FURANOSTEROİD YAPILI BAZI BİLEŞİKLERİN ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN VE *Neurospora crassa* FUNGAL KÜLTÜRÜNÜN BİYOTRANSFORMASYON VE BİYOSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Tamer AKAR

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Aralık 2005

Investigation of the Antifungal Activity of Some Furanosteroid Derivatives and Biotransformation and Biosorption Properties of *Neurospora crassa* Fungal Culture

Tamer AKAR

Ph.D. THESIS

Department of Chemistry

December 2005

FURANOSTEROİD YAPILI BAZI BİLEŞİKLERİN ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN VE *Neurospora crassa* FUNGAL KÜLTÜRÜNÜN BİYOTRANSFORMASYON VE BİYOSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Tamer AKAR

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

Danışmanlar : Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR
Yrd. Doç. Dr. İsmail KIRAN

Aralık-2005

ÖZET

Çalışmamızda bir furanosteroid yapısına sahip olan demetoksiviridin, 1α-hidroksidemetoksiviridin, 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion ve 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion bileşiklerinin *Candida albicans, Aspergillus niger, A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium graminarium*, *F. solani ve Geotrichum candidum* fungal kültürlerine karşı antifungal aktiviteleri incelenmiş ve demetoksiviridin ve 1α-hidroksidemetoksiviridin bileşiklerinin, amphotericin B (amfoterisin B) ile karşılaştırıldığında iyi bir etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca seskiterpen yapısına sahip diizoforon, sedrol ve patculi alkol bileşiklerinin *Neurospora crassa* fungal kültürü ile biyotransformasyonları incelenmiştir. Diizoforon ve sedrol bileşiklerinin biyotransformasyonları sonucunda stereospesifik mono hidroksillenmiş türevleri olan 8β-hidroksidiizoforon ve 12β-hidroksisedrol metabolitleri elde edilmiştir. Metabolitler kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılmış ve yapıları FTIR, ^{1}H NMR,^{13}C NMR, APT, DEPT, HETCORE, HMBC, n.O.e ve HREIMS analizleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Son olarak çalışmamızda bir tekstil boyası olan Asit Kırmızısı (AK- 57) nin *N. crassa* fungal biyokütlesi ile biyosorpsiyonu incelenmiş ve izoterm, kinetik ve termodinamik parametreleri belirlenmiştir. Biyosorpsiyon verilerinin Freundlich, Langmuir ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izotermlerine ve yalancı ikinci derece kinetik modele uyum sağladığı ve prosesin ekzotermik olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak bu biyokütlenin sulu çözeltilerden Asit Kırmızısı 57 (AK57) boyasının uzaklaştırılmasında alternatif bir biyosorbent olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

SUMMARY

Antifungal activities of demethoxyviridin, 1α-hydroxydemethoxyviridin, 5'-methylfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dione and 5'-methylfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dione, which possess furanosteroid like structures, were investigated against *Candida albicans, Aspergillus niger, A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium graminarium*, *F. solani* and *Geotrichum candidum* and it was found that demethoxyviridin and 1α-hydroxydemethoxyviridin showed good inhibition effect when compared with that of amphotericin B.

In addition; biotransformation of sesquiterpene-type structures of diisophorone, cedrol and patchouli alcohol were studied and monohydroxylated diisophorone and cedrol derivatives were obtained stereoselectivelly whereas no metabolite was identified from patchouli alcohol. The structures of the metabolites were determined by using spectroscopic methods which include FTIR, ^{1}HNMR, ^{13}C NMR, APT, DEPT, HETCORE, HMBC, nOE and HREIMS spectra.

Finally, biosorption properties of dried *Neurospora crassa* biomass for the removal of a textile dye, Acid Red 57 (AR-57) from aqueous solutions were studied and isotherm, kinetic and thermodynamic parameters were derived. The results showed that the biosorption process was appropriately described by the Langmuir, Freundlich and Dubinin-Radushkevich (D-R) isotherm models, followed by the pseudo-second order kinetic model and was exothermic in nature.

TEŞEKKÜR

"Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi" konulu bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR ve Yrd. Doç. Dr. İsmail KIRAN'ın danışmanlığında yürütülmüştür.

Tez çalışmalarım süresince göstermiş oldukları ilgi, destek ve yardımlardan dolayı Doktora tez danışmanlarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca, çalışmamızın antifungal aktivite kapsamında kullanılan patojenik fungusların Fakültemiz Biyoloji Bölümü'nden temininde göstermiş olduğu kolaylıktan ötürü Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN'a ve biyotransformasyon çalışmalarında kullandığımız *Neurospora crassa* fungal kültürünün teminini sağlayan Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye;

Çalışmalarım süresince desteğini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sibel TUNALI ve Arş. Gör. Dr. Ahmet ÇABUK'a,

Spektroskopik analiz çalışmalarına katkıda bulunan Atatürk Üniversitesi'nden sayın Yrd. Doç. Dr. Cavit KAZAZ'a ve Japonya Tokushima Bunri Üniversitesi'nden sayın Dr. Toshihoro HASHIMOTO'ya,

Biyosorpsiyon çalışmalarına katkılarından dolayı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden sayın Doç. Dr. A. Safa ÖZCAN ve sayın Doç. Dr. Adnan ÖZCAN'a,

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

Sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

Tamer AKAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ……..… **iv**

SUMMARY……... **v**

TEŞEKKÜR…….. **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ…….. **xiii**

ÇİZELGELER DİZİNİ…… **xvi**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……... **xvii**

1. GİRİŞ VE AMAÇ……. **1**

2. FURANOSTEROİDLER……...…….. **4**

2.1. Furanostereoid Yapılı Bazı Bileşikler……...…….. 5

2.1.1. Viridin ……...…….. 5

2.1.2. Viridiol……..... 6

2.1.3. Viron……...…. 6

2.1.4. Demetoksiviridin ve Demetoksiviridol…….……..... 7

2.1.5. Wortmannin……...…. 7

2.2. Furanosteroidlerin Biyolojik Aktivitesi……..... 8

3. BİYOTRANSFORMASYON……... **10**

3.1. Geçmişten Günümüze Biyotransformasyon……..... 10

3.2. Biyotransformasyon ve Enzimler…….…….. 13

3.2.1. Oksidoredüktazlar (Sınıf 1)….....…… 13

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2. Transferazlar (Sınıf 2)…….……...…. 14

3.2.3. Hidrolazlar (Sınıf 3)……. 14

3.2.4. Liyazlar (Sınıf 4)…….....…. 14

3.2.5. İzomerazlar (Sınıf 5)……..... 15

3.2.6. Ligazlar (Sınıf 6)…….....… 15

3.3. Enzimatik Reaksiyonların Avantajları……..……. 16

3.4. Biyotransformasyonda Kullanılan Enzim Sistemleri……...……... 18

3.5. Mikrobiyal Hidroksillemenin Mekanizması……...… 20

3.6. Biyotransformasyon Teknikleri……... 23

3.6.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon…….…….……..... 23

3.6.2. Durağan hücreler ile biyotransformasyon……..…… 24

3.6.3. Spor kültürleri ile biyotransformasyon…… 24

3.6.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon……... 24

3.7. Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri……... 25

3.8. Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler…….…. 25

3.9. *Neurospora crassa* Fungal Kültürü……...……..… 26

3.10. Seskiterpenler…… 26

4. BOYA GİDERİMİNDE BİYOSORPSİYON……. 28

4.1. Biyosorpsiyonu Etkileyen Faktörler….……..…. 30

4.2. Biyosorpsiyon İzotermleri…….….. 30

4.2.1. Langmuir izotermi……..…. 31

4.2.2. Freundlich izotermi…….. 32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.3. Dubinin-Radushkevich (D-R) izotermi……... 33

4.3. Biyosorpsiyonun Kinetiği…….…... 34

4.3.1. Birinci dereceden kinetik modeli…….……..... 35

4.3.2. Yalancı ikinci-dereceden kinetik modeli……..... 36

4.4. Biyosorpsiyonun Termodinamiği…… 36

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR…….….. 37

5.1. Antifungal Aktivite Çalışmaları…….. 37

5.2. Demetoksiviridin Türevlerinin Hazırlanması…….. 37

5.2.1. Demetoksiviridin'in biyosentezi……..…….….... 37

5.2.2. Dehidroksidemetoksiviridin-1-en'in sentezi……... 38

5.2.3. 1α-Hidroksidemetoksiviridin'in sentezi…….. 39

5.2.4. Diğer bileşiklerin sentezi……. 39

5.2.5. Agar difüzyon metodu…….… 39

5.2.6. Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) belirlenmesi…….. 40

5.3. Biyotransformasyon Çalışmaları…….……..... 40

5.3.1. Mikroorganizmanın hazırlanması…….…... 40

5.3.2. *N.crassa*'nın üretimi için kullanılan sıvı besiyeri bileşenleri…….. 41

5.3.3. Sıvı besiyerinde mikroorganizmanın inokulasyonu……..…. 41

5.3.4. Substratların hazırlanması ve biyotransformasyonu……..….. 42

5.3.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu ve izole edilmesi……... 42

5.3.6. Metabolitlerin tanımlanması……..... 43

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.3.7. Seskiterpen sistemlerinin numaralandırılması……. 43

5.3.8. Diizoforonun sentezi…….…….. 43

5.3.9. Diizoforon'un *N. crassa* ile biyotransformasyonu……... 44

5.3.10. Sedrol'ün *N. crassa* ile biyotransformasyonu…… 45

5.4. Biyosorpsiyon Çalışmaları…….. 46

5.4.1. Biyokütlenin hazırlanması…….….. 46

5.4.2. Boya çözeltilerinin hazırlanması…….… 46

5.4.3. Boya biyosorpsiyonu çalışmaları……. 46

5.5. Genel Deneysel Bilgiler……...……... 47

6. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA……...…... 48

6.1. Furanosteroid'lerin Eldesi……... 48

6.2. Furanosteroid'lerin Antifungal Etkinlikleri…….……...…....… 49

6.3. Yapı-Aktivite İlişkileri…… 50

6.4. Diizoforon'un Sentezi……. 51

6.5. Diizoforon'un *N. crassa* ile Biyotransformasyonu……. 52

6.6. Sedrol'ün *N. crassa* ile Biyotransformasyonu……..……..… 60

6.7. Patculi alkol'ün *N. crassa* ile Biyotransformasyonu……..... 65

6.8. Biyosorpsiyona pH Etkisi…… 65

6.9. Biyosorpsiyona Biyosorbent Konsantrasyonu Etkisi…….…….… 66

6.10. Biyosorpsiyona Çalkalama Süresinin Etkisi……. 67

6.11. Biyosorpsiyona Sıcaklığın Etkisi…….. 68

6.12. Biyosorpsiyon İzotermleri……. 68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

6.13. Biyosorpsiyon Kinetiği……..... 70

6.14. Biyosorpsiyonun Termodinamik Parametreleri…… 72

7. KAYNAKLAR DİZİNİ……...……....…..… 74

8. SPEKTRUMLAR……..... 82

Spektrum 1: Diizoforon'un IR spektrumu……..… 83

Spektrum 2: 8β-Hidroksidiizoforon'un IR spektrumu …….…. 84

Spektrum 3: Diizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu…….….. 85

Spektrum 4: 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu …… 86

Spektrum 5:Diizoforon'un DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları ……...…….. 87

Spektrum 6: 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-1……..….. 88

Spektrum 7: 8β -Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-2……..... 89

Spektrum 8: 8β-Hidroksidiizoforon'un APT spektrumu ……..…… 90

Spektrum 9: 8β-Hidroksidiizoforon'un HETCORE spektrumu ……...… 91

Spektrum 10: 8β-Hidroksidiizoforon'un HMBC spektrumu ……..... 92

Spektrum 11: 8β-Hidroksidiizoforon'un genişletilmiş HMBC spektrumu ……... 93

Spektrum 12: 8β-Hidroksidiizoforon'un nOe spektrumu ……. 94

Spektrum 13: Sedrol'ün IR spektrumu ……..... 95

Spektrum 14: 12β-Hidroksisedrol'ün IR spektrumu ……...…….. 96

Spektrum 15: Sedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu……..... 97

Spektrum 16: 12β-Hidroksisedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu ……..…..... 98

Spektrum 17: Sedrol'ün DEPT ve ^{13}C NMR spektrumu……... 99

Spektrum 18: 12β-Hidroksisedrol'ün ^{13}C NMR spektrumu ……. 100

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

Spektrum 19: 12β-Hidroksisedrol'ün kütle (EIMS) spektrumu ……..... 101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Streroid halka sistemi……..…….....	4
2.2.	Furanosteroid halka sistemi……..…….....	5
2.3.	Viridin ……..……..…….....	5
2.4.	Viridiol ……..……..…….....	6
2.5.	Virion …….……..……..…….....	7
2.6.	Demetoksiviridin (a) ve Demetoksiviridiol (b)……..….....	7
2.7.	Wortmannin…….……..……..…….....	8
3.1.	Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu…….....	12
3.2.	Oksidoredüktazların genel reaksiyon tipi……..	13
3.3.	Transferazların genel reaksiyon tipi……..	14
3.4.	Hidrolazların genel reaksiyon tipi…….	14
3.5.	Liyazların genel reaksiyon tipi……..……	15
3.6.	İzomerazların genel reaksiyon tipi……	15
3.7.	Ligazların genel reaksiyon tipi……..……	15
3.8.	Enzim sınıflandırma örneği……...	16
3.9.	Sitokrom P-450 bağımlı monooksijenazın katalitik döngüsü……...	22
3.10.	Önerilen Oksen mekanizması……	22
3.11.	Hidroksilleme için mümkün olan tekrar bağlanma yolu……...	23
3.12.	Terpenlerin temel yapı birimleri……...	26
4.1.	Maksimum doygunluk noktasında yüzeye adsorbe olan madde miktarı……..	31
5.1.	*N. crassa*'nın katı (a) ve sıvı (b) besiyerlerindeki görünümü……..….	42
5.2.	Diizoforon, sedrol ve patculi alkol bileşiklerinin numaralandırılması…….	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil		Sayfa
6.1.	1α-Hidroksidemetoksiviridin'in (3) sentezi……..	48
6.2.	5'-Metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion (4) ve 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion (5)……..	48
6.3.	İzoforon'dan diizoforon'un bazik şartlarda elde edilmesi……	51
6.4.	Diizoforon'un IR spektrumu…….	52
6.5.	8β-Hidroksidiizoforon'un IR spektrumu……...	53
6.6.	Diizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu……...	54
6.7.	8β-Hidroksidiizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu……	54
6.8.	Diizoforon'un DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları……..	55
6.9.	8β-Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-1……	55
6.10.	8β -Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-2……...	56
6.11.	8β-Hidroksidiizoforon'un APT spektrumu……...	56
6.12.	8β-Hidroksidiizoforon'un HETCORE spektrumu……	57
6.13.	8β-Hidroksidiizoforon'un HMBC spektrumu……...	58
6.14.	8β-Hidroksidiizoforon'un genişletilmiş HMBC spektrumu…….	58
6.15.	8β-Hidroksidiiozforon molekülündeki 8α-H sinyalinin HMBC korelasyonları……	59
6.16.	8β-Hidroksidiizoforon'un nOe spektrumu……	59
6.17.	Diizoforonun *N.crassa* ile mikrobiyal hidroksillenmesi……...	60
6.18.	Sedrol'ün IR spektrumu……	61
6.19.	12β-Hidroksisedrol'ün IR spektrumu……...	61
6.20.	Sedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu……..	62
6.21.	12β-Hidroksisedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu…….	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil		Sayfa
6.22.	Sedrol'ün DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları…….	63
6.23.	12β-Hidroksisedrol'ün ^{13}C NMR spektrumu……	63
6.24.	12β-Hidroksisedrol'ün kütle (EIMS) spektrumu……..	64
6.25.	Sedrolün *N.crassa* ile mikrobiyal hidroksillenmesi……..	64
6.26..	*N. crassa* biyosorbenti ile AK-57 boyasının biyosorpsiyonuna pH etkisi……	65
6.27.	Biyosorbent konsantrasyonunun AK-57 boyasının biyosorpsiyonuna etkisi...	66
6.28.	AK-57 boyasının *N. crassa* ile biyosorpsiyonuna çalkalama süresinin etkisi..	67
6.29.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich izoterm grafikleri……	69
6.30.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm grafiği……...	69
6.31.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için birinci dereceden kinetik grafiği……	71
6.32.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için yalancı-ikinci dereceden kinetik grafiği……	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
3.1.	Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları……..…….....……..…….....	19
3.2.	Terpenlerin içerdikleri isopren birimlerine göre sınıflandırılmaları…….	27
5.1.	*N. hinnuleum* fungal kültürünün besiyeri bileşenleri ve miktarları……..	37
5.2.	*N. crassa*'nın sıvı besiyeri bileşenleri……..	41
6.1.	Demetoksiviridin (1) ve 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiklerinin antifungal aktiviteleri……..	49
6.2.	Demetoksiviridin (1) ve 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiklerinin minimum inhibitör konsantrasyonları……...	50
6.3.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Langmuir, Freundlich ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm verileri……	70
6.4.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için kinetik veriler……..	72
6.5.	*N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için termodinamik veriler……...	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AK57	Asit Kırmızısı 57
APT	Attached proton test
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
β	Adsorpsiyonun ortalama serbest enerjisiyle ilgili sabit (mol^2/J^2)
CFU	Koloni oluşturan ünite
C_o	Başlangıç adsorbat derişimi (mol/L)
C_d	Dengede adsorplanmadan kalan madde miktarı (mol/L)
$CDCl_3$	Dötoro kloroform
^{13}C NMR	Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans
d	Dublet (çift pik)
DEPT	-CH, $-CH_2$ ve $-CH_3$ gruplarının tespit edildiği NMR tekniği
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
E	Adsorpsiyonun ortalama serbest enerjisi (kJ/mol)
EIMS	Elektron iyonizasyonu kütle spektrumu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
ε	Polanyi potansiyeli
g	Gram
HMBC	Uzun Mesafeli Proton ve Karbon Etkileşimlerinin Korelasyonu
HREIMS	Yüksek çözünürlüklü elektron iyonizasyon kütle spektrumu
IMI	International Mycological Institute
İTK	İnce tabaka kromatografisi
J	Joule
J	Coupling constant, yarılma sabiti (Hz)
K_F	Freundlich adsorpsiyon izotermi katsayısı (L/g)
K_L	Langmuir izoterm sabiti (L/mol)
k_1	Yalancı- birinci dereceden hız sabiti (1/dk)
k_2	Yalancı-ikinci dereceden hız sabiti (g/mg.dk)
L	Litre
m	Biyosorbent kütlesi (g)
MHA	Mueller Hinton agar
n	Freundlich izoterm sabiti
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simge	Açıklama
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nOe	Nükleer overhause etkisi
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
PA	Fosfatidat
PC	Fosfatidilkolin
PLC	Fosfolipaz C
PI-3-kinaz	Fosfoinositid 3-kinaz
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PIP_3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PLA_2	Fosfolipaz A2
PLD	Fosfolipaz D
R	İdeal gaz sabiti (J/mol.K)
r^2	Regresyon katsayısı
R_L	Boyutsuz ayırma faktörü
s	Singlet (tekli pik)
SGM	Sabouraud glukoz ortamı
T	Mutlak sıcaklık (K)
t	Zaman (dk)
TMS	Tetrametilsilan
q_d	Dengede adsorplanan madde miktarı (mol/g)
q_m	Teorik doygunluk kapasitesi (mol/g)
q_{mak}	Maksimum tek tabakalı adsorpsiyon kapasitesi (mol/g)
q_o	Adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
q_t	*t* zamanda biyosorplanan madde miktarı (mg/g).
ΔG^o	Adsorpsiyon serbest enerjisi (kJ/mol)
ΔH^o	Adsorpsiyon entalpisi (kJ/mol)
ΔS^o	Adsorpsiyon entropisi (J/K.mol)
$[\alpha]_D$	Sodyum lambasında spesifik rotasyon=100α/lc

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoteknoloji; mikroorganizmaların, hücre ve doku kültürlerinin ve bunların çeşitli kısımlarının teknik uygulama potansiyelinden yararlanmak amacıyla biyoloji, biyokimya, kimya, mikrobiyoloji, genetik ve mühendisliğin entegre bir uygulama alanını kapsamaktadır. Avrupa Biyoteknoloji Federasyonu (EFB)'na göre biyoteknoloji "İnsan ve çevre sağlığını olumsuz etkilemeyecek yöntemlerle ve bilim ve mühendislik ilkelerine dayalı olarak biyolojik sistemlerin mal ve hizmet üretiminde kullanılması" olarak tanımlanmaktadır. Biyoteknoloji, diğer bir çok bilim dalından farklı olarak multi-disipliner bir özelliğe sahiptir. Temel bilimlerdeki gelişmelerin üzerine kurulan günümüz biyoteknolojisinin çevre biyoteknolojisi, gıda biyoteknolojisi, tarım biyoteknolojisi, tıbbi biyoteknoloji, fermentasyon biyoteknolojisi, enzim biyoteknolojisi, gen biyoteknolojisi gibi değişik uygulama alanları bulunmaktadır (Kolankaya, 2000). Canlı hücreler (mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücreleri veya dokuları) ve hücrelerden elde edilen enzimler veya organeller tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlar, aşağıda sıralanan araştırma konularında günümüzdeki bilimsel çalışmalara önemli katkılar sağlamaktadır (Telefoncu, 1995).

- Biyolojik reaksiyonlarla bazı maddelerin üretimi,
- Mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücre kültürleri yardımıyla maddelerin yıkımı,
- Atık suların biyolojik arıtımı,
- Protein üretimi ve insan beslenmesinin garantiye alınması,
- Hammadde ve enerji stoklarının daha verimli değerlendirilmesi,
- Bulaşıcı ve salgın hastalıklarla savaş,
- İnsan ve hayvan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi,
- Çevre korunması ve atıkların yeniden değerlendirilmesi,
- Bitkilerin biyolojik korunması.

Günümüzde antibiyotikler, Vitamin B_{12} gibi ikincil (sekonder) metabolitler, mikrobiyal biyotransformasyonla elde edilebilen steroidler ve doğum kontrol hapları,

amino asitler, enzim preparatları gibi birçok ürün, endüstriyel boyutlarda biyoteknolojik olarak üretilmektedir. Ayrıca atık suların arıtılmasında birçok teknik kullanılmasına rağmen, atık suyun hijyenik hale getirilerek, arıtılıp tekrar doğal su sirkülasyonuna sokulabilmesi için biyoteknolojik arıtım, önemli bir olanaktır (Telefoncu, 1995).

Patojenik fungal kültürler tarım bitkilerinde ve insan sağlığı üzerinde ciddi fungal enfeksiyonlar yaratabilmektedir. Örneğin insanlarda görülen Aspergillosis bir fungal enfeksiyon nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu gibi fungal enfeksiyonları önleyebilmek için yeni ve yan etkisi az antifungal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Amfoterisin B (Amphotericin B) ve İtrakonazol (Itraconazole) yaygın olarak kullanılan iki antifungal ajandır. Fakat bunların kullanımı, diğer ilaçlarda olduğu gibi, yan etkilerinin olması ve tedaviye yanıt oranlarının düşük olması (% 0-50) nedeniyle kısıtlanabilmektedir. Bu sebeple daha etkili ve yüksek aktivite gösteren yeni bileşikler bulunması üzerinde yapılan araştırmalar günümüzde önem kazanmıştır (Denning et al., 1994; Denning, 1996; Rewankar and Peterson, 1997; Summers et al., 1997; Iwai et al., 2004). Bitki, hayvan ve insan sağlığına zarar veren fungal kültürler aynı zamanda endüstriyel öneme sahip birçok bileşiğin üretiminde de kullanılabilmektedir. Bu tür maddelere, gıda katkı maddesi olarak kullanılan ve monoterpen yapısına sahip mentolün türevlerinin eldesi, parfüm sanayinde kullanılan ve seskiterpen yapısına sahip olan bileşiklerin ve türevlerinin eldesi, furanosteroidler olarak adlandırılan antibiyotik grubunun *Nodulosporium hinnuleum* başta olmak üzere birçok fungal kültür tarafından fermantasyonla elde edilmeleri örnek olarak verilebilir. Bu şekilde, organik yöntemlerle eldesi zor olan veya uzun reaksiyon zinciri sonucu elde edilebilecek moleküllerin daha kısa sürede ve yüksek verimle eldesine olanak sağlanmaktadır (Hanson, 1995a).

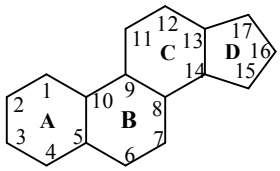
Çalışmamızın ilk bölümünde furanosteroid antibiyotik grubuna ait demetoksiviridin ve bazı türevlerinin sentezi gerçekleştirilerek değişik fungal kültürlere karşı antifungal etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar irdelenerek yapı-biyolojik aktivite değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışmamızın diğer bölümlerinde ise *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özellikleri açısından biyoteknolojik potansiyeli araştırılmıştır. Literatürde söz konusu fungal

kültür kullanılarak sadece steroid hormonlar ile biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve hidroksillenmiş türevlerin elde edildiği rapor edilmiştir (Stone et al., 1955; Maugras et al.,1973a; Maugras et al.,1973b). Bu fungal kültürün biyosorpsiyon özelliğine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda ilk olarak seskiterpen yapısına sahip sedrol, diizoforon ve patculi alkolün biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda diizoforon ve sedrol'ün monohidroksillenmiş türevleri elde edilmiştir. Çalışmamızın son bölümünde ise *N. crassa* fungal biyokütlesinin bir tekstil boyası olan Asit Kırmızısı 57 (AK-57)'nin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında alternatif bir biyosorbent olarak kullanımı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bu biyokütlenin değişik sıcaklıklarda ve asidik pH'da, sulu çözeltilerden asit kırmızısı boyasının uzaklaştırılması için etkin bir biyosorbent olabileceği belirlenmiştir.

Çalışmamız antifungal aktivite, biyotransformasyon ve biyosorpsiyon konularına ait çalışmaları bir arada içermektedir. Giriş bölümünde ilk olarak furanosteroidlerin yapı, tür ve özellikleri açıklanmaya çalışılmış, daha sonra biyotransformasyon, seçilen fungal kültür ve seskiterpenler hakkında bilgiler verilmiştir. Son olarak ise özellikle sulu çözeltilerden boyar maddelerin uzaklaştırılması kapsamında biyosorpsiyon irdelenmiştir.

2. FURANOSTEROİDLER

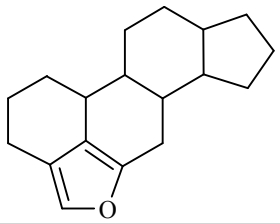
Steroidler canlı organizmalarda çok önemli fonksiyonları olan doğal ürünlerin geniş bir grubunu oluştururlar. Steroid hormonlar, vitamin-D ve bazı antibiyotikler bu bileşiklere örnek olarak verilebilir. Steroidlerin tümünde tetrasiklik karbon iskeleti olarak adlandırılan ve üç benzen halkasına bir beşli halkanın eklenmesiyle oluşan bir ortak yapı bulunmakla beraber, halkada ya da yan zincir olarak taşıdıkları farklı gruplarla birbirlerinden ayrılırlar (Fieser and Fieser, 1959).



Şekil 2.1. Steroid halka sistemi.

Steroid ilaçların ve hormonların üretiminde mikrobiyal biyoteknolojinin önemi ilk kez 1952 yılında Murray ve Peterson tarafından gerçekleştirilen progesteronun *Rhizopus arrhizus* fungal kültürü ile 11-α hidroksillenmiş türevine dönüştürülmesiyle anlaşılmıştır (Murray and Peterson, 1952). Patentlenen bu çalışmadan itibaren ilaç ve hormon olarak değerlendirebilmek için yeni bileşiklerin oluşturulması amacıyla steroidlerin mikrobiyal transformasyonları alanındaki çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Günümüzde ticari önem taşıyan steroid türevlerin eldesinde kimyasal yollar yetersiz kalmakta veya ekonomik olarak sınırlanmaktadır. Bu nedenle bu amaç için biyotransformasyon reaksiyonları tercih edilmektedir (Mahato and Garai, 1997).

Sistematik olarak furanosteroidler olarak adlandırılan bileşikler değişik fungal kültürlerden metabolit olarak izole edilirler. Bu bileşikler steroidal antibiyotikler sınıfının bir grubunu oluşturmaktadır. Diğer doğal steroidlerden farklı olarak furanosteroid yapılı bileşikler steroid iskeletindeki A ve B halkaları arasına yerleşmiş bir furan halkası içerirler (Şekil 2.2) (Boynton et al., 1999).



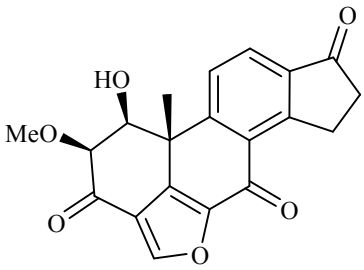
Şekil 2.2. Furanosteroid halka sistemi.

Viridin, viridiol, viron, demetoksiviridin, demetoksiviridiol ve wortmannin furanosteroidler antibiyotikler grubunda yer alan bileşiklerdir.

2.1. Furanostereoid Yapılı Bazı Bileşikler

2.1.1. Viridin

Viridin, furanosteroid antibiyotikler içinde ilk izole edilen bileşiktir ve *Gliocladium virens* fungal kültürünün metaboliti olarak tanımlanmıştır. Viridin üreten bu mikroorganizma sonradan *Trichoderma viridae* olarak adlandırılmıştır (Hanson, 1995b). Bu bileşik ayrıca *T. koningii* ve minör metabolit olarak da *Gliocladium flavofuscum* fungal kültürlerinden de izole edilmiştir (Avent et al., 1993).

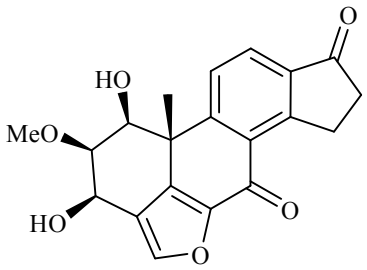


Şekil 2.3. Viridin

Viridinin alfa ve beta olmak üzere iki formu mevcuttur. Alfa formu baskın olan fungal metabolittir. Beta formunda metoksi grubu ekvatoryal konumda iken alfa formunda aksial konumda bulunur. Alfa viridin beta formuna göre antifungal etki olarak 10 kat daha güçlüdür (Fieser and Fieser, 1959; Hanson, 1995b).

2.1.2. Viridiol

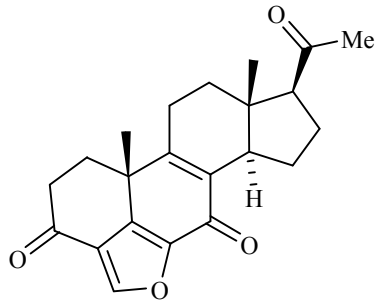
Viridiol temel metabolit olarak ilk kez *G. virens* fungal kültüründen elde edilmiştir. Viridiol ayrıca *G. deliquescens* ve *T. viridae* kültürlerinden de izole edilmiştir. Viridole ait spektroskopik verilerin viridinin spektroskopik verileriyle karşılaştırılmasından sonra, izole edilen bu bileşiğin dihidroviridin (viridol) adı verilen yeni bir bileşik olduğu ortaya konmuştur. Viridiol, *T. viridae* fungal kültürünün özellikle karbon bakımından zengin aynı zamanda kısıtlı azot bulunan besiyerinde kültürlendirilmesi ile ana metabolit olarak izole edilmiştir (Jones and Hancock, 1987; Hanson, 1995b).



Şekil 2.4. Viridiol.

2.1.3. Viron

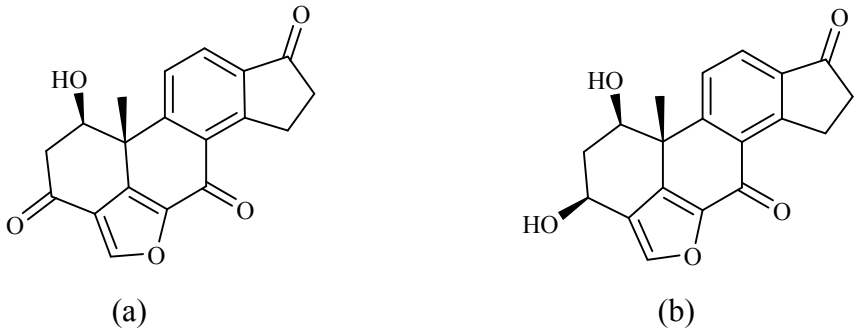
Viridin *G. virens* fungal kültürü tarafından fermentasyon sıcaklığının 25°C olduğu ortamda üretilmektedir. Aynı fermentasyonun 32°C'de gerçekleştirilmesi durumunda ise daha düşük verimli, daha az polar ve viridine benzer ikinci bir metabolit belirlenmiştir. Bu bileşik (Şekil 2.5) viron olarak adlandırılmıştır. Viron, 25°C sıcaklıktaki fermentasyon ortamında oluşmamaktadır. Vironun muhtemelen viridin biyosentezinde ara ürünlerden bir tanesi olarak oluştuğu düşünülmektedir (Hanson, 1995b).



Şekil 2.5. Viron

2.1.4. Demetoksiviridin ve Demetoksiviridiol

Demetoksiviridin ve Demetoksiviridiol bileşikleri *N. hinnnuleum* fungal kültürü tarafından üretilen metabolitlerdir. Bu bileşiklerin biyolojik aktivite potansiyeli, hücre sinyal sisteminin bazı spesifik adımlarını inhibe etmelerine dayanır (Cole et al., 1975; Hanson, 1995b).

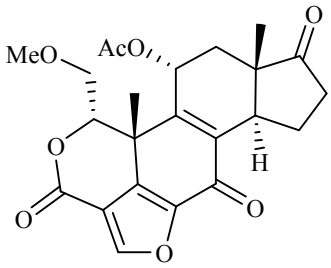


Şekil 2.6. Demetoksiviridin (a) ve Demetoksiviridiol (b).

2.1.5. Wortmannin

Wortmannin, *Penicillium wortmanni* fungal kültüründen elde edilen bir metabolit olarak tanımlanmıştır. Bu bileşik genel bir antibiyotik olmamakla beraber oldukça spesifik antifungal özelliğe sahiptir. Örneğin *Botrytis allii*, *B. cinerea*, *B. fabae*, *Cladosporium herbarum*, *R. stolinifer* ve daha pek çok patojenik fungal kültürün büyümesini inhibe etmektedir. Wortmannin ve yapısal analoğu olan demetoksiviridinin fosfoinositid 3-kinaz (PI-3-kinaz) aktivitesi üzerinde nanomolar konsantrasyonlarda

inhibitör etkisi gösterdikleri ortaya konmuştur (Arcaro and Wymann, 1993; Hanson, 1995b).



Şekil 2.7. Wortmannin

2.2. Furanosteroidlerin Biyolojik Aktivitesi

Büyüme faktörleri ile hücre çoğalmasının düzenlenmesi hücre içi sinyal sisteminin aktivasyonuna dayanmaktadır (Cross et al., 1997). PI-3-kinaz metabolizmanın kontrolü, hücresel hareket, membran transportu, salgılama, hücrelerin çoğalması ve canlılığını devam ettirmesi ve karbohidrat metabolizması gibi süreçlerin düzenlenmesi, ayrıca lokositlerdeki NADPH oksidaz ve endotelial hücrelerdeki nitrik oksit sentetaz gibi bazı özel enzim sistemlerinin kontrolüne ait hücre sinyal sistemlerinde çok önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle bu enzimi inhibe etme yeteneğine sahip bileşikler tedavi edici ilaç potansiyeline sahiptir. Antikanser ilaçlar ve antiinflamatuar ajanlar gibi ilaçlar buna örnek olarak verilebilir (Wymann et al., 2003; Isosaki, 2004).

