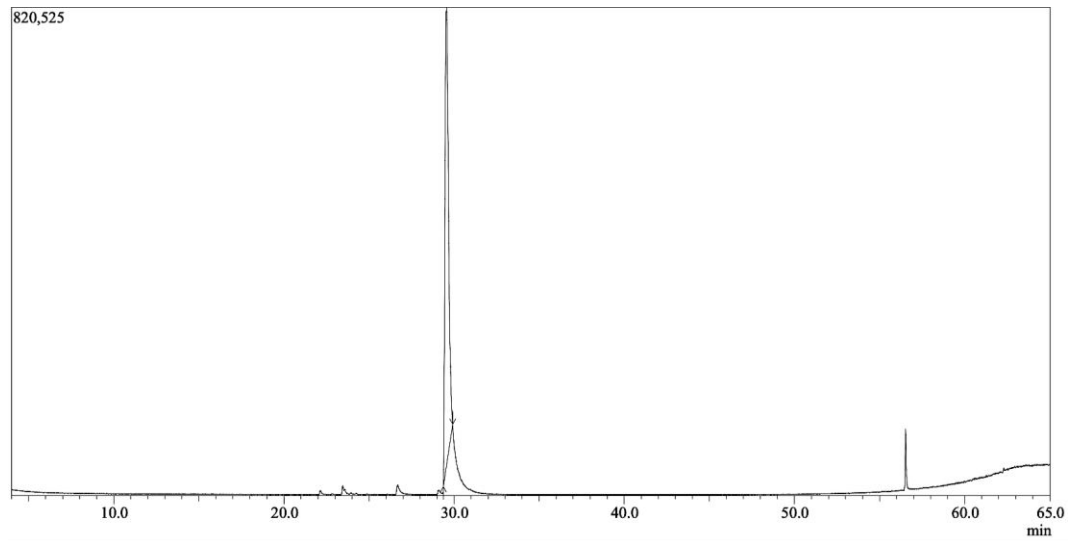


M-7 metabolitinin kromatogramı

Kristal olarak elde edilen M7 metabolitinin kromatogramı Şekil 4.11’de verilmiştir.

Şekil 4.11

M-7 Metabolitinin Kromatogramı



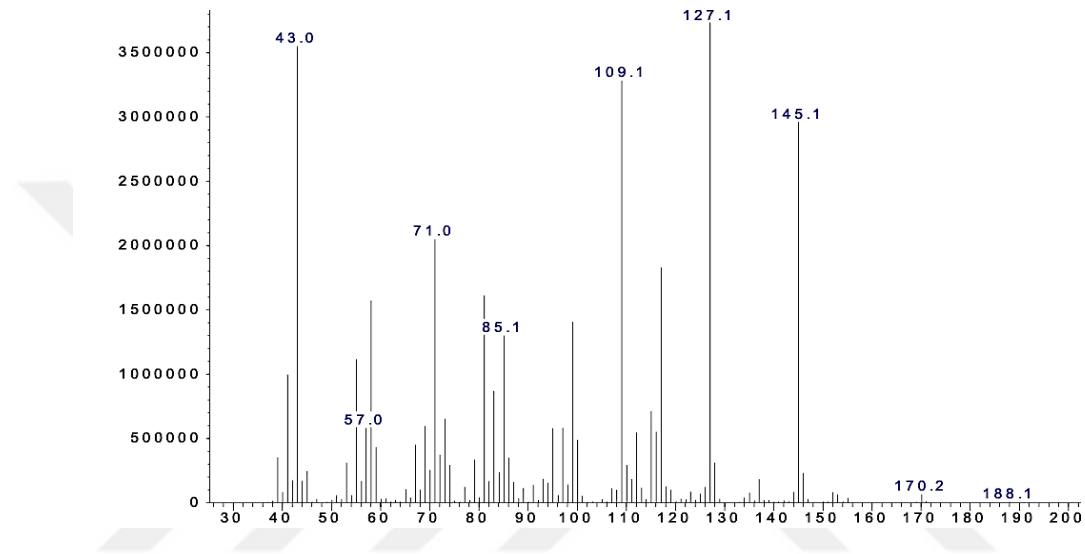
M-7 metabolitinin spektral verileri

M7 metabolitinin kütle spektrumu Şekil 4.12’de ve NMR analizine ait spektral verileri Tablo 4.6’da verilmiştir

***p*-mentan-1,2,4-triol EI/MS m/z:** 188(1) [M]⁺ 170(2), 145(87), 127 (100), 117(37), 109(91), 99(35), 95(15), 85(42), 81(47), 71(47), 57(39), 55(32) 43(96)

Şekil 4.12

M-7 Metabolitinin Kütle Spektrumu



Literatürde *p*-mentan-1,2,4-triol bileşiğinin doğal olarak *Zingiber mekongense* bitkisinin rizomlarından elde edildiği rapor edilmiştir (Chareonkla ve ark., 2011). Ayrıca terpinen-4-ol'den hareketle *Giberella cyanea* DSM 62719 ile biyotransformasyon süreçleri sonucu *p*-mentan-1,2,4-triol elde edildiği gösterilmiştir (Abraham ve ark, 1986)

Tablo 4.6*M7 Metabolitinin ^{13}C (100 MHz) ve ^1H (400 MHz) NMR Spektroskopik Verileri* (DMSO- d_6)*

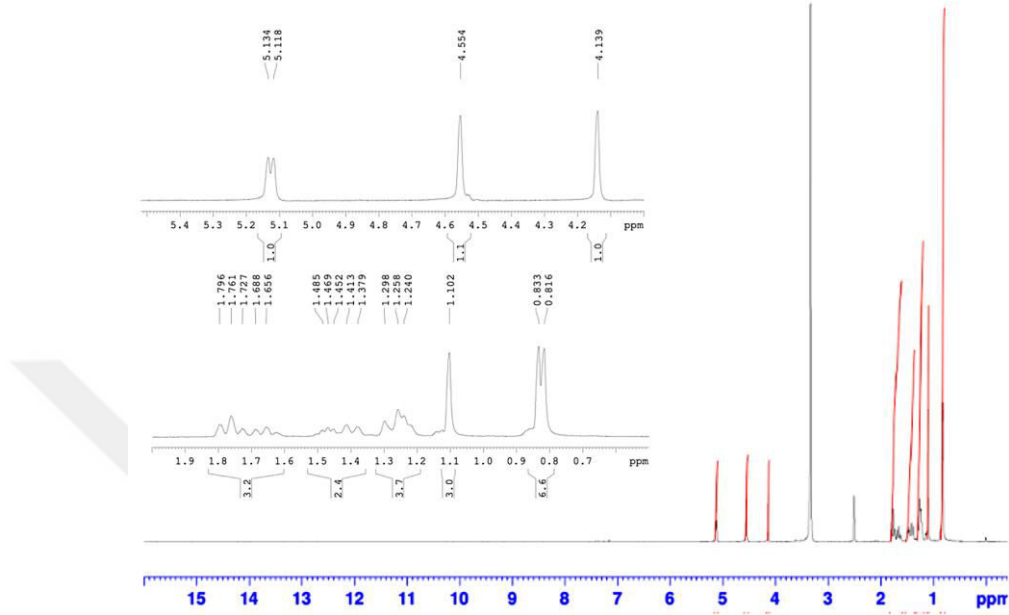
Pozisyon	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)
1 (C)	70.3	-
2 (CH)	74.2	3.33 ^a
3 (CH ₂)	34.4	1.78 gd (13.7) 1.40 gd (13.7)
4 (C)	73.5	-
5 (CH ₂)	29.9	1.74 ^a 1.27 ^a
6 (CH ₂)	29.7	1.65 t (13.0) 1.24 ^a
7 (CH ₃)	27.5	1.10 s
8 (CH)	37.8	1.47 m
9 (CH ₃)	17.3	0.83 d (6.7)
10 (CH ₃)	17.3	0.83 d (6.7)
1-OH	-	4.14 s
2-OH	-	5.13 d (6.4)
4-OH	-	4.55 s

^aÇakışan sinyaller; *M7 metabolitine ait HMBC, COSY ve HSQS spektrumları **EKLER** kısmında verilmiştir.

^1H NMR

Şekil 4.13

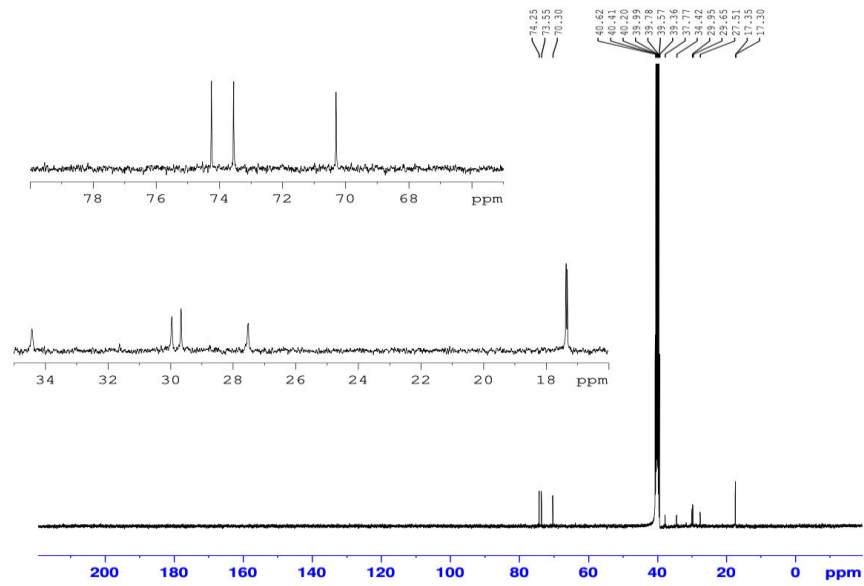
M-7 Metabolitinin ^1H NMR Spektrumu



^{13}C NMR

Şekil 4.14

M-7 Metabolitinin ^{13}C NMR Spektrumu

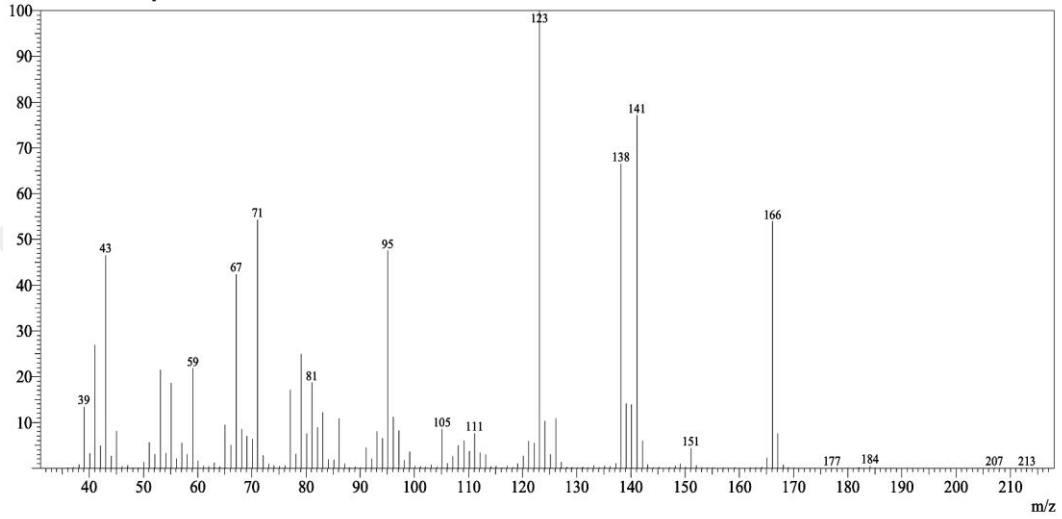


M-8 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 184(1)[M]⁺·166(54), 151(4), 141 (76), 138(67), 123(100), 111(8), 95(47), 81(19), 71(53), 67(42), 59(22) 43(46), 41(27)

Şekil 4.15

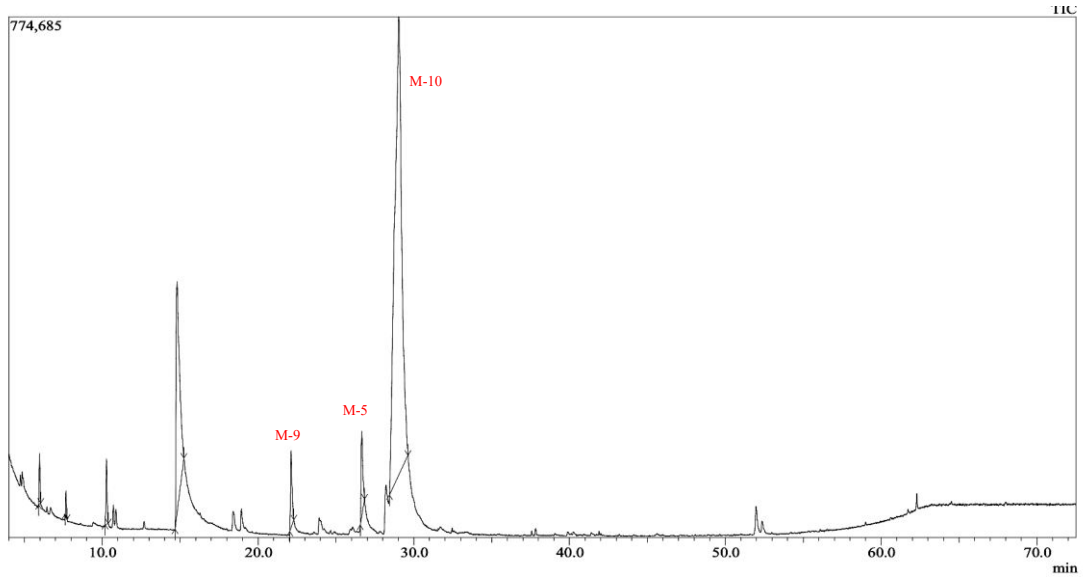
M-8 Metabolitinin Kütle Spektrumu



4.3.2.1.2 Aspergillus africanus var. africanus ile elde edilen metabolitlerin kromatogramları ve spektrografik verileri

Şekil 4.16

Aspergillus africanus var. africanus Küfünden Elde Edilen Metabolit Fraksiyonunun Kromatogramı

