

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**(E)-STİLBEN BİLEŞİĞİNİN  
ASPERGILLUS NIGER  
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Elif GÜN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM**

**Haziran 2007**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**(E)-STİLBEN BİLEŞİĞİNİN  
ASPERGILLUS NIGER  
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Elif GÜN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Bu tez 11 / 06 / 2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.**

**Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM  
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Ali Osman AYDIN  
Üye**

**Prof. Dr. Recep İLERİ  
Üye**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı büyük bir titizlikle yöneten, çalışma boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen başta Araş. Gör. Semra YILMAZER olmak üzere tüm Kimya Bölümü Öğretim Üyelerine, ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel Çalışmalarım sırasında yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Cavit UYANIK, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. İsmail KIRAN ve Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Esabi B. KURBANOĞLU hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2007

Elif GÜN

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
RESVERATROL.....	3
2.1. Resveratrol Biyosentezi.....	3
2.2. Resveratrolün İzomerleri, Konjugatları ve Türevleri.....	4
2.3. Resveratrolün Biyolojik Fonksiyonları.....	6
2.4. Resveratrol Temini.....	7
2.5. Çalışmanın Amacı.....	8
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot.....	12
3.2.1. Taze yatık agar kültürlerin hazırlanması.....	12
3.2.2. <i>Aspergillus niger</i> küfünün besiyerinin hazırlanması.....	12

3.3. ( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile Biyotransformasyonları.....	13
3.3.1. ( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 1.Biyotransformasyonu.	13
3.3.2. ( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 2.Biyotransformasyonu.	14
3.3.3. ( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 3.Biyotransformasyonu.	15
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	18
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR.....	31
BÖLÜM 6.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$\text{CDCl}_3$	: Dötorokloroform
CHS	: Kalkon sentaz enzimi
$^{13}\text{C-NMR}$	: Karbon 13-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
COX-2	: Siklooksigenaz-2 enzimi
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
$\text{FeSO}_4$	: Demir sülfat
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
g	: Gram
$\text{G}_2$ Evresi	: Mitoz bölünmeye hazırlık evresi
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
$^1\text{H-NMR}$	: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KBr	: Potasyum Bromür
KCl	: Potasyum Klorür
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	: Potasyum dihidrojen fosfat
L	: Litre
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
$\text{MgSO}_4$	: Magnezyum Sülfat
$\text{FeSO}_4$	: Demir Sülfat
m	: Multiplet
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
PDA	: Potato Dextrose Agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması

ppm	: Milyonda bir (kimyasal kayma birimi)
RS	: Resveratrol sentaz enzimi
s	: Singlet
SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome
S Evresi	: DNA replikasyonunun gerçekleřtiđi evre (sentez evresi)
STS	: Stilben sentaz enzimi
T	: Geçirgenlik
UV	: Ultraviyole ( Morötesi) ışınları
$v_{max}$	: Maksimum dalga sayısı
$\nu \text{ cm}^{-1}$	: Santimetreye dűřen dalga boyu sayısı
$\delta_H$	: $^1\text{H}$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
$\delta_C$	: $^{13}\text{C}$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil.1.1.	Bazı önemli fitoaleksinler.....	1
Şekil 2.1.	Resveratrol ve kalkon biyosentezi.....	4
Şekil 2.2.	Bazı önemli stilbenoidler. ....	5
Şekil 2.3.	İnsan ve farelerde ( <i>E</i> )–stilben bileşiğinin metabolizasyonu.....	9
Şekil 4.1.	Başlangıç maddesinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması.....	18
Şekil 4.2.	( <i>E</i> )–Stilben’in <sup>1</sup> H–NMR spektrumu.....	22
Şekil 4.3.	Değişmeyen başlangıç maddesinin <sup>1</sup> H–NMR spektrumu.....	23
Şekil 4.4.	( <i>E</i> )–Stilbenoksit’ in <sup>1</sup> H–NMR spektrumu.....	24
Şekil 4.5.	( <i>E</i> )–Stilben’in <sup>13</sup> C–NMR spektrumu.....	25
Şekil 4.6.	Değişmeyen başlangıç maddesinin <sup>13</sup> C–NMR spektrumu.....	26
Şekil 4.7.	( <i>E</i> )–Stilbenoksit’in <sup>13</sup> C–NMR spektrumu.....	27
Şekil 4.8.	( <i>E</i> )–Stilben’in FTIR spektrumu.....	28
Şekil 4.9.	Değişmeyen başlangıç maddesinin FTIR spektrumu.....	29
Şekil 4.10	( <i>E</i> )–Stilbenoksit’in FTIR spektrumu.....	30
Şekil 5.1.	( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 1.Biyotransformasyonu.....	31
Şekil 5.2.	( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 2.Biyotransformasyonu.....	32
Şekil 5.3.	( <i>E</i> )–Stilben’in <i>Aspergillus niger</i> ile 3.Biyotransformasyonu.....	32