Yapılan çalışmalar, büyüme faktörleri ile hücrenin uyarılmasının bazı fosfolipidlerin hidrolizinden oluşan fosfolipazlarla ilişkili membranların aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Fosfolipaz C (PLC) ile fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2)'ın hidrolizi sonucu intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artmasını ve protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlayan inositol 1,4,5-trifosfat ve sn-1,2-diaçilgliserol ikincil habercileri oluşmaktadır. PIP_2 ayrıca büyüme faktörü düzenleyicisi olan PI-3-kinaz tarafından fosforillenebilir ve yine ikincil haberci olduğu kabul edilen fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP_3) oluşur. PI-3-kinaz'ın büyüme faktör reseptörleri ve belli onkojenlerin hücresel kompleksleri ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir.

Fosfatidilkolin (PC), büyüme faktör uyarılmasına cevap olarak da hidrolizlenir. Bu lipid fosfolipaz D (PLD) tarafından da fosfatidat (PA) ve kolin ya da fosfolipaz A_2 (PLA_2) oluşturmak üzere hidrolizlenebilir böylece oluşan araşidonat ve lizofosfatidilkolinin intrasellüler haberci fonksiyonlarına sahip oldukları düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda fungal metabolit olan wortmannin ve onun yapısal analoğu demetoksiviridin'in insan nötrofillerinde fMet-Leu-Phe uyarıcılığıyla gerçekleşen süperoksit oluşumunu, PLD aktivitesini ve kısmen PI-PLC aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bundan başka wortmannin ve demetoksiviridin'in spesifik olarak PI-3-kinaz inhibitörleri oldukları ve yakın zamanda da fosfolipaz A_2 inhibitörü oldukları ortaya konmuştur. Bulgular wortmannin ve demetoksiviridin'in fosfolipid ile ilgili sinyal sisteminin inhibisyonunda geniş bir spesifite aralığına sahip olabileceğini göstermektedir (Cross et al., 1997).

3. BİYOTRANSFORMASYON

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik sistemlerin doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak, doğal substratları olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümler sözkonusudur (Davies et al., 1989; Martin, 1991; Poppe and Novak, 1992; Roberts, 1992; Hanson, 1995a; Berger, 1995; Loughlin, 2000; Faber, 2004). Günümüzde önemi giderek artan biyoteknolojik çalışmaların çok önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon, aşağıda sıralandığı gibi pek çok kullanım alanı dışında toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre sorunlarının giderilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir (Hanson, 1995a; Telefoncu, 1995; Faber, 2004).

- İlaç etken maddeleri üretimi,
- Koku maddeleri üretimi,
- Gıda katkı maddesi üretimi,
- Enerji üretimi,
- Antibiyotik üretimi,
- Amino asit üretimi.

3.1. Geçmişten Günümüze Biyotransformasyon

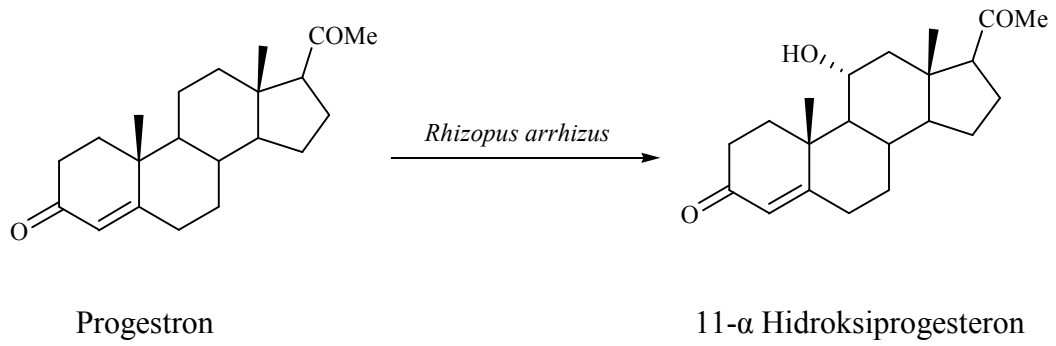
Biyotransformasyon ve biyoteknoloji birlikte düşünüldüğünde M.Ö 3000 yılında ilk ekmek mayasının, ilk alkolik mayalanmanın ve ilk sirke yapımının gerçekleştirildiği dönemlere kadar gidilebilir. Elbette o dönemlerde bu işlemler bilinçli olarak yapılmasa da insanlar bu sayede ilk kez mayalanmayı öğrenmişlerdir. Sonraki dönemlerdeki önemli gelişmeler ise tarihleri baz alınarak aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Roberts, 1992; Telefoncu, 1995; Hanson, 1995a).

- M.Ö 2000 yılında Mezapotamyada şarap üretimi,
- MÖ. 300 yılında bira üretimi,
- 1150 yılında etanol üretimi,
- 14. yy'da endüstriyel anlamda sirke üretimi,
- 1650 yılında kültür mantarı üretimi,
- 1818 yılında mayaların mayalanma özelliğinin keşfedilmesi.

Biyotransformasyon alanındaki ilk uygulamayı, Pasteur tarafından 1858 yılında *P. glaucum* fungal kültürü ile DL-amonyum tartarattan L-amonyumun, D-enantiyomerinin seçimli yıkımı ile elde edilmesi oluşturmaktadır. Yine 1864 yılında Pasteur tarafından yapılan çalışmada, etanolün *Acetobacter aceti* ile asetik asite dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma biyotransformasyon alanında literatürde yayınlanan ilk çalışmadır. Bu çalışmalar 1886'da Brown tarafından genişletilmiş ve etanolün oksidasyonunu da gerçekleştiren *Bacterium aceti* olarak adlandırılan mikroorganizma ile propanol propiyonik aside yükseltgenmiştir. Bu çalışma aynı organizma ile mannitolün fruktoza ve dekstrozun glukonik aside biyotransformasyonu ile ilgili Berthelot tarafından daha önce yapılan çalışmaların devamıdır. Bununla birlikte daha önceki çalışmaların çoğunda saf kültürlerin eksikliği söz konusudur. 1874'te Dumas tarafından yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile sülfürün hidrojen sülfüre indirgendiği belirtilmiştir. Bunu 1898'de Windisch tarafından furfuralın, furfuril alkole indirgenebileceğinin açıklanması izlemiştir. Bu yüzyılın başlarında *S. cerevisiae* fungal kültürünün kullanımına dayanan pek çok biyotransformasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Özellikle Liebig ve Neuberg tarafından gerçekleştirilen bu biyotransformasyonların bazıları 1. Dünya savaşı süresince aseton, gliserol ve bütanolün mikrobiyolojjk olarak üretimine yöneliktir. 1921'de Neuberg tarafından maya ile kiral asetoin kondenzasyonu geliştirilmiştir. Fermantasyon ortamına benzaldehidin ilave edilmesi ile asetaldehit kondenzasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta ketol oluşmuştur. Bu 1934'te bir alkaloid olan epedrinin ticari sentezine temel oluşturmuştur. Yine 1930'larda vitamin C'nin sentezi endüstriyel uygulamalarda yararlı bir gelişmedir. Modern uygulamaların temelini steroid hormonların mikrobiyal transformasyonu oluşturmuştur. Buna en iyi örnek

dehidroizoandrosteron ve testesteron arasındaki dönüşüm reaksiyonudur. 1937 yılında *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen bu dönüşümün ilk aşamasında, söz konusu fungal kültür dehidroizoandrosteronu androsterodiona oksitlemiş, daha sonra da C-17'de bulunan keto grubu seçimli ve sterospesifik olarak testosteron vermek üzere alkole indirgenmiştir (Hanson, 1995a; Roberts et al., 1995; Dixan, 1999; Faber, 2004).

1952 yılında ise Murray tarafından *R. arrhizus* fungal kültürü ile progesteronun 11. pozisyonuna bir hidroksil grubunun α- konumunda sterospesifik olarak ilavesi gerçekleştirilerek 11α-hidroksiprogesteron molekülü sentezlenmiştir (Şekil 3.1) (Murray and Peterson, 1952).



Şekil 3.1. Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu

Bu çalışmayı takiben androstrenedionun bakteriyal biyotransformasyonu ile çeşitli steroid hormonların eldesi gerçekleştirilmiştir. İlaç etken maddesi üretiminde önemli bir gelişme, *P. chryssogenum* tarafından üretilen doğal penisilinin β-laktam, ampisilin ve amoksilin gibi yarı sentetik penisilinlerin etken maddesi olan 6-aminopenisillanik aside transformasyonunun keşfedilmesidir. İlaç etken maddesi özelliğine sahip moleküllerin içerdiği fonksiyonel grupların stereokimyası, ilaçların etkinliği bakımından çok önemlidir. Genellikle yararlı etkileri bir enantiyomerde bulunan bu moleküllerin hazırlanmasında çoğu zaman güncel kimyasal yöntemler yetersiz kalmaktadır. Özellikle 1960'lardaki talidomit felaketiyle diğer enantiyomerlerin yan etki hatta zehir kaynağı olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle spesifik enantiyomerin üretimi ilaç endüstrisinde önemlidir. Biyotransformasyonla tek

enantiyomerin seçimli üretimi daha kolay gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas putida* bu amaç için kullanılan mikroorganizmalardan biridir (Hanson, 1995a).

Geçmişteki spesifik enzim uygulamaları, hazır enzim sistemlerine ulaşılamaması nedeniyle kısıtlı iken genetik mühendislik ve yeni geliştirilen DNA teknikleriyle bir organizmadan diğerine genetik bilgi transferine olanak sağlanmış ve bu sınırlama ortadan kaldırılmıştır (Hanson, 1995a; ; Roberts et al., 1995; Dixan, 1999; Faber, 2004).

3.2. Biyotransformasyon ve Enzimler

Biyotransformasyon reaksiyonları enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimler izole enzimler ya da bütün hücre sistemlerinde bulunan enzimlerdir (Demirci, 2000, Faber, 2004). Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (E.C.) enzimleri hem reaksiyon hem de substrat özelliklerini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirmiştir. Buna göre enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar, olmak üzere aşağıda verilen altı ana sınıf altında toplanmıştır (Gözükara, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Koolman and Röhm, 2002) .

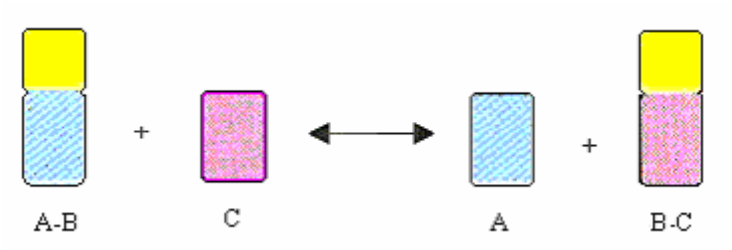
3.2.1.Oksidoredüktazlar (Sınıf 1)

İki substrat arasında yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Örneğin; CH-OH, CH=CH, C=O, CH-NH_2, CH-NH gruplarının indirgenme ve yükseltgenmelerini katalizleyen enzimler bu gruptadır. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:

Şekil 3.2. Oksidoredüktazların genel reaksiyon tipi

3.2.2. Transferazlar (Sınıf 2)

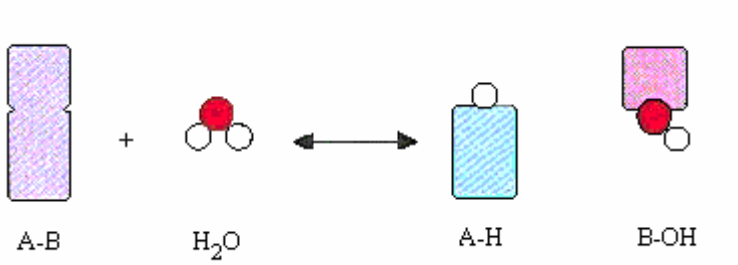
Bir substrattan diğerine fonksiyonel grupların transferini katalizlerler. Örneğin; glikozil, amino, fosfat gibi grupların transferini gerçekleştirirler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.3. Transferazların genel reaksiyon tipi

3.2.3. Hidrolazlar (Sınıf 3)

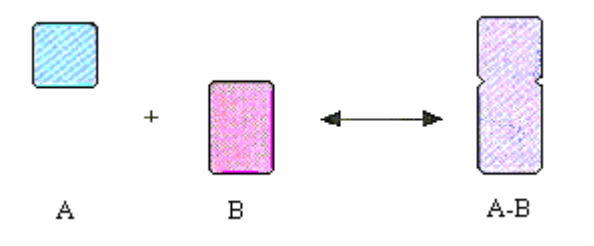
Ester, eter, peptid, glikozit gibi bağların hidrolizini katalizlerler. Bir başka deyişle hidrolazlar da grup transferinde rol alırlar, ancak alıcı daima bir su molekülüdür. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.4. Hidrolazların genel reaksiyon tipi

3.2.4. Liyazlar (Sınıf 4)

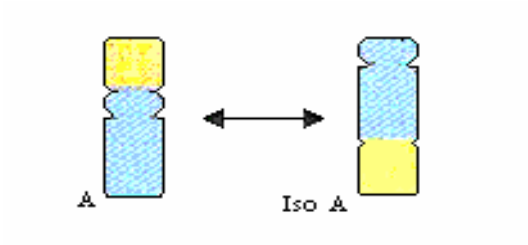
C-C, C-O ve C-N arasındaki çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.5. Liyazların genel reaksiyon tipi

3.2.5. İzomerazlar (Sınıf 5)

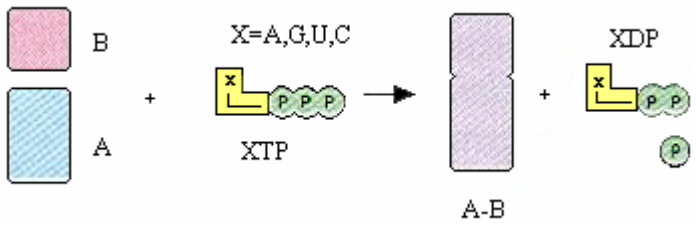
Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalizlerler. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.6. İzomerazların genel reaksiyon tipi

3.2.6. Ligazlar (Sınıf 6)

Bu gruba sentetazlar da denir. C-O, C-S, C-N, ve C-C arasında bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Ligazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle bu reaksiyonlar her zaman ATP ya da diğer trifosfatlardaki yüksek enerjili fosfat bağının hidroliziyle açığa çıkan enerji yardımıyla gerçekleşir. Genel reaksiyon tipi aşağıdaki gibidir:



Şekil 3.7. Ligazların genel reaksiyon tipi

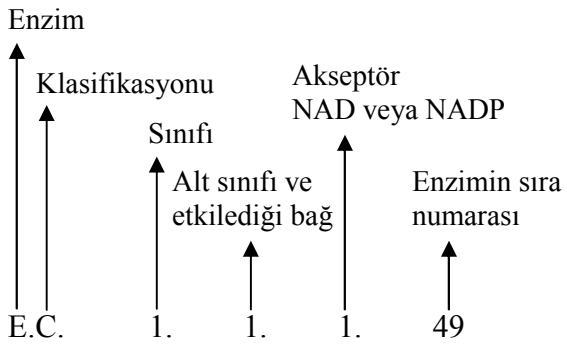
Bugün yaklaşık 2000 farklı enzim bilinmektedir. Tüm enzimler enzim kataloğuna bir dört basamaklı sayı olan EC numarası altında girilir.

1- İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir.

2- İkinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu belirtir.

3- Üçüncü numara ise akseptörü belirtir.

4- Dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasıdır (Gözükara, 1997). Bu gösterim aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 3.8. Enzim sınıflandırma örneği

3.3. Enzimatik Reaksiyonların Avantajları

a. Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir.

Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen aynı reaksiyona göre 10^8-10^{10} kez daha hızlıdır. Bu değer kimi zaman 10^{12} düzeyine de ulaşabilir ki bu kimyasal katalizörlerin ulaşamayacağı bir hızı ifade eder. Kimyasal bir katalizör işlevini gerçekleştirmesi için genellikle % 0,1-1 mol aralığına ihtiyaç duyarken enzimatik bir reaksiyonda bu oran % 10^{-3}-10^{-4} düzeyine düşer. Bu da enzimleri oldukça etkili kılar (Faber, 2004).

b. Enzimler ılımlı koşullarda çalışırlar.

Enzimatik reaksiyonlar pH 5-8 (genellikle pH 7) ve 20-40°C (genellikle 30°C) koşullarında gerçekleşir. Bu ılımlı koşullar sayesinde istenmeyen yan reaksiyonlar minimum düzeye indirgenir (Faber, 2004).

c. Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden kalabilirler.

Enzimlerin çalışma koşulları benzer ya da aynı olduğundan tek bir ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi reaksiyon prosesini kolaylaştırır (Faber, 2004).

d. Enzimler geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir.

Enzimler bu özellikleri ile doğal substratları olmayan sentetik substratlar üzerinde de etkili olabilirler. Ayrıca sıklıkla sulu ortamda çalışmayı gerektirmezler. Bu da organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren durumlar için bir avantajdır (Faber, 2004).

e. Enzimlerin geniş bir reaksiyon spektrumu vardır.

Tüm katalizörler gibi enzimler de bir reaksiyonu hızlandırır, ancak reaksiyonun termodinamik dengesi yönünde etkileri olmadığından bazı enzim katalizli reaksiyonlar her iki yönde de gerçekleşebilir. Ayrıca organik reaksiyonların hemen her tipine karşılık gelen bir enzimatik reaksiyon vardır. Örneğin; ester, amid, lakton, laktam, eter, asit anhidrit, epoksit ve nitrillerin hidrolizi ya da sentezi, alkan, alken, aromatik, alkol, aldehit ve keton, sülfid ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, halojenasyon ve dehalojenasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, izomerizasyon, alkiloin ve aldol reaksiyonları gibi (Faber, 2004).

f. Enzimler üç tip seçicilik gösterirler.

<u>Kimyasal seçicilik:</u> Fonksiyonel grubun bir tek tipi üzerine seçicilik gösteren enzimlerin bu özelliği sayesinde reaksiyon verimli ve yan ürün olasılığı düşük olarak gerçekleşir (Faber, 2004).

Bölgesel seçicilik: Kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde enzimler aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara seçicilik gösterirler (Faber, 2004).

Enantiyomer seçicilik: Enzimlerin substrattaki kiral seçiciliğidir. Özellikle enantiomerik olarak istenen ürünün hazırlanmasında çok önemli bir özelliktir (Faber, 2004).

g. Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi çok zor ya da imkansız reaksiyonlar enzimatik olarak kolayca gerçekleştirilebilir.

Enzimatik reaksiyonların sağladığı önemli avantajlar nedeniyle, biyotransformasyon uygulamaları güncel kimyasal reaksiyonlarla karşılaştırıldığında önemli üstünlüklere sahiptir. Bunlardan başlıcaları aşağıda sıralanmıştır (Hanson, 1995a; Faber, 2004).

- İlaçların, ziraii kimyasalların ve gıda katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasaların hazırlanmasında,
- Enzimatik reaksiyonlarla doğal olarak ya da kimyasal olarak sentezlenmiş çeşitli bileşiklerin özel modifikasyonlarının hazırlanmasında,
- Yapı etki ilişkilerinin araştırılması için türevlerin hazırlanmasında,
- Biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanmasında,
- Biyolojik sentez çalışmaları ve biyolojik sistemlerin taklit edilmesinde,
- Biyodegredasyonda (çevre, ekoloji, geri dönüşüm, biyokütle, biyoenerji konularında) ön plana çıkmaktadır. Ayrıca bu özellikleri ile biyotransformasyon reaksiyonları daha ekonomik ve çevre dostu olarak nitelendirilirler (Demirci, 2000; Faber, 2004).

3.4. Biyotransformasyonda Kullanılan Enzim Sistemleri

Biyotransformasyon reaksiyonları temel olarak bütün hücre sistemleri ya da izole enzim sistemleri ile gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri kapsamında değerlendirilen biyokatalizörler şunlardır (Demirci, 2000);

- Mikroorganizmalar,
- Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri,
- Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri,
- İnsan metabolizması.

Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemleri birbiriyle karşılaştırıldığında sahip oldukları avantaj ve dezavantajlar Çizelge 3.1'de özetlenmiştir (Faber, 2004).

Çizelge 3.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları

Biyokatalizör	Form	Avantaj	Dezavantaj
İzole enzimler	**Genel**	✓ Basit düzenekler, ✓ Basit işlemler, ✓ Yüksek konsantrasyon toleransı nedeniyle iyi verim	✓ Kofaktöre ihtiyaç duyulur
	Sulu ortamda	✓ Yüksek enzim aktivitesi	✓ Yan reaksiyon olasılığı, ✓ Çözünmeyen lipofilik substratlar, ✓ Ekstraksiyon gerekliliği
	Organik çözücüde	✓ Çalışma kolaylığı, ✓ Lipofilik substrat çözünürlüğü, ✓ Enzimin geri kazanım kolaylığı	✓ Düşük aktivite
	İmmobilize	✓ Tekrar kullanılabilirlik	✓ İmmobilizasyon esnasında aktivite kaybı
Bütün hücreler	**Genel**	✓ Kofaktöre ihtiyaç duyulmaz	✓ Pahalı donanım, ✓ Büyük hacimlerle çalışma zorluğu, ✓ Düşük konsantrasyon toleransı nedeniyle düşük verim, ✓ Organik çözücülere düşük tolerans, ✓ Yan ürün olasılığı.
	Büyüyen kültür	✓ Yüksek aktivite	✓ Çok miktarda biyokütle, ✓ Türev ürün fazlalığı, ✓ Proses kontrol güçlüğü.
	Durağan kültür	✓ Çalışma kolaylığı, ✓ Daha az türev ürün	✓ Düşük aktivite
	İmmobilize hücreler	✓ Tekrar kullanılabilirlik	✓ Düşük aktivite

Biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemlerinin tercih edilmesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir (Faber, 2004);

- Potansiyel olarak yararlı pek çok enzim doğal ortamı olan hücre dışında kararsız olabilir.
- İntrasellüler enzimler hücre dışında özellikle hücre gelişmesi sırasında salınan proteazlar gibi enzimlerin hidrolitik saldırısına maruz kalabilirler.
- İntrasellüler enzimler aktivite gösterebilmeleri için bir ya da daha çok kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktörler canlı hücre içerisinde hazır iken hücre dışında bunların sağlanması ekonomik bir güçlüktür.
- İntrasellüler enzimlerin izole edilmesi zaman ve kaynak yönünden pahalı olabilir.

Yine biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemleri içinde mikrobiyal hücrelerin tercih edilmesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir (Faber, 2004)

- Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı ve buna bağlı olarak metabolik hızı, bitki ve hayvan hücreleri ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyon reaksiyonunun hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesini sağlar.
- Genellikle mikrobiyal hücrelerde metabolize edilen substrat çeşitliliği bitki ve hayvan hücrelerine göre daha fazladır.
- Mikrobiyal hücrelerin sahip olduğu küçük boyutlar ve etkili hücre duvarı yapısı onları bitki ve havyan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlı kılar. Bu da değişik kültür tekniklerinde hücrenin ortamdaki direnci adına bir avantajdır.

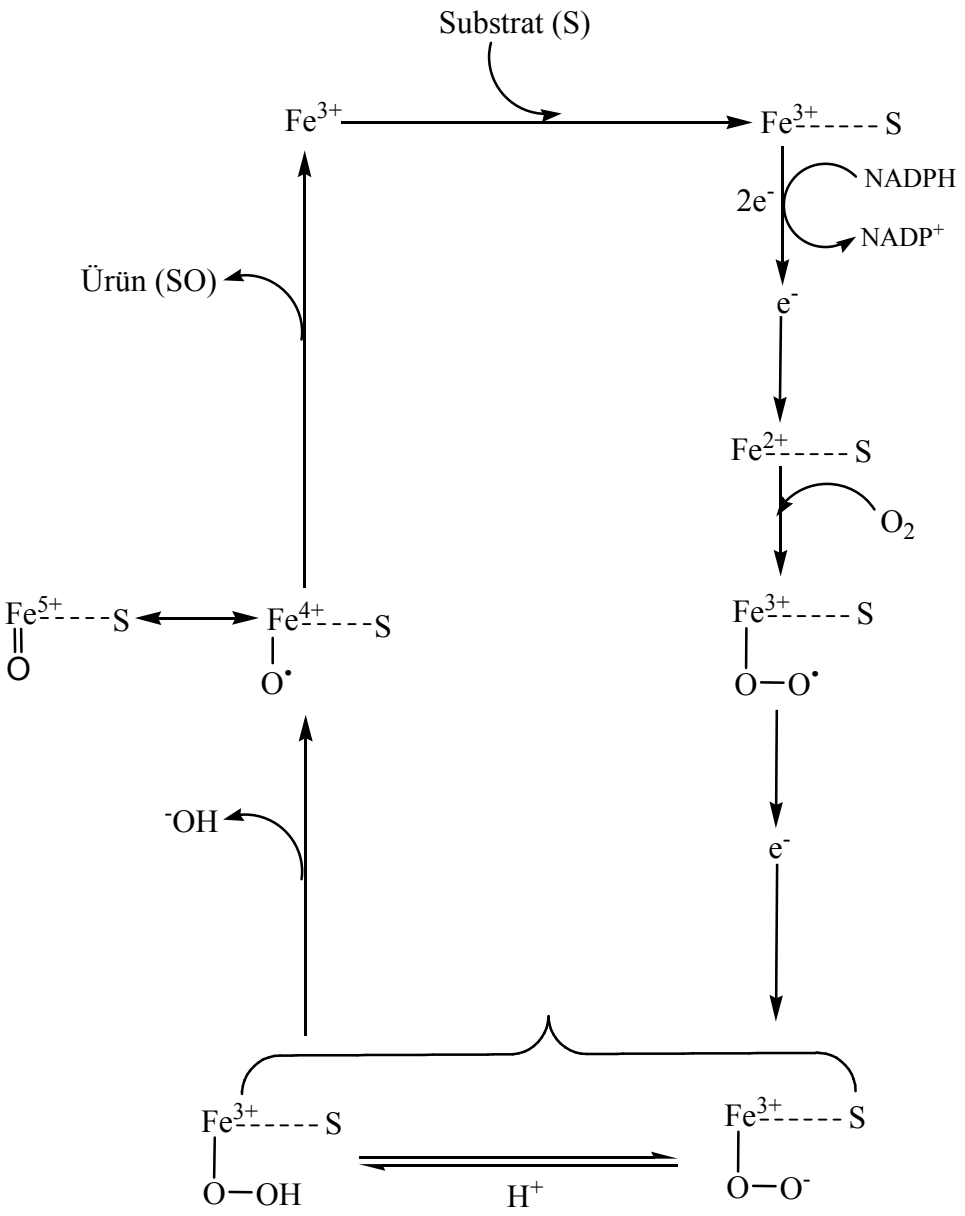
3.5. Mikrobiyal Hidroksillemenin Mekanizması

Mikrobiyolojik hidroksillenmelerin memelilerde, mantar ve bakterilerde bulunan sitokrom P-450'e bağımlı monooksijinaz enzimleri tarafından katalizlendiği düşünülür. Mikrobiyolojik hidroksilleme moleküler oksijen kullanımı, NADPH veya NADH gibi hidrojen kaynağı ve su molekülü de gerektirir. Mikrobiyolojik hidroksillemenin

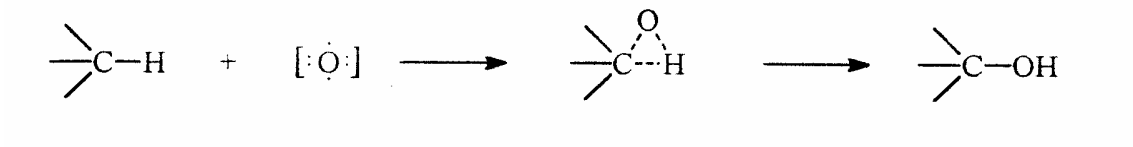
mekanizması *Pseudomans putida* bakterisinden elde edilen kamfor (camphor) hidroksilaz, sitokrom P-450_{cam}, kullanılarak etraflıca çalışılmıştır (Holland, 1992). P-450_{cam}'ın kristal formu X-ray kristalografi tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada kamfor molekülünün, enzimin aktif merkezine iki tip etkileşimle hafifçe bağlandığı görülmüştür. Birincisi; kamfor, karbonil oksijeni ve aktif merkezde tirozin kalıntısının yan zincir hidroksili arasında hidrojen bağı etkileşimi olur. Diğeri ise kamfor molekülü ile komşu alifatik ve aromatik kalıntılar arasındaki hidrofobik etkileşimdir (Berg et al., 1976).

Hidroksilleme esnasında hava oksijeninin bir atomu organik substratla birleşir (White and Coon, 1980; Poulos et al., 1985). İki indirgenme eşdeğeri NADPH ya da daha az yaygın olarak NADH tarafından sağlanır (Holland, 1992). İlk adımda substrat bağlanması gerçekleşir (Gunsalus and Sligar, 1978). Substrat bağlanmasından sonra üç değerlikli demir önce hem kompleksine bitişik konumdaki hidrofobik cepteki su molekülü ya da hidroksit gruplarının yer değiştirmesiyle iki değerlikli demire indirgenir (Raag and Poulos, 1989). İhtiyaç duyulan tek elektron NADH ya da NADPH'tan mikrobun türüne ya da enzimin kaynağına bağlı olarak flavin nükleotid, demir sülfür proteinleri (ferrodoksinler) ya da sitokrom b_5 tarafından karşılanır. Sonra moleküler oksijen, komplekse bağlanır ve bunu diğer bir elektronun O-O bağına aktarılması izler. Bu değişiklik O-O bağının kopmasına neden olur. Oksijenlerden bir tanesi su molekülü olarak ayrılırken diğer oksijen kuvvetli elektrofil özelliği gösteren Fe^{4+} türünün oluşumunu sağlar. Bu basamağı, ürünün uzaklaştırılması ve Fe^{3+}'ün geri kazanımı izler (Şekil 3.9) (Wheeler, 1983; Dawson et al., 1986).

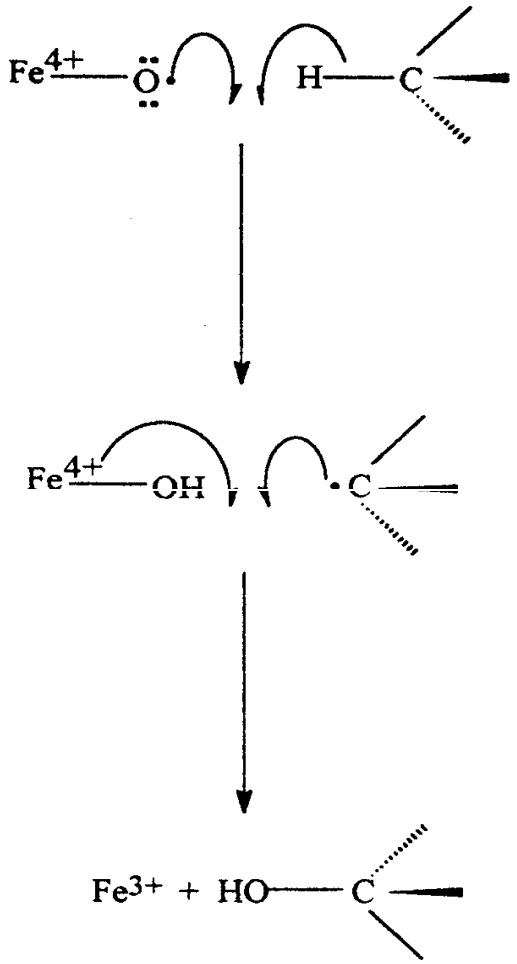
Oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun mekanizması için önerilen ''OKSEN'' mekanizması (Şekil 3.10) yıllarca kabul görmüştür (Hamilton, 1964). Memeli ciğerinde bulunan sitokrom P-450'nin karbon radikal aracılığı yoluyla substratları katalizlediği sonraki bazı araştırmalarda ortaya konmuştur. Bu doygun karbon üzerinde hidroksillemenin mekanizması, radikal tekrar bağlanma prosesi (Şekil 3.11) ile doğrulanmıştır (Groves et al., 1978; Fourneron et al., 1989).



Şekil 3.9. Sitokrom P-450 bağımlı monooksijenazın katalitik döngüsü



Şekil 3.10. Önerilen Oksen mekanizması



Şekil 3.11. Hidroksilleme için mümkün olan radikal tekrar bağlanma yolu

3.6. Biyotransformasyon Teknikleri

Mikrobiyal bütün hücrelerin kullanıldığı biyotransformasyonlar için dört temel alternatif hücre tipi mevcuttur. Bunlar; büyüyen, durağan, spor ve immobilize kültürlerdir.

3.6.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

En basit biyotransformasyon tekniğidir. Saf mikroorganizma kültürü en ideal besiyerinde çalkalamalı sistemde üretilir ve daha sonra ortama biyotransformasyona uğratılacak olan madde ilave edilir. Düzenli aralıklarla ortamdan alınan numune ince

tabaka, gaz, sıvı kromatografisi gibi tekniklerle takip edilir. Bu yöntemin en önemli özelliği yüksek verim elde edilebilmesidir (Roberts et al., 1995).

3.6.2. Durağan hücreler ile biyotransformasyon

Durağan hücreler, büyüme süreci tamamlanmış hücrelerdir. Öncelikle uygun besiyerinde üretilen hücreler bu besiyerinden uzaklaştırılır ve ayrılan bu hücrelerin bir tampon (20-100 mM) çözeltide uygun bir pH değerinde substratla reaksiyona girmesi sağlanır. Bu sırada ortama az miktarda glukoz ilave edilerek hücrelerin canlılığının devamı sağlanır. Bu yöntemin en önemli anvantajı, ortamda büyüyen hücre olmadığından, büyüyen hücreler tarafından üretilebilecek diğer metabolitlerin en aza indirgenmiş olması ve bu nedenle ürün izolasyonunun kolaylığıdır. (Roberts et al., 1995).

3.6.3. Spor kültürleri ile biyotransformasyon

Sporlar bazı mikroorganizmalar tarafından olumsuz çevre koşullarıyla başa çıkmak için üretilen hücrenin kalın duvarlı formlarıdır. Spor kültürleri besiyeri olmadan, sulu ortamda bozulmadan biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirebilmektedirler (ortalama 30 gün boyunca). Bu yöntemin avantajı, sporların -15°C'de 30 aya kadar muhafaza edilebilmesidir (Roberts et al., 1995).

3.6.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon

Bu yöntemde mikroorganizmalar substrat ve ürünün geçişine izin verecek şekilde immobilize edilir. Büyüdüğü besiyerinden ayrılan hücreler dört alternatif yöntemden biri kullanılarak immobilize edilir. Bunlar aşağıda belirtilmektedir.

- Poliakrilamid, alginat, kapa-karragenan gibi bir polimer matrikse tutuklama,
- Suda çözünmeyen değişik iyon değiştirici reçineler ya da silikatlar gibi katı bir destek üzerine yüzey adsorpsiyonu,
- Selülozun modifiye edilmiş formu olan karboksimetil selüloz gibi suda çözünmeyen katı bir destek üzerine kovalent bağlama,
- Glutaraldehit gibi ajanlarla çapraz bağlama.

Bu yöntemin avantajı immobilize sistemin ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmesi ve sürekli kullanılabilmesi iken difüzyon kısıtlılığının getirdiği dezavantaj da mevcuttur (Armstrong and Yamazaki, 1986; Roberts et al., 1995; Telefoncu, 1995).