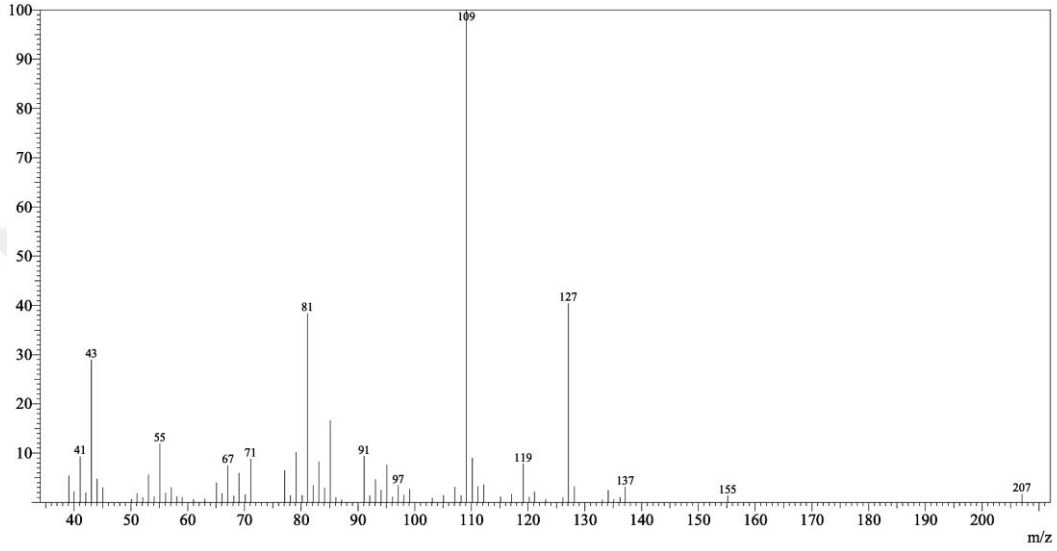


M-9 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170(1) [M]⁺ 155(), 127 (40), 119(8), 109 (100), 91(9), 85(17), 81(38), 71(9), 55(12), 43(29)

Şekil 4. 17

M-9 Metabolitinin Kütle Spektrumu

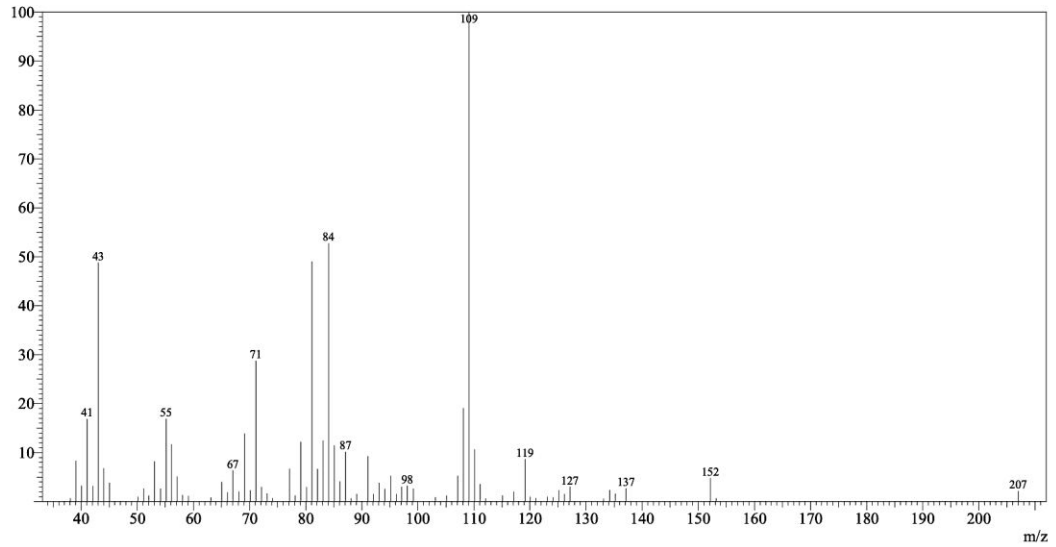


M-5 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170 (1)[M]⁺ 137 (3), 127 (39), 119(), 109 (100), 87(10), 84(53), 81(49), 71(29), 55(17), 43(48)

Şekil 4.18

M-5 Metabolitinin Kütle Spektrumu

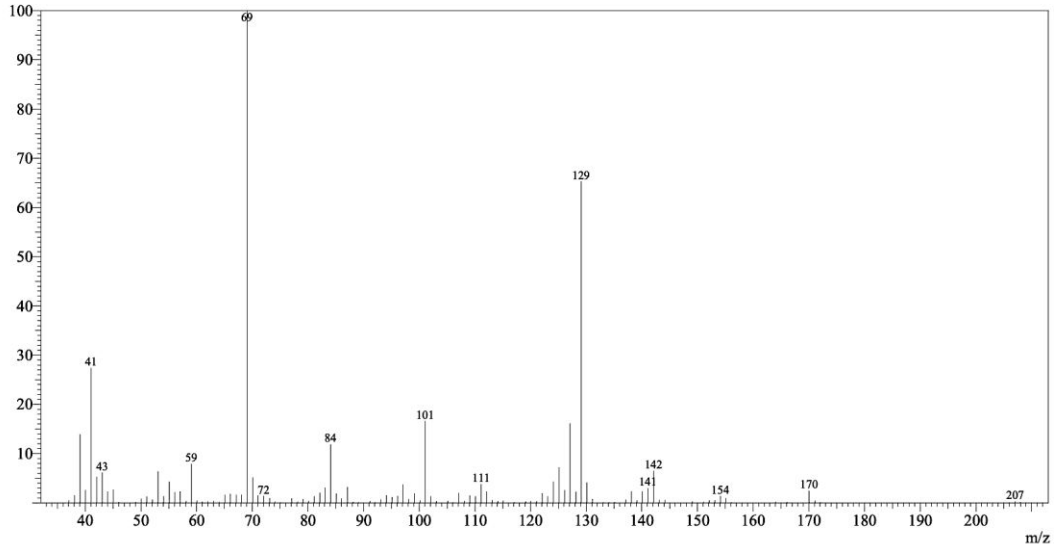


M-10 metabolitinin spektral verileri

EI/MS m/z: 170 (2)[M]⁺ 142 (7), 129 (62), 127(16), 101(16), 84(12), 69(100), 59(8), 41(27)

Şekil 4. 19

M-10 Metabolitinin Kütle Spektrumu



Biyotransformasyon çalışmaları ile 10 metabolit elde edilmiştir. M1, M5 ve M7 metabolitlerinin yapıları aydınlatılmıştır. Miktarlarının yetersiz olması nedeniyle 7 metabolit için yapı tayini çalışmaları yapılamamıştır.

4.4 Biyolojik Aktivite Sonuçları

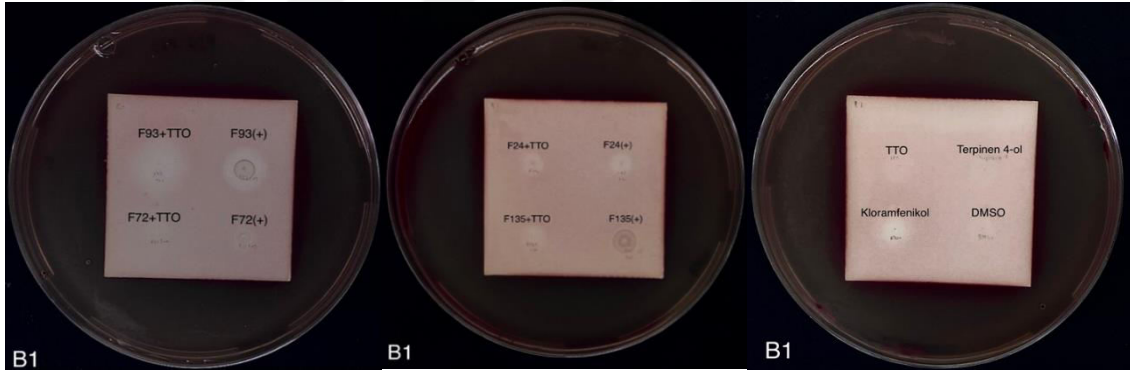
4.4.1 Ekstrelerin antibakteriyel aktivite sonuçları

4.4.1.1 Biyootografi dot-blot yöntemi antibakteriyel etkinin gösterilmesi

Çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstrelerin antibakteriyel etkileri biyootografi dot-blot tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. 20 mg/mL dozlarda hazırlanan ekstrelerin, çay ağacı uçucu yağının ve terpinen-4-ol'ün Gram negatif *E. coli* ve Gram pozitif *S. aureus* suşların karşı aktivitelerini gösteren ön değerlendirme sonuçları Görsel 4.7 ve Görsel 4.8'de gösterilmiştir. Kloramfenikol 128 µg/mL dozda uygulanmıştır

Görsel 4.7

Ekstrelerin Biyootografi-Dot Blot Yöntemi ile E. Coli'ye Karşı Antibakteriyel Aktivitelerinin Test Edilmesi



Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

Görsel 4.8

Ekstrelerin Biyootografi-Dot Blot Yöntemi ile S. aureus'a Karşı Antibakteriyel Aktivitelerinin Test Edilmesi



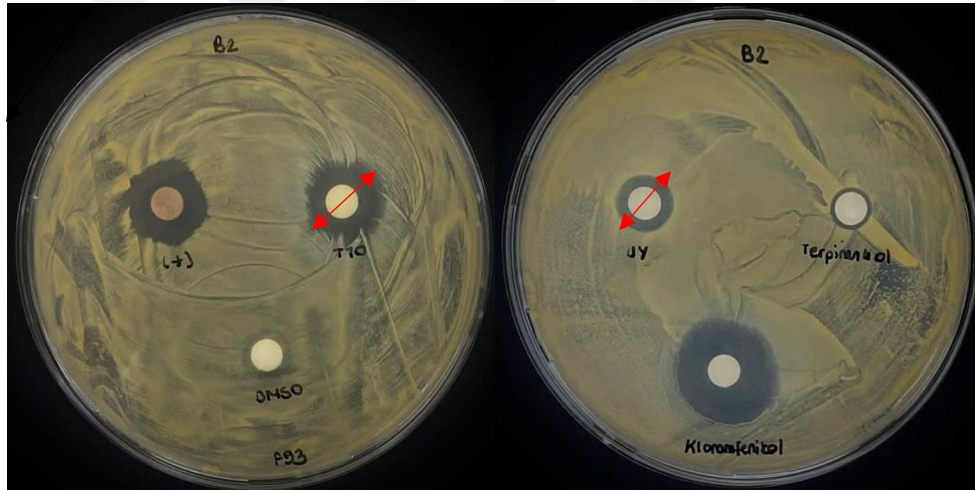
Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

4.4.1.2 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Biyotransformasyon reaksiyonları sonucu elde edilen ekstrelerin ön tarama amacıyla 4 farklı bakteri suşuna karşı antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. 20 mg/mL dozlarda hazırlanan ekstrelerin, çay ağacı uçucu yağının ve terpinen-4-ol'ün bakterilere karşı oluşturdukları zon çapları (mm) Tablo 4.5'de verilmiştir. *Aspergillus africanus* var. *africanus* (F93) fungus kontrolünün bakterilere karşı biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstrelerden daha fazla inhibe edici etkilere sahip olduğu ancak *Aspergillus africanus* var. *africanus* (F93) ve *Altenaria eureka* (F135) biyotransformasyon ekstrelerinin Gram (-) *E. coli* NRRL B-3008 ve Gram (+) *S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* ATCC 12228 karşı TTO'dan ve terpinen-4-ol'den daha etkili olduğu gösterilmiştir (Görsel 4.9).