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Besiyeri çözeltilisinin bileşenleri.....	12
Tablo 4.1. ( <i>E</i> )–Stilben ve ilgili diğer bileşiklerin <sup>1</sup> H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	19
Tablo 4.2. ( <i>E</i> )–Stilben ve ilgili diğer bileşiklerin <sup>13</sup> C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	20

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, (*E*)-Stilben, Biyotransformasyon, *Aspergillus niger*

Resveratrol birçok önemli biyolojik fonksiyonlara sahip bir bileşiktir. Resveratrol sadece bazı bitkilerde ve çok az miktarlarda bulunur. Bu nedenle bilim adamları resveratrolü bitkilerden izole etmek yerine sentetik yöntemlerle elde etmeyi tercih etmişlerdir.

Bazı mikroorganizmalar aromatik hidroksilasyon yapabildiklerinden bu çalışmada, resveratrol gibi hidroksillenmiş stilbenoidler elde etmek için (*E*)-stilben bileşiğinin *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

Biyotransformasyon çalışmaları sonrasında başlangıç maddesi ve elde edilen bileşiklerin erime noktaları ile <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FTIR spektrumları alındı. Biyotransformasyonların sonucunda başlangıç maddesinin çoğu ve az miktarda (*E*)-stilben oksit elde edildi.

Bütün bu sonuçlar *Aspergillus niger*'in (*E*)-stilben bileşiğini beklenen şekilde metabolize edemediğini ve bu yolla resveratrol gibi hidroksillenmiş stilbenoidler elde edilemeyeceğini gösterdi.

# THE BIOTRANSFORMATION OF (*E*)-STILBENE BY *ASPERGILLUS NIGER*

## SUMMARY

Keywords : Resveratrol, (*E*)-Stilbene, Biotransformation, *Aspergillus niger*

Resveratrol is a compound with a lot of important functions. Only some plants have resveratrol and they have it a little. Therefore, scientist prefer getting resveratrol by synthetic methods to isolating it form plants.

In this study, the biotransformations of (*E*)-stilbene were performed in order to get hydroxylated stilbeneoids such as resveratrol since some microorganisms are able to hydroxylate aromatic rings.

After the biotransformations, the melting points and <sup>1</sup>H- NMR, <sup>13</sup>C-NMR and FTIR spectra were taken from both starting materials and the new compounds. Most of the unchanged starting material and some (*E*)-stilbene oxide were obtained from the biotransformations.

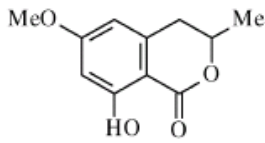
All these results showed that *Aspergillus niger* could not metabolise (*E*)-stilbene in an expected way and the biotransformation was not a good way in order to get hydroxylated stilbenoids.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

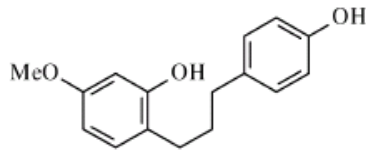
Bitkiler, bazı stres faktörlerine maruz kaldıklarında kendilerini korumak için birçok kimyasal üretirler. Bu kimyasallara bitki savunucuları anlamına gelen fitoaleksinler adı verilmektedir [1].

Fitoaleksinlerin başlangıçta sadece mantarlar ile bakterilerin istilasını sonrasında oluştuğu ve antimikrobiyal özellikte oldukları gözlemlendiğinden bu bileşikler bitki antibiyotikleri olarak da adlandırılmıştır. Sonradan fitoaleksinlerin, mantarlar ve bakterilerin istilasını gibi biyotik stres faktörlerinin yanı sıra kısa dalga boylu UV ışığı, ağır metal iyonları ve yaralanma gibi abiyotik stres faktörlerine maruz kalma sonucu oluştuğu anlaşıldığında ise bu kimyasallar stres bileşikleri olarak da adlandırılmışlardır [2].