3.7. Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri

Aşağıda sıralanan reaksiyon tipleri biyotransformasyonların neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir (Demirci, 2000).

- Oksidasyon (hidroksilasyon, epoksidasyon, dehidrojenasyon, Baeyer Villiger oksidasyonu, kısmi oksidatif degradasyon),
- Redüksiyon (aldehitlerin, ketonların, karboksilik asitlerin, heteroatomların indirgenmesi, çifte bağların halojenasyonu),
- Hidrolitik reaksiyonlar (esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlarına su girişi, N-demetilasyon),
- Katılım ve kondenzasyon, (ester ve amit bağlarının oluşumu, asikloin kondenzasyonu, C=C bağlarına amonyak ilavesi, birleşme reaksiyonları),
- İzomerizasyon,
- Yeni C-C bağlarının oluşumu,
- Yeni heteroatomların ilavesi.

3.8. Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

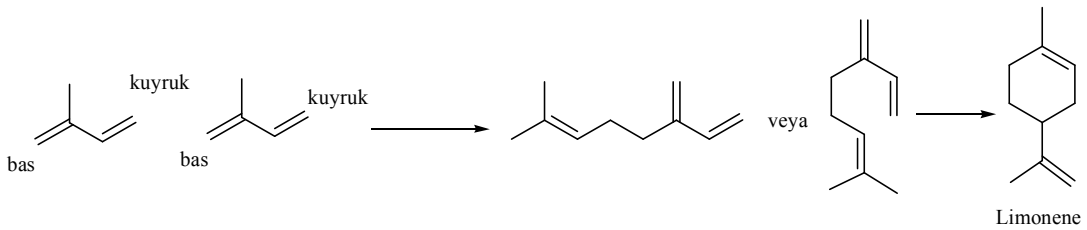
Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörleri canlı sistemler ve enzimler olduğundan bu reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli şartlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha çeşitli ve hassas olabilmektedir. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen önemli faktörler arasında besiyerinin bileşimi, materyalin toksisitesi ve konsantrasyonu (tolerans aralığı % 0,1-10>), ortam sıcaklığı (değişim limiti ±2°C), çalkalama hızı (rpm), zaman (saat-ay), oksijen miktarı, pH (genellikle nötr) ve mikroorganizma suşunun kökeni sayılabilir. Yine biyotransformasyonda materyalin antimikrobiyal etkisi ve bu etkinin görüldüğü konsantrasyon dikkat edilmesi gereken önemli faktörler arasındadır (Demirci, 2000).

3.9. *Neurospora crassa* Fungal Kültürü

Neurospora genusu, genel olarak nemli, tropkial ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak görülen bir fungal kültürdür. Yangından arta kalan bitki kalıntıları *Neurospora* türleri için uygun bir yaşam alanıdır ve buralarda koloniler oluşturur (Perkins and Turner 1988, Turner et al., 2001). *Neurospora*'nın dünyanın değişik bölgelerinde farklı türleri mevcuttur. Örneğin Kuzey Amerika'nın batısında ve Meksika'dan Alaskaya uzanan bölgede %95 olarak baskın olan tek türü *N. discreta* iken Güney Avrupada Portekizin güneyi ile İsviçre arasında kalan bölgede ise *N. crassa*, *N. discreta*, *N. sitophila*, ve *N. tetraspermaa* türleri yaygındır (Powell et al. 2003). Çeşitli *Neurospora* türleri ve alt türleri genetik ve biyokimyasal çalışmalar için önemli imkanlar sağlar (Gücin ve Tamer, 1994).

3.10. Seskiterpenler

İzopren birimlerinden oluşmuş bileşikler terpenler olarak adlandırılır. Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi terpen yapıları, baş-kuyruk yöntemiyle, 5 karbonlu izopren birimlerine ayrılabilir. Ruzicka tarafından (Ruzicka and Meyer, 1921) geliştirilen izopren kuralı bu tür yapıların saptanmasında rehber görevi görmüştür.



Şekil 3.12. Terpenlerin temel yapı birimleri

Terpenlerin içerdikleri isopren birimlerine göre sınıflandırılmaları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Terpenlerin içerdikleri isopren birimlerine göre sınıflandırılmaları

Sınıf	İsopren birimi sayısı	Karbon atomu sayısı
Hemiterpen	1	5
Monoterpen	2	10
Seskiterpen	3	15
Diterpen	4	20
Sesterterpen	5	25
Triterpen	6	30
Tetraterpen	8	40
Politerpen	8'den çok	40'tan çok

Seskiterpenler 15 karbon atomu içeren ve üç izopren biriminin birleşmesiyle oluşan doğal bileşiklerdir. Seskiterpen yapısında siklik hidrokarbonlar, alkoller, ketonlar ya da laktonlar bulunabilir. Bu bileşikler pek çok canlı sistemde özellikle de yüksek yapılı bitkilerde bulunurlar ve bir yüzyıldan fazla zamandır esasi yağların bileşenleri olarak bilinirler. Eski araştırmacılar saf homojen bileşiklerin izolasyonunda güçlüklerle karşılaşmışlardır. Ayrıca alışılmış oksidatif degredasyon metotları seskiterpenoid bileşiklerine uygulandığında yeterli verim elde edilememektedir. Çünkü, ürünler çok basit bileşenler ya da kompleks karışımları içerdiği için ana bileşikler hakkında çok az bilgi elde edilebilmiştir. Bu bileşiklerin kimyası sadece son zamanlarda detaylı olarak incelenmiştir. Seskiterpenler doymamış bileşiklerdir ve asiklik, monosiklik, bisiklik ya da trisiklik olabilirler. Günümüzde 1000'den fazla seskiterpen bilinmekte ve bunlar 100'den fazla karbon iskeleti taşımaktadır. Terpen türevlerinden mono ve seskiterpenler, uçucu bileşikler olup uçucu yağların bileşiminde yer alırlar. Bu bileşikler aromatik bitkilerin ve gıdaların aroma, koku ve tatlarından sorumlu olan maddelerdir. Aynı zamanda başta antimikrobiyal etki olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere de sahiptirler. Gıda, parfümeri ve ilaç sanayinde mono ve seskiterpenlerin yeni türevleri geniş kullanım alanları bulmaktadır. Bu nedenle bu bileşiklerin yeni türevlerinin eldesinde, son yıllarda hızlı bir gelişme gösteren biyotransformasyon tekniği kimyasal sentez yöntemlerine tercih edilmektedir (Pinder, 1960; Skeya, 2000; Yıldırım, 2004). Bu prosesler sonucunda elde edilen ürünler doğal ürünler olarak kabul edilmektedir.

4. BOYA GİDERİMİNDE BİYOSORPSİYON

Bir maddenin diğer bir madde yüzeyinde veya iki faz arasındaki ara yüzeyde konsantrasyonunun artması ya da başka bir ifade ile moleküllerin, etkileştikleri yüzeydeki çekim kuvvetlerine bağlı olarak o yüzeyle birleşmesi adsorpsiyon olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir tanıma göre ise, adsorpsiyon, gaz buhar ya da sıvı fazında veya herhangi bir çözeltide bulunan çözünmüş maddelere ait molekül, atom veya iyonların, katı bir maddenin yüzeyinde tutunması olayıdır. Adsorpsiyonda adsorbe edilen maddeye adsorplanan, adsorbe eden katı maddeye adsorban denilmektedir (Pekin, 1985; Dąbrowski, 2001). Biyosorpsiyon sürecinde kullanılan adsorbanlar biyolojik materyallerdir ve uzaklaştırma mekanizması temel olarak sorpsiyona dayanır. Buna göre biyosorpsiyon, sulu çözeltilerden metaller ve boyar maddeler gibi çeşitli inorganik ve organik kirleticilerin canlı, ya da ölü biyokütleler ya da onların türevlerinin kullanılmasıyla uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Çeşitli mikroorganizmalar (bakteri, fungus, alg) ve fermentasyon endüstrisinde kullanılan mikrobiyal biyokütleler bu amaçla kullanılan biyosorbentlere örnek olarak verilebilir (Volesky, 1990; Fu and Viraraghavan, 2000; Maurya et al., 2006).

Boyalar genellikle sentetik orijinli ve kompleks aromatik yapıya sahip maddeler olup azo grupları ya da antrokinon tipi kromoforlar ve bunların çeşitli reaktif gruplarla oluşturduğu kombinasyonları içerirler (Fu and Viraraghavan, 2001; Aksu and Tezer, 2005). Boyahanelerde, yiyecek, kauçuk, tekstil, deri, kozmetik, farmasotik, kağıt ve baskı endüstrisi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılırlar (Gong et al., 2005). Boyar maddelerle kirlenmiş endüstriyel atık suların su kaynaklarına karışması önemli bir çevre sorununu oluşturmaktadır (Aksu and Dönmez, 2003). Çünkü boyar maddeler bulundukları ortamın ışık geçirgenliğini azaltmak suretiyle sulardaki yaşamı olumsuz etkilemenin yanı sıra karsinojenik ve mutajenik etkiler de yaratabilmektedir (Mahony et al., 2002). Ayrıca atıksularla çevreye salınan boyar maddelerin yapısal bozunmasıyla oluşan toksik aminler de akciğerlerde, böbreklerde, beyin ve merkezi sinir sisteminde ve üreme sisteminde çeşitli tahribatlara neden olabilmekte ve bunun sonucunda metabolizmada önemli sağlık sorunları yaratabilmektedir (Aksu, 2005).

Endüstriyel atıksulardan boyaların uzaklaştırılması zor bir prosestir ve çevresel yönden önemli bir araştırma alanıdır (Özcan and Özcan, 2004). Çünkü boyalar yapısal olarak kararlı moleküller olmaları nedeniyle çeşitli kimyasallara, oksitleyici ajanlara, ısıya ve biyolojik olarak bozundurulmaya karşı oldukça dirençlidirler (Kargi and Ozmihci, 2004). Endüstriyel atıksulardan boyar maddelerin uzaklaştırılması için geleneksel olarak kullanılan fiziksel ve kimyasal metotlar arasında flokulasyon, koagulasyon, çöktürme, ters osmoz, ultrafiltrasyon, oksidasyon ve adsorpsiyon sayılabilir (Ong et al., 2005). Bu metotlar arasında adsorpsiyon etkili ve önemli bir alternatif prosestir ve aktif karbon bu amaçla en yaygın olarak kullanılan adsorbandır. Aktif karbon, gözenekli yapısına ilave olarak yüksek adsorpsiyon kapasitesi, yüzey alanı ve yüzey reaktivite derecesine sahiptir ancak maliyetinin yüksek olması ve büyük ölçekli uygulamalarda geri kazanım zorluğunun getirdiği ekonomik ve teknik problemler nedeniyle kullanımı zaman zaman kısıtlı kalmaktadır. Bu sebeple boyar maddelerin atıksulardan uzaklaştırılmasında daha ucuz alternatif adsorpsiyon materyalleri geliştirilmesi üzerine yapılan araştırmalar devam etmektedir. Bataklık kömürü, bentonit kili ve ateş külü gibi materyaller bu amaçla kullanılan adsorbanlara örnek olarak verilebilir (Liversidge et al., 1997; Mahony et al., 2002; Özcan and Özcan, 2004). Halen yeni, ekonomik, kolay elde edilebilen ve verimli adsorbanlara olan ihtiyaç devam etmektedir (Fu and Viraraghavan, 2001).

Son zamanlarda çalışmalar bakteri, fungus ve alg (Fu and Viraraghavan, 2002; Arıca et al., 2005) gibi çeşitli mikroorganizmaların yanı sıra atık portakal kabukları, pirinç kabukları, ağaç kabukları, mısır koçanı gibi ucuz ve yapılarında boya bağlayıcı uçlar içeren alternatif olabilecek biyosorbentler üzerinde yoğunlaşmıştır (Waranusantigul et al., 2003). Bahsedilen biyolojik hücreleri kullanan ve biyosorpsiyon olarak adlandırılan yöntem, kullanılan mikrobiyal biyokütlenin özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Çünkü ağır metaller ve boyalar gibi toksik maddelerin biyosorpsiyon ile uzaklaştırılması, bu maddelerin, başlıca bileşenler olarak polisakkaritler, proteinler ve lipidleri içeren hücre duvarı yüzeyinin fonksiyonel gruplarıyla etkileşimine dayanır (Gadd and White, 1985). Bu etkileşimler metabolizmadan bağımsız bir prosesi temsil etmektedir. Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, elektrostatik etkileşim, iyon değişimi, kompleksleşme, şelat oluşumu, mikropresipitasyon hücre duvarı üzerinde

gerçekleşebilecek etkileşimlerdir. Canlı ya da cansız (fiziksel ya da kimyasal ön işlem görmüş) biyokütleler biyosorpsiyon uygulamalarında kullanılmakla birlikte cansız formların kullanımı diğerine göre bazı avantajlara sahip olması nedeniyle tercih sebebi olabilmektedir (Liu et al., 2003; Aksu, 2005). Canlılığını koruyabilmesi için besin kaynağına ihtiyaç duyan hücrelerin adsorpsiyon süresince canlı kalabilmesi çok zordur. Ayrıca ortamdaki toksisiteden de korunmaları gerekmektedir. Oysa cansız hücrelerin biyosorpsiyon amacıyla kullanılması önemli avantajlar sunmaktadır (Aksu, 2005). Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Toksik maddelerden etkilenmezler,
- Besin kaynağı gerekmez,
- Geri kazanımları kolay olup defalarca kullanılabilirler,
- Yapılarında herhangi bir bozulma olmadan uzun süre saklanabilirler.

4.1. Biyosorpsiyonu Etkileyen Faktörler

Bir biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesi, çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlardan başlıcaları; biyokütlenin çeşidi, kirleticinin kimyasal yapısı (tür, boyut, iyonik yük), biyokütlenin hazırlanma metodu (canlı biyokütle için kültür koşulları), yüzey özellikleri, ortamda bulunan diğer maddeler ve sıcaklık, pH, konsantrasyon gibi çeşitli fizikokimyasal faktörler olarak sıralanabilir (Aksu, 2005; Maurya et al., 2006).

4.2. Biyosorpsiyon İzotermleri

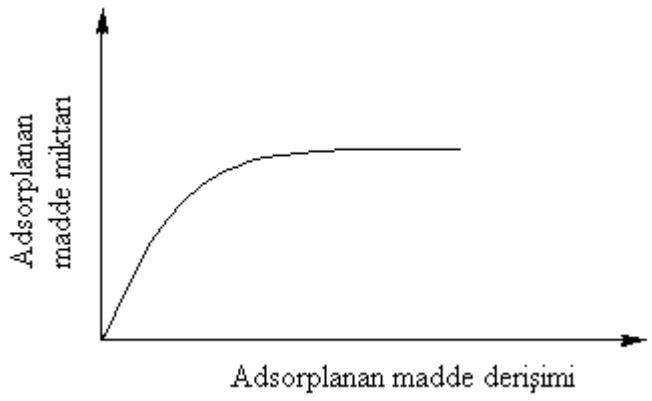
Büyük ölçüde adsorplayıcı ve adsorplanan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olan adsorpsiyon, gaz ve buhar adsorpsiyonlarında sıcaklık, basınç ve hacim değişkenlerinden birbirinden bağımsız olan herhangi ikisine bağımlıdır. Çözeltiden adsorpsiyonda ise gaz adsorpsiyonundaki basınç yerine konsantrasyon değişimi önemlidir. Adsorplayıcı ve adsorplanan yanında sıcaklık da sabit tutulduğunda gaz fazından adsorpsiyon yalnızca basınca, çözeltiden adsorpsiyon ise yalnızca konsantrasyona bağlı olur. Bu durumda bir maddenin sabit sıcaklıkta yüzeye bağlanan miktarının, o maddenin gaz fazı veya çözeltideki konsantrasyonuyla bağıntısını gösteren denkleme adsorpsiyon izotermi denir (Sarıkaya, 1993). Biyosorpsiyon çalışmalarında

Langmuir, Freundlich ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

4.2.1. Langmuir izotermi

Langmuir, izoterm modeli, sorbent yüzeyinde aktif bölgelerin olduğunu kabul etmektedir. Yüzeydeki her bölgenin sadece bir molekül adsorplayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle Langmuir denklemi, tek tabakalı fiziksel adsorpsiyonu öngörmektedir. Yani bir başka deyişle adsorpsiyon sonrasında meydana gelen tabaka bir molekül kalınlığındadır. Ayrıca Langmuir izoterminde, tüm adsorpsiyon alanları adsorplanan moleküllere karşı eşit miktarda çekim uygulamakta ve adsorbe olan bir molekül, bitişik alandaki bir başka molekül ile herhangi bir etkileşime girmemektedir. Bu izoterm modeli, katı yüzeyler üzerindeki aktif adsorpsiyon alanlarında gerçekleşen tutulmanın, fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer modellere göre daha iyi açıklamaktadır (Langmuir, 1918).

Langmuir izoterm modelinde adsorpsiyon, adsorplanan maddenin başlangıç konsantrasyonuyla birlikte doğrusal bir artış göstermektedir. Maksimum doygunluk noktasında yüzey, tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeye adsorbe olan madde miktarı sabit kalmaktadır (Şekil 4.1) (Langmuir, 1918).



Şekil 4.1. Maksimum doygunluk noktasında yüzeye adsorbe olan madde miktarı.

Langmuir izoterm modelinde adsorpsiyon enerjisi uniformdur. Adsorpsiyon hızı; adsorplanan madde konsantrasyonu ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile, desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır. Buna göre Langmuir izoterm eşitliği (Langmuir, 1918);

$$q_d = \frac{q_{mak} K_L C_d}{1 + K_L C_d} \tag{4.1.}$$

şeklinde yazılabilir. Burada;

q_d = Dengede adsorplanan madde miktarını (mol/g)

C_d = Dengede adsorplanmadan kalan madde miktarını (mol/L)

q_{mak} = Maksimum tek tabakalı adsorpsiyon kapasitesini (mol/g)

K_L = Biyosorpsiyonun serbest enerjisi ile ilgili Langmuir izoterm sabitini (L/mol) göstermektedir.

İzoterm şeklinin etkisi biyosorpsiyon sisteminin istemli ya da istemsiz olması bakımından değerlendirilirse Langmuir izotermi için ayırma faktörü ya da denge parametresi olarak tanımlanan ve aşağıda eşitliği verilen R_L değeri hesaplanmalıdır (Langmuir, 1918).

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_o} \tag{4.2.}$$

Bu eşitlikte C_o maksimum AK-57 başlangıç konsantrasyonudur (mol/L). Eğer buradan hesaplanan R_L değeri 0 ile 1 arasında ise biyosorpsiyon süreci kendiliğinden gerçekleşmektedir (Weber and Chakravorty, 1974; Hall et al., 1966).

4.2.2. Freundlich izotermi

Langmuir denklemine uyan sistemler, genel olarak ideal adsorpsiyon gösteren sistemler olarak tanımlanırlar. Ancak çoğu katının yüzeyi homojen olmadığından, desorpsiyon hızı adsorplanan moleküllerin konumuna bağlı olduğundan ve adsorplanmış moleküller arasında etkileşmeler meydana geldiğinden çoğu sistem Langmuir denkleminden sapmalar gösterir. İdeal olmayan sistemler, Freundlich adsorpsiyon izotermi gibi bazı ampirik izotermlere uyabilirler (Pekin, 1985).

Freundlich (1906) tarafından adsorpsiyon işlemini ifade eden ampirik bir denklem geliştirilmiştir. Freundlich izoterm modeli, bir adsorbanın yüzeyinde bulunan adsorpsiyon bölgelerinin heterojen yapıda olduğunu öngörür ve aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$q_d = K_F C_d^{1/n} \tag{4.3.}$$

Burada;

q_d = Dengede adsorplanan madde miktarını (mol/g)

C_d = Dengede adsorplanmadan kalan madde miktarını (mol/L)

K_F ve n = Freundlich izoterm sabitleri

K_F ve n sırasıyla, adsorpsiyonun şiddeti ve çözelti konsantrasyonu ile adsorpsiyon arasında doğrusallıktan sapmanın derecesi hakkında bilgi verirler.

4.2.3. Dubinin-Radushkevich (D-R) izotermi

Dubinin-Radushkevich (D-R) izotermi Langmuir izoterm modelinden daha genel bir izoterm modelidir. Bu izoterm modelinde adsorpsiyonun homojen yüzeyde ya da sabit adsorpsiyon *potansiyeliyle* gerçekleştiği düşünülmez. Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm modeli *adsorpsiyonun* fiziksel ya da kimyasal olduğu hakkında bilgi verebilir. Dubinin ve Radushkevich (1947) tarafından geliştirilen bu izoterm modeli eşitliği aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$\ln q_d = \ln q_m - \beta\varepsilon^2 \tag{4.4.}$$

Burada;

q_d = Dengede adsorplanan madde miktarını (mol/g)

β = adsorbatın bir molü başına adsorpsiyonun ortalama serbest enerjisiyle ilgili sabit (mol^2/J^2),

q_m= Teorik doygunluk kapasitesi (mol/g)

ε = Polanyi potansiyelidir.

$$\varepsilon = RT \ln(1 + \frac{1}{C_d}) \tag{4.5.}$$

formülü ile ifade edilir. Bu formüldeki R (J/mol. K) gaz sabiti ve , T (K) is the mutlak sıcaklıktır. Burada ε^2 ye karşı $\ln q_e$ grafiğe geçirilirse doğrunun eğimi β'yı ve ordinatı kesim noktası da q_m (mol/g)'ı verir.

β, adsorbatın molekülü başına gerçekleşen adsorpsiyonun ortalama serbest enerjisi E (kJ/mol) ile ilgilidir. Bunlar arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikle ifade edilir (Hobson, 1969; Hasany and Chaudhary, 1996; Dubey and Gupta, 2005).

$$E = \frac{1}{(2\beta)^{1/2}} \qquad (4.6.)$$

Bu parametre biyosorpsiyonda kimyasal-iyon değişimi ya da fiziksel biyosorpsiyon mekanizmalarından hangisinin etkili olduğu hakkında bilgi verir. E değerinin büyüklüğü 8-16 kJ/mol arasında ise kimyasal-iyon değişimi, 8 kJ/mol'den daha küçük ise fiziksel biyosorpsiyon mekanizması söz konusudur (Helfferich, 1962; Onyango et al., 2004).

4.3. Biyosorpsiyonun Kinetiği

Biyosorpsiyon işleminin hızına etki eden basamakların anlaşılması için biyosorpsiyon kinetiğinin incelenmesi önemli bir adımdır (Ho and McKay, 1999). Kinetik çalışmalar, biyosorpsiyonun zaman-konsantrasyon profilini gösterir. Bir çözeltide bulunan adsorbatın biyosorbent tarafından sorplanması işleminde 4 ana basamak vardır;

1. Sıvı fazda bulunan adsorbat, biyosorbenti kaplayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur (bulk solution transport). Bu basamak, biyosorpsiyon düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için çoğunlukla ihmal edilir.

2. Film tabakasına gelen adsorbat buradaki durgun kısımdan geçerek biyosorbentin gözeneklerine doğru ilerler (film mass transfer/boundary layer diffusion).

3. Sonra biyosorbentin gözenek boşluklarında hareket ederek biyosorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler (intraparticle diffusion).

4. En son olarak da adsorbatın biyosorbentin gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir (sorpsiyon).

Eğer biyosorbentin bulunduğu faz hareketsiz ise, 1. basamak en yavaş ve biyosorpsiyon hızını belirleyen basamak olabilmektedir. Bu nedenle, eğer akışkan hareket ettirilirse, yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için biyosorpsiyon hızı artacaktır. Son basamak ölçülemeyecek kadar hızlı olduğundan ve ilk basmak da iyi bir karıştırma olduğu düşünülerek biyosorpsiyon hızına aksi bir etki yapmayacakları için 2. ve 3. basamaklar hız belirleyicidir. 2. basamak biyosorpsiyon işleminin ilk birkaç dakikasında, 3. basamak ise biyosorpsiyon işleminin geri kalan daha uzun bir süresinde meydana geldiği için, biyosorpsiyon hızını tam olarak etkileyen basamağın 3. basamak olduğunu söylemek mümkündür (Chu and Chen, 2002; Basibuyuk and Forster, 2003; Keskinkan et al., 2003).

Biyosorpsiyon hızını belirlemek için birinci dereceden ve yalancı-ikinci dereceden kinetik eşitlikler kullanılabilir.

4.3.1. Birinci dereceden kinetik modeli

Birinci dereceden kinetik modeli aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir (Kanan and Sundaram, 2001).

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{q_1} + \frac{k_1}{q_1 t} \qquad (4.7.)$$

Burada;

q_t = t zamanda biyosorplanan madde miktarı (mg/g).

q_1 = dengede biyosorplanan madde miktarı (mg/g).

k_1 = birinci dereceden hız sabiti (1/dk).

Birinci dereceden biyosorpsiyon kinetik eşitliğindeki $1/t$'ye karşı $1/q_t$ grafiğe geçirildiğinde, eğimi k_1 ve ordinatı kesim noktası $1/q_1$ olan bir doğru elde edilir.

4.3.2. Yalancı ikinci-dereceden kinetik modeli

Yalancı-ikinci dereceden kinetik modeli aşağıdaki eşitlikle ifade edilir (Ho and McKay, 1998);

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_2^2} + \frac{1}{q_2} t \qquad (4.8.)$$

Burada;

q_2 = maksimum biyosorpsiyon kapasitesi (mg/g)

q_t = t zamanda biyosorplanan madde miktarı (mg/g).

k_2 = yalancı-ikinci dereceden hız sabiti (g/mg.dk).

Eşitlik 4.8'deki t'ye karşı t/q_t grafiği çizildiğinde, eğimi $1/q_2$ ve ordinatı kesim noktası $1/k_2q_2^2$ olan bir doğru elde edilir.

4.4. Biyosorpsiyonun Termodinamiği

Denge sabiti K_L değerinin sıcaklığa bağlılığı ile serbest enerji (ΔG^o), entalpi ($\Delta H°$) ve entropi ($\Delta S°$) değişimi gibi termodinamik parametreler aşağıdaki eşitliklerle belirlenebilir.

$$\Delta G^o = -RT \ln K_L \qquad (4.9.)$$

$$\ln K_L = -\frac{\Delta G^o}{RT} = -\frac{\Delta H^o}{RT} + \frac{\Delta S^o}{R} \qquad (4.10.)$$

$\ln K_L$ nin $1/T$ 'ye karşı grafiğe geçirilmesiyle ΔH^o ve ΔS^o değerleri sırasıyla doğrunun eğiminden ve kesim noktasından hesaplanabilir.

Entalpi değişiminin pozitif değerleri biyosorpsiyonun endotermik, Gibss serbest enerjisinin negatif değerleri biyosorpsiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, biyosorpsiyon işleminin uygulanabilirliği entalpi ve Gibss serbest enerjisinin negatif olması ile anlaşılabilir. Entropinin pozitif değerleri ise katı/çözelti ara yüzeyindeki rastlantısallığın artışını göstermektedir (Sarıkaya, 1993).

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1. Antifungal Aktivite Çalışmaları

Antifungal aktivite çalışmaları için kullanılan fungal kültürler *Candida albicans* (NRRL Y-12983), *Aspergillus niger* (ATCC 10549), *A. fumigatus* (NRRL 163), *A. flavus* (ATCC 9807), *A. parasiticus* (NRRL 465), *Fusarium graminarum* (wild type), *F. solani* (wild type) ve *Geotrichum candidum* (wild type) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü ile Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Biyoloji Bölümlerinin kültür koleksiyonlarından sağlanmıştır. Demetoksiviridin'in biyosentezi için kullanılan *N. hinnuleum* (IMI 214826) ise Promochem (İngiltere) firmasından satın alınmıştır. Malt extract agar yatık besiyerinde 4°C'de muhafaza edilen kültürler antifungal aktivite çalışmaları öncesinde yine Malt extract agar besiyeri kullanılarak petrilerde büyütülmüştür.

5.2. Demetoksiviridin Türevlerinin Hazırlanması

5.2.1. Demetoksiviridin'in biyosentezi

Demetoksiviridin'in eldesi için *N. hinnuleum* fungal kültürü aşağıdaki çizelgede belirtilen bileşenlerle steril koşullarda hazırlanan besiyerinden 150'şer mL içeren yatık şişelerde (Roux bottles) 21°C'de 35 gün boyunca büyütülmüştür.

Çizelge 5.1. *N. hinnuleum* fungal kültürünün besiyeri bileşenleri ve miktarları

Bileşen	**Miktar**
Glukoz	50 g
Tartarik asit	4 g
$K_2CO_3.1,5H_2O$	600 mg
$(NH_4)H_2PO_4$	600 mg
$MgCO_3$	400 mg
$(NH_4)_2SO_4$	250 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	100 mg
$FeSO_4.7H_2O$	100 mg
Distile su	1L

Bu süre sonunda vakumda süzme ile sıvı besiyerinden (1,5 L) ayrılan miseller (210 g) soxhlet cihazında 800 mL kloroform ile 5 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrat vakum altında sakızımsı bir kütle (900 mg) olana dek bekletildikten sonra 200 mL petrol eteri ile muamele edilmiştir. 500 mL sıcak asetonda çözülen bu katı ürün, 3 g renk giderici (charcoal) ile muamele edildikten sonra vakum altında bırakılarak konsantre edilmiştir. Böylece oluşan demetoksiviridin (1) aseton içinde çözülüp tekrar kristallendirilerek saflaştırılmıştır (100 mg) (Hanson et al., 1985).

Erime noktası : 143-152°C [145-160°C (Hanson et al., 1985)]

I.R.(V_{max}) : 3416 (OH), 1704 (C=O), 1676 (C=O), 1538cm^{-1} (C=C)

EIMS : m/z = 322 [M^+] ($C_{19}H_{14}O_5$)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : 1,60 (3H, s, 19-CH_3), 3,37 (2H, s, H_2O kristal), 4,38 (1H, m, 1-H), 6,20 (1H, d, *J* = 5 Hz, 1-H), 7,92 (1H, d, *J* = 8 Hz, 11-H), 8,62 (1H, d, *J* = 8 Hz, 12-H) ve 8,86 (1H, s, 21-H)

5.2.2. Dehidroksidemetoksiviridin-1-en'in sentezi

Bölüm 5.2.1'de açıklandığı şekilde elde edilen demetoksiviridin (100 mg), 5 mL piridin içerisinde çözülerek oda sıcaklığında, 10 dakika boyunca 1,5 mL metansülfonilklorür'ün damla damla ilavesi ile reaksiyona sokulmuştur. 4 saatlik karıştırma süreci sonrasında, reaksiyon karışımı seyreltik HCl içerisine alınmış ve bileşik etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat fazı su ile yıkandıktan sonra sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur. Çözücünün evaparatörde uzaklaştırılmasından sonra ürün (dehidroksidemetoksiviridin-1-en) (2) aseton içinde çözülüp tekrar kristallendirilmek suretiyle saflaştırılmıştır (75 mg, %75) (Hanson et al., 1985).

Erime noktası : 228-231°C [228-232°C (Hanson et al., 1985)]

I.R.(V_{max}) : 1712 (C=O), 1666 (C=O), 1590cm^{-1} (C=C)

EIMS : m/z = 304 [M^+] ($C_{19}H_{12}O_4$)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : 1,78 (3H, s, 19-CH_3), 2,76 (2H, t, *J* = 5,9 Hz, 16-H), 3,66 (2H, m, 15-H), 6,40 (1H, d, *J* = 10,1 Hz, 1-H), 7,69 (1H, d, *J* = 10,1

Hz, 2-H), 7,81 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, 11-H), 8,03 (1H, d, *J* = 8 Hz, 12-H) ve 8,29 (1H, s, 21, H)

5.2.3. 1α-Hidroksidemetoksiviridin'in sentezi

Bölüm 5.2.2'de açıklandığı şekilde elde edilen dehidroksidemetoksiviridin-1-en (50 mg), aseton içersinde 2,5 mL seyreltik HCl ile oda sıcaklığında 3saat karıştırılmıştır. Çözelti vakum altında konsantre edildikten sonra su içersine alınmış ve ürün etil asetat ile geri kazanılmıştır. Etil asetat fazı su ile yıkandıktan sonra sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur. Çözücünün evaparatörde uzaklaştırılmasından sonra ürün (1α-hidroksidemetoksiviridin) (3) aseton içinde çözülüp tekrar kristallendirilmiştir (25 mg, %52) (Hanson et al., 1985).

Erime noktası : 225-230°C [238-240°C (Hanson et al., 1985)]
I.R.(Vmax) : 3290 (OH), 1735 (C=O), 1700 (C=O), 1590cm^{-1} (C=C)
EIMS : m/z = 322 [M^{+}] ($C_{19}H_{14}O_5$)
^{1}H NMR (DMSO) : 1,60 (3H, s, 19-CH_3), 5,02 (1H, br.s 1-H, 16-H), 5,36 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, 1-OH), 7,96 (2H, s, 11 ve 12-H) ve 8,66 (1H, s, 21, H)

5.2.4. Diğer bileşiklerin sentezi

Antifungal aktivite deneylerinde kullanılan diğer bileşiklerden 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion (4) (Tür, 2004) ve 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion (5) (Boynton et al., 1999) belirtilen literatür metodları kullanılarak araştırma grubumuz tarafından sentezlenmiştir.

5.2.5. Agar difüzyon metodu

Mueller Hinton agar (MHA) ve Sabouraud % 4 glukoz (SGM) karışımı otoklavlama sonrasında besiyerinin kalınlığı 4 mm olacak şekilde steril koşullarda, petrilere döküldükten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Diğer taraftan spor oluşumunu sağlamak için fungal kültürler patates (potato) dekstroz agar içeren yatık besiyerlerinde 27°C'de 5-7 gün büyütülmüştür. Her bir kültürün spor konsantrasyonu steril % 0,1 tween 80 kullanılarak 10^6 CFU/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan bu spor süspansiyonu drigalsi spatülü yardımıyla MHA ve SGM karışımı ile

hazırlanan petrilerdeki besiyeri üzerine yayılmıştır. DMSO içinde konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde çözülerek hazırlanan test bileşiklerinin 10 µL'si kağıt disklere (Schleicher&Schuell Ø 6 mm) emdirildikten sonra diskler spor süspansiyonunun yayılmış olduğu besiyerinin tam merkezine yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saatlik ön inkübasyondan sonra 35°C'de inkübasyona geçilmiştir. İnkübasyondan 16-18 saat sonra petrilerdeki disk çapını da kapsayan inhibisyon çapı ölçülmüştür (NCCLS, 1990a).