Görsel 4.9

Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkisi Olan Ekstrelerin Belirlenmesi



Tablo 4.7

Ekstrelerin Bakteri Suşlarına Karşı Oluşturdukları Zone Çapları (Mm)

Zone çapı	<i>E. coli</i> NRRL B-3008	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. marcescens</i> NRRL B-2544	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
F93+TTO	12	14	12	12,5	8
F93	17	16	18	8	8,5
F72+TTO	7	13	8	7,5	8
F72	-	8,5	-	-	-
F135+TTO	12	12	13	10	8,5

(Devam) Ekstrelerin Bakteri Suşlarına Karşı Oluşturdıkları Zone Çapları (Mm)

F135	8	10	12	8	-
F24+TTO	12	11	11	11	8
F24	10	12	-	-	-
TTO	11	10	12	12,5	7,5
Terpinen 4-ol	13	8,5	7	12	9
Kloramfenikol	21	18	17	15,5	15

Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

4.4.1.3 Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi

Biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstreler, 5 farklı bakteri suşuna karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 3 paralel olarak test edilmiştir. Deney sonucunda elde edilen MİK değerleri $\mu\text{g/mL}$ olarak Tablo 4.6’de verilmiştir. Numuneler için 10 mg/ml, kloramfenikol için 128 $\mu\text{g/mL}$ dozdan başlanarak dilüsyon yapılmıştır (Görsel 4.10). *Aspergillus africanus* var. *africanus* (F93) biyotransformasyon ekstresinin 156 $\mu\text{g/mL}$ ve fungus kontrolünün 78 $\mu\text{g/mL}$ dozda antibakteriyel etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Görsel 4.10

Mikrodilüsyon Yöntemi ile Ekstrelerin Antibakteriyel Etkilerinin Gösterilmesi



Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

Tablo 4.8*Ekstrelerin Bakteri Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları*

(MIC µg/mL)	<i>E. coli</i> NRRL B-3008	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>B. cereus</i> NRRL B-3711
F93+TTO	1250	156*	>2500	156
F93	312,5	78	>2500	78
F72+TTO	2500	625	>2500	625
F72	2500	1250	>2500	>2500
F135+TTO	1250	625	>2500	625
F135	1250	312,5	>2500	156
F24+TTO	>5000	625	>2500	1250
F24	>5000	625	>2500	625
TTO	2500	625	312,5	312,5
Terpinen-4-ol	2500	1250	>2500	1250
Kloramfenikol	8	8	2	8

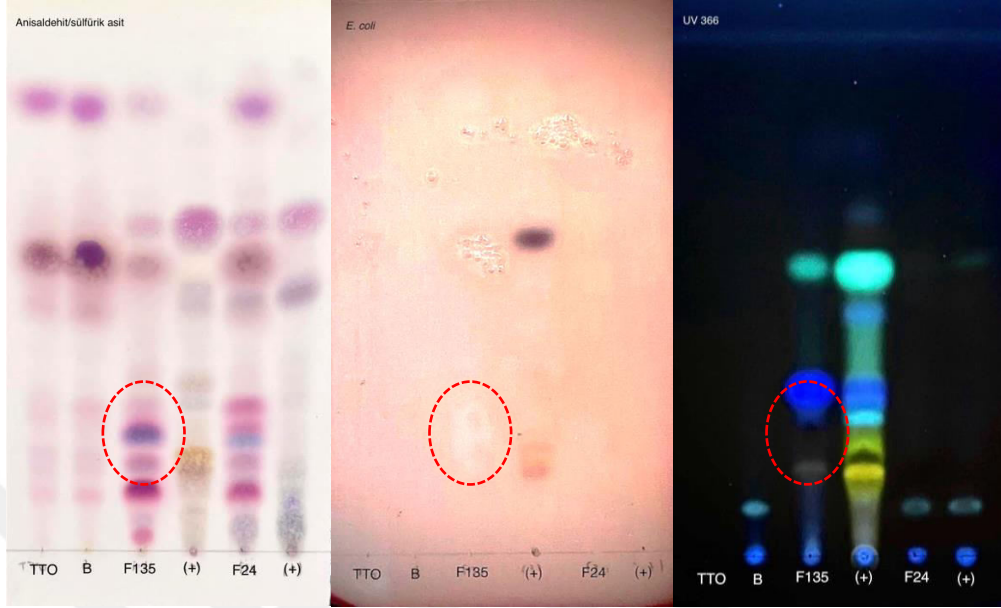
Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

4.4.1.4 Biyootografi yöntemi ile antibakteriyel etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi

Çay ağacı uçucu yağının *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24), fungusu ile yapılan biyotransformasyon süreçleri sonunda besiyerlerinin ekstraksiyonu ile elde edilen metabolit karışımı, fungus kontrolü (belirtilen numaralarının sağında (+)), İTK plakalarına tatbik edilerek toluen:etilasetat:formik asit 17:3:1 mobil fazında yürütülmüştür. Ayrıca çay ağacı uçucu yağının kendisi (TTO) ve besiyerinde çay ağacı uçucu yağının dönüşümü ve değişimini izlemek amacıyla aynı şartlarda inkübasyona bırakılan TTO kontrol erleninin ekstresi (B), plağa tatbik edilerek antibakteriyel etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen metabolitlerin, biyootografi yöntemi ile *E. coli* (Görsel 4.11), *S. aureus* (Görsel 4.12) ve *Bacillus cereus* (Görsel 4.13) suşlarına karşı inhibe edici etkileri gösterilmiştir.

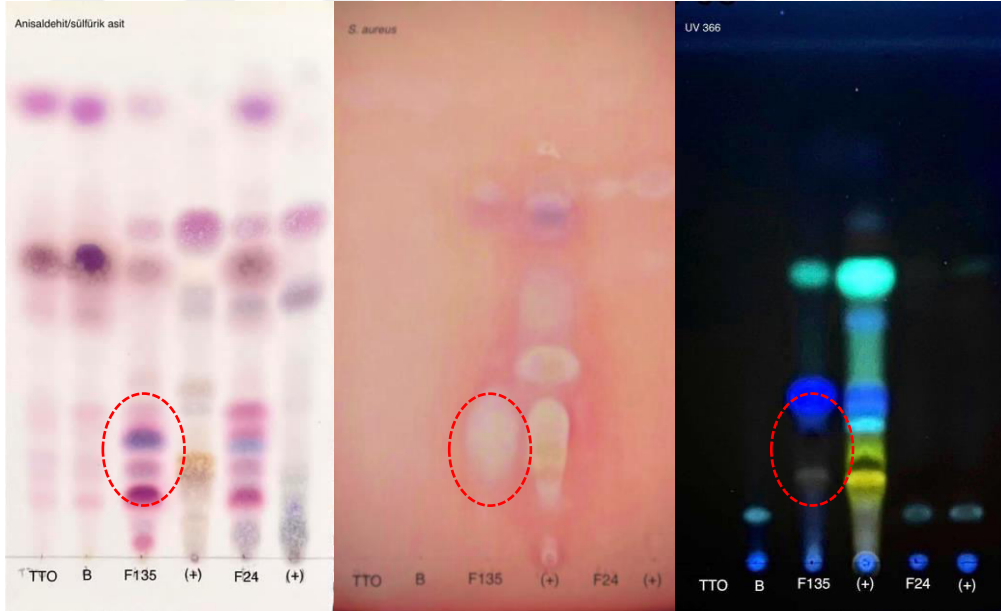
Görsel 4.11

Escherichia coli'ye Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



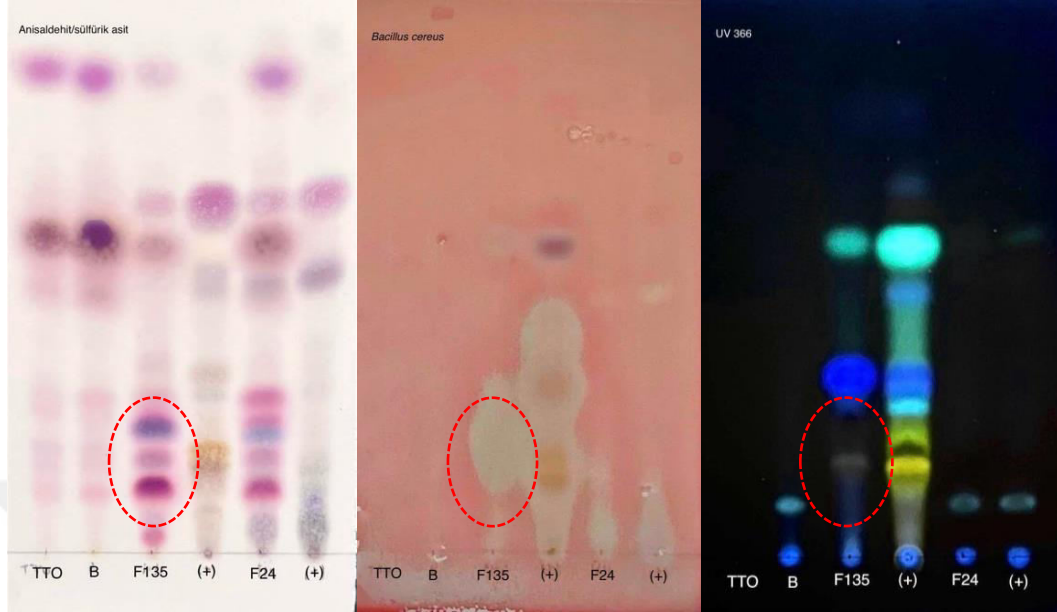
Görsel 4.12

Staphylococcus aureus'a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



Görsel 4.13

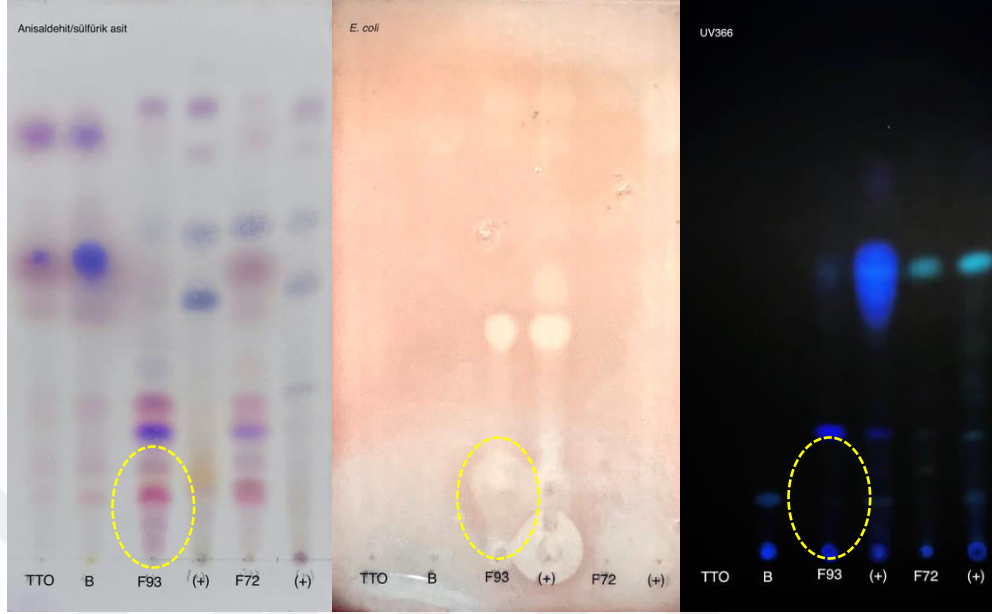
Bacillus cereus'a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



Çay ağacı uçucu yağının *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93) ve *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72) küfü ile yapılan biyotransformasyon süreçleri sonunda besiyerlerinin ekstraksiyonu ile elde edilen metabolit karışımı, küflerin kontrolü (+ ile gösterilmiştir), İTK plakalarına tatbik edilerek toluen:etilasetat: formik asit 17:3:1 mobil fazında yürütülmüştür. Ayrıca çay ağacı uçucu yağının kendisi (TTO) ve besiyerinde çay ağacı uçucu yağının dönüşümü ve değişimini izlemek amacıyla aynı şartlarda inkübasyona bırakılan TTO kontrol erleninin ekstresi (B), plağa tatbik edilerek antibakteriyel aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen metabolitlerin, biyootografi yöntemi ile *E. coli* (Görsel 4.14), *S. aureus* (Görsel 4.15) ve *Bacillus cereus* (Görsel 4.16) suşlarına karşı inhibe edici etkileri gösterilmiştir.

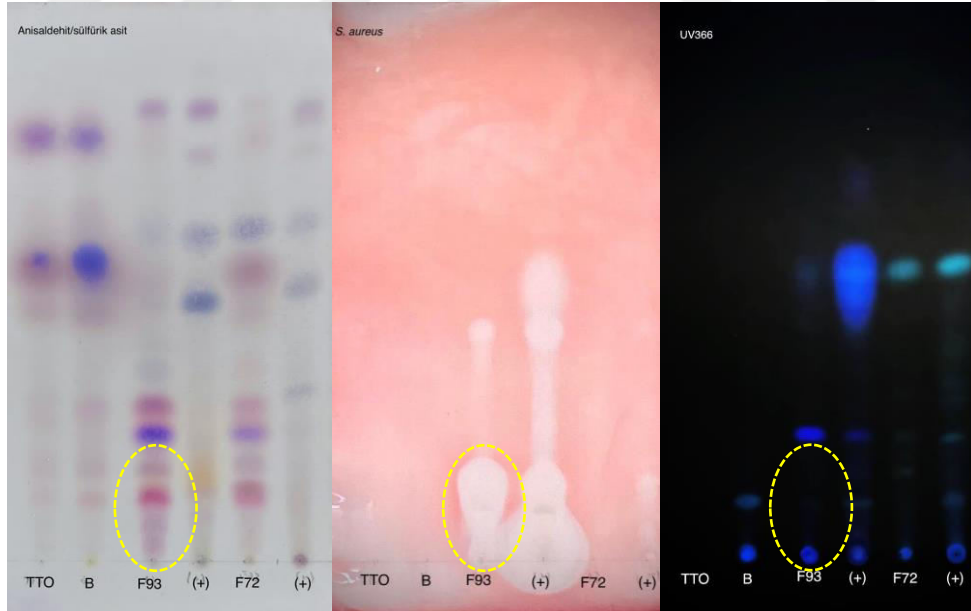
Görsel 4.14

Escherichia coli'ye Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



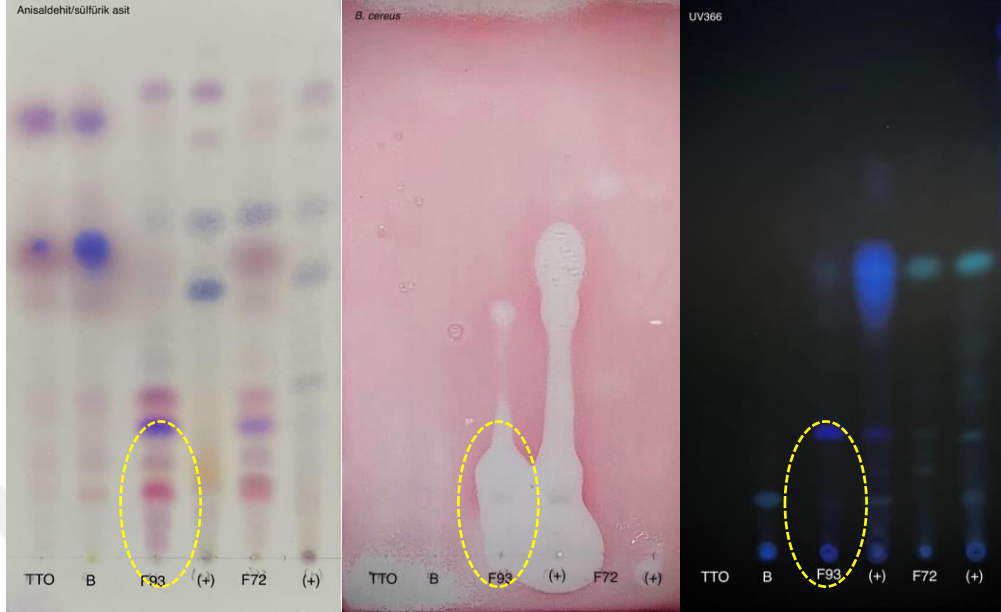
Görsel 4.15

Staphylococcus aureus'a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



Görsel 4.16

Bacillus cereus'a Karşı İnhibitör Etki Gösteren Metabolitlerin Biyootografi Yöntemiyle Belirlenmesi