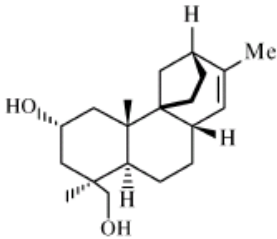
Fitoaleksinler, kumarinler, flavonoidler, izoflavonoidler, terpenoidler ve stilbenoidler gibi yapıları bakımından oldukça farklı kimyasal gruplara ait bileşikler içerirler. Şekil 1.1. de bazı fitoaleksinlerin kimyasal yapısı verilmiştir [1].



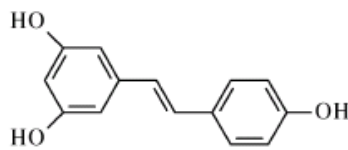
6-Metoksimellein



Brussonin A



Orizalexin S



Resveratrol

Şekil 1.1. Bazı önemli fitoaleksinler

Bir stilbenoid olan resveratrol önemli fitoaleksinlerdendir. Resveratrol ayrıca çok önemli diğer bazı biyolojik fonksiyonlara da sahiptir [3]. Bu çalışmada resveratrol üzerinde durulacaktır.

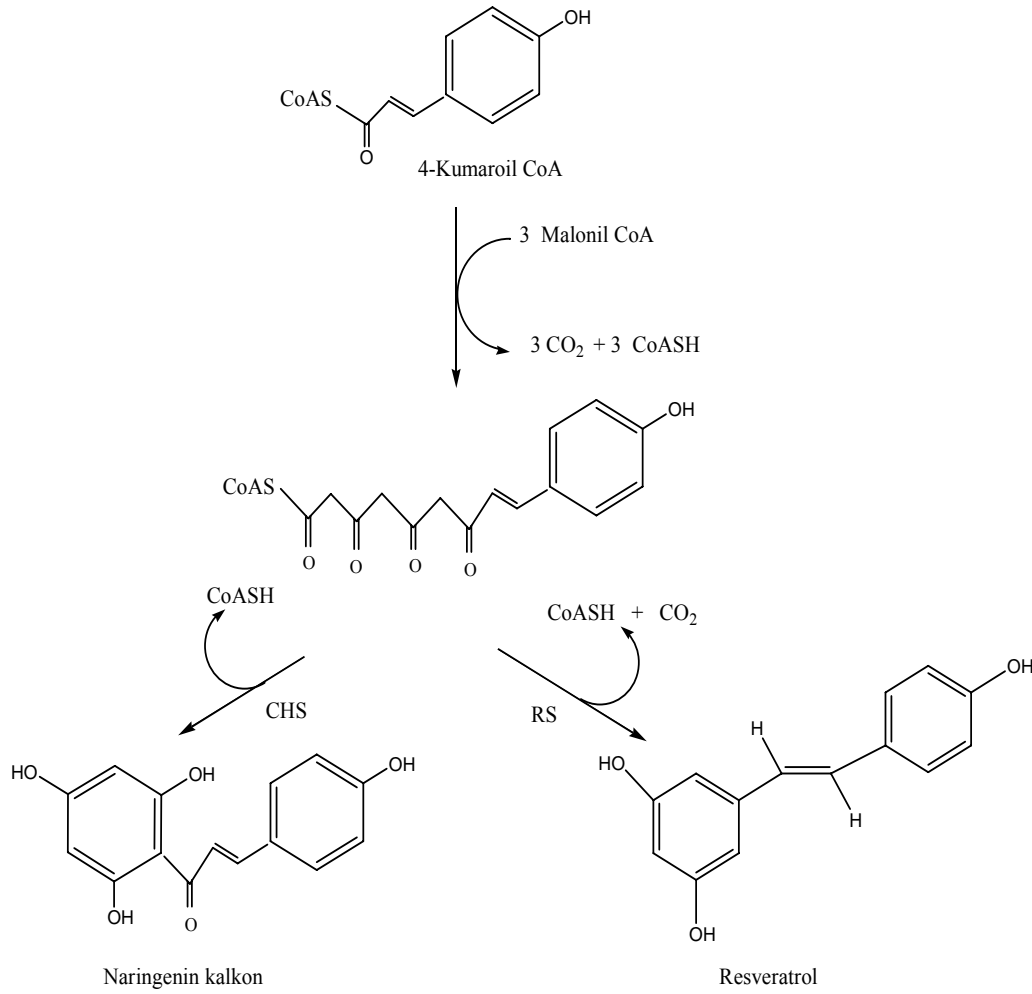
## BÖLÜM 2. RESVERATROL

### 2.1. Resveratrol Biyosentezi

Resveratrol sadece bazı bitkilerde doğal olarak bulunabilen önemli bir kimyasaldır. Resveratrol, yer fıstığı, çilek ve üzüm gibi en az 72 bitki türünde bulunur [4]. Çoğu bitkinin resveratrol içermemesinin sebebi resveratrol biyosentezini gerçekleştiren resveratrol sentaz (RS) enziminin her bitkide bulunmamasıdır. Resveratrol sentaz enzimi stilben sentaz (STS) olarak da bilinmektedir [5].