5.2.6. Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) belirlenmesi

İncelenen bileşiklerden aktif olanlarının minimum inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesinde agar-dilüsyon metodu kullanılmıştır. Buna göre, uygun miktardaki DMSO ile çözülen test bileşikleri her bir petrideki agar besiyeri ile değişik konsantrasyonlarda (20-640 µg/mL) olacak şekilde karıştırılmıştır. Diğer taraftan kontrol amaçlı olarak biri test bileşiğini ve diğeri DMSO içermeyen iki besiyeri kullanılmıştır. Fungal spor konsantrasyonu 10^7 CFUs/mL olan kültürlerden alınan 2 µL örnek agar besiyerinin 5-8 mm'lik bir alanı üzerine aşılanmıştır. Spotlar kuruduktan sonra ters çevrilen petriler 35°C'de inkübe edilmiştir (NCCLS, 1990b; NCCLS, 2002). Büyümeyi tamamen inhibe eden antifungal bileşiğin en düşük konsantrasyonu MIC konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

5.3. Biyotransformasyon Çalışmaları

5.3.1. Mikroorganizmanın hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan fungus *N. crassa* (wild type), Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi kültür kolleksiyonundan Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ tarafından sağlanmıştır. Malt extract agar ve patates dekstroz agar karışımıyla hazırlanan eğik besiyeri ve petrilerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

5.3.2. *N.crassa*'nın üretimi için kullanılan sıvı besiyeri bileşenleri

Çizelge 5.2. *N.crassa*'nın sıvı besiyeri bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
Glukoz	15 g
Sakaroz	15 g
KH_2PO_4	1 g
KCl	500 g
Poli pepton	5 g
$MgSO_4.7H_2O$	500 mg
$FeSO_4.7H_2O$	10 mg
Distile su	1L

Sıvı besiyeri yukarıda belirtilen besiyeri bileşenleri gerekli miktarlarda tartılarak hazırlanmştır. 1M'lık KOH çözeltisinin dikkatli bir şekilde ilave edilmesiyle besiyerinin pH değeri 6-6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 250 mL'lik erlenlerin her birine 80 mL'lik besiyeri konularak erlenlerin ağızları pamukla kapatılıp pamuğun üzeri alüminyum folyo kaplanmıştır. Besiyerleri, 121°C'de 1,1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

5.3.3. Sıvı besiyerinde mikroorganizmanın inokulasyonu

İnokulant (aşı) üretimi için, mikroorganizma malt extract agar ve patates dekstroz agar karışımıyla hazırlanan yatık besiyerine bir öze ile inokule edilmiş ve 7 gün süreyle 27°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinden sonra, *N. crassa* aşı kültürünün üzerine steril 10 mL saf su ilave edilerek ve bir öze ile karıştırılarak sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu spor süspansiyonu eşit miktarda steril sıvı besiyerini içeren erlenlere aseptik koşullarda aktarılmıştır. Zenginleştirilmiş sıvı besiyerlerine ekimi yapılan kültürler çalkalamalı koşullarda (120 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki aşamada ortama substrat eklenerek

biyotransformasyon süreci başlatılmıştır. Tüm çalışmalar aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki şekilde *N.crassa* fungal kültürünün katı ve sıvı besiyerlerindeki durumları görülmektedir.

(a) (b)

Şekil 5.1. *N. crassa*'nın katı (a) ve sıvı (b) besiyerlerindeki görünümü

5.3.4. Substratların hazırlanması ve biyotransformasyonu

500 mg substrat molekülü 20 mL etanol içerisinde çözüldükten sonra bölüm 5.2.2'de belirtildiği şekilde, kültüre edilen fungusa inkübasyonun ikinci gününde eşit hacimlerde olacak şekilde, ilave edilmiştir. İnkübasyon, oda sıcaklığında 120 rpm hızla çalıştırılan dairesel çalkalayıcı üzerinde, 10 gün boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç içerisinde biyotransformasyon İTK sistemi ile izlenmiş ve dönüşümlerin sona erdiği ya da maksimuma ulaştığı tespit edildiğinde biyotransformasyon sonlandırılmış, ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarına geçilmiştir. Çalışmamızda substrat molekülleri olarak diizoforon, sedrol ve patculi alkol tercih edilmiştir. Çünkü, bu moleküller oda sıcaklığında kararlı yapıdadır, kolay elde edilebilirler ve türevleri endüstride kullanım potansiyeline sahiptir. Ayrıca diizoforon, bir fotoaleksin olan risitin molekülüne yapısal bakımdan benzerlik taşımaktadır (Morrisey and Osbourne, 1999). Bu sebeple diizoforon türevlerinin eldesi, antifungal ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olabilir. Biyotransformasyon deneyleri her bir substrat molekülü için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

5.3.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu ve izole edilmesi

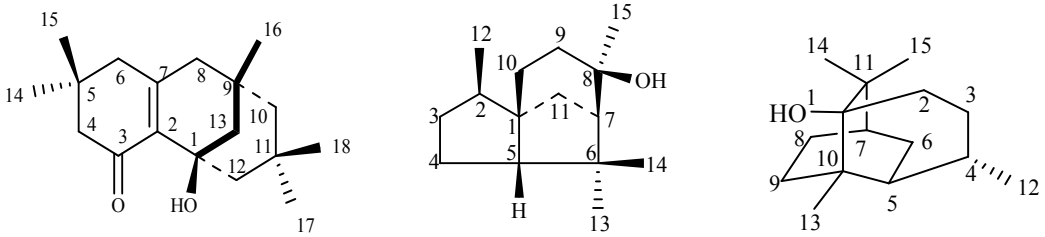
İnkübasyon tamamlandıktan sonra kültür içeren çözeltiler vakum altında süzülerek ayrılmıştır. Ayrılan kültüre ait miseller etil asetat (500 mL) ile yıkanmıştır. Süzüntünün pH'ı % 10'luk HCl çözeltisi ile 2'ye ayarlandıktan sonra üç kez etil asetat ile (1,5 L) ekstrakte edilmiştir ve organik faz susuz Na_2SO_4 üzerinde kurutulmuştur. Çözücü vakum altında buharlaştırıldıktan sonra elde edilen yağımsı madde silika üzerinde (Merck 60, 230-400 mesh) kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kolonda çözücü sistemi olarak petrol eteri içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanılmıştır. Ayrılan kısımlar silika üzerinde İTK ile izlenmiştir (Merck silika jel GF254).

5.3.6. Metabolitlerin tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, spektroskopik metotlar (FTIR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, APT, DEPT, HETCORE, HMBC, nOe ve HREIMS) kullanılarak veya bilinen bir madde ise erime noktaları karşılaştırılarak aydınlatılmıştır. Enzimatik olarak gerçekleşen reaksiyonlar genelde stereospesifik ürünler verdiğinden, yukarıdaki metotlara ek olarak polarimetre ile optik aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

5.3.7. Seskiterpen sistemlerinin numaralandırılması

Çalışmamızda biyotransformasyonları incelenen diizoforon, sedrol ve patculi alkol bileşiklerinin numaralandırılması aşağıdaki şekilde yapılmaktadır.



Diizoforon Sedrol Patculi alkol

Şekil 5.2. Diizoforon, sedrol ve patculi alkol bileşiklerinin numaralandırılması

5.3.8. Diizoforon'un sentezi

İzoforon (27,6 g) 30 mL toluen içinde çözünerek kaynama taşı içeren 100 mL balona konulmuş ve toz haline getirilen sodyum hidroksit peletleri (2,5 g) izoforon

çözeltisine eklenmiştir. Geri sogutucu altında 4-5 saat ısıtılan çözeltiye biraz eter ilave edildikten sonra ortam 100 mL HCI ile asitlendirilmiştir. Eter ve tolueni uzaklaştırmak için 3 kez su ile yıkama yapıldıktan sonra, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulmuştur. Balondaki çözelti süzülerek, çözücüsü rotary-evaporatörde uçurulmuştur. Elde edilen yağımsı madde, petrol eterinde (60-80°C) dikkatlice kristallendirilerek diizoforon molekülü elde edilmiştir.

Erime noktası	:110-111°C [(110-111°C (Morizur et al., 1967)]
I.R.(V_{mak})	: 3340, 1710 cm^{-1}
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	: 0,70 (3H, s, 14-CH_3), 0,89 (3H, s, 16-CH_3), 0,93 (3H, s, 15-CH_3), 1,01 (3H, s, 17-CH_3), 1,02 (3H, s, 18-CH_3) ve 5,49 (1H, s, 1-OH)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$-TMS)	: 27,28 (C-17), 28,68 (C-14), 30,27 (C-15), 31,97 (C-11), 32,75 (C-9), 32,96 (C-16), 33,16 (C-5), 37,52 (C-18), 45,20 (C-6), 46,32 (C-8), 46,96 (C-13), 50,60 (C-4), 52,29 (C-12), 52,65 (C-10), 72,03 (C-1), 135,92 (C-2), 158,45 (C-7), 201,64 (C-3).

5.3.9. Diizoforon'un *N. crassa* ile biyotransformasyonu

Bölüm 5.2.5'de belirtilen işlemler uygulandıktan sonra elde edilen yağımsı madde kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Kolondan %15'lik etil asetat çözeltisi (petrol eteri içerisinde) geçirilerek saflaştırılan 8β-hidroksidiizoforon yeteri kadar aseton ve petrol eteri karışımı içinde çözülerek kristallendirilmiştir.

Erime noktası	: 119-122°C [(121-123°C (Kruzer et al., 1988)]
I.R.(V_{mak})	: 3445, 1688 cm^{-1}
$[\alpha]^{20}_{D}$	: +13,6° (20°C, 10 mL $CHCl_3$ içinde 1,25 mg)
HREIMS	:m/z= 292,203 ($C_{18}H_{28}O_3$ için hesaplanan: 292,204)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 0,70(3H, s, 18-CH_3), 0,94 (3H, s, 16-CH_3), 1,05 (3H, s, 17-CH_3), 1,06 (3H, s, 14-CH_3), 1,07 (3H, s, 15-CH_3), 3,47 (1H, br. s, 8α-H) ve 5,37 (1H, br. s, 1-O<u>H</u>)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : 26,97 (C-17), 27,80 (C-14), 29,81 (C-16), 30,10 (C-15), 31,44 (C-11), 32,84 (C-5), 37,48 (C-9), 37,54 (C-18), 41,17 (C-13), 42,78 (C-6), 49,73 (C-12), 50,65 (C-10), 52,43 (C-4), 71,73 (C-1), 76,41 (C-8), 136,45 (C-2), 155,62 (C-7), 203,04 (C-3).

5.3.10. Sedrol'ün *N. crassa* ile biyotransformasyonu

Çalışmamızda kullandığımız sedrol bileşiğine ait spektroskopik veriler aşağıda verilmiştir.

Erime noktası : 85-86°C [85-86°C (Skeya, 2004)]

I.R.(V_{mak}) : 3335 (OH), 1715 cm^{-1} (C=O)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 0,82(3H, d, 12-CH_3), 0,98 (3H, s, 14-CH_3), 1,25 (3H, s, 15-CH_3), 1,31 (3H, s, 13-CH_3)

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$) : 15,98 (C-12), 25,74 (C-4), 28,04 (C-13), 29,31 (C-14), 30,58 (C-15), 31,97 (C-10), 35,71 (C-9), 37,39 (C-3), 41,84 (C-2), 42,35 (C-11), 43,77 (C-6), 54,47 (C-1), 56,89 (C-5), 61,39 (C-7), 75,48 (C-8).

Sedrol'ün biyotransformasyonu için bölüm 5.2.5'de belirtilen işlemler uygulandıktan sonra elde edilen madde kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Kolondan %15'lik etil asetat çözeltisi (petrol eteri içerisinde) geçirilerek saflaştırılan 12β-hidroksisedrol yeteri kadar aseton ve petrol eteri karışımı içinde çözülerek kristallendirilmiştir.

Erime noktası : 122-123 ^{o}C [125-127°C (Miyazawa et al., 1995)]

I.R.(V_{mak}) : 3285 (OH), 1699 cm^{-1}(C=O)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 1,02 (3H, s, 14-CH_3), 1,27 (3H, s, 15-CH_3), 1,33 (3H, s, 13-CH_3), 3,46 (1H, dd, J = 7,7 ve 10,4 MHz, 12β-C$\underline{H}_2$), 3,65 (1H, dd, J = 6,9 ve 10,4 MHz, 12β-C$\underline{H}_2$)

^{13}C NMR (90 MHz, $CDCl_3$) : 25,82 (C-4), 27,50 (C-13), 29,03 (C-14), 30,21 (C-15), 30,89 (C-10), 32,11 (C-3), 34,94 (C-9), 42,59 (C-11), 43,03 (C-6), 50,36 (C-2), 53,26 (C-1), 57,41 (C-7), 61,16 (C-5), 63,72 (C-12), 74,97 (C-8).

5.4. Biyosorpsiyon Çalışmaları

5.4.1. Biyokütlenin hazırlanması

Biyosorbent olarak kullanılacak *N.crassa* fungal kültürünün hazırlanmasında biyotransformasyon çalışmaları için izlenen yöntem kullanılmış ve biyokütle üretimi yine aynı besiyerinde (Bkz. bölüm 5.2.3.) gerçekleştirilmiştir. Belirtilen besiyerinde 7 gün boyunca üretilen biyokütle vakumda süzme ile besiyerinden ayrılmış ve petrilere yayılarak 60°C sıcaklıktaki etüvde bir gece boyunca kurutulmuştur. Kurutulan bu biyokütle porselen havanda öğütüldükten sonra elekten geçirilerek 150 µm tanecik boyutunda biyosorbent olarak hazırlanmıştır.

5.4.2. Boya çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan Asit Kırmızısı-57 (AR57; Nylosan Red EBL) tekstil boyası Clairent-İsviçre'den sağlanmıştır. AK-57'nin 1 g/L'lik stok çözeltisi hazırlandıktan sonra diğer konsantrasyonların (100-400 mg/L) hazırlanmasında bu stok çözelti kullanılmıştır. Çözeltilerin pH'sı 0,1 M HCl ya da 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılarak gerekli değerlere ayarlanmıştır. Tüm deneylerde taze hazırlanmış çözeltiler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

5.4.3. Boya biyosorpsiyonu çalışmaları

Biyosorpsiyon deneyleri, çalkalamalı sistemde 200 rpm çalkalama hızında yapılmıştır. Biyosorpsiyona pH etkisi, 1-10 pH aralığında incelenmiştir. 0,1 g

biyosorbent örneği 100 mg/L, 50 mL boya çözeltisi ile oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Biyosorpsiyona biyosorbent konsantrasyonu etkisi ise optimum pH'da (pH 1,0) 0,2-4,0 g/L biyosorbent konsantrasyonu aralığında araştırılmıştır. Biyosorbent, çözeltiden 4500 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek ayrıldıktan sonra çözeltideki boya konsantrasyonları, UV spektrofotometresi ile (UV/Vis, Unicam UV2-100) 512,5 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Biyosorpsiyon denge süresi farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50°C) çalkalama süresi 10-90 dk. arasında değiştirilerek incelenmiştir. Elde edilen verilerin birinci derece ve yalancı-ikinci derece kinetik modellere uygunluğu araştırılmıştır. Farklı sıcaklıklarda 100-400 mg/L konsantrasyon aralığındaki boya çözeltileri kullanılarak biyosorpsiyona başlangıç boya konsantrasyonunun etkisi incelenmiş ve elde edilen veriler Langmuir, Freundlich ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm modelleri ile değerlendirilmiştir. Langmuir sabiti K_L kullanılarak, biyosorpsiyon için termodinamik veriler türetilmiştir.

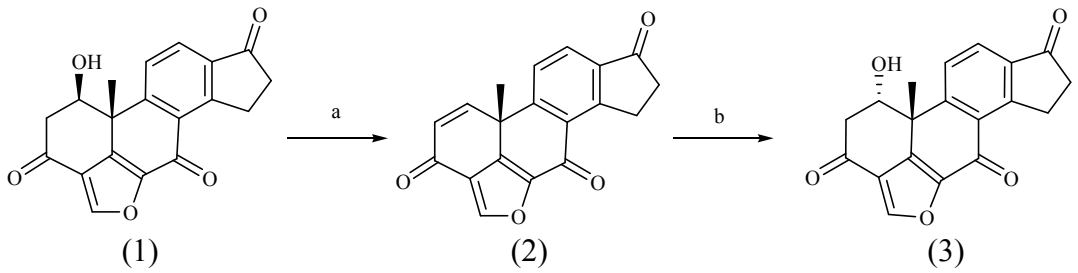
5.5. Genel Deneysel Bilgiler

Erime noktaları, Gallenkamp MPD350 erime noktası cihazıyla belirlenmiştir. İnfrared spektrumları, KBr diskleri kullanılarak Bruker Tensor 27 infrared spektrofotometresi cihazı ile, EIMS ve HREIMS spektrumları ise VG Autospec Fisions cihazıyla alınmıştır. Optik rotasyonlar ise Optik Activite Limited AA-5 serisi polorimetresiyle ölçülmüştür. ^{1}H-NMR ,^{13}C-NMR ve 2D-NMR spektrumları Bruker DPX 300, 400 ve Avance 500 Fourier Transform spektrofotometreleriyle alınırken, DEPT spekturumları 125 ve 90 MHz'de Dötorokloroform içerisinde tetrametilsilan uluslar arası standart referans alınarak yapılmıştır. Saflaştırma işlemi için kullanılan çözücü sistemleri kullanımdan önce distillenmiştir. Kolon kromotografisi için 60 (Merck ,230-400 mesh) tipi silika jel kullanılmıştır. İnce tabaka kromotografisi, 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF_{254}) üzerinde (60-80°C) etil asetat–petrol eteri (1:1) çözelti sistemiyle izlenmiştir. Bileşiklerin spotları 1:1 oranında metanol:sülfürik asit çözeltisiyle renklendirildikten sonra ısıtılarak belirgin hale getirilmiştir.

6. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

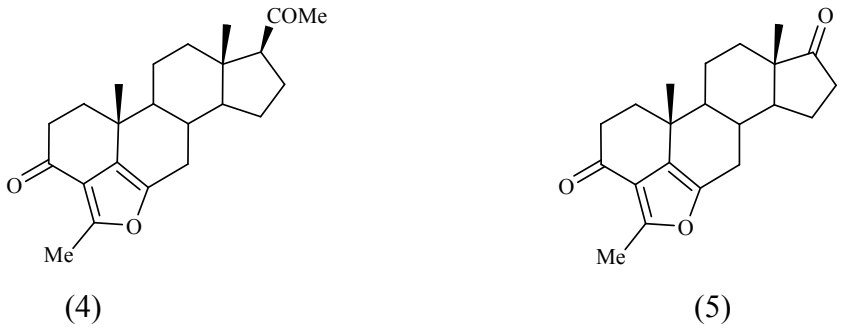
6.1. Furanosteroid'lerin Eldesi

Bölüm 5.2.1'de açıklandığı şekilde *N. hinnuleum* fungal kültürünün biyosentez ürünü olarak elde edilen demetoksiviridin (1) bileşiğinin piridin içersinde metansülfonilklorür ile oda sıcaklığında 4 saat boyunca muamelesi sonucu dehidroksidemetoksiviridin-1-en (2) bileşiği elde edilmiş ve bu bileşiğin yine aseton içersinde, seyreltik HCl ile oda sıcaklığında 3 saat muamelesi sonucunda 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiği elde edilmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. 1α-Hidroksidemetoksiviridin'in (3) sentezi.
Koşullar: a) $MeSO_2Cl$, C_5H_5N, 25 ^oC, 4 saat; b) HCl (10%), $(CH_3)_2CO$, 25 ^oC, 72 saat.

Çalışmamızda kullandığımız, Şekil 6.2'de yapıları verilen 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion (4) (Tür, 2004) ve 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion (5) (Boynton et al., 1999) bileşiklerinin sentezi ise literatür metodları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil. 6.2. 5'-Metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion (4) ve 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion (5)

6.2. Furanosteroid'lerin Antifungal Etkinlikleri

Çalışmamızda kullandığımız bileşiklerden en etkili olanlarının (1, 3), güncel olarak kullanılan bir antifungal ilaç olan Amphotericin B ile yapılan antifungal aktivite karşılaştırmalarına ait veriler Çizelge 6.1'de görülmektedir.

Çizelge 6.1. Demetoksiviridin (1) ve 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiklerinin antifungal aktiviteleri.

Fungal kültür	İnhibisyon çapı (mm)		
	Demetoksiviridin (1) (100 µg/disk)	**1α-Hidroksidemetoksiviridin (3) (100 µg/disk)**	**Amphotericin B (10 µg/disk)**
C. albicans	-	9	13
A. niger	-	10	9
A. fumigatus	7	10	-
A. flavus	7	10	8
A. parasiticus	-	15	7
F. graminarium	-	-	7
F. solani	-	-	9
G. candidum	-	10	8

-, İnhibisyon yok.

Bu verilerden 100 µg/disk test konsantrasyonunda, demetoksiviridinin *A. fumigatus* ve *A. flavus* fungal kültürlerine karşı zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan 1α-hidroksidemetoksiviridin ise *F. solani* ve *F. graminarum* dışındaki tüm fungal kültürler üzerinde yine 100 µg/disk test konsantrasyonunda, 9-15 mm ihibisyon çapı değerleri arasında değişen oldukça iyi bir antifungal etkinlik göstermiştir. Üzerinde inhibisyon gözlenen fungal kültürler arasında 15 mm inhibisyon çapı ile *A. parasiticus* bu bileşiğe en duyarlı tür olarak belirlenirken, bunu 10 mm inhibisyon çapının gözlendiği *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *G. candidum* fungal kültürleri izlemiştir. Bu değerler Amphotericin B antifungal ilacının yarattığı inhibisyon etkileri ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Bu bileşikler için belirlenen minimum inhibitör konsantrasyonları ise Çizelge 6.2' de görülmektedir.

Çizelge 6.2. Demetoksiviridin (1) ve 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiklerinin minimum inhibitör konsantrasyonları.

Fungal kültür	Minimum inhibitör konsantrasyonu (µg/mL (mM))	
	Demetoksiviridin (1)	1α-Hidroksidemetoksiviridin (3)
C. albicans	>320 (0,994)	80 (0,249)
A. niger	>320 (0,994)	20 (0,062)
A. fumigatus	>320 (0,994)	20 (0,062)
A. flavus	320 (0,994)	20 (0,062)
A. parasiticus	>320 (0,994)	20 (0,062)
F. graminarium	320 (0,994)	20 (0,062)
F. solani	160 (0,497)	20 (0,062)

Minimum inhibitör konsantrasyonları incelendiğinde, demetoksiviridin için *F. solani* üzerinde ölçülen 160 µg/mL ve 1α-hidroksidemetoksiviridin için *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *F. graminarium*, ve *F. solani* fungal kültürleri üzerinde ölçülen 20 µg/mL ve *C. albicans* üzerinde ölçülen 80 µg/mL değerleri göze çarpan değerler olarak ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bileşiklerden 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)pregn-5-ene-3,20-dion (4) çalışılan fungal kültürler üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi yaratmazken, 5'-metilfuro-(4',3',2'-4,5,6)androst-5-ene-3,17-dion (5) ise *C. albicans* fungal kültürü üzerinde 100 µg/disk test konsantrasyonunda gösterdiği 7 mm inhibisyon çapı haricinde diğer fungal kültürler üzerinde bir etki göstermemiştir.

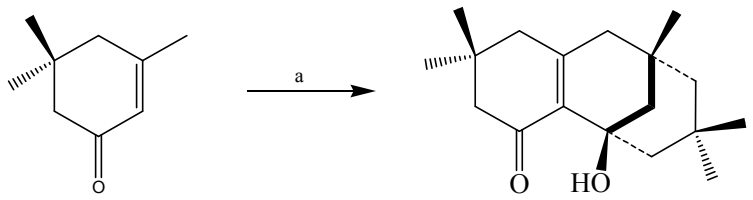
6.3. Yapı-Aktivite İlişkileri

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre antifungal aktiviteleri incelenen bileşiklerden demetoksiviridin'in (1), stereokimyasının alfa konumuna eklenen bir hidoksil grubu ile değişmesiyle oluşan 1α-hidroksidemetoksiviridin (3) bileşiğinin aktivitesinde, demetoksiviridin ile kıyaslandığında önemli bir artış gözlenmiştir. Buna göre ilk olarak alfa konumuna bağlanan bu hidroksil grubunun biyolojik aktivite artışına neden olduğu, ikinci olarak moleküldeki furan halkasının varlığının biyolojik aktivite

için önemli olduğu söylenebilir. Bu da furanosteroidlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili olarak literatürde bildirilen çalışmalarla uyum içerisindedir (Norman et al., 1995; Dodge et al., 1995). Üçüncü olarak ise furan halkasına C-20. konumundan bağlanan metil grubu ve androstan serisi için C-17, pregn serisi için C-20. konumdan bağlanan asetil grubunun, bileşiklerin bu çalışmada kullanılan fungal kültürlere karşı gösterdikleri inhibitör etkilerini tamamen ortadan kaldırabileceği söylenebilir.

6.4. Diizoforon'un Sentezi

Diizoforon bileşiği izoforondan bir adımda yüksek verimle elde edilmiştir (Şekil 6.3).



İzoforon Diizoforon

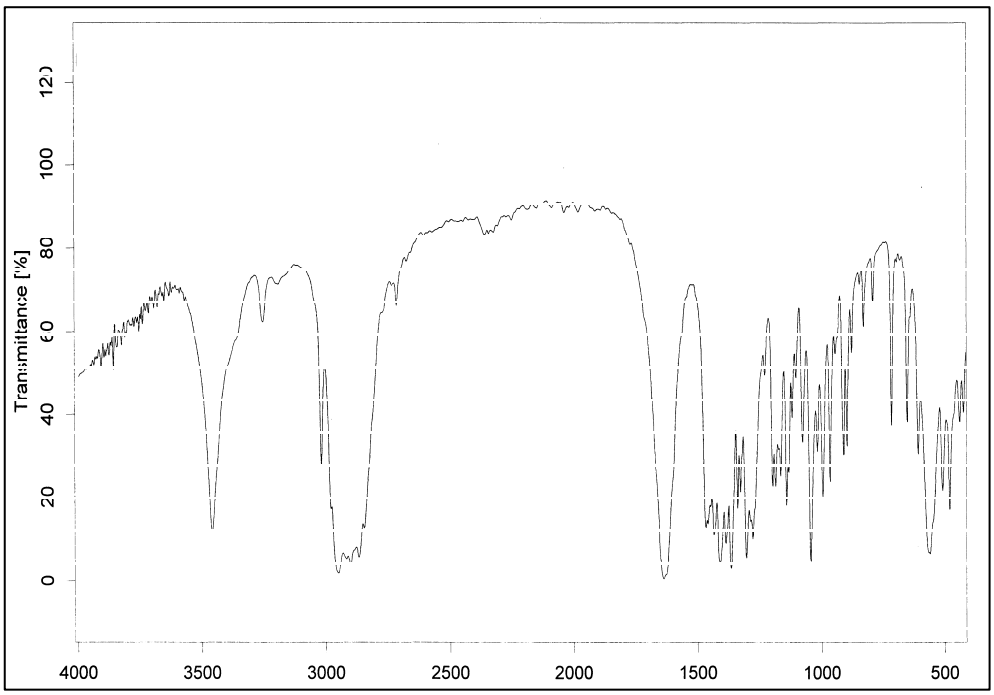
Şekil 6.3. İzoforon'dan diizoforon'un bazik şartlarda elde edilmesi
Koşullar: a) aq.NaOH, Toluen, 120°C, 6 saat.

Bu bileşiğin IR spektrumu incelendiğinde 3340 cm^{-1}'de hidroksil gruplarının karakteristik piki ve 1710 cm^{-1}'de de karbonil grubuna ait bir pik gözlenmiştir. Bu pikler yapı ile uyum halindedir. ^{1}H NMR spektrumunda yapıdaki 5 tane metil gruplarına ait pikler sırasıyla 0,70 (3H, s, 14-CH_3), 0,89 (3H, s, 16-CH_3), 0,93 (3H, s, 15-CH_3), 1,01 (3H, s, 17-CH_3), 1,02 ppm'lerde (3H, s, 18-CH_3) ve 1 nolu karbon atomuna bağlı hidroksil protonu da yayvan bir pik olarak 5,49 ppm'de (1H, s, 1-OH) gözlenmiştir. ^{13}C NMR spektrumunda gözlenen 5 tane metil piki [37,52 ppm (C-18), 32,96 ppm (C-16), 30,27 ppm (C-15), 28,68 ppm (C-14), 27,28 ppm (C-17)]; 6 tane metilen piki [52,65 ppm (C-10), 52,29 ppm (C-12), 50,60 ppm (C-4), 46,96 ppm (C-13), 46,32 ppm (C-8) ve 45,20 ppm (C-6)]; 4 tane kuaterner karbon atomuna ait pik [72,03 ppm (C-1), 33,16 ppm (C-5), 32,75 ppm (C-9) ve 31,97 ppm (C-11)]; 2 tane çifte bağ içeren karbon atomlarına ait pik [158,45 ppm (C-7) ve 135,92 ppm (C-2)] ve son olarak

da keton grubuna ait olan bir pikin [201,64 ppm'de (C-3)] gözlenmesi, söz konusu yapıyı doğrulamıştır.

6.5. Diizoforon'un *N. crassa* ile Biyotransformasyonu

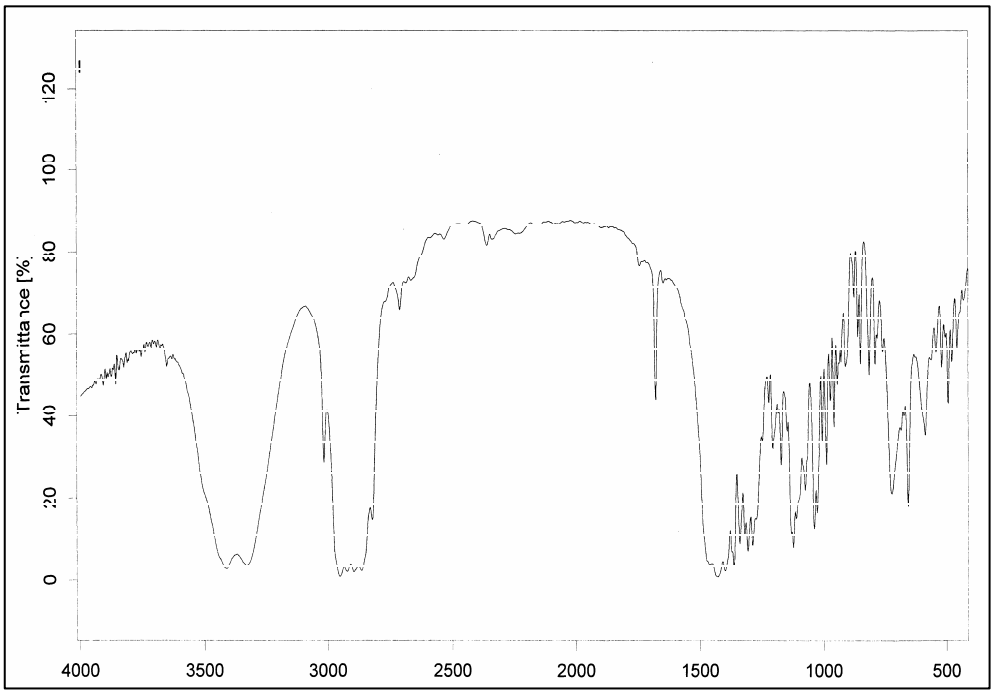
Rasemik diizoforon'un, sıvı besiyerindeki *N. crassa* fungal kültürü ile dairesel çalkalayıcı üzerindeki 10 günlük inkübasyonu sonunda, az miktarda başlangıç maddesi ve iki polar metabolitin varlığı, ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edilmiştir. Öncelikle kolondan etil asetatın petrol eteri içindeki % 10'luk çözeltisi geçirilerek başlangıç maddesi tümüyle izole edilmiştir. Başlangıç maddesinin yapısı, mevcut NMR spektrumları ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Maddenin erime noktası (110-111°C) ve IR spektrumu (Şekil 6.4) literatür değerleri ile uyum göstermiştir.



Şekil 6.4. Diizoforon'un IR spektrumu

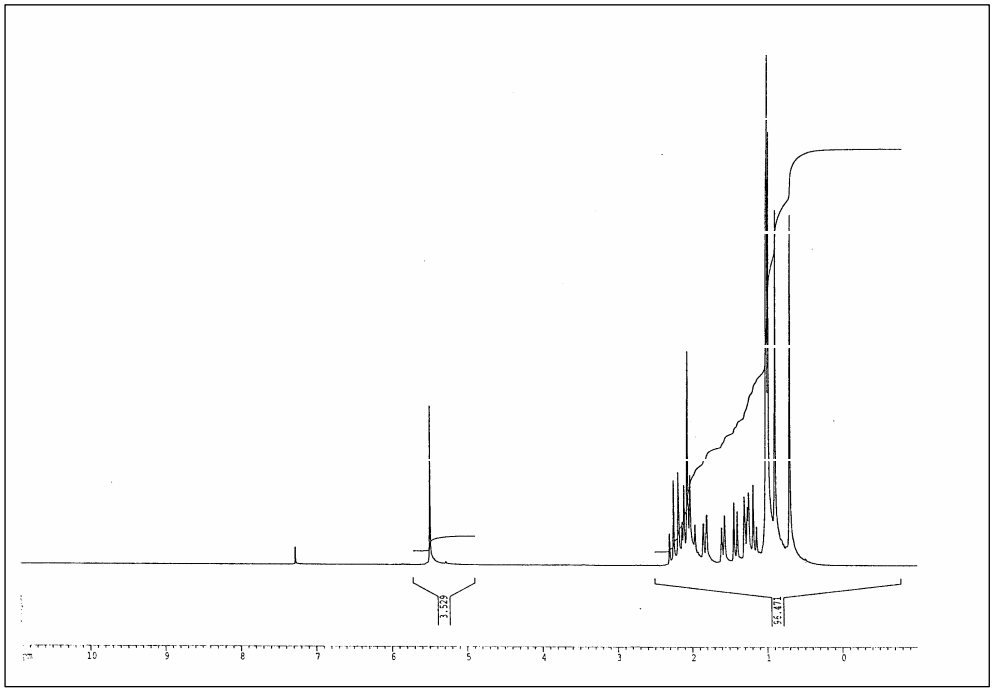
Daha sonra kolondan etil asetatın petrol eteri içindeki % 15'lik çözeltisi geçirilerek beyaz renkli katı bir metabolit izole edilmiştir. Bu metabolitin kütle spektrumu alındığında 292'de moleküler bir iyon göstermiştir. Bileşiğin HREIMS' deki moleküler iyonu 292,203 olarak belirlenmiştir. Bu veri $C_{18}H_{28}O_3$ molekül formülü ile

uyumludur. Bileşiğin IR spektrumu alındığında 3445 cm^{-1}'de bir hidroksil piki ve 1688 cm^{-1}'de bir karbonil piki gözlenmiştir (Şekil 6.5).

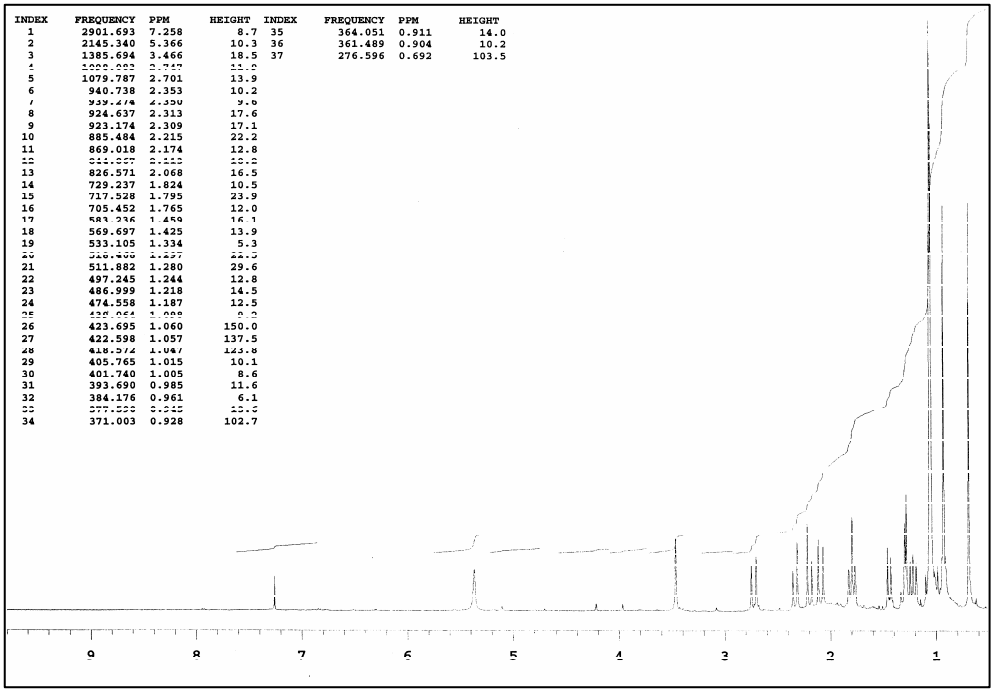


Şekil 6.5. 8β-Hidroksidiizoforon'un IR spektrumu

Bu bileşiğin spesifik çevirme derecesi +13,6^{o} olarak belirlenmiştir. Bileşiğe ait ^{1}H NMR spektrumu diizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu ile benzer olmakla beraber δ_H 3,47'de bir singlet olarak gözlenen ve yeni bir hidroksil grubu taşıyan metil protonunun [CH(OH)] görünümü yapıya C-4, C-6, C-8, C-10, C-12 veya C-13 karbonlarındaki metilen gruplarından birisi üzerinden bir hidroksil grubunun ilave edilmiş olabileceğini göstermiştir (Şekil 6.6 ve 6.7).