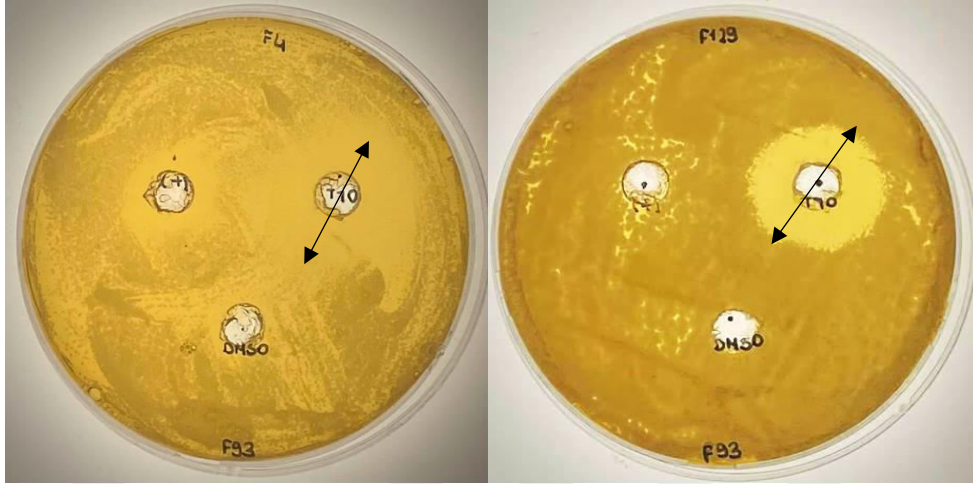
4.4.2 Ekstrelerin antikandidal aktivite sonuçları

4.4.2.1 Kuyu difüzyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi

Elde edilen ekstrelerin antikandidal etkinliğinin test edilmesi amacıyla kuyu difüzyon metodu uygulanmıştır. 20 mg/mL dozundaki tartılan ekstreler ve küf kontrollerinin *Candida* türlerine karşı oluşturdukları zon çapları Tablo 4.7 verilmiştir. *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93)'un TTO ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen ekstrenin özellikle *C. utilis* NRRL Y-900 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Görsel 4.17).

Görsel 4.17

Kuyu Difüzyon Metodu ile Antikandidal Aktiviteye Sahip Ekstrelerin Belirlenmesi



Not*:TTO: *Aspergillus africanus* var. *africanus* TTO ile biyotransformasyon ekstresi,(+): *Aspergillus africanus* var. *africanus* fungus kontrolü, DMSO: Çözücü kontrolü

Tablo 4.9

Ekstrelerin *Candida* Suşlarına Karşı Oluşturdukları Zone Çapları (Mm)

Zone çapı	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida utilis</i> NRRL Y-900	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
F93+TTO	13	20	17
F93	24	21	11
F72+TTO	13	-	-
F72	11	-	-
F135+TTO	12	13	-
F135	11	12	-
F24+TTO	-	-	-
F24	-	-	-
Ketokonazol	15	29	20

Not*:*Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93),*Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

4.4.2.2 Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi

Biyotransformasyon reaksiyonları sonucu elde edilen ekstreler, 7 farklı patojen *Candida* suşuna karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 3 paralel olarak test edilmiştir (Görsel 4.18). Ekstrelerin göstermiş oldukları minimum inhibitör konsantrasyonları $\mu\text{g/mL}$ olarak Tablo 4.10'de verilmiştir. 20 mg/mL hazırlanan ekstreler ilk kuyu 5 mg/mL olarak başlanmıştır. Ketokonazol 16 $\mu\text{g/mL}$ dozda uygulanmıştır.

Aspergillus africanus var. *africanus* (F93) biyotransformasyon ekstresinin *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. utilis* NRRL Y-900 karşı 312,5 $\mu\text{g/mL}$ dozda *C. krusei* ATCC 6258'e karşı 156,25 $\mu\text{g/mL}$ dozda etki göstererek TTO'dan ve terpinen-4-ol'den daha etkili olduğu gösterilmiştir. *Alternaria eureka* biyotransformasyon ekstresinin özellikle *C. utilis* NRRL Y-900 ve *C. krusei* ATCC 6258 karşı etkili olduğu, *C. utilis*'e karşı 312,5 $\mu\text{g/mL}$ dozda etki göstererek fungus kontrolünden, yağın kendisinden ve ana metaboliti terpinen-4-ol'den daha güçlü inhibe edici etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Görsel 4.18

Mikrodilüsyon Yöntemi ile Ekstrelerin Antikandidal Etkilerinin Gösterilmesi



Tablo 4.10*Ekstrelerin Candida Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları*

(MIC µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
F93+ TTO	312,5	312,5	625	312,5	625	625	156,25
F93(+)	625	156,25	312,5	>1250	156,25	312,5	156,25
F72+ TTO	>1250	625	>1250	625	>1250	>1250	625
F72(+)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
F135+ TTO	625	312,5	>1250	>1250	625	625	312,5
F135 (+)	625	625	>1250	>1250	156,25	625	312,5
F24+ TTO	625	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
F24(+)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
TTO	625	625	>1250	>156,25	312,5	156,25	312,5
Terpinen -4-ol	>1250	625	>1250	312,5	312,5	312,5	312,5
Keto.	1	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,125

Not*: *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24)

4.4.3 Metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteleri

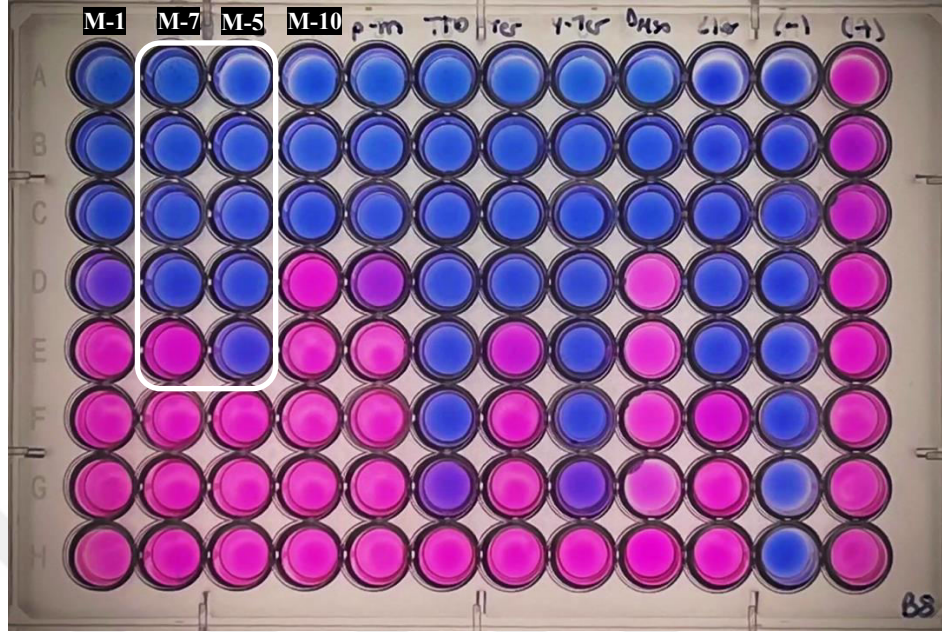
4.4.3.1 Antibakteriyel etkinin belirlenmesi

4.4.3.1.1 Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Yapılan aktivite deneylerinde özellikle Gram (+) *Bacillus cereus* ve *S. aureus* suşlarını inhibe ettiği gösterilen ekstrelerin ana metabolitleri izole edilerek bu suşlara karşı 10 mg/mL dozlarda denenmiştir. Çay ağacı uçucu yağı, terpinen-4-ol ve gama terpinen 20 mg/mL dozlarda uygulanmıştır. Metabolitlerin *B. cereus* ve *S. aureus* suşlarına karşı inhibitör dozları Tablo 4.11’de verilmiştir. M5 metabolitinin *B. cereus*’a karşı 312,5 µg/mL dozda etkili olduğu gösterilmiştir (Görsel 4.19).

Görsel 4.19

İzole Edilen Metabolitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi



Tablo 4.11

İzole Edilen Metabolitlerin Bakteri Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları

(MIC µg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>B. cereus</i> NRRL B-3711
M1	>1250	>1250
M5	>1250	312,5
M7	>1250	625
M10	>1250	>1250
TTO	625	312,5
Terpinen-4-ol	>1250	1250
γ-Terpinen	>1250	312,5
Kloramfenikol	4	4

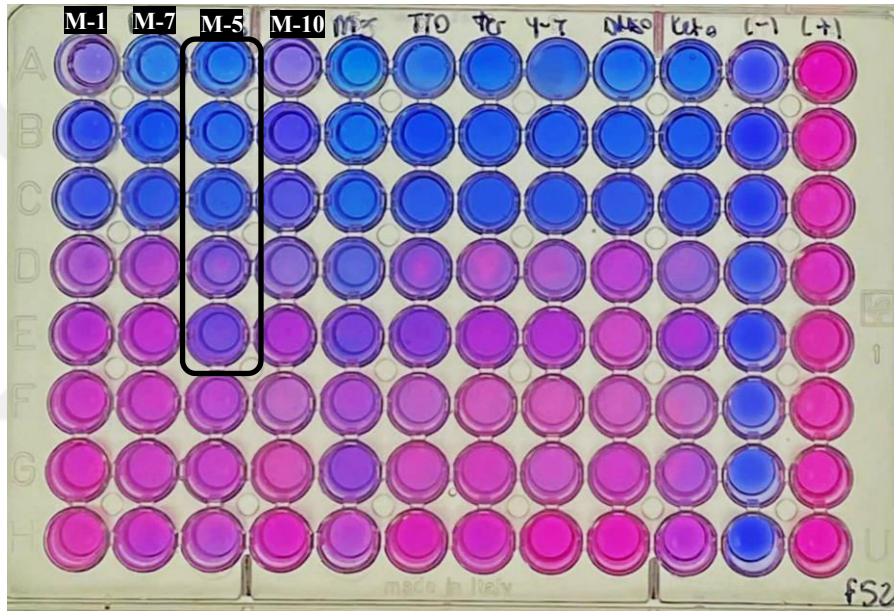
4.4.3.2 Antikandidal etkinin belirlenmesi

4.4.3.2.1 Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandidal aktivitenin belirlenmesi

Elde edilen ekstreler 10 mg/mL dozlarda tartılarak deneylerde kullanılmıştır. Metabolitlerin *Candida* suşlarına karşı inhibitör dozları Tablo 4.12’de verilmiştir. *Aspergillus africanus* var. *africanus* ile elde edilen M5 ve M10 metabolitlerinin *C. albicans*’a karşı sırasıyla 156,25 µg/mL ve 312,5 µg/mL dozda etkili olduğu, *C. tropicalis*’e ise 312,5 µg/mL dozda etkili oldukları gösterilmiştir (Görsel 4.20).

Görsel 4.20

İzole Edilen Metabolitlerin Antikandidal Aktivitelerinin Belirlenmesi



Tablo 4.12

İzole Edilen Metabolitlerin *Candida* Suşlarına Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonları

(MIC µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
M1	>625	>625	>625	625	>625
M7	>625	>625	>625	625	>625
M5	>625	>625	156,25	312,5	>625
M10	>625	>625	312,5	312,5	>625
T10	>625	>625	>625	78	312,5

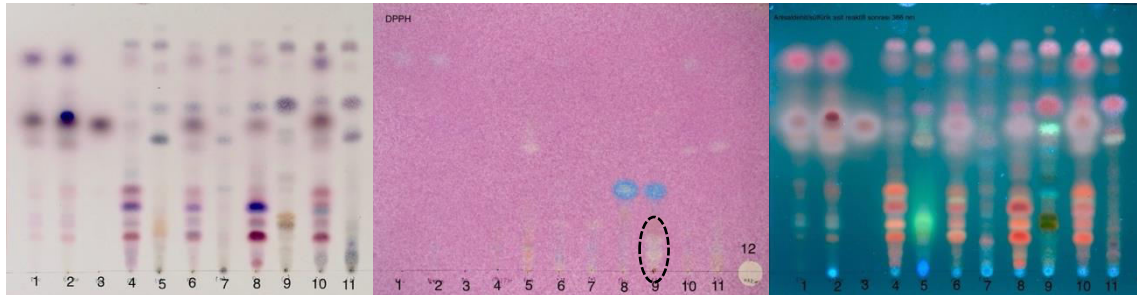
Tablo 4.12*(Devam) İzole Edilen Metabolitlerin Candida Suşlarına Karşı Etkili İnhibitör Dozlarının Belirlenmesi*

Terpinen 4-ol	>625	>625	>625	625	312,5
Gama terpinen	>625	>625	>625	625	>625
Ketokonazol	1	0,25	1	0,125	0,125

In vitro biyolojik aktive çalışmalarında ekstrelerin ve izole edilen metabolitlerin aktiviteleri fungus kontrolleri, yağın kendisi ve standartlar ile karşılaştırılmıştır. *Candida* türlerine karşı *Alternaria eureka* ve *Aspergillus africanus* var. *africanus* funguslarının biyotransformasyon ekstralarının belirli bir antikandidal aktivite gösterdiği ve her iki fungusun ortak olarak dönüşüm sağladıkları M-5 metabolitinin söz konusu aktiviteye etkili olduğu düşünülmektedir. İzole edilen M5 metabolitinin, *C. albicans*'ı 156 µg/mL, *C. tropicalis*'i 312,5 µg/mL dozda inhibe ederek yağın kendisinden, terpinen-4-ol ve γ-terpinenden daha etkili olduğu gösterilmiştir.

4.4.4 Biyootografi yöntemi ile antioksidan etkili bileşiklerin taranması

DPPH radikali süpürücü aktivitenin tespiti için hazırlanan plakalarda *Alternaria eureka* fungus kontrolünün sahip olduğu antioksidan etki potansiyeli bulunan bileşikler gösterilmiştir. Çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolitlerin ön tarama testlerinde belirgin bir antioksidan aktiviteleri gözlenmediğinden antioksidan aktivite taramalarına devam edilmemiştir (Görsel 4.22).

Görsel 4.21*DPPH Reaktif Püskürtülmesi Sonrası Antioksidan Aktiviteleri Bulunan Metabolitlerin Belirlenmesi*

1: TTO, 2: uçucu yağın 10. Günün sonundaki değişiminin izlenmesi için ekstre edilen kontrol, 3: Terpinen-4-ol, 4: *Aspergillus terreus* var. *africanus* metabolitleri 5: *Aspergillus terreus* var. *africanus* küf kontrolü, 6: *Penicilium italicum* var. *italicum* metabolitleri, 7: *Penicilium italicum* var. *italicum* küf kontrolü, 8: *Alternaria eureka* metabolitleri, 9: *Alternaria eureka* küf kontrolü, 10: *Fusarium culmorum* metabolitleri, 11: *Fusarium culmorum* küf kontrolü 12: askorbik asit

5 SONUÇ VE TARTIŞMA

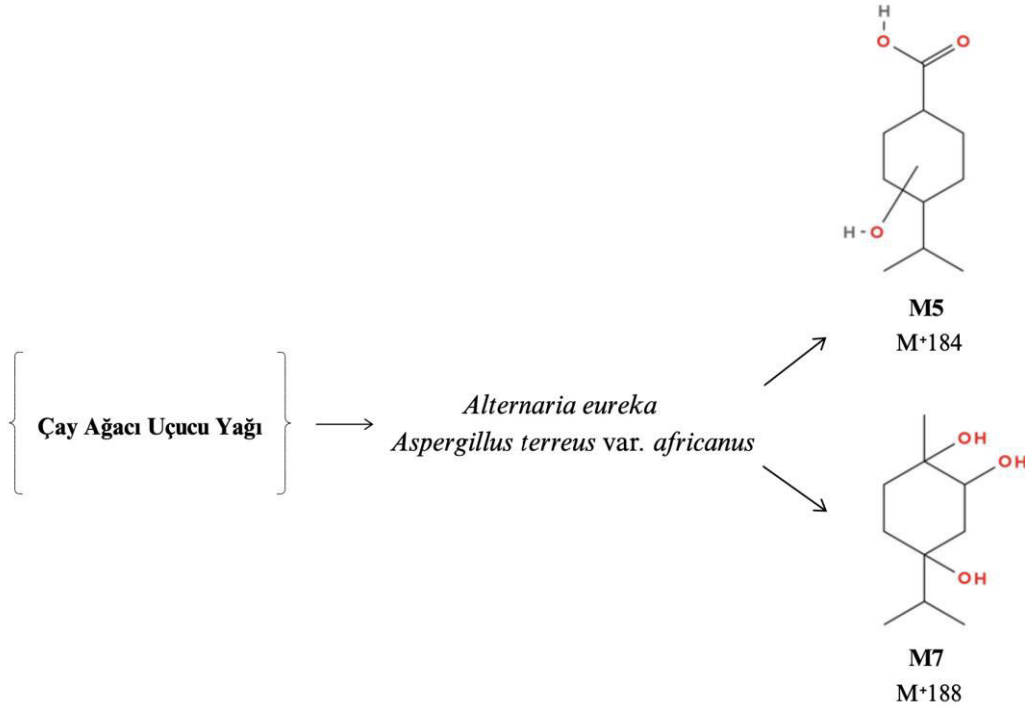
Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı Mantar Öncelikli Patojenler listesi ve COVID-19 pandemisi, küresel çapta artan enfeksiyon tehdidini ve mevcut antimikrobiyallerin yetersizliğini ortaya koymuştur (Havlickova, 2008). Fungal patojenler, hızlı yayılma ve üreme yetenekleri ve çoklu direnç mekanizmaları geliştirebilmeleri nedeniyle önemli bir halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Bu tez kapsamında özellikle antikandidal ve antibakteriyel etkileriyle öne çıkan çay ağacı uçucu yağının 15 farklı fungus ile biyotransformasyon potansiyelleri incelenmiştir. Çay ağacı yağından hareketle çeşitli metabolitleri üretebilen ve relatif olarak yüksek miktarda metabolit oluşumunu katalizleyen *Aspergillus terreus* var. *africanus* (F93), *Penicilium italicum* var. *italicum* (F72), *Alternaria eureka* (F135) ve *Fusarium culmorum* (F24) suşları ile 10 metabolit elde edilmiş ve 2'sinin yapısı tam olarak, M5 kodlu numunenin yapısı ise kısmen aydınlatılmıştır. Biyotransformasyon ile elde edilen *p*-mentan-1,2,4-triol ve diğer hidroksilli türevlerin *in vitro* aktivite çalışmaları ilk kez bu tez çalışması ile yapılmıştır.

İTK ve Gaz Kromatografisi verileri incelenerek M-7 ve M-5 metabolitlerini çalışılan 4 fungusun da oluşturduğu gösterilmiştir. M-7 (%31) ve M-5 (%16) metabolitlerinin yüksek miktarlarda dönüşümlerini katalizleyen *Alternaria eureka* fungusunun metabolit karışımlarını içeren ekstresi ile izolasyon ve saflaştırma çalışmaları yapılmış, miktarı en fazla olan 2 metabolit saflaştırılarak yapıları kromatografik ve spektroskopik teknikler ile aydınlatılmıştır. Literatürde terpinen-4-ol'ün *Gibberella cynea* DSM 62719 ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında elde edilen (1*S*, 2*S*, 4*S*)-*p*-mentan-1,2,4-triol metaboliti ve çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyonu ile elde edilen M7 metabolitine ait spektral veriler karşılaştırılmıştır (Abraham ve ark., 1986). Spektral veriler birbirleri ile uyumlu olduğundan oluşan metabolitin terpinen-4-ol'den oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Majör olarak oluşumu gözlenen M5 metabolitine ait NMR sonuçlarına benzer sonuçlar, literatürde α -terpineol'ün *Alternaria alternata* ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında *p*-menten iskeletine sahip 7. karbonunda karboksil grubu bulunan 4*R*-oleuropeik asit ile benzerlik göstermektedir. Ancak 4*R*-oleuropeik asit molekülünde 8. konumdaki hidroksil grubunun M5 metabolitinde hangi karbona bağlı olduğu kesin olarak belirlenememiştir ve molekülün yapı tayini çalışmalarına devam edilmektedir (Mei ve ark., 2020).

Elde edilen M5 ve M7 metabolitlerinin, *Aspergillus terreus* var. *africanus*, *Penicilium italicum* var. *italicum*, *Fusarium culmorum* ve *Alternaria eureka* ile biyotransformasyon sonucu oluşumu ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir.

Şekil 4.20

Biyotransformasyon Çalışmaları Sonucunda İzole Edilerek Yapıları Aydınlatılan Metabolitler



Literatürde α -terpineol'den hareketle *Giberella cynaea* DSM 62719 ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında 2-hidroksi-1,8-sineol elde edildiği gösterilmiştir (Abraham ve ark.,1986). **M-1** molekülünün literatür verisi yanında NIST ve Başer kütüphanesinde kromatografik ve spektroskopik verileri karşılaştırılmıştır (Duisken ve ark., 2005). *Alternaria eureka* ile yapılan biyotransformasyon sonucu elde edilen **M-1** metabolitinin 2-hidroksi-1,8-sineol olduğu saptanmıştır. Biyotransformasyon çalışmaları ile elde edilen diğer metabolitler olan M-2, M-3, M-4 ve M-9 metabolitlerinin kütle spektrometrisi ile molekül ağırlıkları 170 [M]⁺ olarak belirlenmiştir. Spektrumları “diol” yapılı moleküller olabileceğini göstermekte ve *p*-menten iskeletine sahip dioller oldukları düşünülmektedir. Fakat metabolitlerin miktarlarının azlığı nedeniyle izolasyonları yapılamamış ve kesin yapıları karakterize edilememiştir.

Biyotransformasyon sonucu metabolit karışımlarını içeren ekstraların aktiviteleri, fungus kontrolleri, çay ağacı uçucu yağının kendisi ve yağın antioksidan ve antimikrobial

etkilerinden sorumlu bileşikler olan terpinen-4-ol ve γ -terpinen kullanılarak değerlendirilmiştir. Biyootografi tekniği ile yapılan ön taramalarda ekstrelerin belirgin bir antioksidan etkileri saptanamamıştır. Ancak *Alternaria eureka* fungusunun doğal olarak ürettiği bileşiklerin DPPH radikalinde inhibe edici etkilere sahip olan lekeleri tespit edilmiştir.

Yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde *S. aureus* ATCC 6538 ve *B. cereus* NRRL B-3711 suşlarına karşı *Aspergillus africanus* var. *africanus* ile yapılan biyotransformasyon ekstresinin ve fungus kontrolünün sırasıyla 156,25 mg/mL ve 78 mg/mL dozlarda etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak söz konusu etkinin *Aspergillus africanus* var. *africanus* fungusunun doğal metabolizmasında ürettiği bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gram (-) *E. coli* 'ye karşı biyotransformasyon ekstresinin 1250 μ g/mL dozda inhibe edici etki gösterirken fungus kontrolü, 312,5 μ g/mL dozda etkili olmaktadır. Güçlü antimikrobiyal etkilere sahip çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyon amacıyla eklenmesiyle küfün doğal olarak ürettiği bazı bileşiklerin miktarlarının azalması veya funguslara karşı sidal bir etki göstererek etkili bileşiklerin üretimlerini engellenmesi dolayısıyla ekstrenin antibakteriyel etki potansiyelinin azaldığı düşünülmektedir. Fungusun ürettiği bileşiklerin saflaştırılarak aktivite deneylerinin tekrarlanması planlanmaktadır.

Antikandidal aktivite taramalarında *Aspergillus africanus* var. *africanus* ile yapılan biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstrenin, kuyu difüzyon metodu ile *Candida utilis* NRRL Y-900, *C. utilis* NRRL Y-900 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşlarına etkili olduğu belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ile antikandidal aktivite dozunun belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde *Candida albicans* ATCC 10231 ve *C. tropicalis* ATCC 750 suşlarını 312,5 mg/mL dozda inhibe ettiği ve *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı fungus kontrolünden, yağın kendisinden ve terpinen-4-ol'den fazla aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Alternaria eureka küfü ile yapılan biyotransformasyon sonucu ile elde edilen ekstrlerinin *Candida utilis* NRRL Y-900 suşuna karşı fungus kontrolünden ve test edilen standartlardan daha düşük dozlarda inhibe edici etkileri bulunmaktadır.

Antikandidal ve antibakteriyel etkileri gösterilen *Alternaria eureka* ve *Aspergillus africanus* var. *africanus* funguslarının biyotransformasyon ekstrlerinin bileşimlerindeki relatif miktarları en fazla olan ve biyootografi çalışmalarında bakterilere karşı bir

inhibisyon gösterdiği düşünölen metabolitleri; **M-1**, **M-7**, **M-5** ve **M-10** izole edilerek antibakteriyel ve antikandidal aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

M-5 metabolitinin Gram (+) *B. cereus* karşı (312,5 µg/mL), TTO ve γ-terpinenle aynı dozda inhibe edici etkinliği olduğu gösterilmiştir. Diğer metabolitlerin belirgin bir antibakteriyel etkileri gösterilmemiştir.

Deneylerde ayrıca çay ağacı uçucu yağı, terpinen-4-ol ve γ-terpinen'in antimikrobiyal etkileri karşılaştırılmıştır. Özellikle *Candida tropicalis*'e karşı çay ağacı uçucu yağının saf halde kullanımı (78 µg/mL), yağın sahip olduğu terpenik bileşiklerin sinerjik etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünölen artmış bir aktivite ortaya koymuştur. İzole edilen **M-5** ve **M-10** metabolitlerinin, 312,5 µg/mL dozda *C. tropicalis*'i inhibe ederek terpinen-4-ol ve γ-terpinenden daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak *Alternaria eureka* ve *Aspergillus africanus* var *africanus* funguslarının halihazırda ürettikleri metabolizma bileşikleri özellikle Gram (+)'lere karşı biyotransformasyon sonucu üretilen metabolitlerden, yağın kendisinden, ve standartlardan daha etkili bulunmuştur. *Candida* türlerine karşı *Alternaria eureka* ve *Aspergillus africanus* var *africanus* funguslarının biyotransformasyon ekstrelerinin belirli bir antikandidal aktivite gösterdiği ve her iki fungusun ortak olarak ürettikleri M-5 metabolitinin söz konusu aktiviteye etkili olduğu düşünölebilir ancak bulguların desteklenmesi için kapsamlı ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Candida türleri özellikle yoğun bakım ünitelerinde oldukça yüksek mortalite ve morbitide oranları ile ilişkili nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinin başında gelmektedir. Biyotransformasyon çalışmaları ile elde edilerek doğal olarak nitelendirilen metabolit karışımlarını içeren ekstrelerin ve izole metabolitlerin, spesifik olarak bazı patojen *Candida* suşlarına olan inhibe edici etkisi umut vaad eden bir sonuçtur.