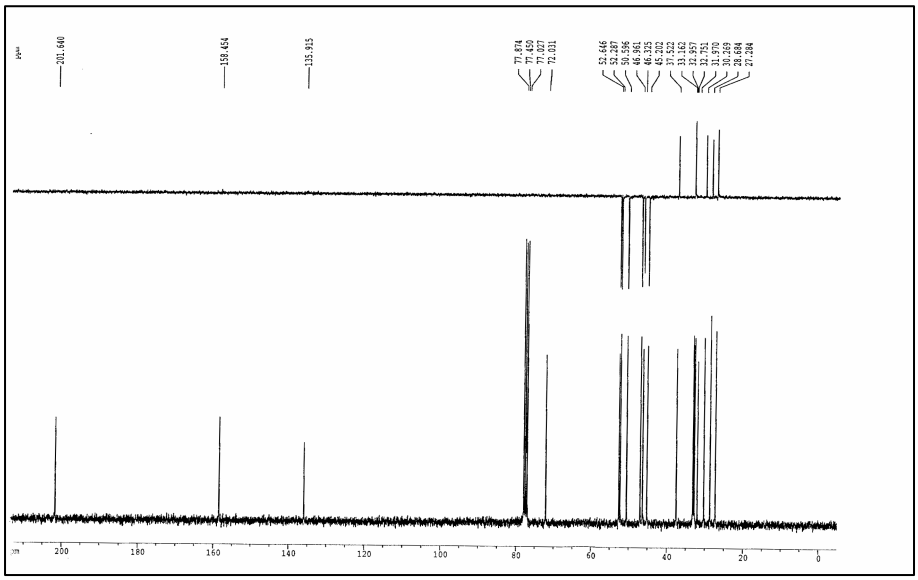
Şekil 6.6. Diizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu



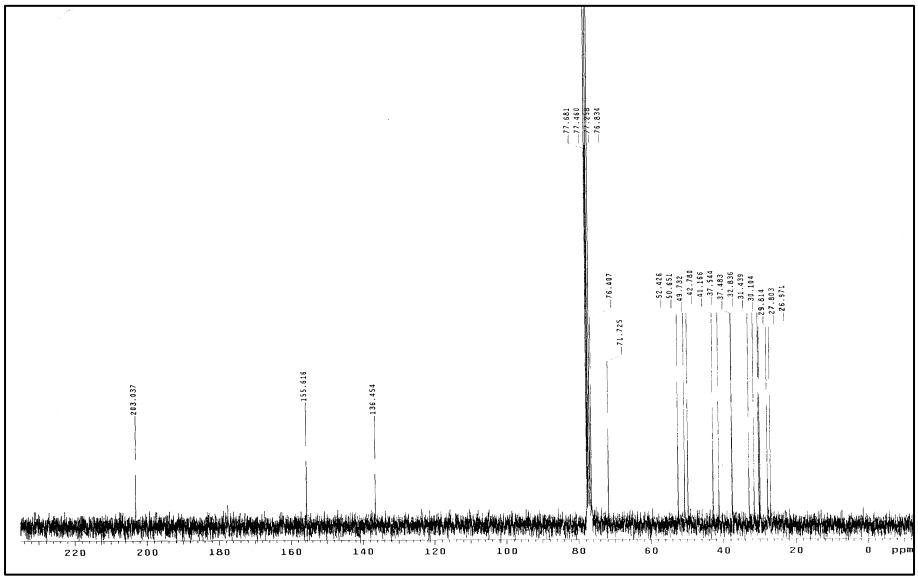
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2901.693	7.258	8.7	35	364.051	0.911	14.0
2	2145.340	5.366	10.3	36	361.489	0.904	10.2
3	1385.694	3.466	18.5	37	276.596	0.692	103.5
4	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
5	1079.787	2.701	13.9				
6	940.738	2.353	10.2				
7	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
8	924.637	2.313	17.6				
9	923.174	2.309	17.1				
10	885.484	2.215	22.2				
11	869.018	2.174	12.8				
12	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
13	826.571	2.068	16.5				
14	729.237	1.824	10.5				
15	717.528	1.795	23.9				
16	705.452	1.765	12.0				
17	583.236	1.459	16.1				
18	569.697	1.425	13.9				
19	533.105	1.334	5.3				
20	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
21	511.882	1.280	29.6				
22	497.245	1.244	12.8				
23	486.999	1.218	14.5				
24	474.558	1.187	12.5				
25	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
26	423.695	1.060	150.0				
27	422.598	1.057	137.5				
28	418.572	1.047	123.8				
29	405.765	1.015	10.1				
30	401.740	1.005	8.6				
31	393.690	0.985	11.6				
32	384.176	0.961	6.1				
33	377.522	0.945	22.2				
34	371.003	0.928	102.7				

Şekil 6.7. 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu

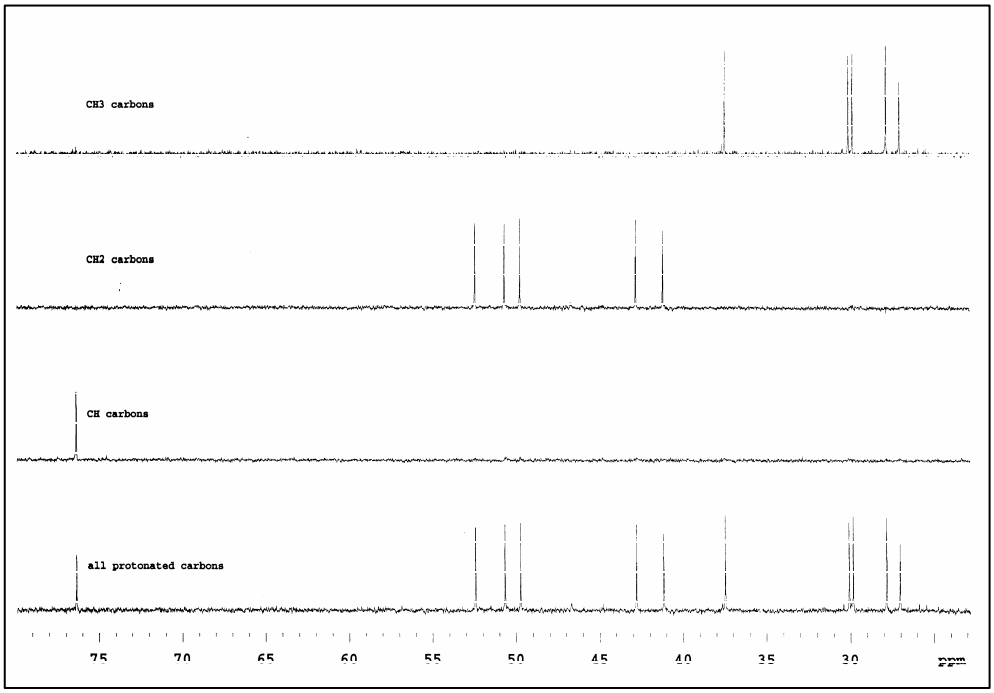
Bu bulgu 18 karbon rezonansının gözlendiği ^{13}C NMR sonuçları ile doğrulanırken, DEPT spektrumu yapıda 5 metil, 5 metilen, 1 metin ve 7 tane kuaterner karbon sinyalinin varlığını göstermiştir ve bu bilgiler ^{1}H NMR spektrumu ile uyum içerisinde olup; δ_C 76,12'deki düşük alanlı hidroksil içeren yeni bir metin pikinin varlığı ve başlangıçtaki yapıda bulunan 6 metilen karbon pikinin 5'e düşmesi de yukarıdaki kanıyı doğrulamaktadır (Şekil 6.8, 6.9, 6.10 ve 6.11).



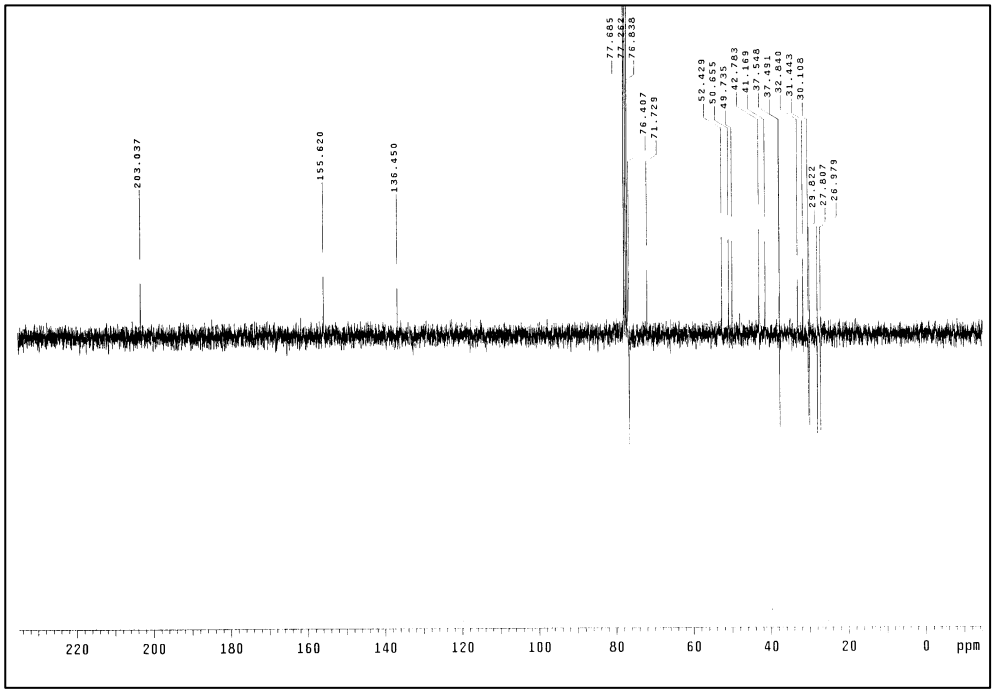
Şekil 6.8. Diizoforon'un DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları



Şekil 6.9. 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-1



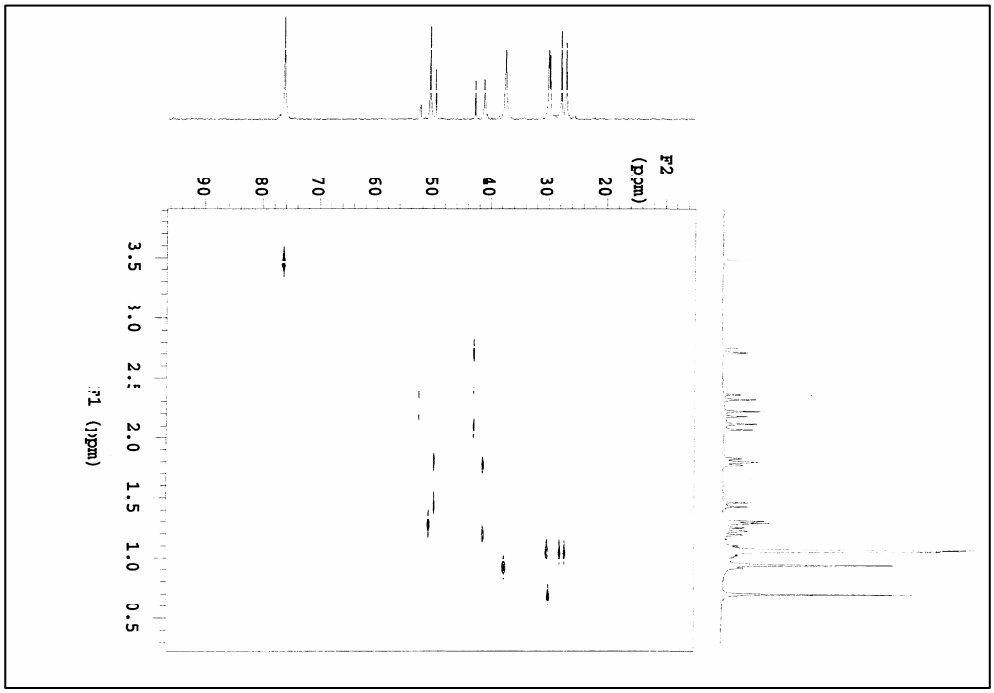
Şekil 6.10. 8β -Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-2



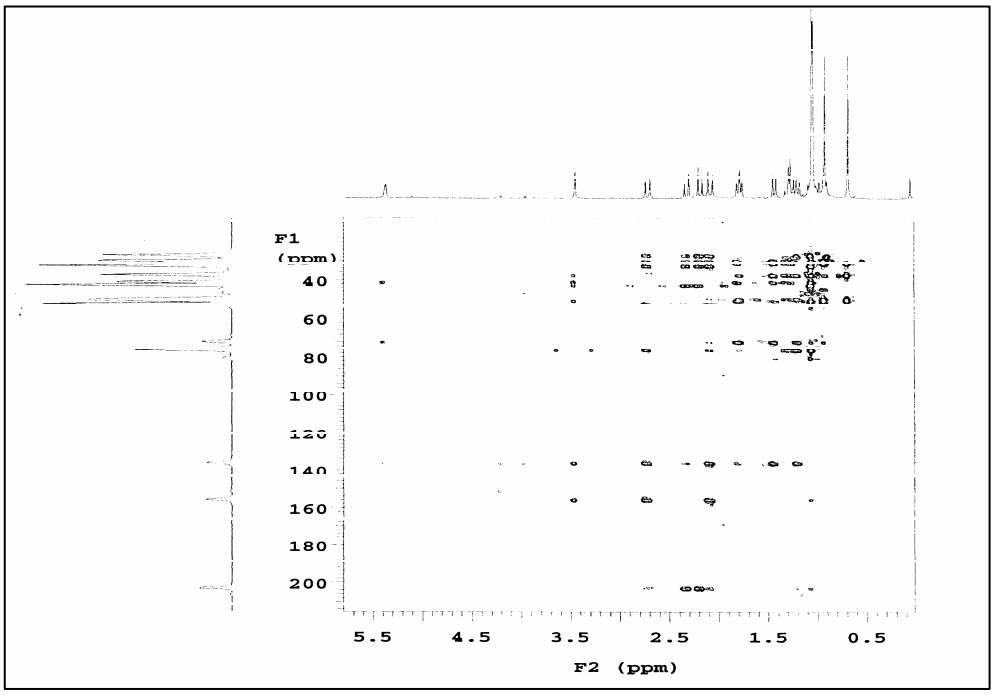
Şekil 6.11. 8β-Hidroksidiizoforon'un APT spektrumu

Yapıya ilave olan hidoksil grubunun konumunun belirlenmesi tüm karbonların ve protonların kombine etkileşimine dayanan, bileşiğin HETCORE (Şekil 6.12) ve HMBC spektrumları (Şekil 6.13 ve 6.14) ile ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarının daha önce literatürde elde edilen diizoforon ve metabolitlerinin (Kiran et al., 2004) spektroskopik verileriyle karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Diizoforon molekülünün δ_C 46,3'deki C-8 karbonunu işaret eden metilen piki, metabolitin ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarında görünmemektedir. Bu bulgu mikrobiyal hidroksillemenin C-8 karbonu üzerinde gerçekleştiğini göstermektedir.

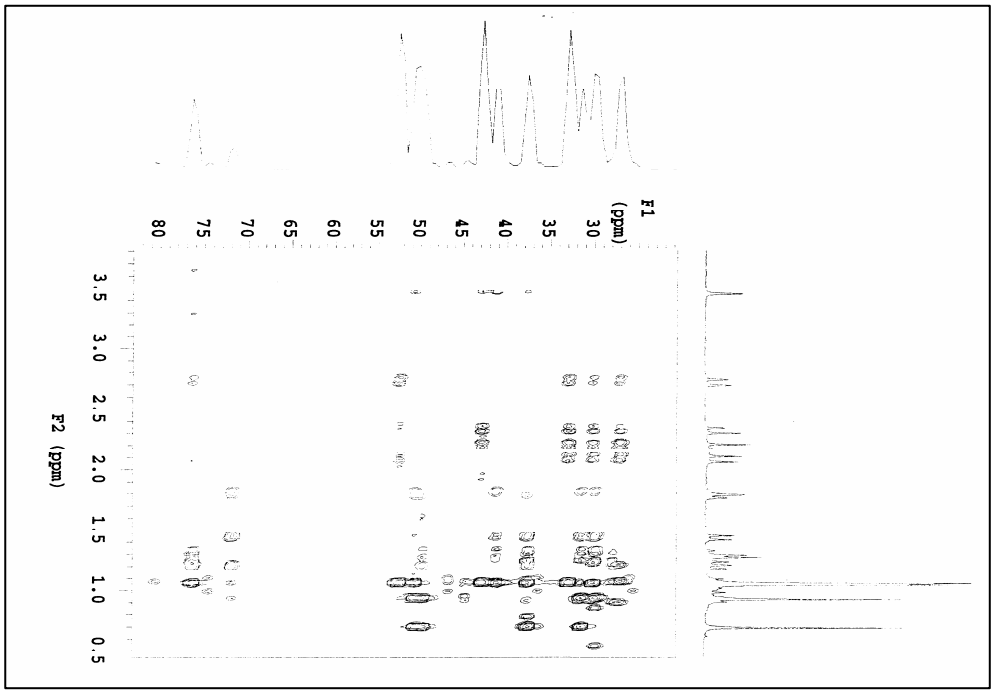
Bileşiğin HETCORE spektrumunda H-8 ile δC 76,8'deki hidroksil içeren C-8 karbonu piki arasında bir ilişki gözlenmiştir (Şekil 6.12).



Şekil 6.12. 8β-Hidroksidiizoforon'un HETCORE spektrumu

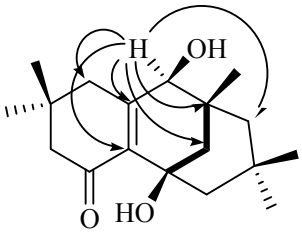


Şekil 6.13. 8β-Hidroksidiizoforon'un HMBC spektrumu



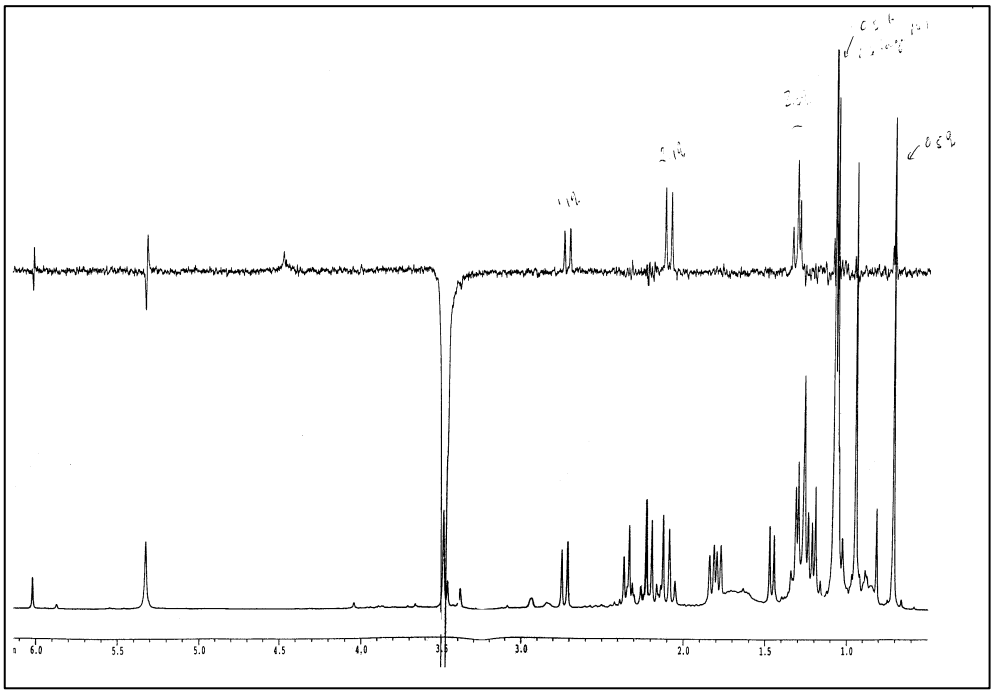
Şekil 6.14. 8β-Hidroksidiizoforon'un genişletilmiş HMBC spektrumu

HMBC spektrumunda δ_H 3,47' deki hidroksil içeren karbon atomu proton sinyalleri (1H, br. s, 8α-H) ile karbon sinyallerinin (δ_C 136,45 (C-2), 42,78 (C-6), 155,61 (C-7), 37,54 (C-9), 50,65 (C-10) ve 41,16 (C-13)) korelasyonu bulguyu doğrulamaktadır (Şekil 6.15).



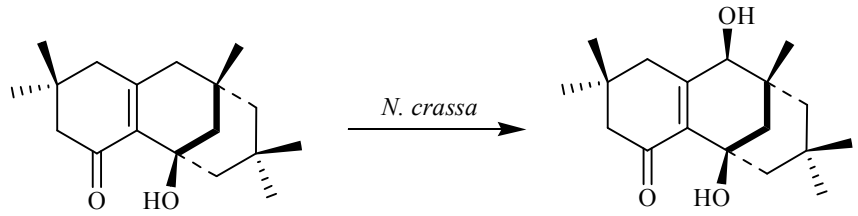
Şekil 6.15. 8β-Hidroksidiiozforon molekülündeki 8α-H sinyalinin HMBC korelasyonları

Metabolit yapısındaki hidroksil grubunun beta konumu, nOe çalışması yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 6.16). 8. konumdaki hidroksil grubunun bağlı olduğu karbon atomunun δ_H 3,47'deki proton pikinin uyarılması sonucu C-6 pikine ait δ_H 2,70'deki pike % 1,1 oranında bir nOe etkileşimi göstermiştir. Bu sonuç, protonun alfa, hidroksil grubunun da beta konumunda olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 6.16. 8β-Hidroksidiizoforon'un nOe spektrumu

Tüm bu spektroskopik veriler ışığında, yapısı aydınlatılan metabolitin 8β-hidroksidiizoforon olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.17).



Diizoforon 8β-hidroksidiizoforon

Şekil. 6.17. Diizoforonun *N.crassa* ile mikrobiyal hidroksillenmesi

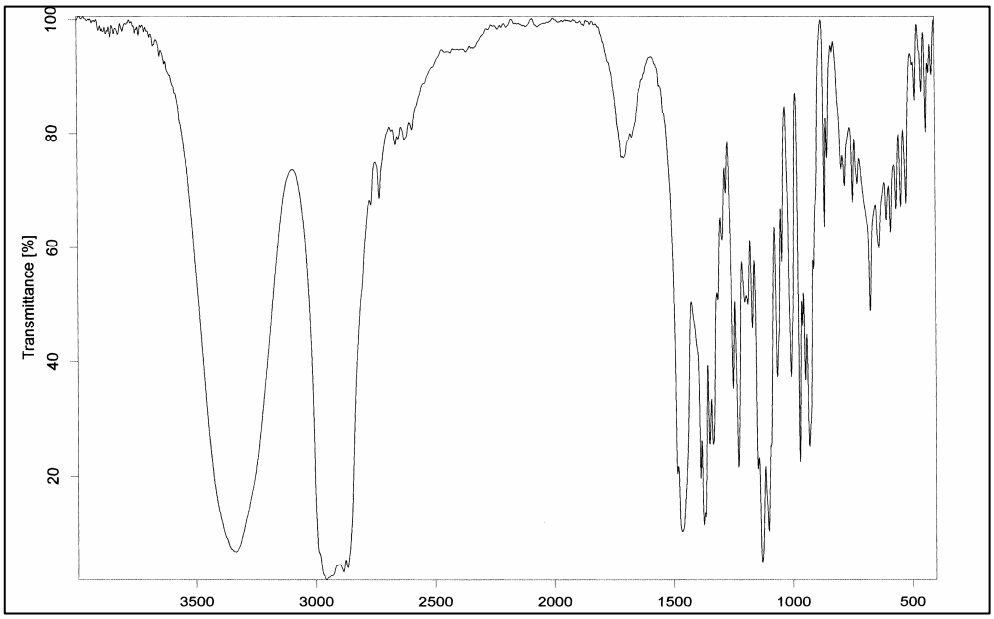
Elde edilen metabolitin kimyasal sentezinin Kruzer ve arkadaşları (1988) tarafından gerçekleştirildiği literatürde belirtilmiştir.

Son olarak kolondan etil asetatın petrol eteri içindeki % 20'lik çözeltisi geçirilerek ikinci metabolit izole edilmiştir. Yapı aydınlatılmasında, bu metabolitin IR, ^{13}C NMR ve APT spektrumları ile daha önce literatürde elde edilen metabolitlerin ve başlangıç maddesinin spektroskopik verilerinden yararlanılmıştır. Bu bileşiğin IR spektrumu 3430 cm^{-1}'de geniş bir hidroksil absorpsiyonu ve 1686 cm^{-1}'de de bir karbonil piki gözlenmiştir. Ayrıca ^{1}H NMR (proton) spektrumu δ_H 4,44'de yeni bir hidroksil grubu taşıyan metilen protonlarının piklerini içermektedir. Metabolitin proton NMR spektrumu substrat molekülünün spektrumu ile karşılaştırıldığında 0,70 ppm'deki piklerden birinin kaybolduğu gözlenmiş ve bunun sonucu olarak da 16-CH_3 grubunun hidroksillendiği sonucuna varılmıştır. Fakat ^{13}C NMR spektrumundaki rezonanslar proton NMR verileri ile örtüşmediğinden, yapı tayini çalışmaları sonuçlandırılamamıştır.

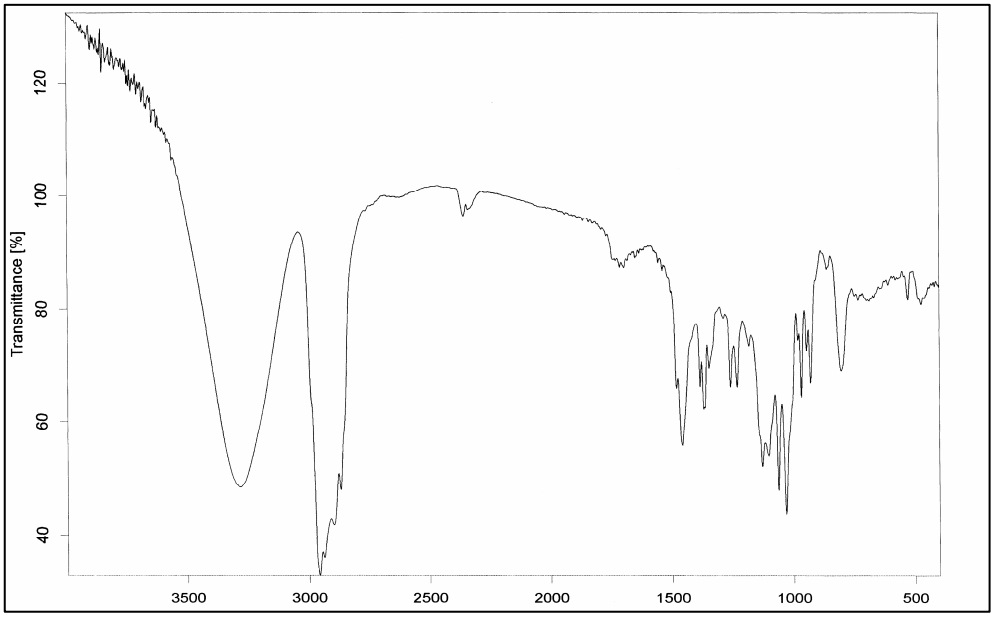
6.6. Sedrol'ün *N. crassa* ile Biyotransformasyonu

Sedrol'ün, sıvı besiyerindeki *N. crassa* fungal kültürü ile dairesel çalkalayıcı üzerindeki 10 günlük inkübasyonu sonunda, az miktarda başlangıç maddesi ve 4 polar metabolitin varlığı, İTK ile tespit edilmiş ve mevcut spotlardan sadece bir tanesi % 20'lik etil asetat çözeltisi kullanılarak saflaştırılabilmiştir. Diğerlerinin bir kısmının

karışım şeklinde olduğu bir kısmının da bozunduğu yapılan ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrum analizleri ile tespit edilmiştir. Elde edilen metabolit 12β-hidroksisedrol olarak belirlenmiştir. Yapı tayininde sedrol ile metabolitin IR, ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 6.18, 6.19, 6.20 ve 6.21).

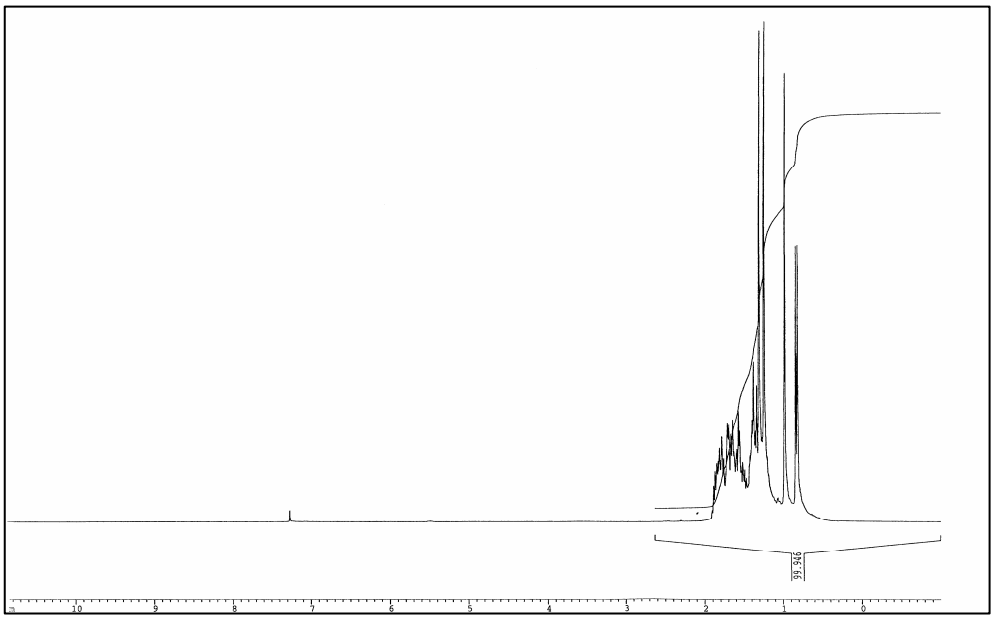


Şekil 6.18. Sedrol'ün IR spektrumu

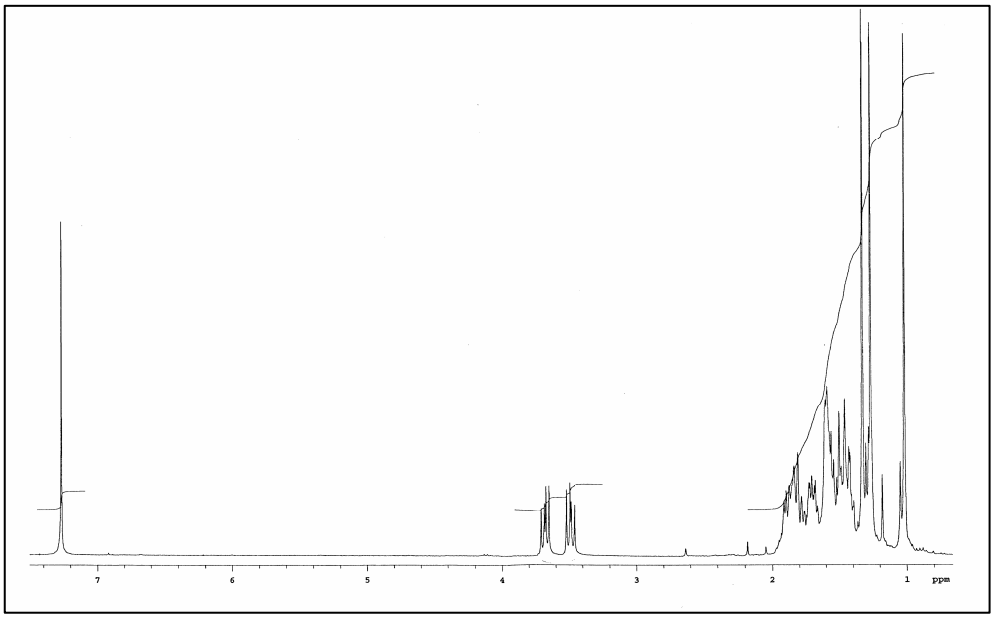


Şekil 6.19. 12β-Hidroksisedrol'ün IR spektrumu

Sedrolün ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 6.20) 0,82 ppm'de mevcut olan ve 12β-CH_3 grubuna ait dublet (*j*=7,1 MHz) piki metabolitin ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 6.21) görülmemiş, fakat 3,46 ve 3,65 ppm'de birer protonluk multiplet pikler görülmüştür.