İleriki çalışmalarda çay ağacı uçucu yağının biyotransformasyonu ile daha etkili ekstreler ve yeni aktif metabolitler üretilmesi çalışmalarına devam edilmesi ayrıca fungusların ürettikleri metabolizma bileşiklerinin saflaştırılarak potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak araştırılmaları ve elde edilen metabolitlerin yapı tayinlerinin tamamlanarak farklı aktive çalışmaları ile potansiyel biyolojik etkilerin taranması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abraham, W. R., Stumpf, B., & Kieslich, K. (1986). Microbial transformations of terpenoids with 1-*p*-menthene skeleton. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 24-30. <https://doi.org/10.1007/BF00266280>
- Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Bonadiman, B. D. S. R., Dornelles, E. B., Trevisan, G., & da Cruz, I. B. M. (2018). Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1253-1261. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.096>
- Asakawa, Y., Takahashi, H., Toyota, M., & Noma, Y. (1991). Biotransformation of monoterpenoids, (-)- and menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species. *Phytochemistry*, 30(12), 3981-3987. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83449-U](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83449-U)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barbosa, L. C. A., Silva, C. J., Teixeira, R. R., Meira, R. M. S. A., & Pinheiro, A. L. (2013). Chemistry and biological activities of essential oils from *Melaleuca* L. species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1), 11-23.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications* (2nd ed.). CRC Press.
- Bezabh, S. A., Tesfaye, W., Christenson, J. K., Carson, C. F., & Thomas, J. (2022). Antiparasitic activity of tea tree oil (TTO) and its components against medically important ectoparasites: A systematic review. *Pharmaceutics*, 14(8), 1587. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081587>
- Bischoff, K., & Guale, F. (1998). Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil poisoning in three purebred cats. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 10(2), 208–210. <https://doi.org/10.1177/104063879801000223>
- Bitteur, S. M., Baumes, R. L., Bayonove, C. L., Versini, G., Martin, C. A., & Dalla Serra, A. (1990). 2-*exo*-Hydroxy-1,8-cineole: A new component from Grape var. Sauvignon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(5), 1210-1213.
- Boelens, M. (1999). The complete database of essential oils, Boelens Aroma chemical information service. The Netherlands.
- Borotová, P., Galovičová, L., Vukovic, N. L., Vukic, M., Tvrdá, E., & Kačániová, M. (2022). Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Plants*, 11(4), 558 <https://doi.org/10.3390/plants11040558>

- Brand, C., Ferrante, A., Prager, R. H., Riley, T. V., Carson, C. F., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H. (2001). The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society*, 50(4), 213–219. <https://doi.org/10.1007/s000110050746>
- Brophy, J. J., Davies, N. W., Southwell, I. A., Stiff, I. A., & Williams, L. R. (1989). Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1330–1335. <https://doi.org/10.1021/jf00089a030>
- Brophy, J. J., Craven, L. A., & Doran, J. C. (2013). *Melaleucas: Their botany, essential oils and uses* (Monograph No. 156). Australian Centre for International Agricultural Research.
- Brophy, J. J., Goldsack, R. J., Bean, A. R., Forster, P. I., & Lepschi, B. J. (1999). Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in eastern Australia. Part 5. *Leptospermum continentale* and allies. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(2), 98–104. [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200007/08\)15:4%3C271::AID-FFJ910%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200007/08)15:4%3C271::AID-FFJ910%3E3.0.CO;2-E)
- Buckle, J., 2015. Clinical aromatherapy – Essential Oils in Healthcare, Third ed. Elsevier Health Sciences, London, UK.
- Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D. R., Keusgen, M., ... & Wink, M. (2022). Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 956541. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.956541>
- Cano-Flores, A., Gómez, J., Escalona-Torres, I. S., & Velasco-Bejarano, B. (2020). Microorganisms as biocatalysts and enzyme sources. In *Microorganisms* (ss. 275–306). London, UK: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90338>
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A. R., & Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(1), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>
- Cao, H., Yang, G., Wang, Y., Liu, J. P., Smith, C. A., Luo, H., & Liu, Y. (2015). Complementary therapies for *acne vulgaris*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1), CD009436. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009436.pub2>
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 50–https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.50-62.2006
- Carson, C. F., Riley, T. V., & Cookson, B. D. (1998). Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. *The Journal of hospital infection*, 40(3), 175–178. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(98\)90135-9](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(98)90135-9)
- Chambergo, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, s. 2567–2577. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7305-2>
- Charney, W., & Herzog, H. L. (2014). *Microbial transformations of steroids: A handbook*. Academic Press.

- Chareonkla, A., Pohmakotr, M., Reutrakul, V., Yoosook, C., Kasisit, J., Napaswad, C., & Tuchinda, P. (2011). A new diarylheptanoid from the rhizomes of *Zingiber mekongense*. *Fitoterapia*, 82(4), 534-538.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Di Martile, M., Garzoli, S., Sabatino, M., Valentini, E., D'Aguanno, S., Ragno, R., & Del Bufalo, D. (2021). Antitumor effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol in combination with target therapy in melanoma models. *Cell Death Discovery*, 7(1), 127. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00510-3>
- Duisken, M., Sandner, F., Blömeke, B., & Hollender, J. (2005). Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: identification of a new hydroxylated metabolite. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722(3), 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.12.019>
- Edris A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research : PTR*, 21(4), 308-323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- Elshafie, H. S., & Camele, I. (2017). An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. *BioMed Research International*, 2017(1), 9268468.
- Farooqi, A. H. A., & Sharma, S. (2000). Aromatherapy—a promising holistic system. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22, 704-706.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Stivala, A., Bisignano, G., & Castro, A. (2011). Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Research*, 89(1), 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.11.010>
- Gavrilescu, M. (2010). Environmental biotechnology: Achievements, opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 4(1), 1-36.
- Haigou, R., & Miyazawa, M. (2012). Metabolism of (+)-terpinen-4-ol by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Journal of Oleo Science*, 61(1), 35-43. <https://doi.org/10.5650/jos.61.35>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2002). *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50(2), 195-199. <https://doi.org/10.1093/jac/dkfl12>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy*, 53(6), 1081-1085. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh243>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., & Nielsen, J. B. (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and chemical toxicology*, 44(5), 616-625. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.09.001>
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51 Suppl 4, 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- Homer, L. E., Leach, D. N., Lea, D., Lee, L. S., Henry, R. J., & Baverstock, P. R. (2000). Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(4), 367-382. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00071-X)
- Humphery, E. M. (1930). A new Australian germicide. *Medical Journal of Australia*, 1(13), 417–418. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1930.tb14581.x>
- Iacovelli, F., Romeo, A., Lattanzio, P., Ammendola, S., Battistoni, A., La Frazia, S., ... & Falconi, M. (2023). Deciphering the Broad Antimicrobial Activity of *Melaleuca alternifolia* Tea Tree Oil by Combining Experimental and Computational Investigations. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12432. <https://doi.org/10.3390/ijms241512432>
- Ireland, D. J., Greay, S. J., Hooper, C. M., Kissick, H. T., Filion, P., Riley, T. V., & Beilharz, M. W. (2012). Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. *Journal of Dermatological Science*, 67(2), 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.05.005>
- Ito, K., & Ito, M. (2013). The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure–activity relationships. *Journal of Natural Medicines*, 67(4), 833–837. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0732-1>
- Johansen, B., Duval, R. E., & Sergere, J. C. (2022). First Evidence of a Combination of Terpinen-4-ol and α -Terpineol as a Promising Tool against ESKAPE Pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7472. <https://doi.org/10.3390/molecules27217472>
- Kant, G., Pandey, A., Shekhar, H., & Srivastava, S. (2023). Enhanced bio-synthesis of isoprene via modifying mevalonate and methylerythritol phosphate pathways for industrial application: a review. *Process Biochemistry*, 130, 256-271. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.04.021>
- Kasujja, I. (2021). Critical evaluation of *Melaleuca alternifolia*: a review of the phytochemical profile, pharmacological attributes and medicinal properties in the botanical, human and global perspectives. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.4236/ojmc.2021.111001>
- Kennedy, D., Okello, E., Chazot, P., Howes, M. J., Ohiomokhare, S., Jackson, P., & Wightman, E. (2018). Volatile terpenes and brain function: investigation of the cognitive and mood effects of *Mentha × piperita* L. essential oil with *in vitro* properties relevant to central nervous system function. *Nutrients*, 10(8), 1029. <https://doi.org/10.3390/nu10081029>

- Khalil, Z., Pearce, A. L., Satkunanathan, N., Storer, E., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H. (2004). Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(4), 683-690. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23407.x>
- Kim, J. H., Park, C. M., Jeong, H. C., Jeong, G. H., Cha, G. S., Lee, S., & Yun, C. H. (2024). Production of Mono-Hydroxylated Derivatives of Terpinen-4-ol by Bacterial CYP102A1 Enzymes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 725–734. <https://doi.org/10.4014/jmb.2310.10018>
- Kristen, K. (2023). Essential oils in traditional medicine: Ancient remedies, modern applications. *Journal of Pharmacognosy & Phytochemistry*, 11(3), 001. <https://doi.org/10.4172/2321-6182.11.3.001>
- Liang, Z., Zhi, H., Fang, Z., & Zhang, P. (2021). Genetic engineering of yeast, filamentous fungi and bacteria for terpene production and applications in food industry. *Food Research International*, 147, 110487. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110487>
- Lis-Balchin, M., Hart, S. L., & Deans, S. G. (2000). Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research : PTR*, 14(8), 623–629. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8<623::aid-pt763>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8<623::aid-pt763>3.0.co;2-z)
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1451v1>
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Pérez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Malloggi, E., Menicucci, D., Cesari, V., Frumento, S., Gemignani, A., & Bertoli, A. (2022). Lavender aromatherapy: A systematic review from essential oil quality and administration methods to cognitive enhancing effects. *Applied Psychology: Health and Well-Being*, 14(2), 663-690. <https://doi.org/10.1111/aphw.12310>
- May, J., Chan, C. H., King, A., Williams, L., & French, G. L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(5), 639-643. <https://doi.org/10.1093/jac/45.5.639>
- McLafferty, F. W., & Stauffer, D. B. (1989). The Wiley/NBS registry of mass spectral data (Vol. 1). New York: Wiley.
- Mei, R. F., Shi, Y. X., Duan, W. H., Ding, H., Zhang, X. R., Cai, L., & Ding, Z. T. (2020). Biotransformation of α -terpineol by *Alternaria alternata*. *RSC advances*, 10(11), 6491-6496. <https://doi.org/10.1039/C9RA08042B>
- Mittal, R., Srivastava, G., & Ganjewala, D. (2022). An update on the progress of microbial biotransformation of commercial monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 77(5-6), 225-240. <https://doi.org/10.1515/znc-2021-0192>

- Miyazawa, M., & Kumagae, S. (2001). Biotransformation of (*R*)- and (*S*)-terpinen-4-ol by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4312-4314. <https://doi.org/10.1021/jf010273t>
- Miyazawa, M., & Haigou, R. (2011). Determination of cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of (-)-terpinen-4-ol by human liver microsomes. *Xenobiotica; The Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 41(12), 1056–1062. <https://doi.org/10.3109/00498254.2011.596230>
- Miyazawa, M., & Ohsawa, M. (2002). Biotransformation of α -terpineol by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4916-4918. <https://doi.org/10.1021/jf020287e>
- Miyazawa, M., & Wada, T. (2000). Biotransformation of γ -terpinene and (-)- α -phellandrene by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2893-2895. <https://doi.org/10.1021/jf9900581>
- Miyazawa, M., Kumagae, S., Nakamura, T., Mineshita, T., Wada, T., Yanagihara, H., & Kameoka, H. (2000). Biotransformation of monoterpenoids in common cutworm larvae (*Spodoptera litura fabficus*). In *Hydrocolloids* (pp. 357-363). <https://doi.org/10.1016/B978-044450178-3/50106-2>
- Miyazawa, M., Wada, T., & Kameoka, H. (1996). Biotransformation of α -terpinene in common cutworm larvae (*Spodoptera litura* Fabricius). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2889-2893. <https://doi.org/10.1021/jf9502966>
- Monti, D., Chetoni, P., Burgalassi, S., Najarro, M., Saettone, M. F., & Boldrini, E. (2002). Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 237(1-2), 209–214. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00032-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00032-7)
- Nikolić, M., Marković, T., Marković, D., Perić, T., Glamočlija, J., Stojković, D., & Soković, M. (2012). Screening of antimicrobial and antioxidant activity of commercial *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(22), 3852-3858. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.309>
- Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A., Goswami, P., Verma, S. K., & Darokar, M. P. (2015). Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole. *Industrial Crops and Products*, 63, 264-268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.039>
- Parshikov, I. A., & Sutherland, J. B. (2014). The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. *Process Biochemistry*, 49(12), 2086-2100. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.005>
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Bagherani, N., & Kazerouni, A. (2013). A review of applications of tea tree oil in dermatology. *International Journal of Dermatology*, 52(7), 784-790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05654.x>
- Pessôa, M. G., Paulino, B. N., Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., Molina, G., & Pastore, G. M. (2017). *Fusarium* species—a promising tool box for industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 3493-3511. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z>