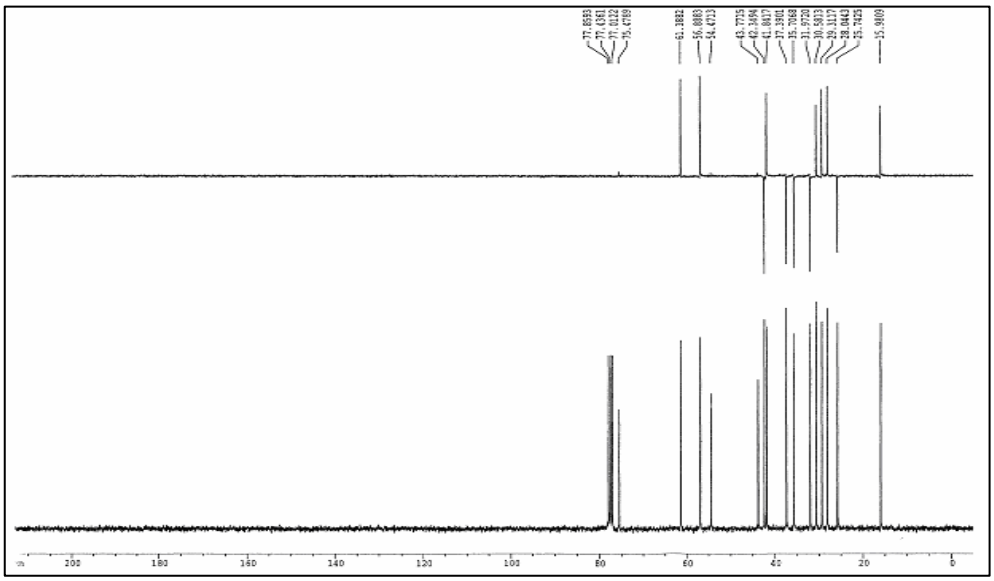


Şekil 6.20. Sedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu

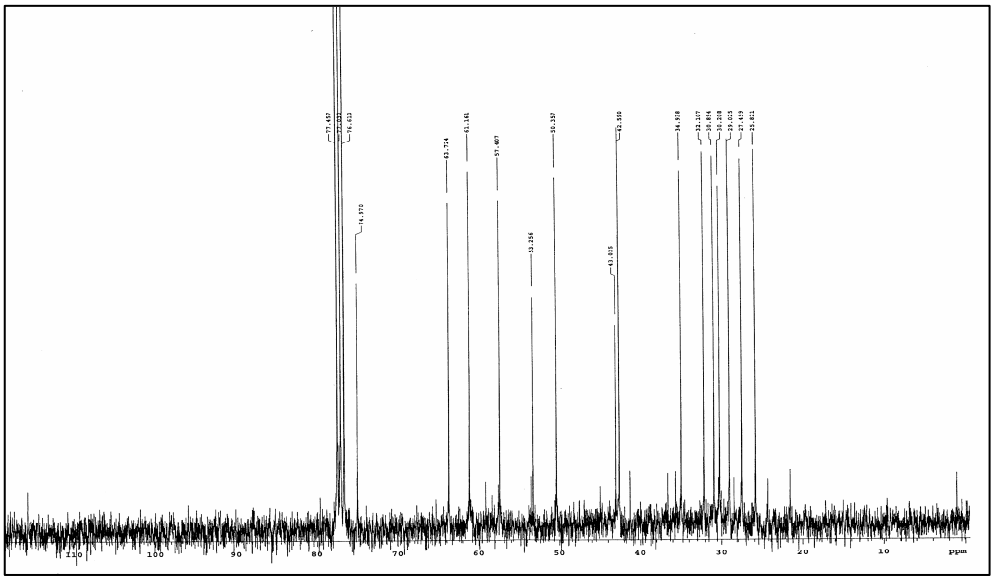


Şekil 6.21. 12β-Hidroksisedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu

Ayrıca sedrolün (Şekil 6.22) ve metabolitin (Şekil 6.23) ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde; metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda CH_3 grubuna ait üç pik ve 63,7 ppm'de hidroksimetil grubuna ait yeni bir sinyal gözlenmiştir. Bu bulgular sedrolün 12. β pozisyonunda bulunan metil grubunun stereospesifik olarak monohidroksillendiğini ortaya koymuştur.

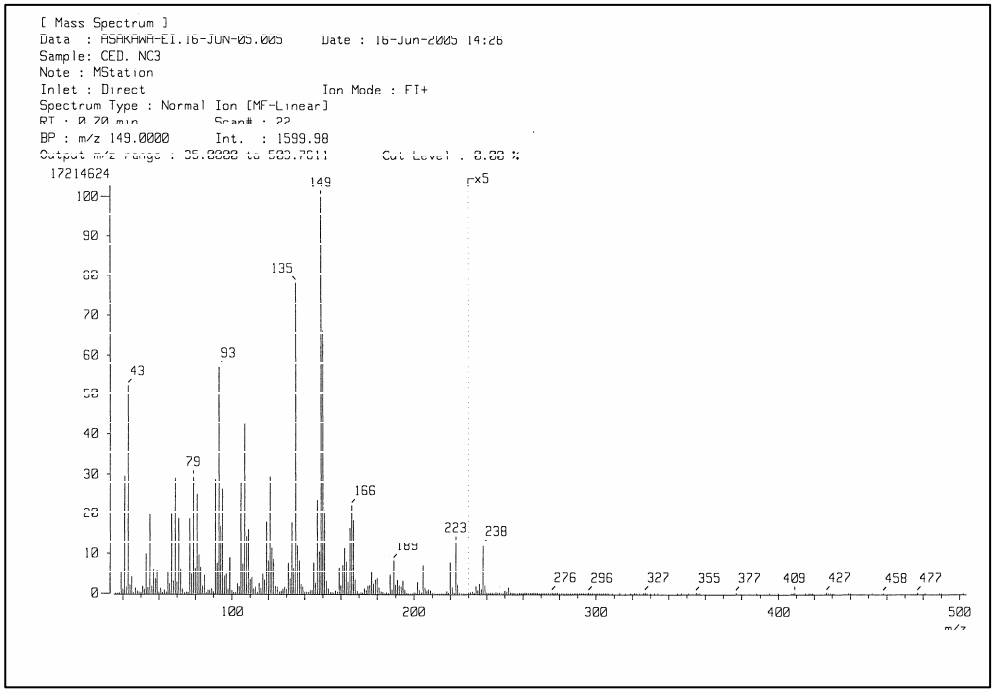


Şekil 6.22. Sedrol'ün DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları



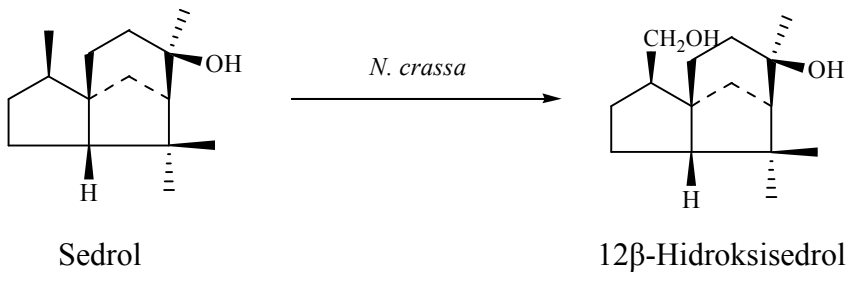
Şekil 6.23. 12β-Hidroksisedrol'ün ^{13}C NMR spektrumu

Metabolitin kütle spektrumunda 238'de bir moleküler iyon piki gözlenmiştir (Şekil 6.24). Ayrıca metabolitin yüksek çözünürlüklü elektron etki kütle spektrumundaki (HREIMS) moleküler iyonu 238,1932 olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.24.12β-Hidroksisedrol'ün kütle (EIMS) spektrumu

Bu veri monohidroksillenmiş sedrolün molekül formülü ($C_{15}H_{26}O_2$) ile uyumludur (Şekil 6.25).



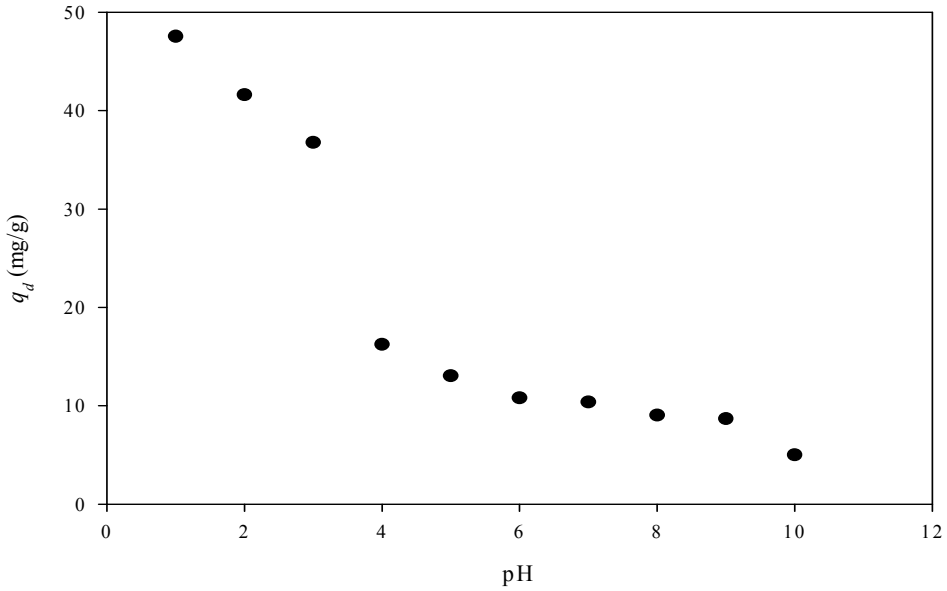
Şekil 6.25. Sedrolün *N.crassa* ile mikrobiyal hidroksillenmesi

6.7. Patculi alkol'ün *N. crassa* ile Biyotransformasyonu

Patculi alkol'ün, sıvı besiyerindeki *N. crassa* fungal kültürü ile dairesel çalkalayıcı üzerindeki 10 günlük inkübasyonu sonunda, az miktarda başlangıç maddesi ve iki polar metabolitin varlığı, İTK ile tespit edilmiştir. Karışım kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Etil asetatın petrol eteri içerisindeki % 10 ve 25'lik çözeltisi kullanılarak metabolitler saflaştırılmıştır. Metabolitlerin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları alındığında büyük bir ihtimalle bozunmaya uğradıkları gözlenmiştir.

6.8. Biyosorpsiyona pH Etkisi

Şekil 6.26'da *N. crassa* fungal biyosorbentinin biyosorpsiyon kapasitesine başlangıç pH'ının etkisi görülmektedir. Biyosorpsiyon kapasitesinin pH 4,0 ve 3,0 arasında keskin bir artış gösterdiği, pH 4,0'ün üzerindeki değerlerde ise biyosorpsiyon kapasitesinin önemli ölçüde düştüğü gözlenmektedir. *N. crassa* fungal biyosorbenti için maksimum biyosorpsiyon kapasitesi pH 1,0'da gözlenmiştir. Çözeltinin pH'ı 10,0'dan 1,0'e azaldığında biyosorpsiyon kapasitesi 5,0 mg/g'dan 47,54 mg/g değerine yükselmiştir.

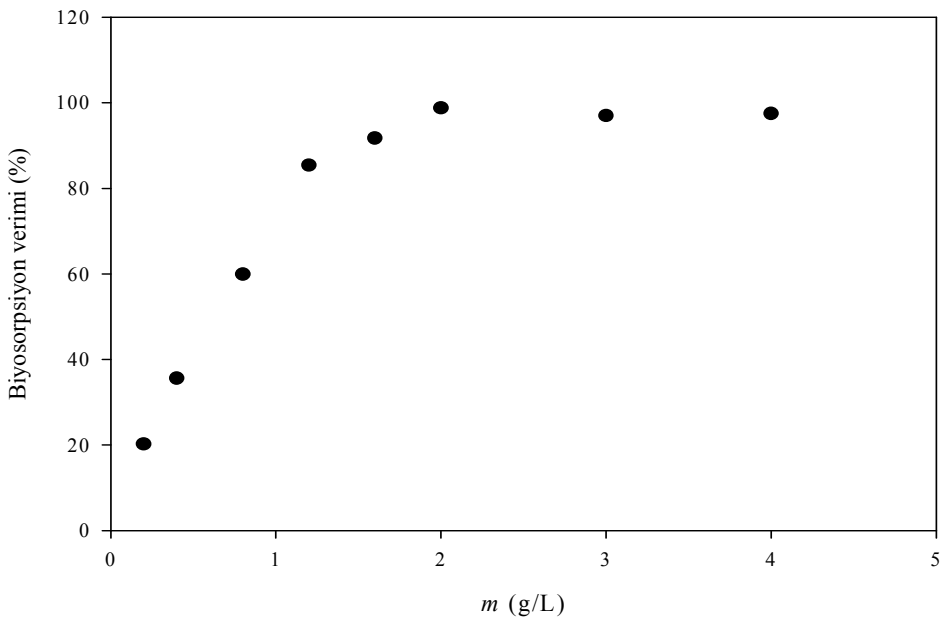


Şekil 6.26. *N. crassa* biyosorbenti ile AK-57 boyasının biyosorpsiyonuna pH etkisi

Biyosorpsiyonun pH'a bağlılığı, *N. crassa* biyokütlesinin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ile boya molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimle açıklanabilir. Ortamın pH'ı asidik değerlere doğru kaydıkça, ortamda proton konsantrasyonunun artması nedeniyle biyosorbent yüzeyinde pozitif yük yoğunluğu artmaktadır. Bu da negatif yüklü boya molekülleri ile etkileşimi artırdığından biyosorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Bazik pH değerlerinde ise biyosorbent yüzeyinde negatif yük yoğunluğu arttığı için, bu durum negatif yüklü boya moleküllerinin elektrostatik olarak itilmesine neden olmaktadır. Böylece pH 4,0'ün üzerinde biyosorpsiyon kapasitesinde bir düşüş gözlenmektedir.

6.9. Biyosorpsiyona Biyosorbent Konsantrasyonu Etkisi

Değişik biyosorbent konsantrasyonu ile gerçekleştirilen deneylerin sonuçları Şekil 6.27.'de sunulmuştur.



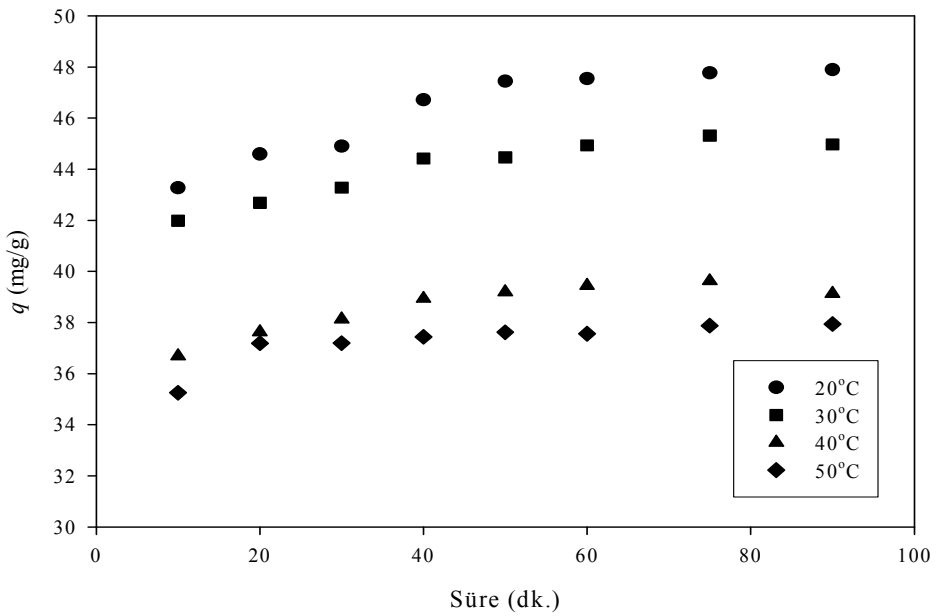
Şekil 6.27. Biyosorbent konsantrasyonunun AK-57 boyasının biyosorpsiyonuna etkisi

Biyosorbent konsantrasyonunun 0,2 g/L'den 2,0 g/L'ye artması boya biyosorpsiyon veriminin % 20,24'den % 98,78'e artmasına neden olmuştur. Biyosorbent konsantrasyonunun 4,0 g/L'ye kadar artması ise biyosorpsiyon verimi üzerinde önemli bir etki yaratmamakta ve biyosorpsiyon kapasitesi hemen hemen sabit

kalmaktadır. Bu etki, boya molekülleri ve biyosorbentteki bağlanma merkezleri arasındaki elektrostatik etkileşimin belli bir biyosorbent konsantrasyonuna kadar artması ve daha sonra biyosorbentin boya molekülleri ile doygunluğa ulaşmasıyla açıklanabilmektedir (Gong et al., 2005).

6.10. Biyosorpsiyona Çalkalama Süresinin Etkisi

Şekil 6.28'de değişik sıcaklıklarda çalkalama süresinin biyosorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi görülmektedir. Şekilden görülecegi gibi biyosorpsiyon her dört sıcaklıkta da yaklaşık 40 dakikada dengeye ulaşmakta ve bu süreden sonra kapasitede önemli bir değişim olmamaktadır. Bu durum sabit miktardaki biyosorbent yüzeyinin bağlanma bölgelerinin tamamının boya molekülleri tarafından doldurulması için gerekli süre olarak açıklanabilir. Diğer bir ifadeyle biyosorpsiyon dengesi kısa bir sürede kurulmaktadır. Bu da *N. crassa* biyokütlesinin AK-57 boyasının biyosorpsiyonla sulu çözeltilerden uzaklaştırılması için kullanımına avantaj sağlamaktadır.



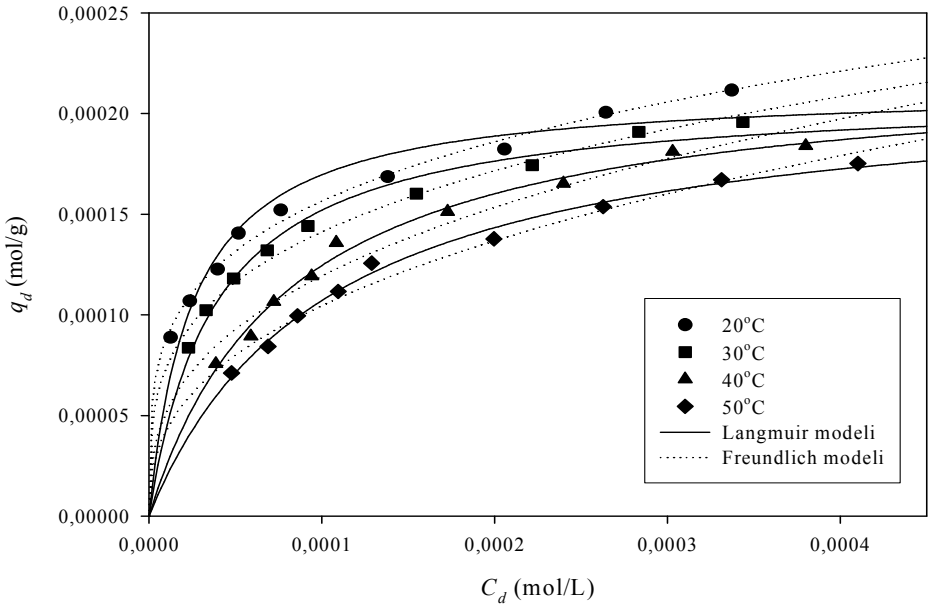
Şekil 6.28. AK-57 boyasının *N. crassa* ile biyosorpsiyonuna çalkalama süresinin etkisi

6.11. Biyosorpsiyona Sıcaklığın Etkisi

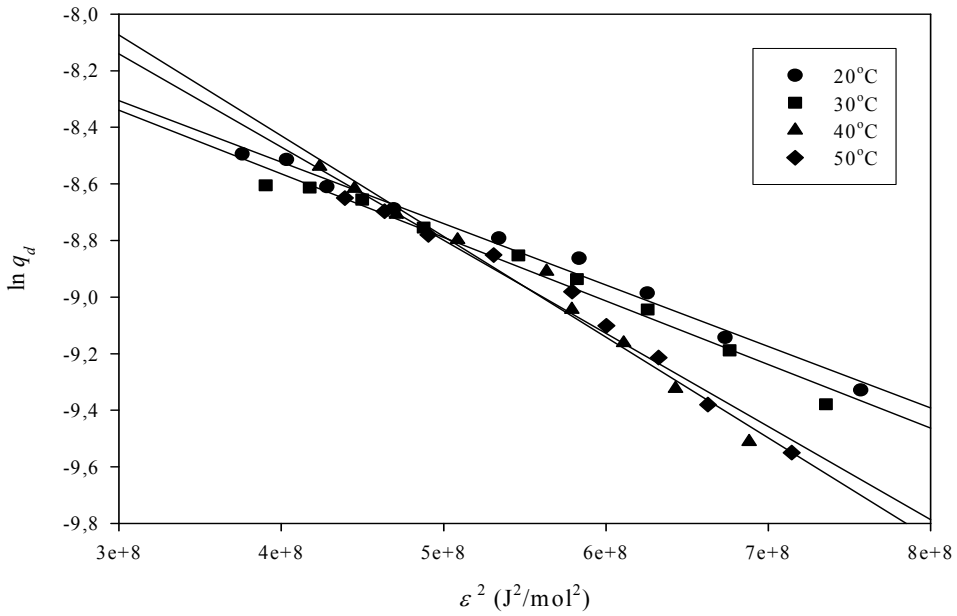
N. crassa biyosorbenti ile AK-57 biyosorpsiyonunun düşük sıcaklıklarda daha verimli olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.28). Sıcaklığın 20°C'den 50°C'ye artması biyosorpsiyon denge süresi olan 40 dakika sonunda biyosorpsiyon kapasitesinin 48,66 mg/g'dan 38,28 mg/g'a düşmesine neden olmaktadır. Dengeye ulaşılmadan önceki sürelerde yine sıcaklıktaki artış biyosorpsiyon kapasitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bu, kinetik olarak kontrol edilebilen bir süreci temsil etmektedir. Dengeye ulaşıldıktan sonraki sürelerde ise aynı şekilde biyosorpsiyon kapasitesinin artan sıcaklıkla beraber azaldığı gözlenmektedir. Bu durum, *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonunun ekzotermik doğaya sahip olduğunu göstermektedir.

6.12. Biyosorpsiyon İzotermleri

Denge biyosorpsiyon izotermleri, biyosorpsiyon mekanizmasının anlaşılmasında kullanılan en önemli parmetrelerdendir. Çalışmamızda, biyosorpsiyon verileri Langmuir, Freundlich ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm modelleri ile değerlendirilmiştir. AK-57'nin *N. crassa* ile biyosorpsiyonuna ait değişik sıcaklıklardaki Langmuir ve Freundlich izotermleri Şekil 6.29'da, Dubinin-Radushkevich izotermleri ise Şekil 6.30'da görülmektedir. Ayrıca AK-57 biyosorpsiyonuna ait izoterm verileri Çizelge 6.3'de verilmiştir.



Şekil 6.29. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich izoterm grafikleri



Şekil 6.30. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm grafiği

Çizelge 6.3'de verilen izotermlerin r^2 değerleri karşılaştırıldığında *N.crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonunun her üç izoterm modeline de uyduğu görülmektedir. Buna gore biyosorbent yüzeyinde homojen ve heterojen biyosorpsiyon bölgelerinin birlikte bulunduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca farklı sıcaklıklardaki q_{mak} değerleri göz önüne alındığında sıcaklığın biyosorpsiyon kapasitesini çok fazla etkilemediği söylenebilir. Biyosorpsiyon serbest enerjisinin *(E)* çalışılan tüm sıcaklıklarda 8 kJ/mol değerinden büyük olması, biyosorpsiyonda kimyasal sorpsiyonun etkili olduğunu göstermektedir. Langmuir izotermi için hesaplanan 'R_L' değerlerinin 0,035–0,118 aralığında olması, biyosorpsiyonun tüm sıcaklıklarda kendiliğinden olduğunu ifade etmektedir. Freundlich sabiti *n* 2,579 ve 4,016 arasında değişmektedir. Bu da biyosorpsiyonun doğrusallıktan saptığının bir göstergesidir.

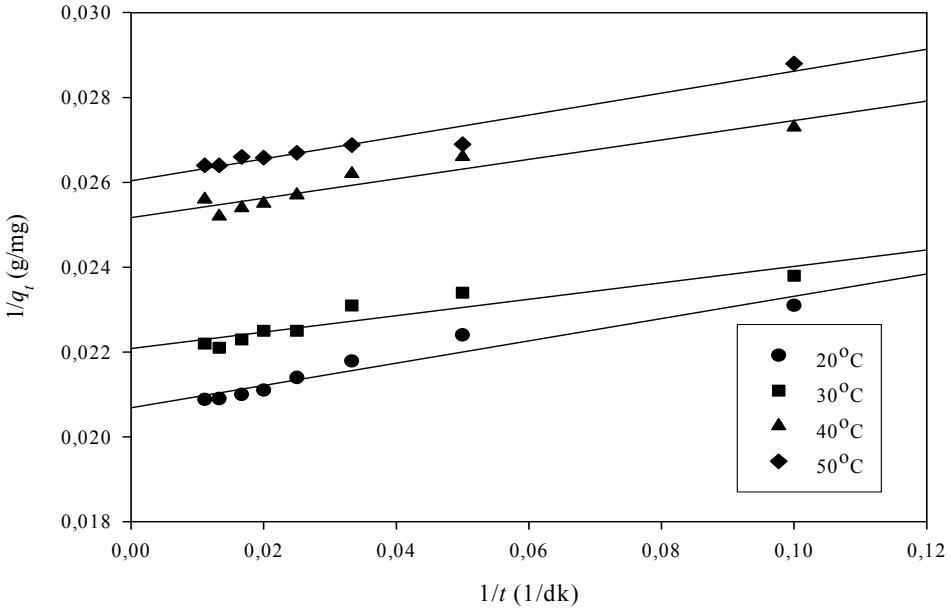
Çizelge 6.3. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için Langmuir, Freundlich ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm verileri

İzoterm modeli	**Sıcaklık (°C)**			
	20	**30**	**40**	**50**
Langmuir				
q_{mak} (mol/g)	$2{,}16 \times 10^{-4}$	$2{,}10 \times 10^{-4}$	$2{,}24 \times 10^{-4}$	$2{,}16 \times 10^{-4}$
K_L (L/mol)	$3{,}66 \times 10^{4}$	$2{,}61 \times 10^{4}$	$1{,}24 \times 10^{4}$	$9{,}80 \times 10^{3}$
r_L^2	0,938	0,980	0,990	0,993
R_L	0,035	0,048	0,096	0,118
Freundlich				
n	4,016	3,560	2,758	2,579
K_F (L/g)	$1{,}55 \times 10^{-3}$	$1{,}88 \times 10^{-3}$	$3{,}37 \times 10^{-3}$	$3{,}72 \times 10^{-3}$
r_F^2	0,990	0,985	0,962	0,977
Dubinin-Radushkevich (D-R)				
q_{mak} (mol/g)	$4{,}96 \times 10^{-4}$	$5{,}54 \times 10^{-4}$	$7{,}73 \times 10^{-4}$	$7{,}64 \times 10^{-4}$
β (mol^2/kJ^2)	$2{,}26 \times 10^{-3}$	$2{,}52 \times 10^{-3}$	$3{,}26 \times 10^{-3}$	$3{,}47 \times 10^{-3}$
r_{D-R}^2	0,988	0,980	0,980	0,978
E (kJ/mol)	14,87	14,09	12,39	12,00

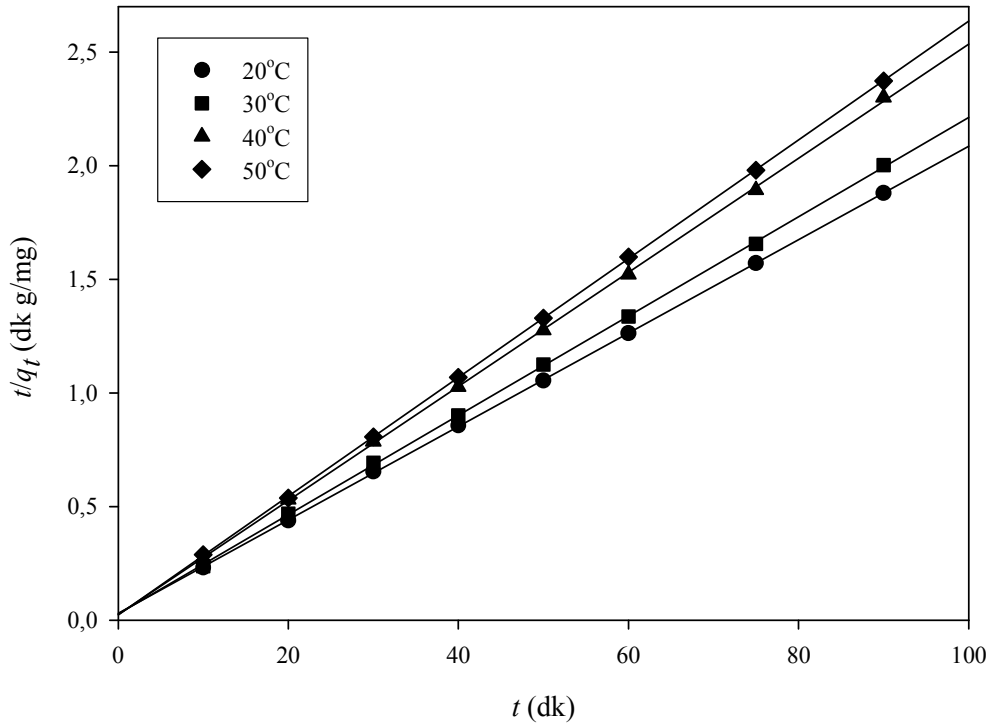
6.13. Biyosorpsiyon Kinetiği

AK-57 boyasının N. crassa ile biyosorpsiyonu için birinci dereceden ve yalancı-ikinci dereceden kinetik modellerine ait grafikler sırasıyla Şekil 6.31 ve 6.32'de verilmiştir. Ayrıca elde edilen kinetik veriler Çizelge 6.4'de görülmektedir. Her iki

modelin korelasyon sabitleri (r^2) karşılaştırıldığında biyosorpsiyonun daha çok yalancı-ikinci dereceden kinetik modele uyum sağladığı görülmektedir. Ayrıca sıcaklığın 20°C'den 50°C'ye artmasıyla hız sabiti değerinin 1,42x10^{-2} g/mg.dk'dan 2,98x10^{-2} g/mg.dk'ya yükselmesi nedeniyle biyosorpsiyon prosesinin yüksek sıcaklıkta daha hızlı gerçekleştiği söylenebilir. q_{mak} değerlerinin sıcaklıkla birlikte yükselmesi ise biyosorpsiyonun ekzotermik olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 6.31. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için birinci dereceden kinetik grafiği



Şekil 6.32. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için yalancı-ikinci dereceden kinetik grafiği

Çizelge 6.4. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için kinetik veriler

T (°C)	k_1 (1/dk)	q_1 (mg/g)	r_1^2	k_2 (g/mg.dk)	q_2 (mg/g)	r_2^2
20	1,274	48,36	0,931	$1{,}42 \times 10^{-2}$	48,66	0,999
30	0,878	45,29	0,855	$1{,}71 \times 10^{-2}$	45,77	0,999
40	0,912	39,75	0,908	$2{,}58 \times 10^{-2}$	39,84	0,999
50	0,992	38,40	0,945	$2{,}98 \times 10^{-2}$	38,29	0,999

6.14. Biyosorpsiyonun Termodinamik Parametreleri

$\ln K_L$'ye karşı $1/T$ değerlerinin grafiğe geçirilmesinden elde edilen doğrunun eğimi ve kesim noktasından yararlanılarak biyosorpsiyon için termodinamik veriler (ΔH^o, ΔS^o ve ΔG^o) elde edilmiş ve Çizelge 6.5'de sunulmuştur. Çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde ΔG^o' nin negatif değerlerde olması biyosorpsiyon sürecinin kendiliğinden olduğunu göstermektedir. Ayrıca negatif ΔH^o değerlerinin gözlenmesi biyosorpsiyonun

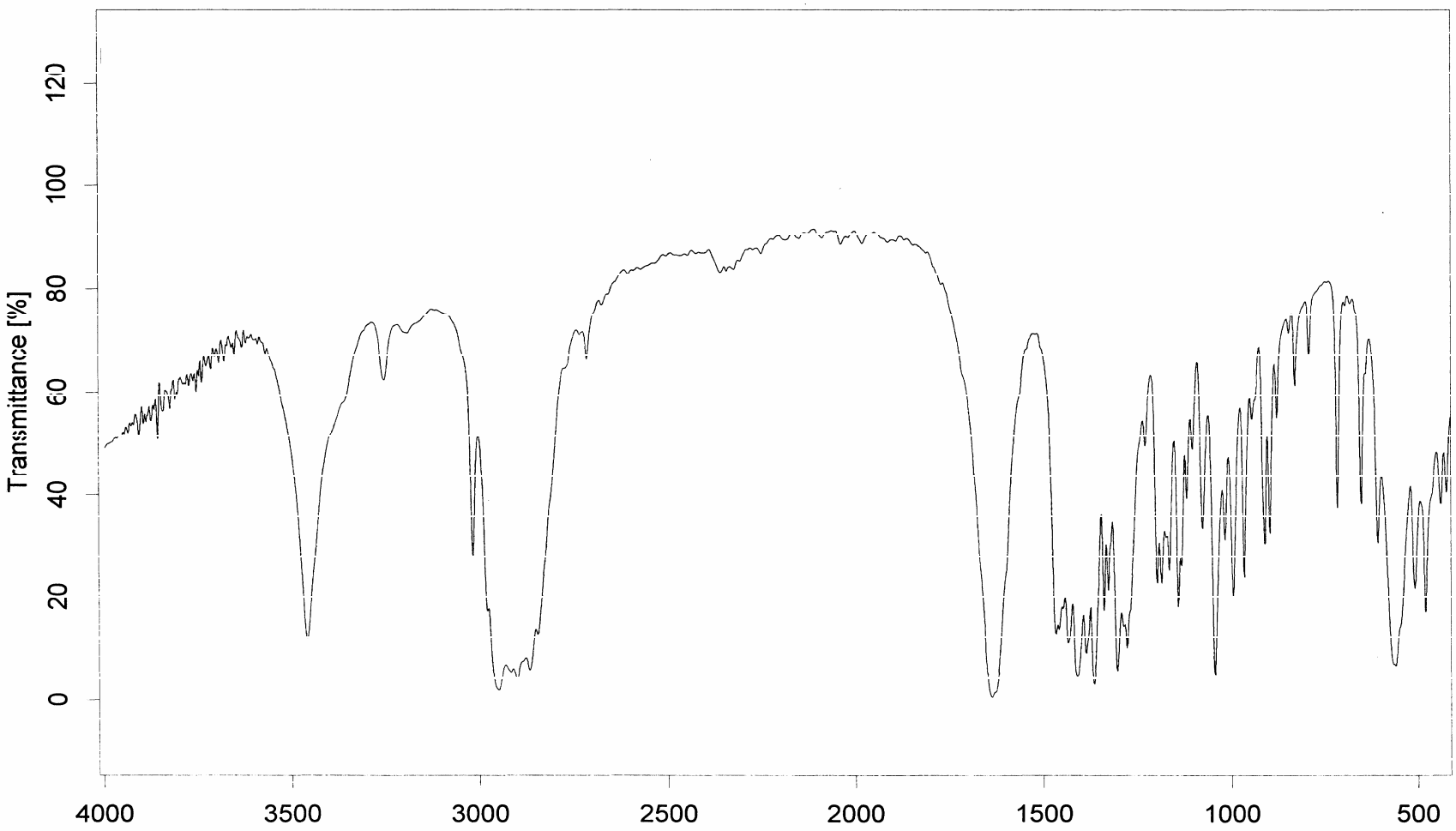
ekzotermik doğaya sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen bu sonuç kinetik verilerle de uyumludur. Negatif ΔS^o değerleri biyosorpsiyon sırasında katı/çözelti ara yüzeyinde düzensizliğin arttığını göstermiştir.

Çizelge 6.5. *N. crassa* ile AK-57 biyosorpsiyonu için termodinamik veriler

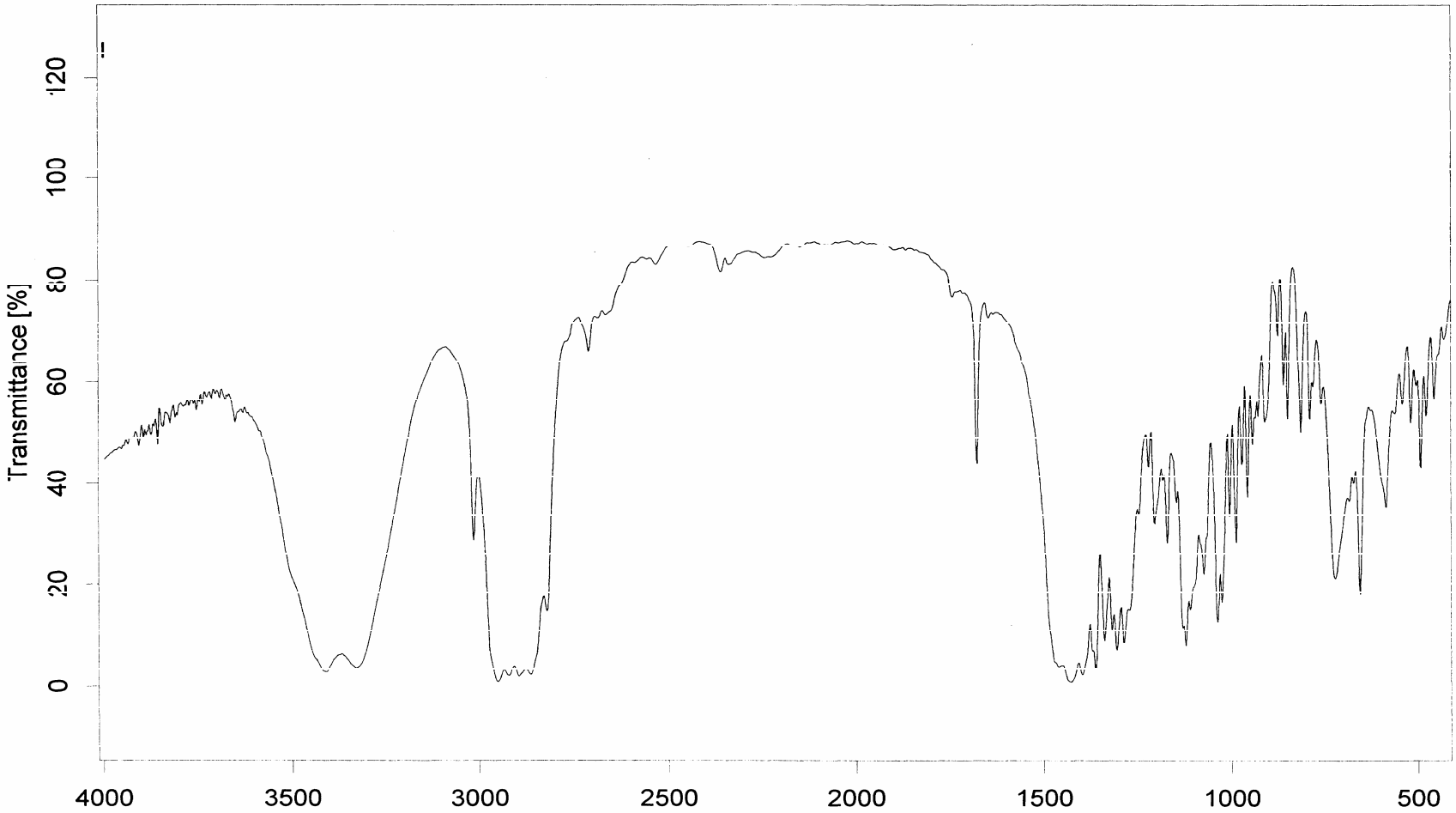
t (°C)	ΔG^o (kJ/mol)	ΔH^o (kJ/mol)	ΔS^o (J/K.mol)
20	–25,61	–37,06	–38,73
30	–25,63		
40	–24,55		
50	–24,69		

Sonuç olarak, çalışmamızda antifungal etkinlik açısından incelenen bileşiklerden demetoksiviridin ve 1α-hidroksidemetoksiviridin'in, amfoterisin B ile karşılaştırıldığında, *Candida albicans, Aspergillus niger, A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium graminarium*, *F. solani ve Geotrichum candidum* fungal kültürlerine karşı iyi bir etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *N. crassa* fungal kültürünün biyoteknolojik kullanım potansiyeli biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özellikleri açısından incelenmiş ve biyotransformasyon çalışmaları sonucunda seskiterpen yapısına sahip diizoforon ve sedrol bileşiklerinin stereospesifik mono hidroksillenmiş türevleri olan 8β-hidroksidiizoforon ve 12β-hidroksisedrol metabolitleri elde edilmiştir. Biyosorpsiyon çalışmaları sonucunda ise, *N. crassa* fungal biyokütlesinin bir tekstil boyası olan Asit Kırmızısı (AK- 57) nin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında alternatif bir biyosorbent olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

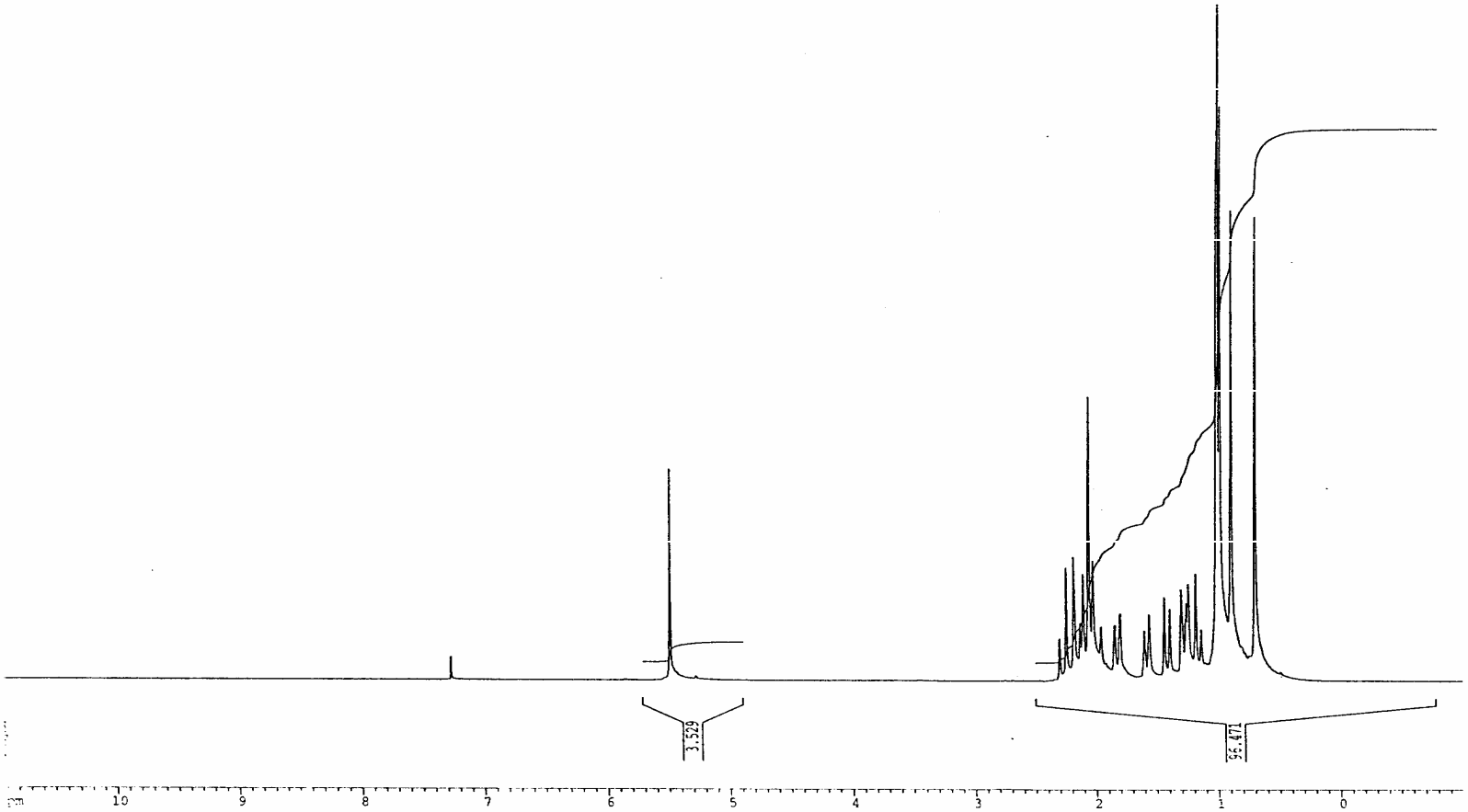
SPEKTRUMLAR



Spektrum 1: Diizoforon'un IR spektrumu

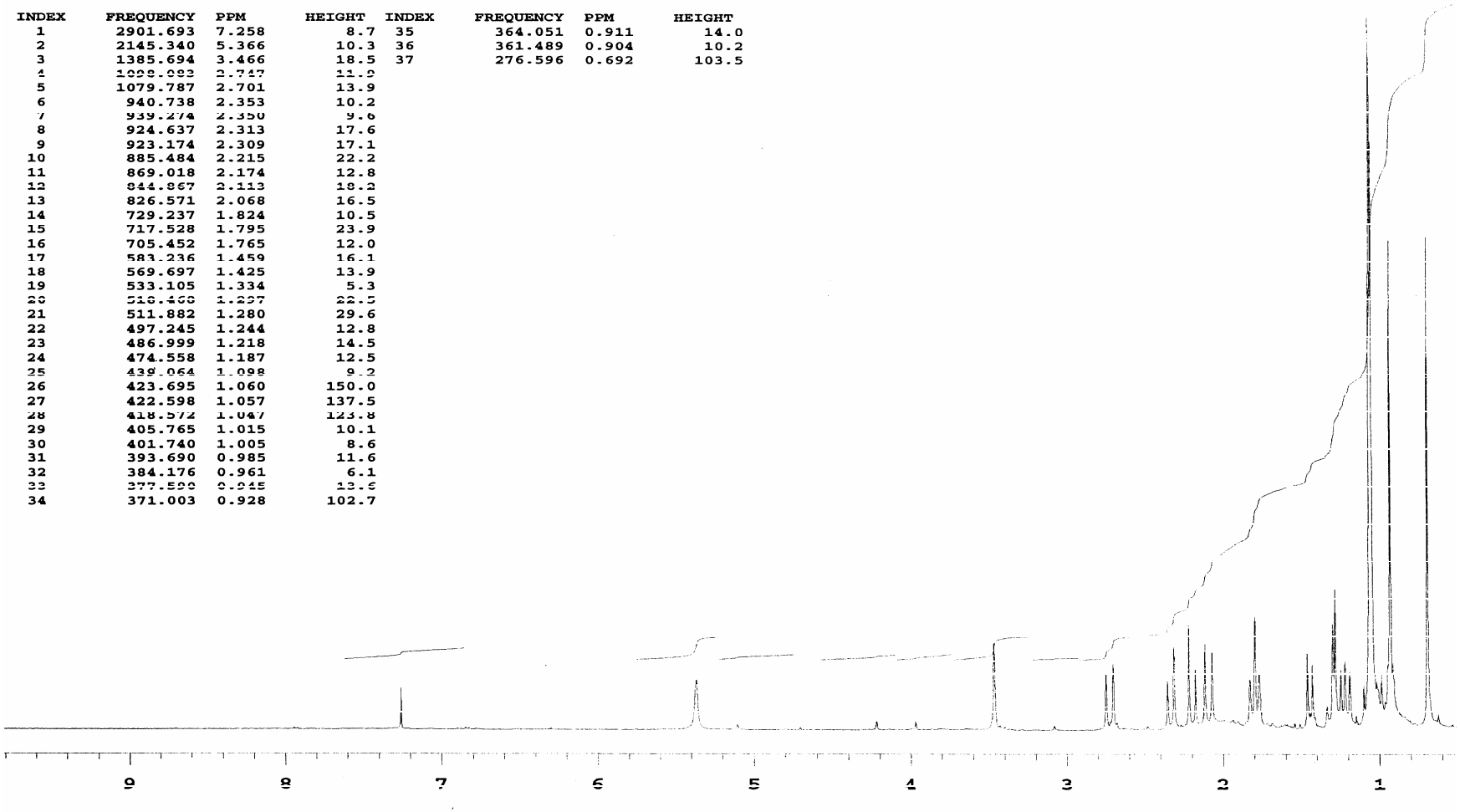


Spektrum 2: 8β-Hidroksidiizoforon'un IR spektrumu

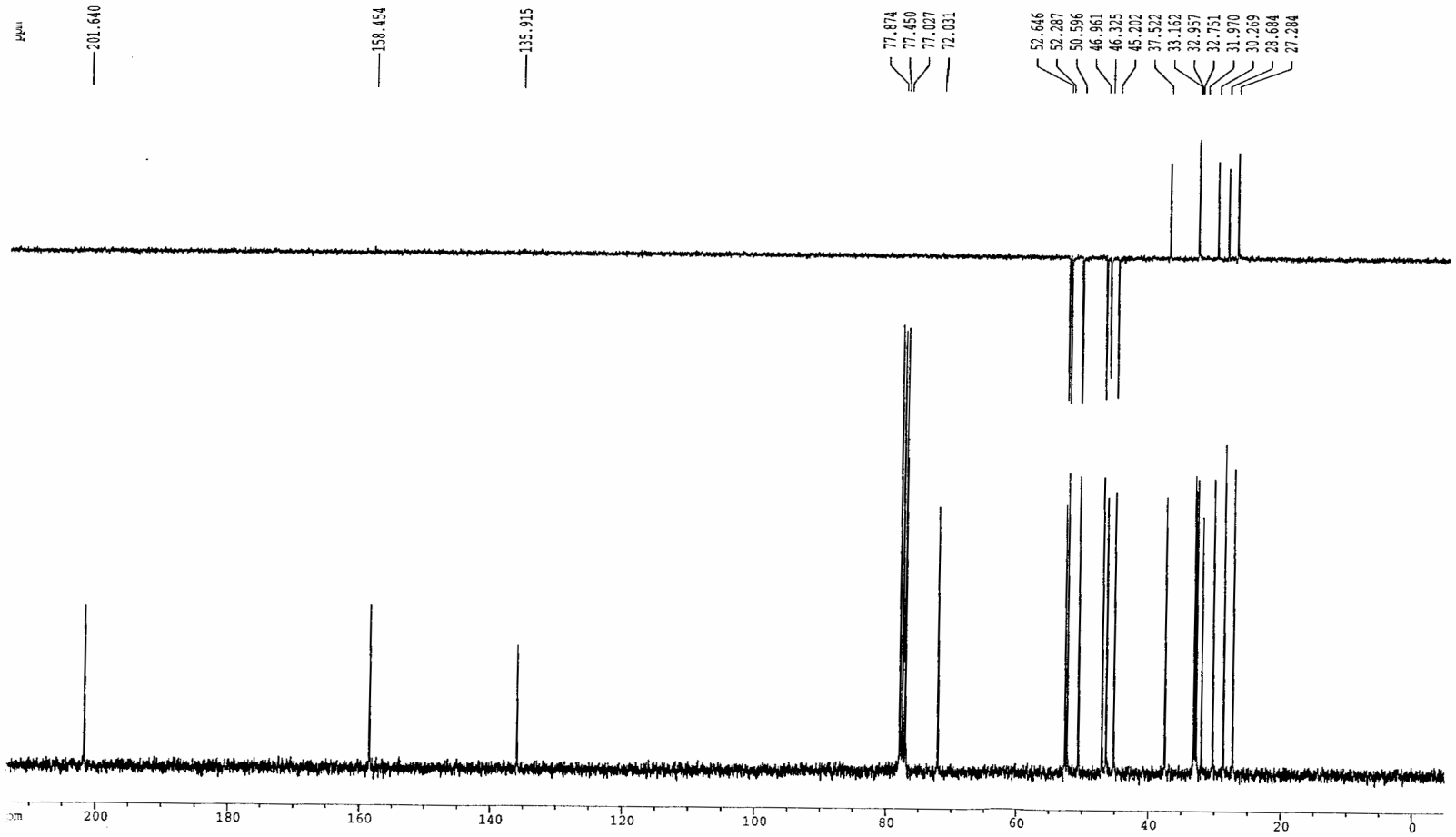


Spektrum 3: Diizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu

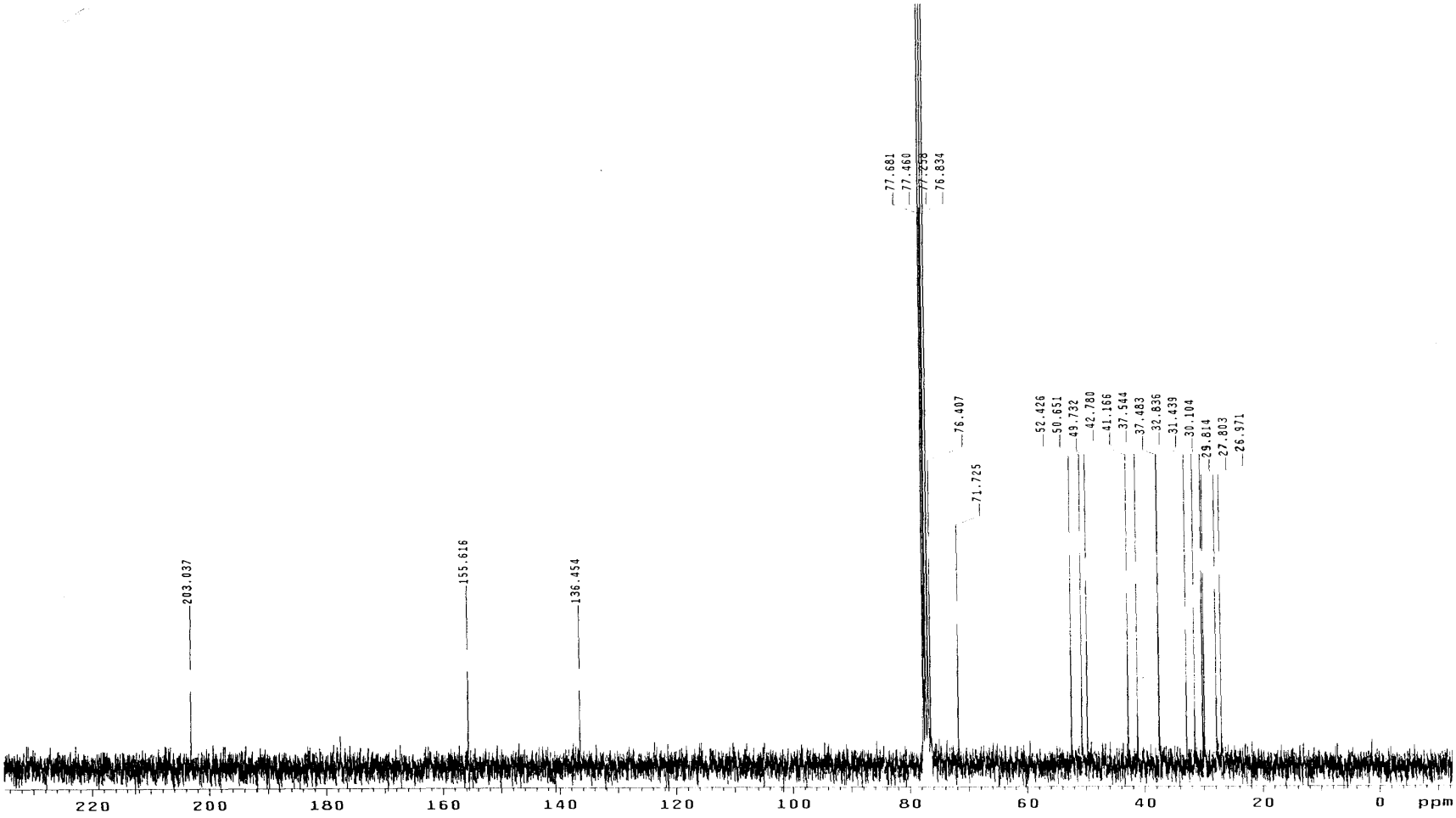
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2901.693	7.258	8.7	35	364.051	0.911	14.0
2	2145.340	5.366	10.3	36	361.489	0.904	10.2
3	1385.694	3.466	18.5	37	276.596	0.692	103.5
4	1098.083	2.747	11.9				
5	1079.787	2.701	13.9				
6	940.738	2.353	10.2				
7	939.274	2.350	9.6				
8	924.637	2.313	17.6				
9	923.174	2.309	17.1				
10	885.484	2.215	22.2				
11	869.018	2.174	12.8				
12	844.867	2.113	18.2				
13	826.571	2.068	16.5				
14	729.237	1.824	10.5				
15	717.528	1.795	23.9				
16	705.452	1.765	12.0				
17	583.236	1.459	16.1				
18	569.697	1.425	13.9				
19	533.105	1.334	5.3				
20	518.468	1.297	22.5				
21	511.882	1.280	29.6				
22	497.245	1.244	12.8				
23	486.999	1.218	14.5				
24	474.558	1.187	12.5				
25	439.064	1.098	9.2				
26	423.695	1.060	150.0				
27	422.598	1.057	137.5				
28	418.572	1.047	123.8				
29	405.765	1.015	10.1				
30	401.740	1.005	8.6				
31	393.690	0.985	11.6				
32	384.176	0.961	6.1				
33	377.500	0.945	13.6				
34	371.003	0.928	102.7				



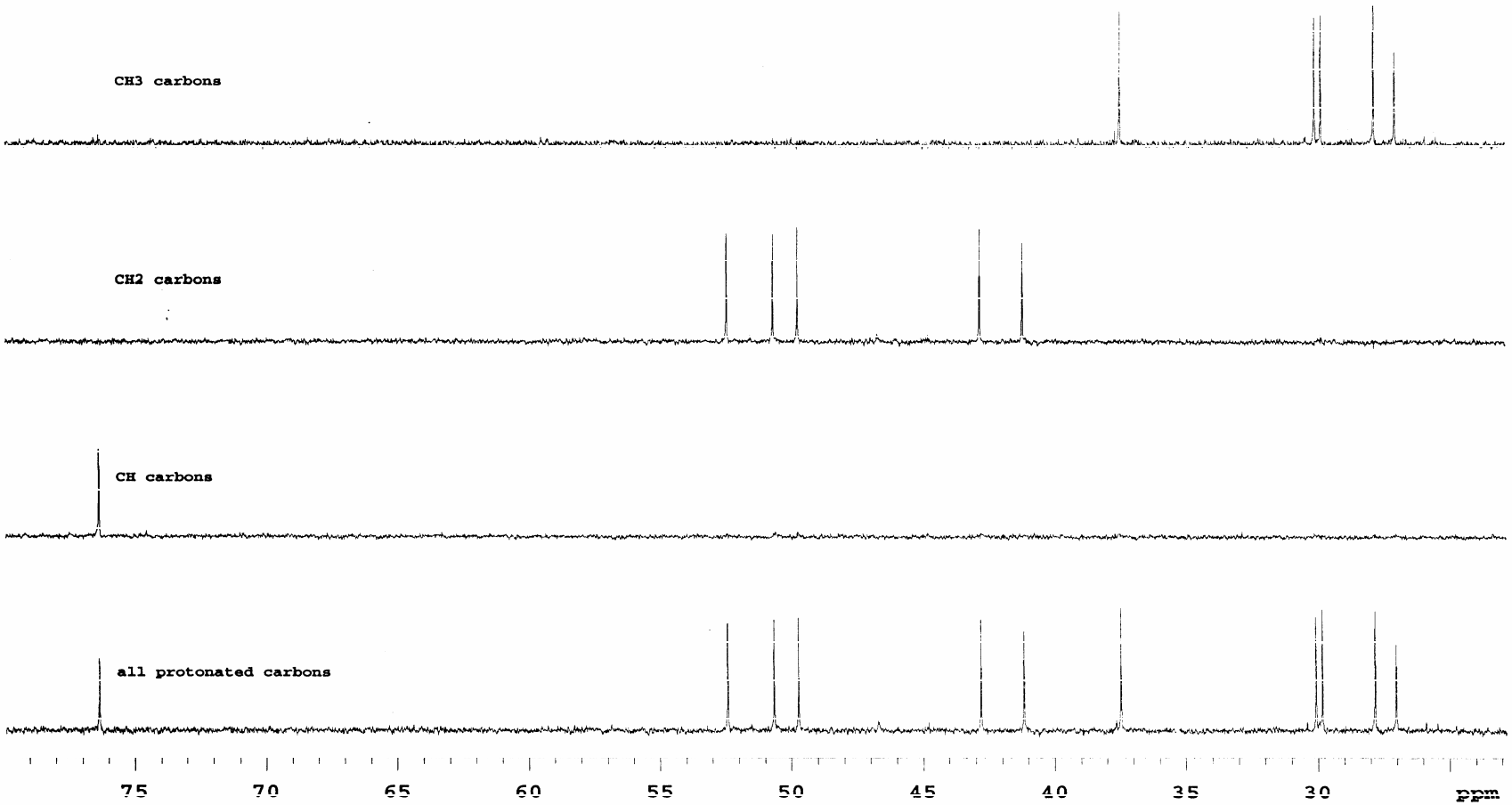
Spektrum 4: 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{1}H NMR spektrumu



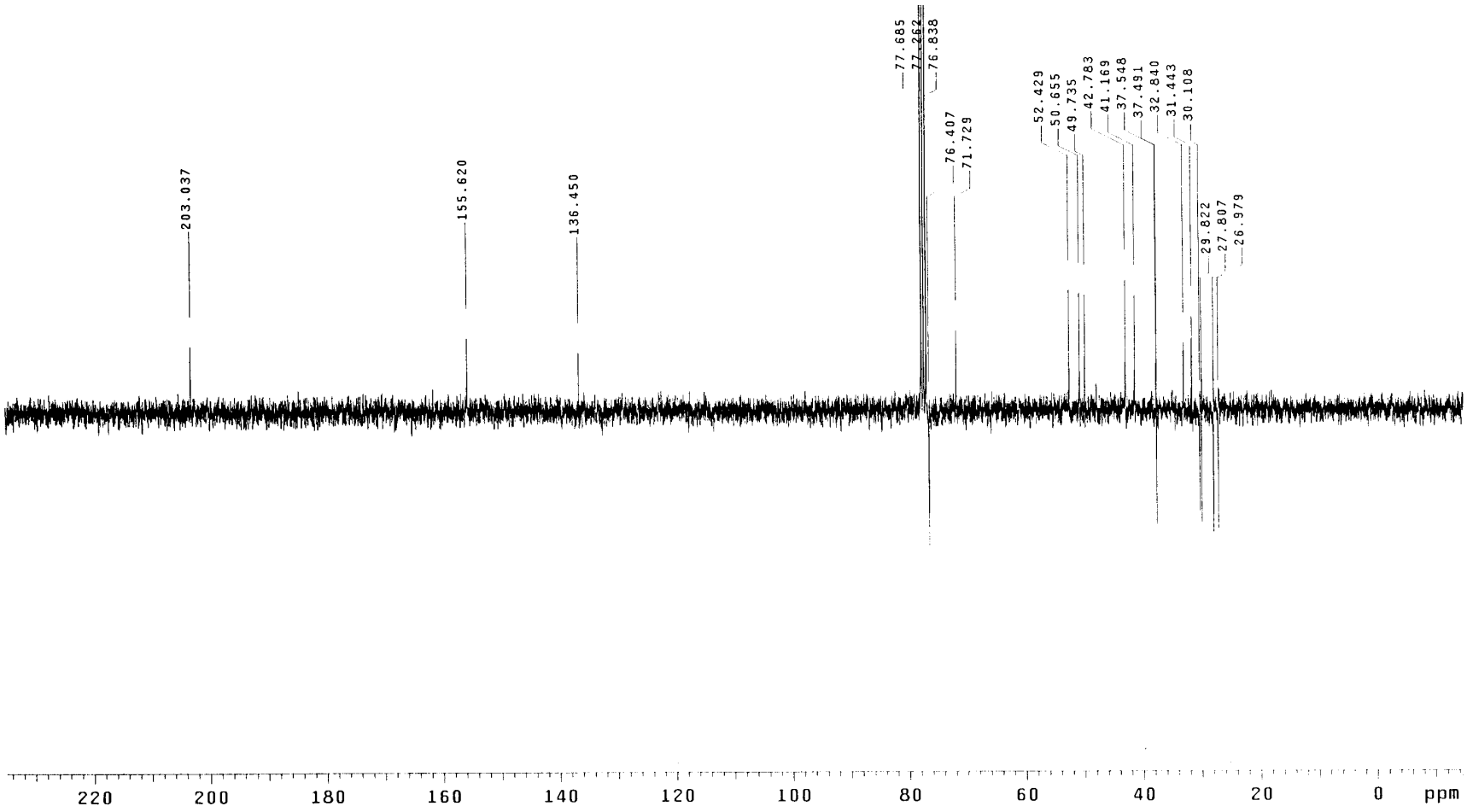
Spektrum 5: Diizoforon'un DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları



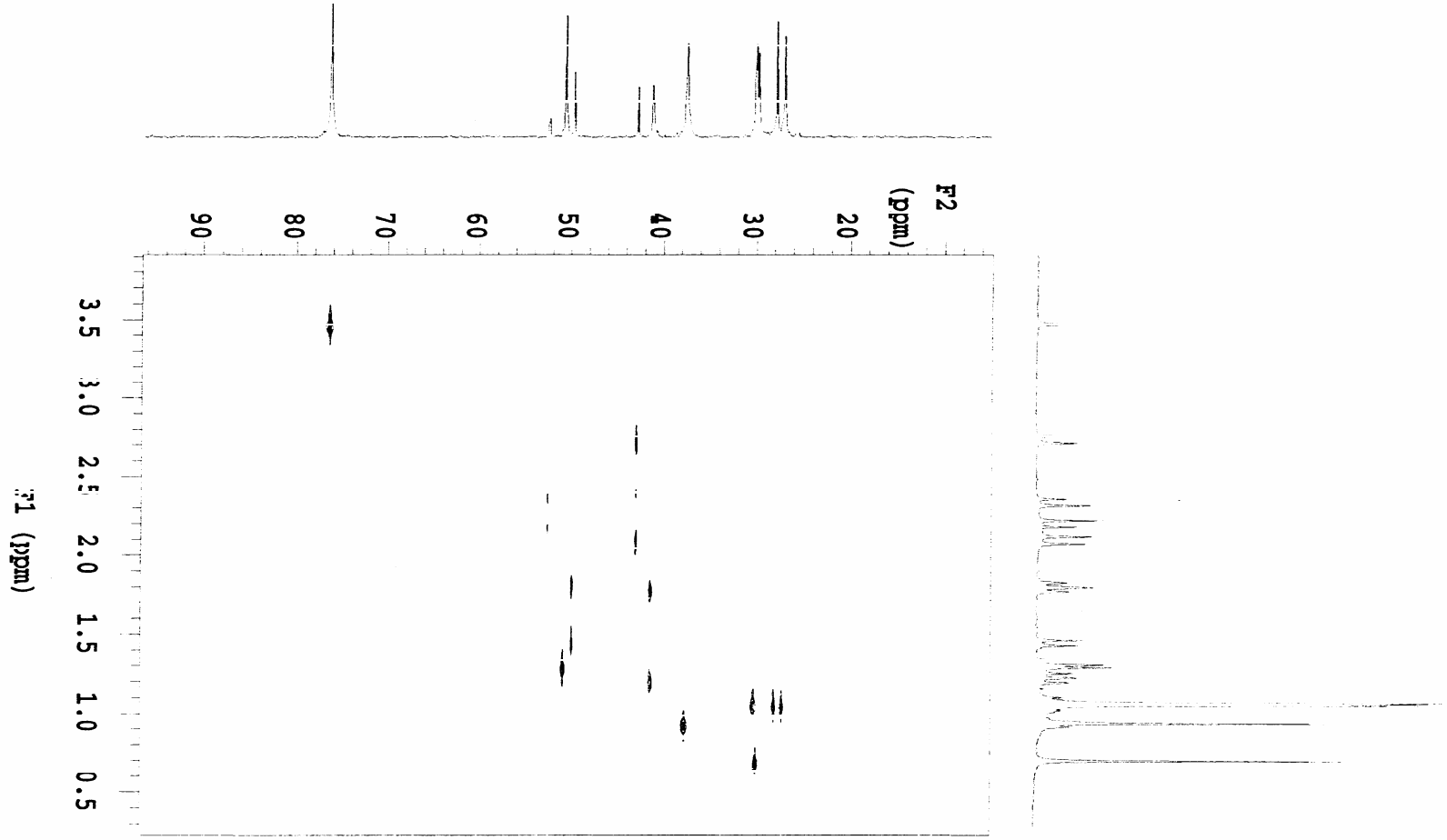
Spektrum 6: 8β-Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-1



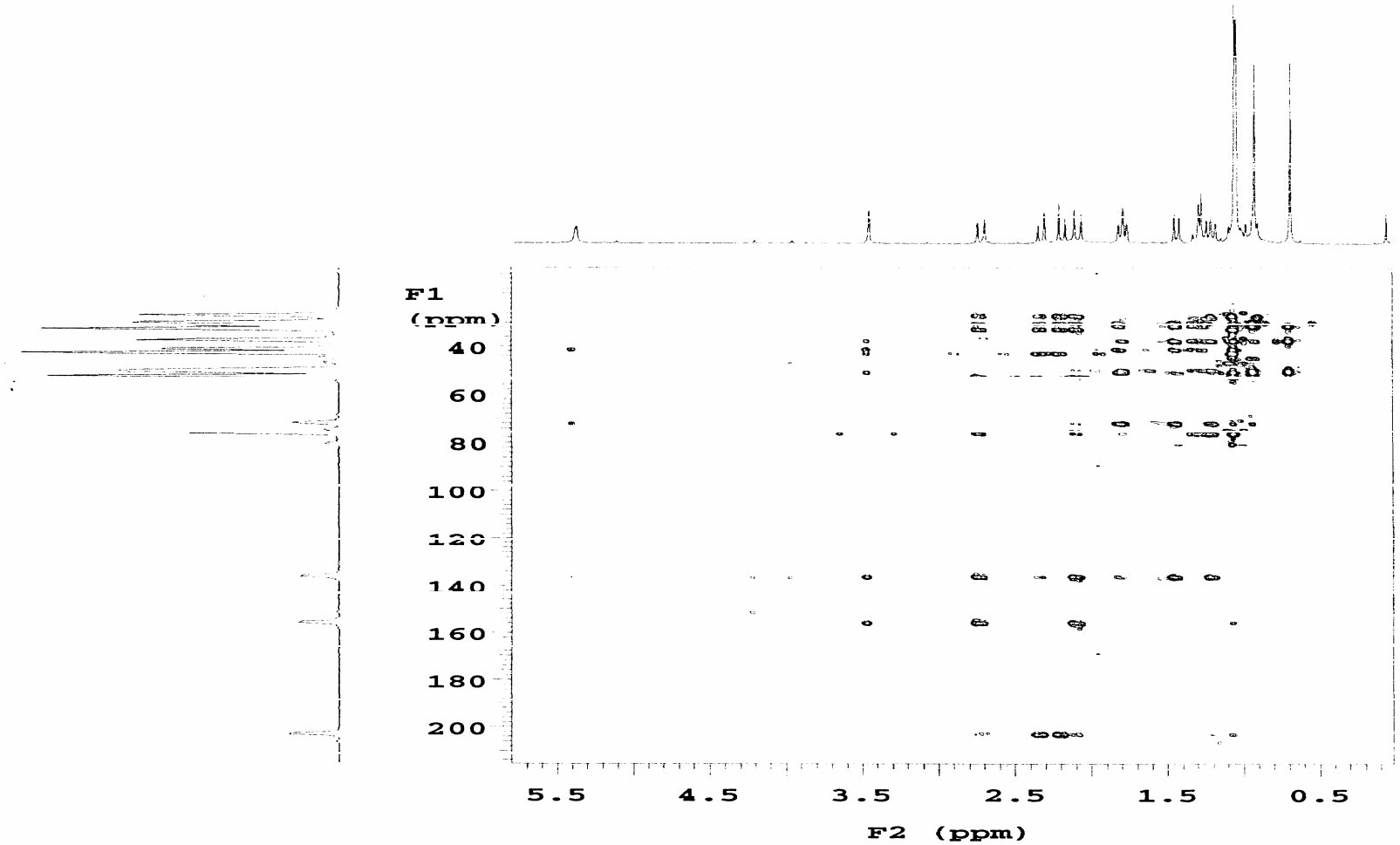
Spektrum 7: 8β -Hidroksidiizoforon'un ^{13}C NMR spektrumu-2