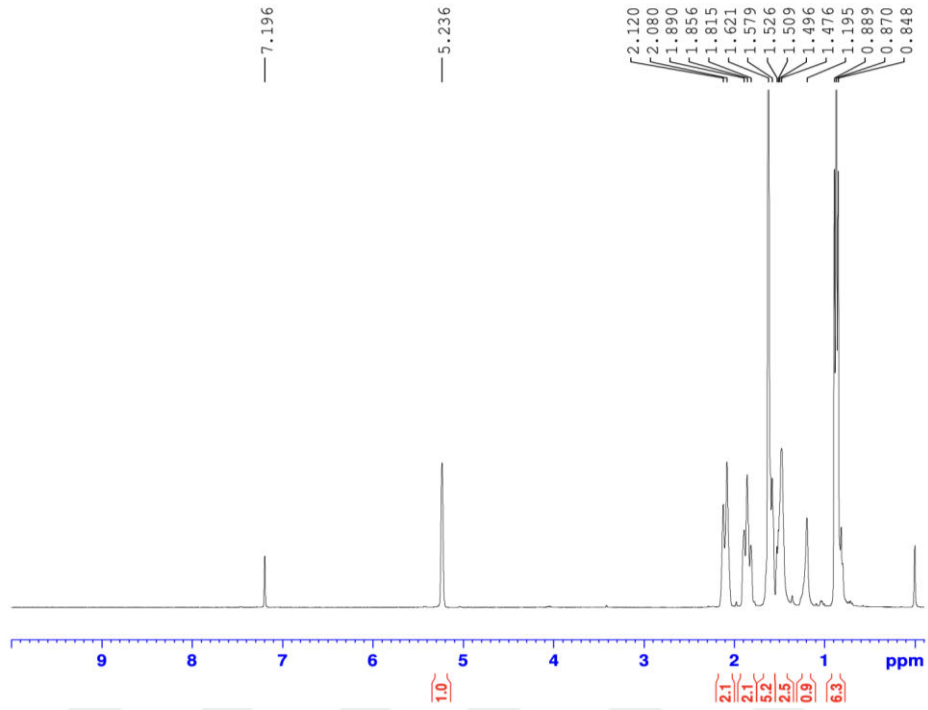
- Porter, N. G., & Wilkins, A. L. (1999). Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochemistry*, 50(3), 407-415. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00548-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00548-2)
- Qin, D., & Dong, J. (2023). Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products. *Molecules*, 28(6), 2619. <https://doi.org/10.3390/molecules28062619>
- Rossetto, M., Slade, R. W., Baverstock, P. R., Henry, R. J., & Lee, L. S. (1999). Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia*–Myrtaceae). *Molecular Ecology*, 8(4), 633-643. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00622.x>
- Rural Industries Research and Development Corporation. (2007). *The effectiveness and safety of Australian tea tree oil*. AgriFutures Australia. <https://agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/07-143.pdf>
- Russell, M. (1999). Toxicology of tea tree oil. In I. Southwell & R. Lowe (Eds.), *Tea tree: The genus Melaleuca* (Vol. 9, pp. 191-201). Harwood Academic Publishers
- Sailer, R., Berger, T., Reichling, J., & Harkenthal, M. (1998). Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 5(6), 489-495. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80048-2](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80048-2)
- Sanchez, J. F., Somoza, A. D., Keller, N. P., & Wang, C. C. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 29(3), 351-371. <https://doi.org/10.1039/C2NP00084A>
- Schnitzler, P., Schön, K., & Reichling, J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against *herpes simplex* virus in cell culture. *Die Pharmazie*, 56(4), 343-347.
- Sharifi-Rad, J., Salehi, B., Varoni, E. M., Sharopov, F., Yousaf, Z., Ayatollahi, S. A., ... & Iriti, M. (2017). Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: From farm to pharmacy. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1475-1494. <https://doi.org/10.1002/ptr.5880>
- Sherma J. (2018). Review of the Determination of the Antioxidant Activity of Foods, Food Ingredients, and Dietary Supplements by Thin Layer Chromatography-Direct Bioautography, Spectrometry, and the Dot-Blot Procedure. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1285-1294. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0116>
- Simpson, M. G. (2019). Diversity and classification of flowering plants: Eudicots. In *Plant Systematics*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50008-7>
- Southwell, I., & Lowe, R. (1999). *Tea tree: The genus Melaleuca*. Harwood Academic Publishers.
- Southwell, I. A., Russell, M. F., Maddox, C. D., & Wheeler, G. S. (2003). Differential metabolism of 1, 8-Cineole in insects. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 83-94.
- Souza, M. E., Lopes, L. Q. S., Bonez, P. C., Gündel, A., Martinez, D. S. T., SAGRILLO, M. R., ... & Santos, R. C. V. (2017). *Melaleuca alternifolia* nanoparticles against *Candida* species biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 104, 125-132.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.023>

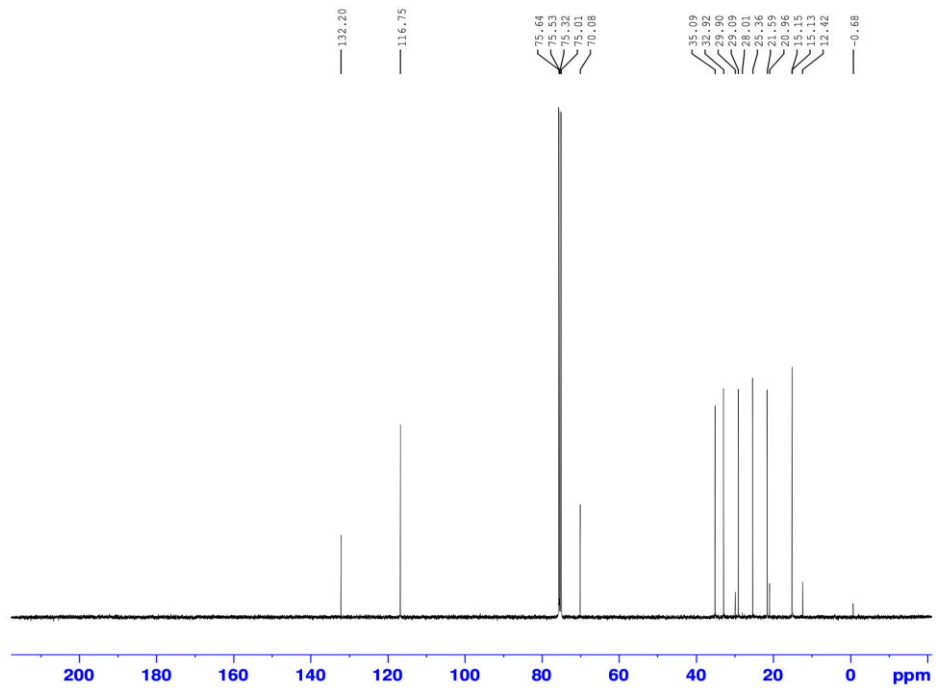
- Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Valè, G., Tacconi, G., & Malnati, M. (2007). *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 613–618. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02128.x>
- Tetali S. D. (2019). Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, 249(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>
- Tholl D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, 63–106. https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Tisserand, R., & Young, R. (2013). *Essential oil safety: A guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences.
- Toghueo, R. M. K., & Boyom, F. F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10(3), 107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>
- Vaingankar, P. N., & Juvekar, A. R. (2014). Fermentative production of mycelial chitosan from zygomycetes: Media optimization and physico-chemical characterization. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(12), 940–956. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.512108>
- Wilson, P. G. (2010). Myrtaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *Flowering plants. Eudicots: The families and genera of vascular plants* (Vol. 10). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14397-7_14
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
- Yadav, E., Kumar, S., Mahant, S., Khatkar, S., & Rao, R. (2017). Tea tree oil: a promising essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(3), 201–213. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1232665>
- Yasin, M., Younis, A., Javed, T., Akram, A., Ahsan, M., Shabbir, R., Ali, M. M., Tahir, A., El-Ballat, E. M., Sheteiwy, M. S., Sammour, R. H., Hano, C., Alhumaydhi, F. A., & El-Esawi, M. A. (2021). River Tea Tree Oil: Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities, and Potential Applications in Agriculture. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2105. <https://doi.org/10.3390/plants10102105>
- Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., & Zakiah, I. (2005). *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed*, 22(2), 165–170.
- Zhao, S., Li, J., Liu, J., Xiao, S., Yang, S., Mei, J., ... & Yang, X. (2023). Secondary metabolites of *Alternaria*: A comprehensive review of chemical diversity and pharmacological properties. *Frontiers in Microbiology*, 13, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1085666>