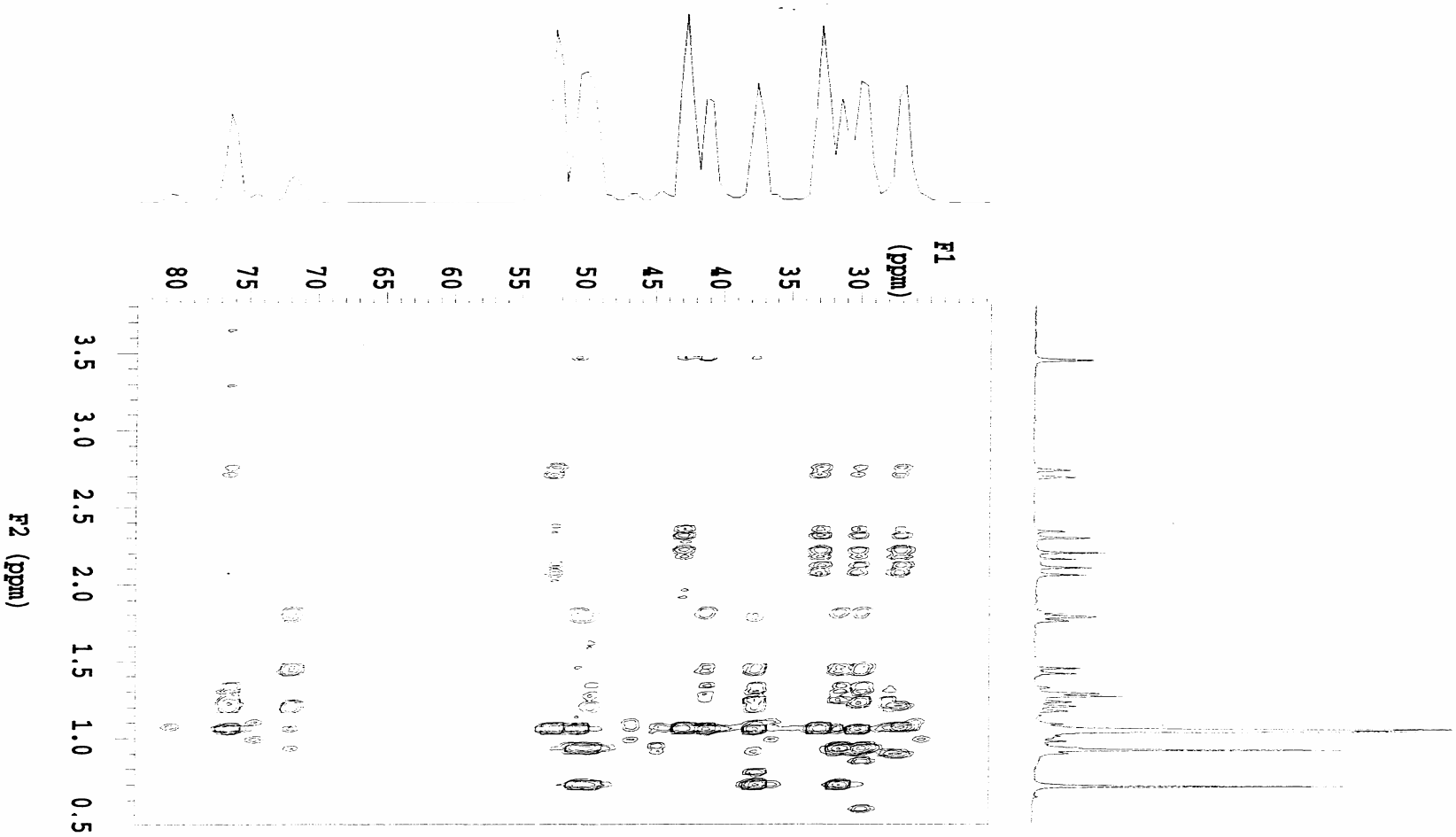
Spektrum 8: 8β-Hidroksidiizoforon'un APT spektrumu



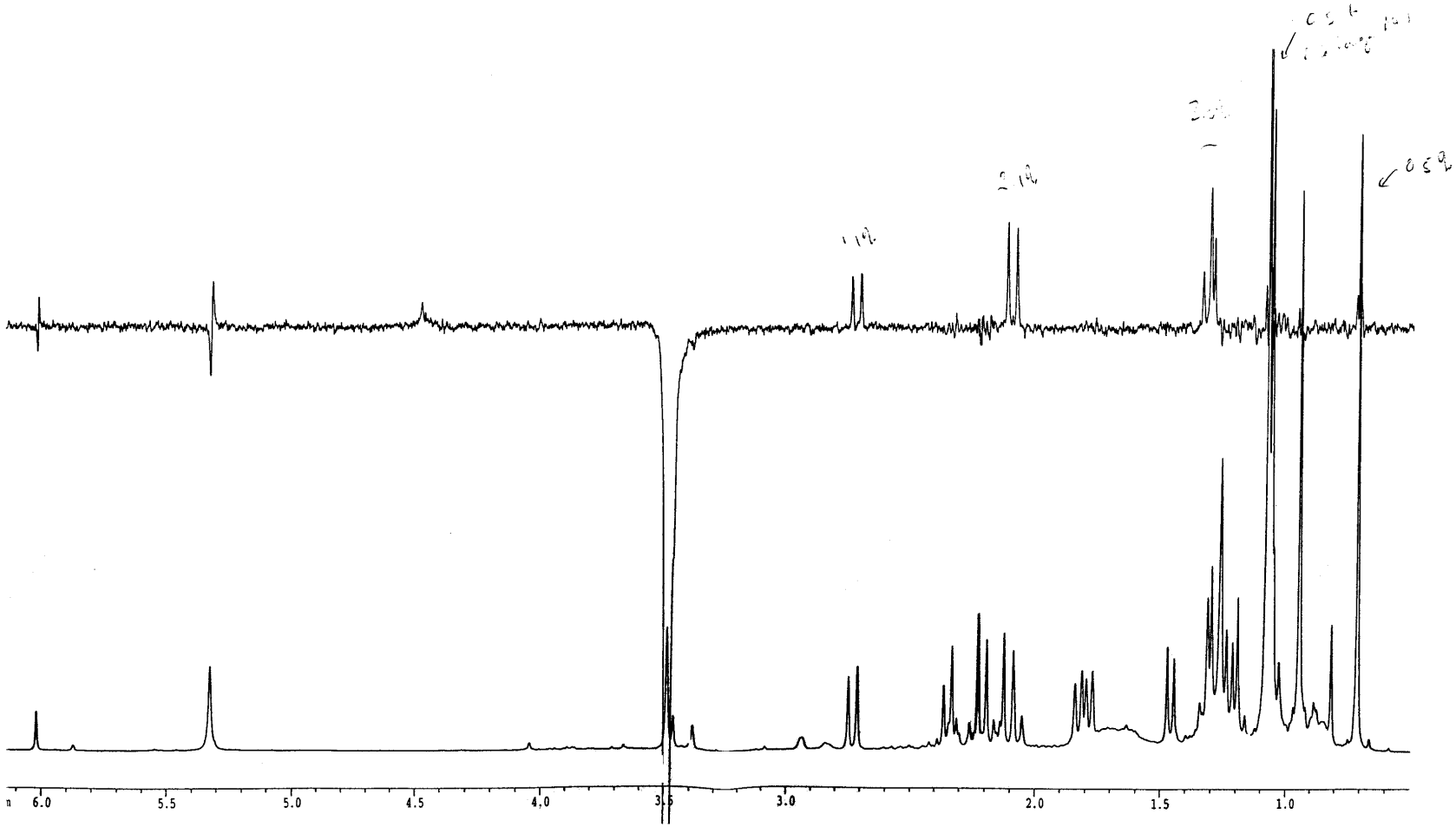
Spektrum 9: 8β-Hidroksidiizoforon'un HETCORE spektrumu



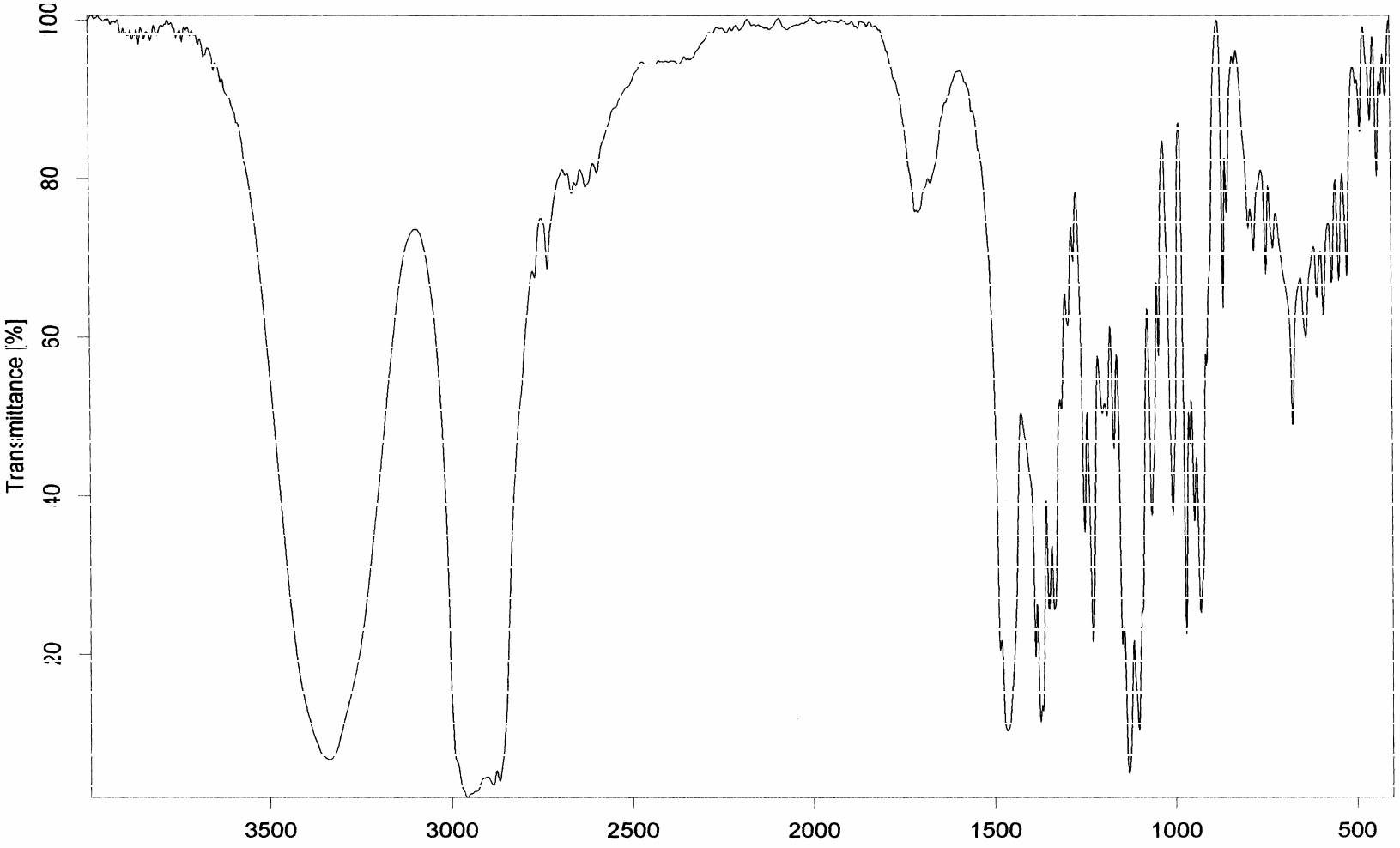
Spektrum 10: 8β-Hidroksidiizoforon'un HMBC spektrumu



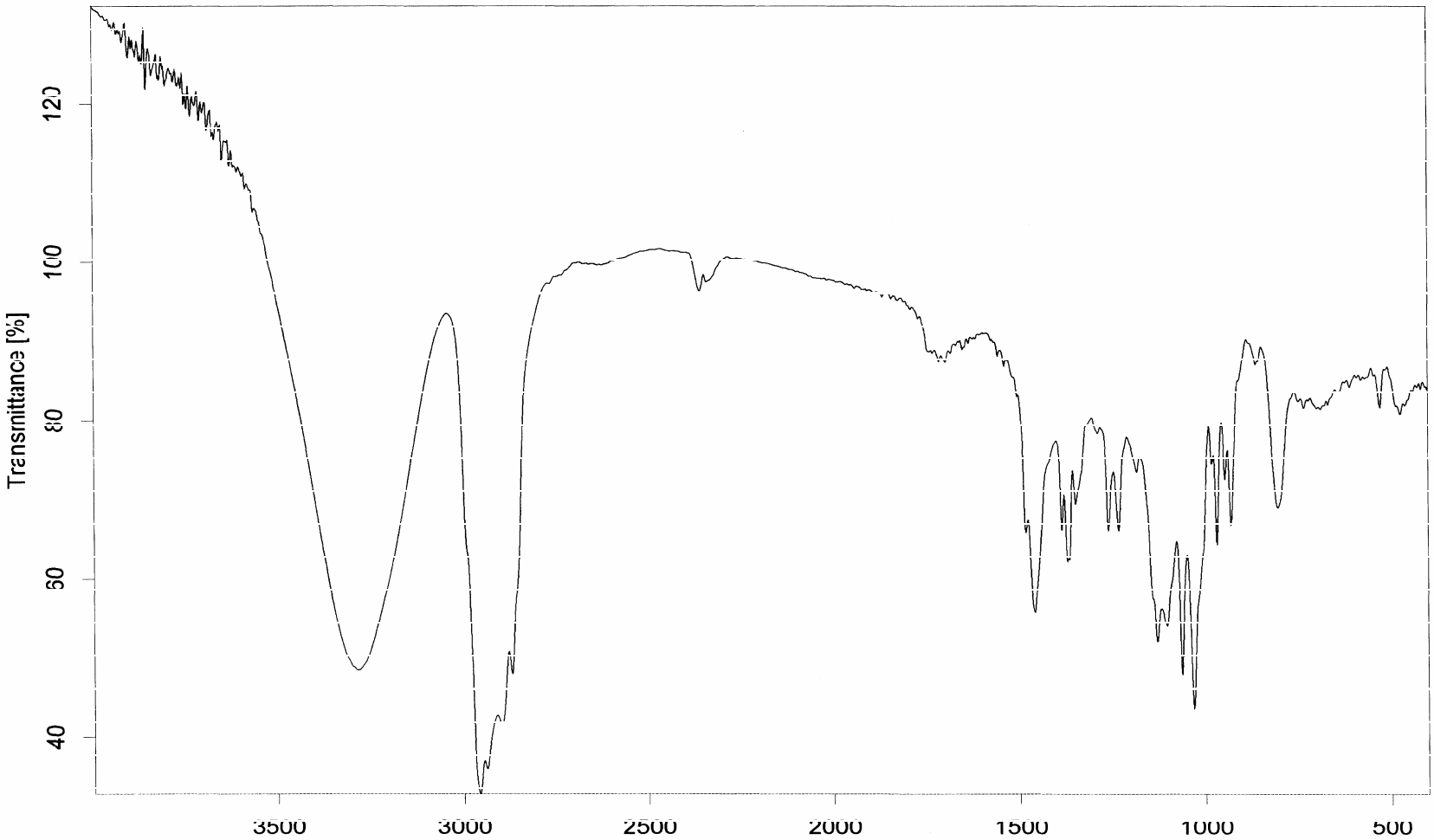
Spektrum 11: 8β-Hidroksidiizoforon'un genişletilmiş HMBC spektrumu



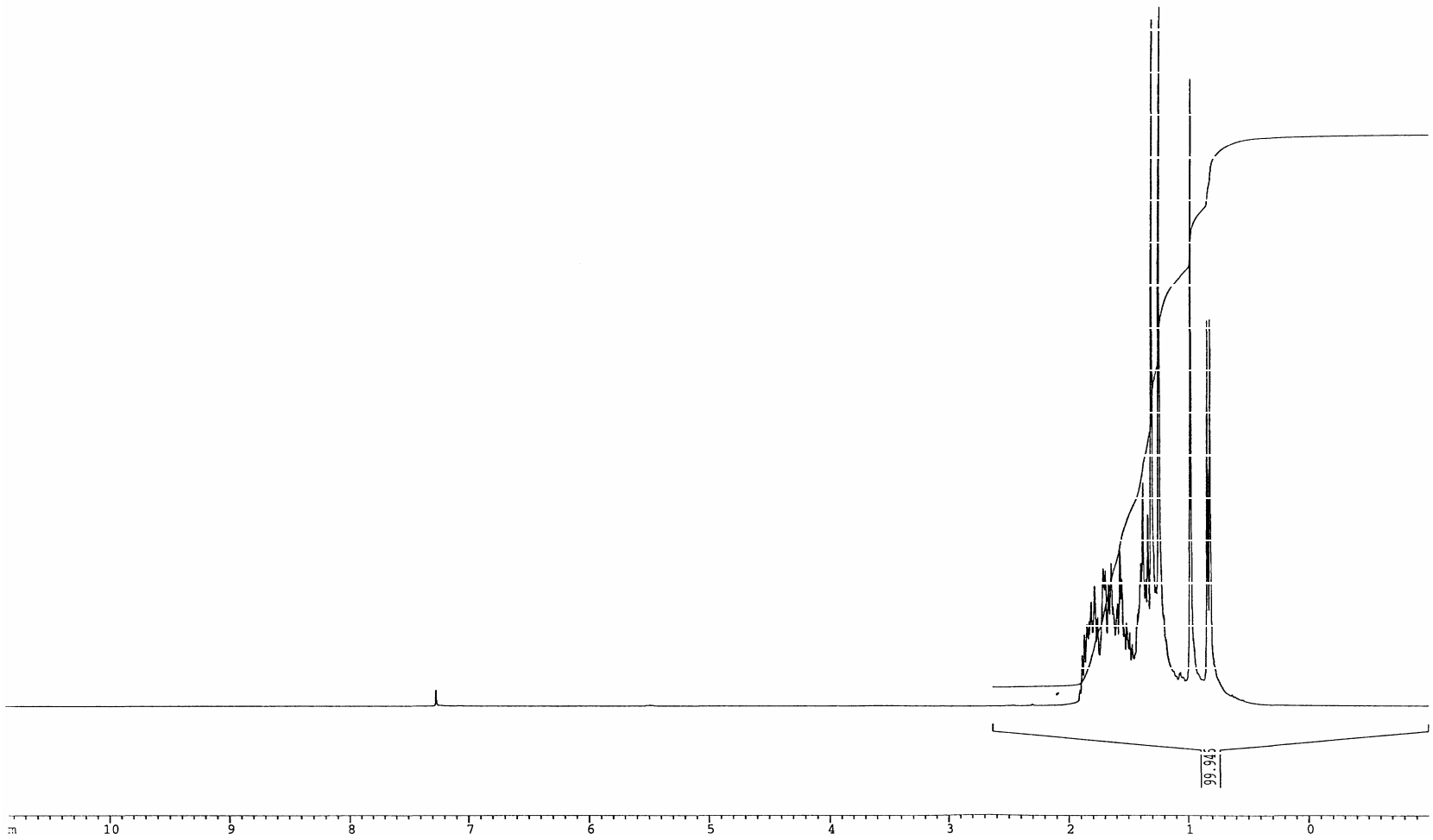
Spektrum 12: 8β-Hidroksidiizoforon'un nOe spektrumu



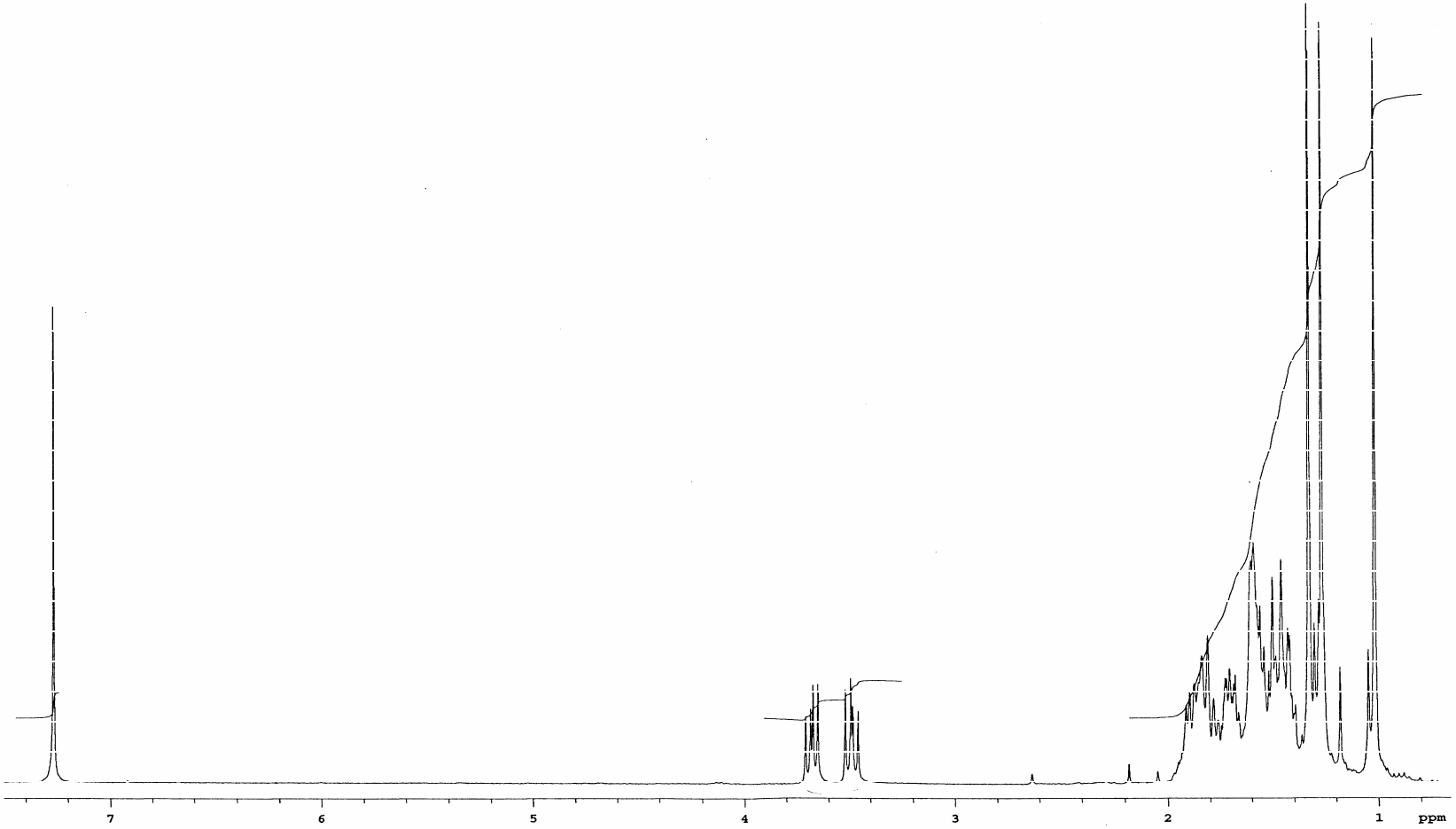
Spektrum 13: Sedrol'ün IR spektrumu



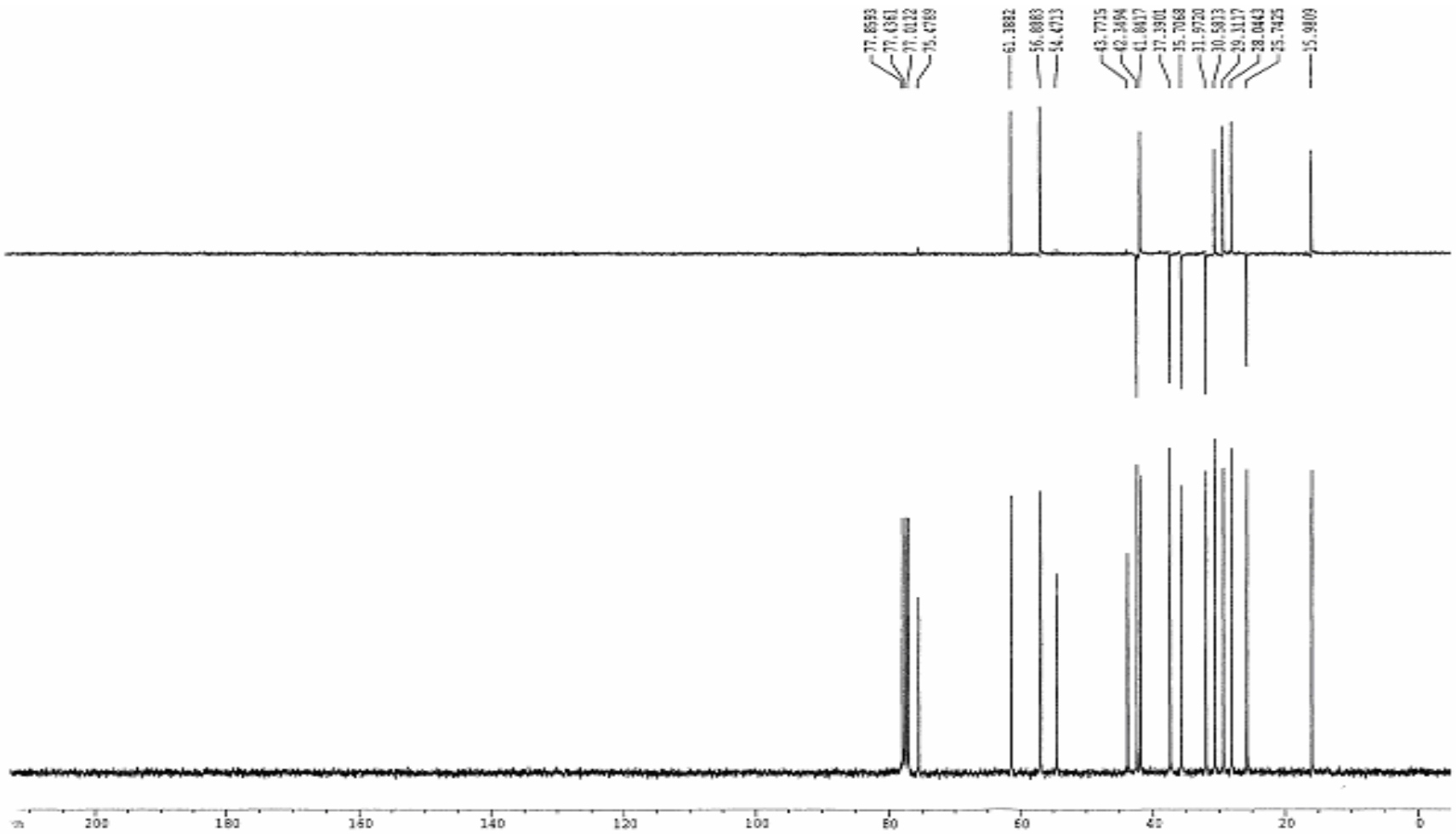
Spektrum 14: 12β-Hidroksisedrol'ün IR spektrumu



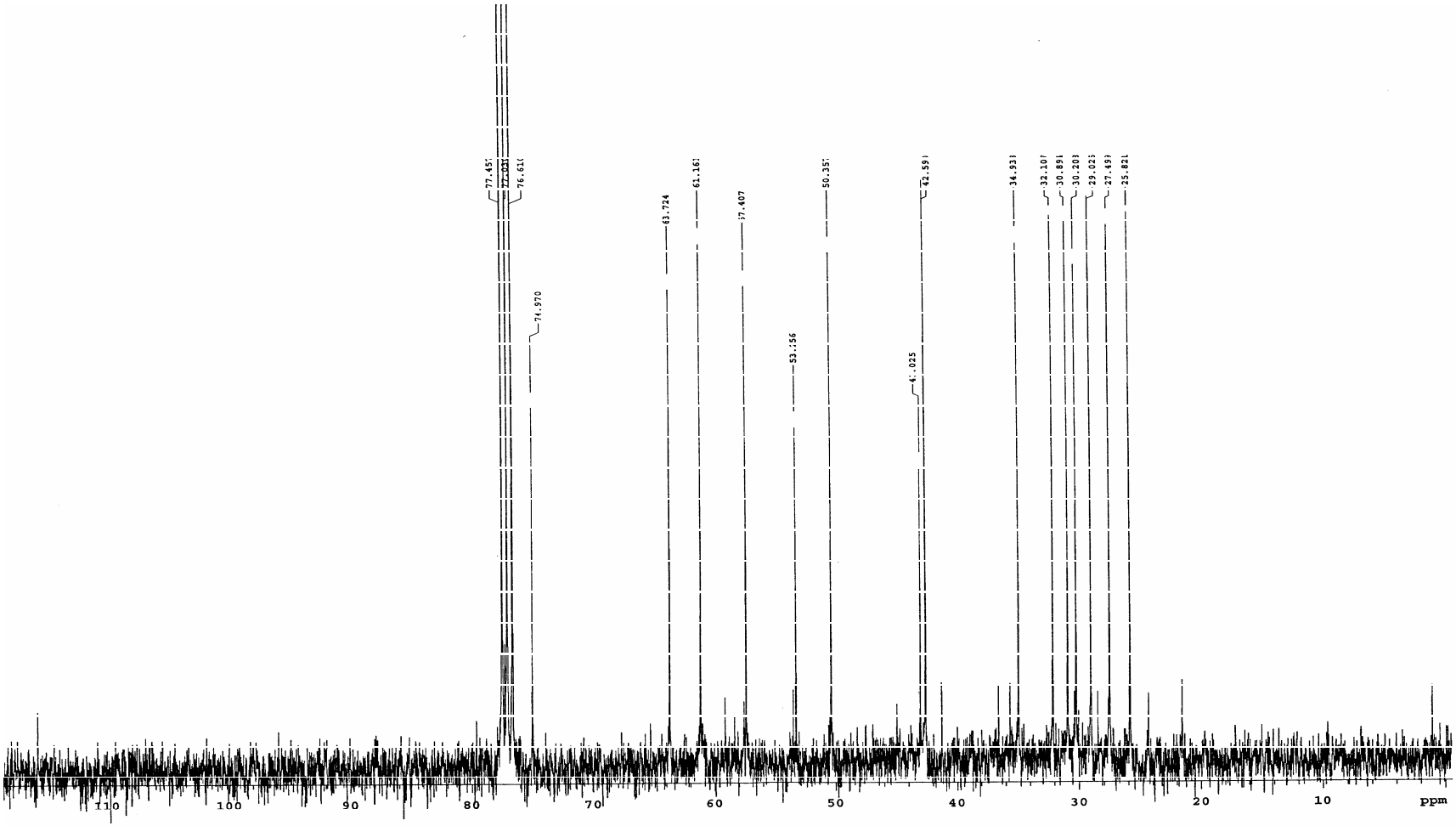
Spektrum 15: Sedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu



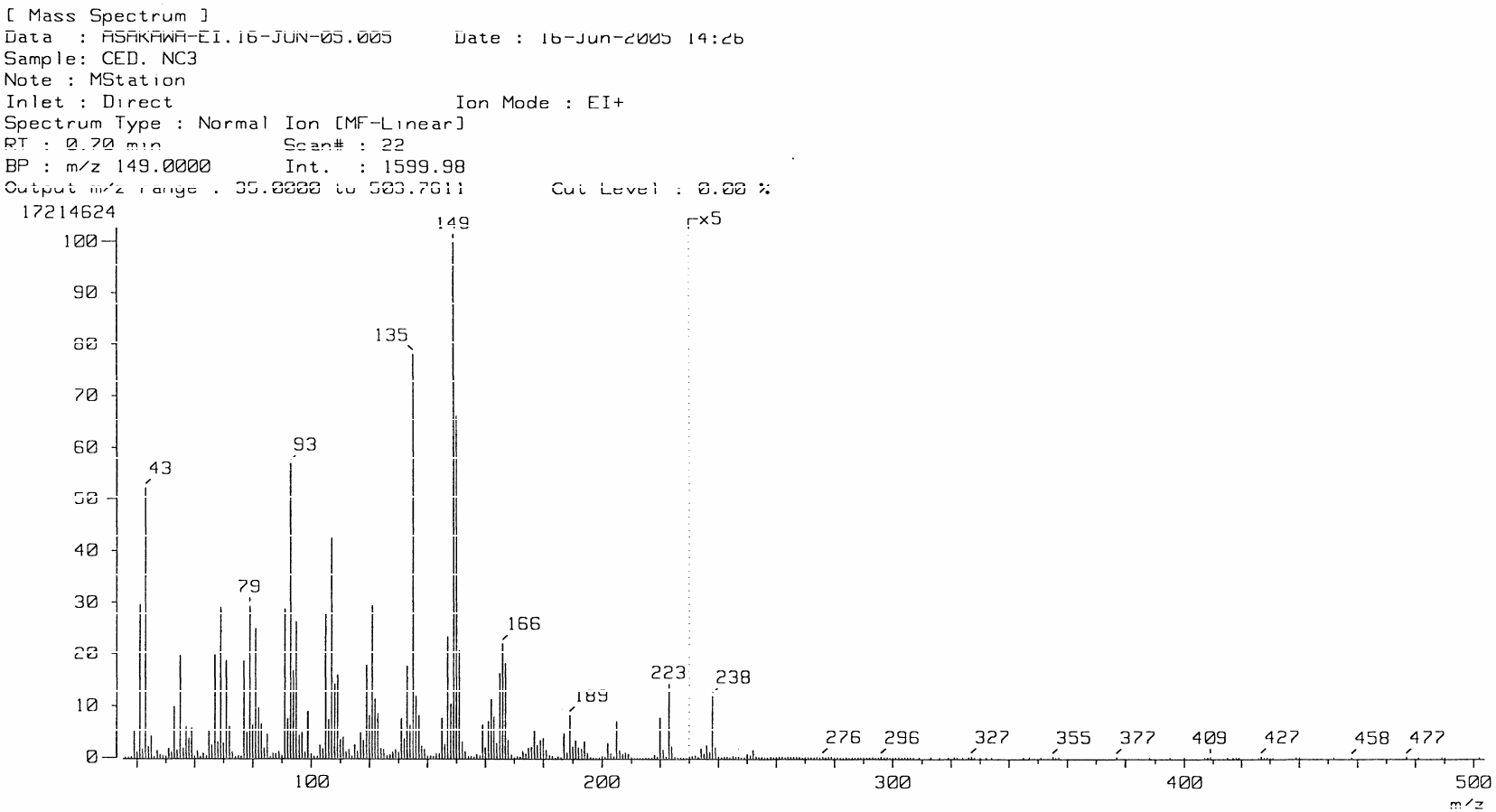
Spektrum 16: 12β-Hidroksisedrol'ün ^{1}H NMR spektrumu



Spektrum 17: Sedrol'ün DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları



Spektrum 18:12β-Hidroksisedrol'ün ^{13}C NMR spektrumu



Spektrum 19: 12β-Hidroksisedrol'ün kütle (EIMS) spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Eskişehir'de doğan Tamer Akar ilk, orta ve lise öğrenimini Eskişehir'de tamamladı. 1998 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 1999 yılında aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2001 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans'ını tamamladı ve 2001 yılında aynı enstitüde Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı'nda doktora programına kayıt oldu. Halen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.