EKLER

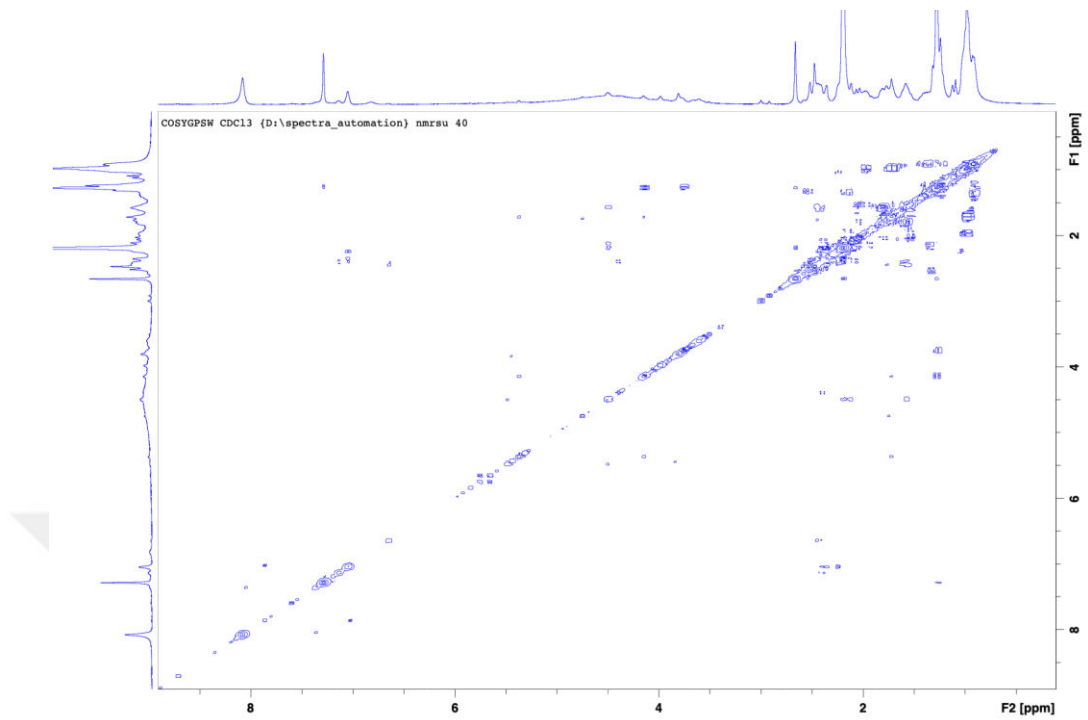
EK-1 Terpinen-4-ol'ün ¹H Spekturumu



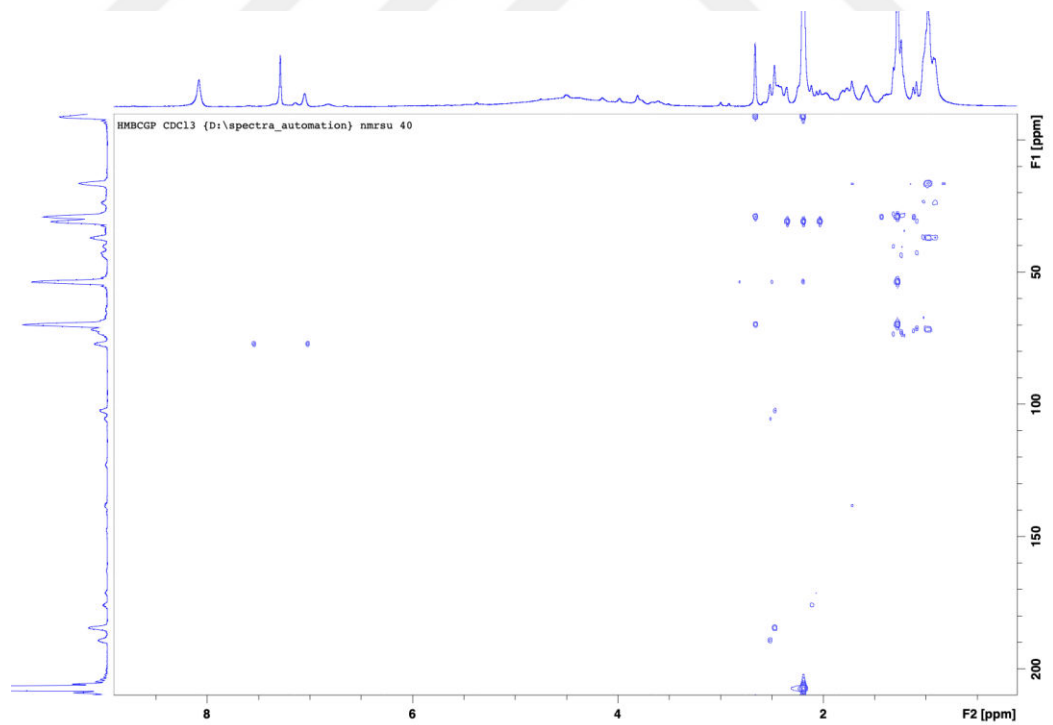
EK-2 Terpinen-4-ol'ün ¹³C Spekturumu



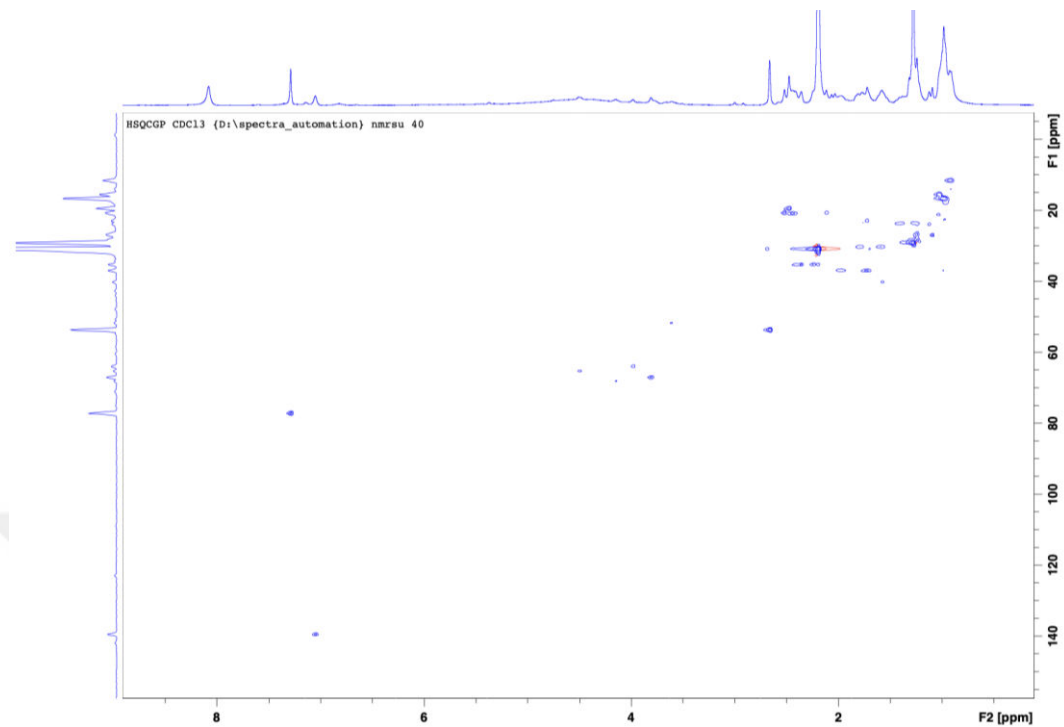
EK-3 M5 metabolitinin 1H-1H COSY Spektrumu



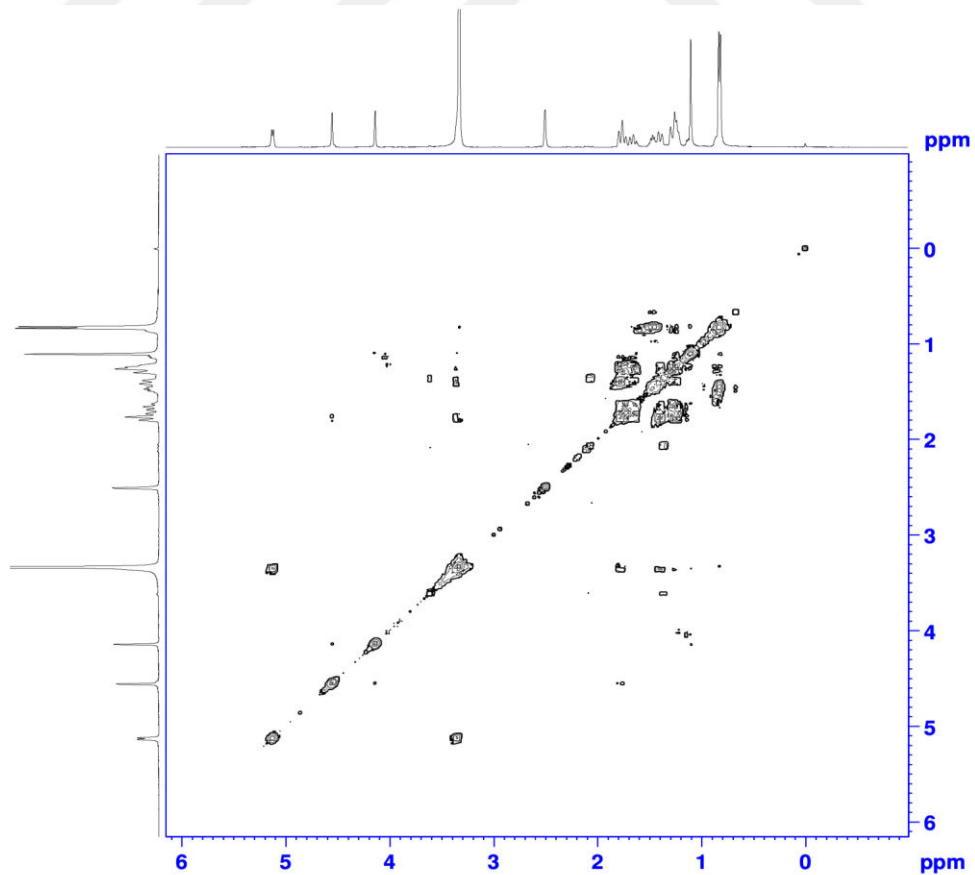
EK-4 M5 metabolitinin 1H-13C HMBC Spektrumu



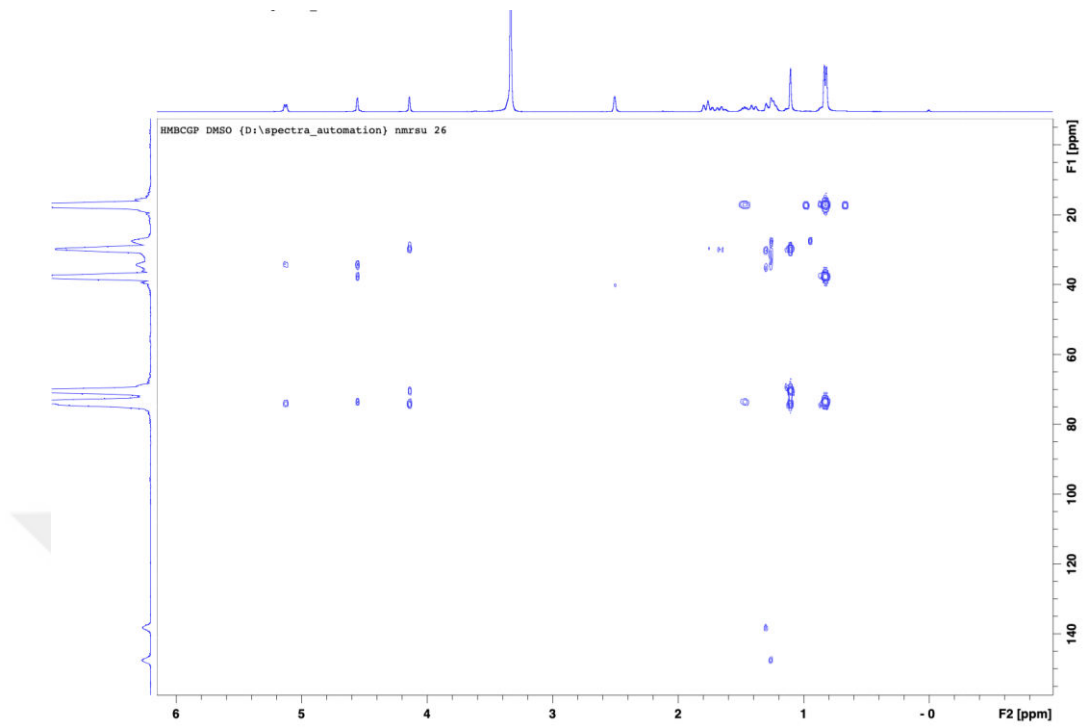
EK-5 M5 metabolitinin 1H -13C HSQC Spektrumu



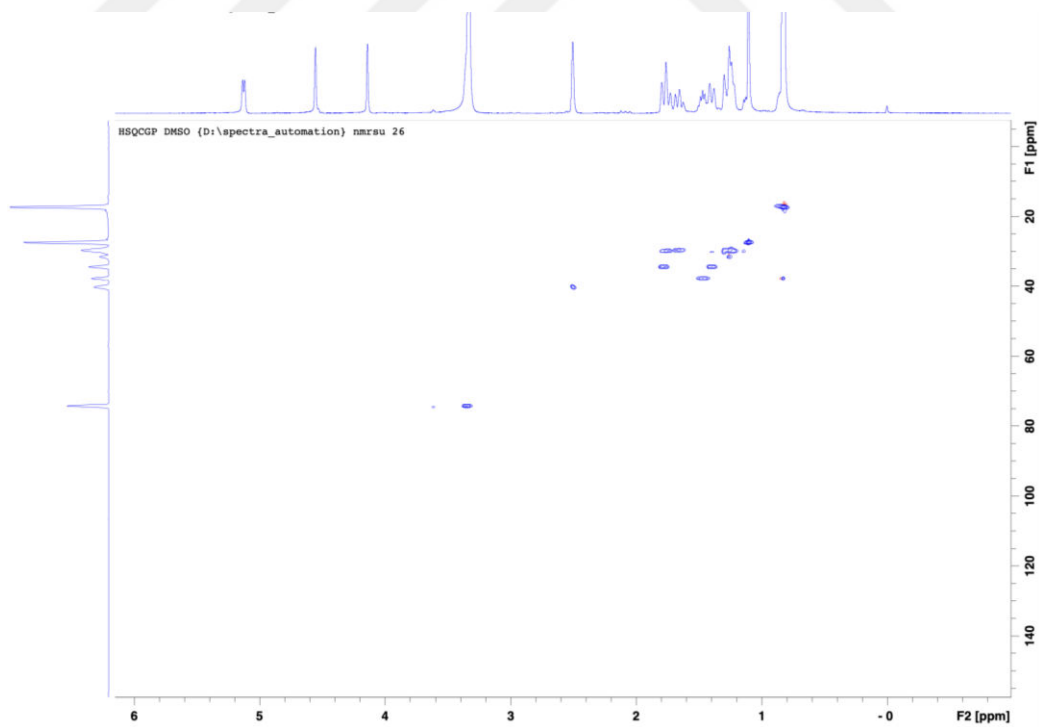
EK-6 M7 metabolitinin 1H-1H COSY Spektrumu



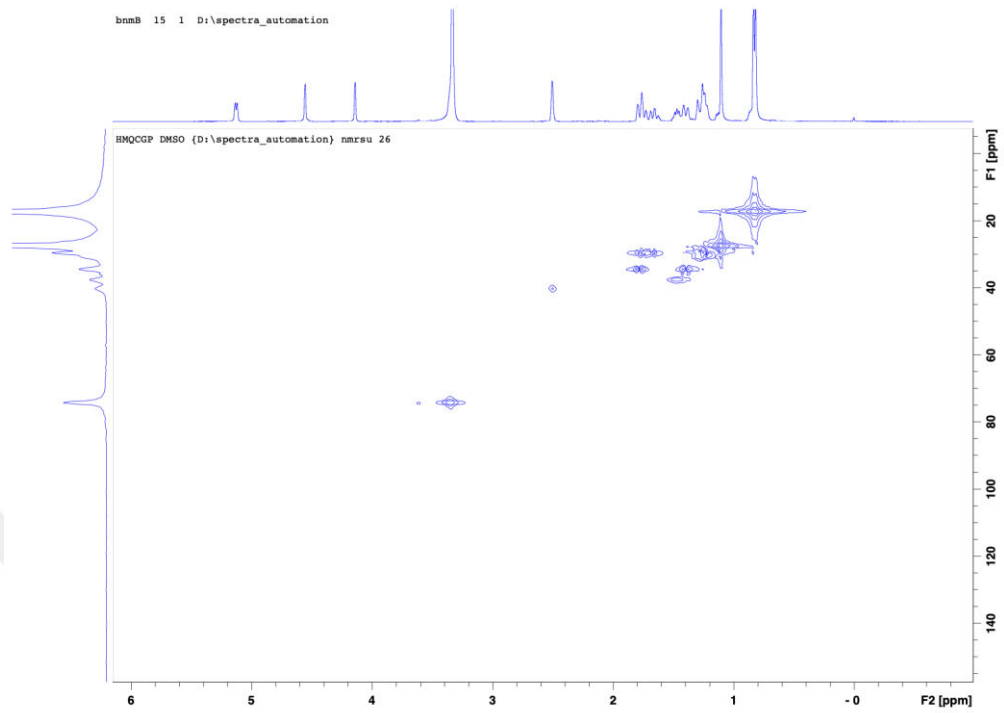
EK-7 M7 metabolitinin 1H-13C HMBC Spektrumu



EK-8 M7 metabolitinin 1H -13C HSQC Spektrumu



EK-9 M7 metabolitinin 1H-13C HMQC Spektrumu



ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bilge Nur Mutlu

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri / Yılı :

E-Posta :

ORCID Numarası :

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans

2022-2024, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı
Lisans

2017-2022 Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Mesleki Deneyimi:

2024-Devam ediyor, Araştırma Görevlisi, Anadolu Üniversitesi, Farmakognozi Anabilim
Dalı

Yayınları:

İşcan, G., Mutlu, B. N., Hacıoğlu, S., İşcan, A., vd. (2024). *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.'nın (Apiaceae) fitokimyasal analizi ve biyolojik etkileri. *Biological Diversity and Conservation*, 17(1), 79-90. <https://doi.org/10.46309/biodicon.2023.1334241>

Görev Aldığı Projeler:

Bilimsel Araştırma Projesi YTT-2024-2568 Yaygın Kullanılan Uçucu Yağların Buhar Difüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi Araştırmacı, (28.06.2024-Devam ediyor)

Bilimsel Araştırma Projesi 2110S181. *Schinus molle* L. Uçucu Yağının Kimyasal Analizi ve Kognitif Süreçler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Bursiyer, (8.12.2021-8.12.2023)