Resveratrol sentaz üzerinde yapılan çalışmalar; bu enzimin bitki metabolizmasında oldukça farklı ve önemli birçok role sahip olduğunu ve geniş bir protein ailesinin üyesi olduğunu göstermektedir. Aynı protein ailesinin bir diğer önemli üyesi ise kalkon sentaz (CHS) enzimidir. CHS insan sağlığı için oldukça önemli olan flavonoidler ve antosiyaninler gibi doğal ürünlerin biyosentezinde anahtar bir enzimdir. RS ve CHS yapıları bakımından % 65-70 özdeştir. Her iki enzimde substrat olarak bütün bitkilerde bulunan 4-kumaroil-CoA ve malonil-CoA bileşiklerini kullanır ve bu enzimlerin reaksiyonları da oldukça benzerdir [6-7].

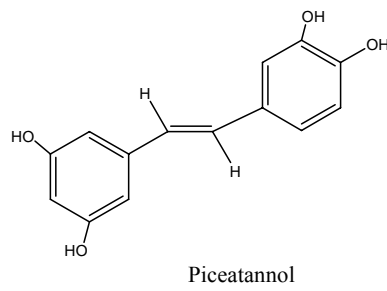
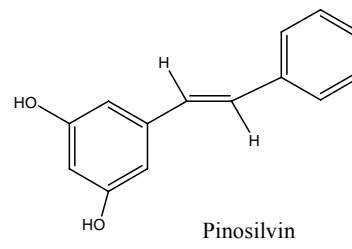
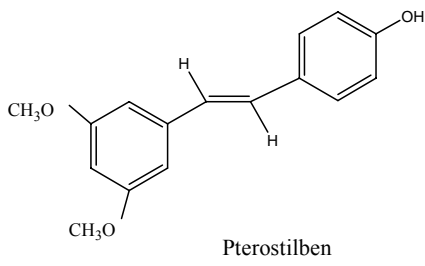
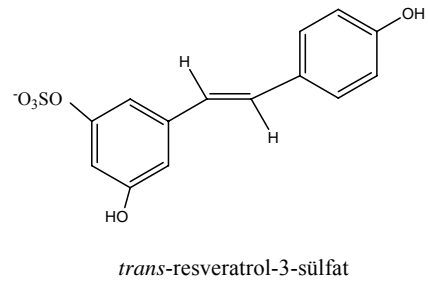
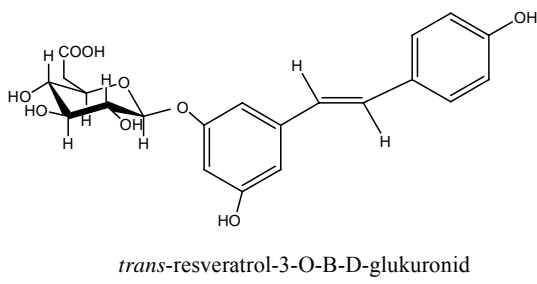
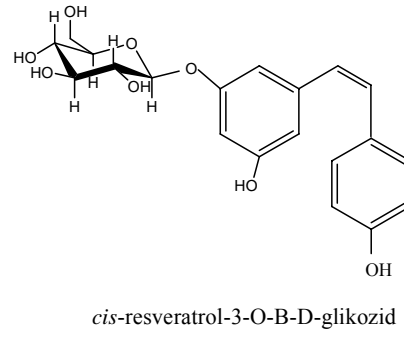
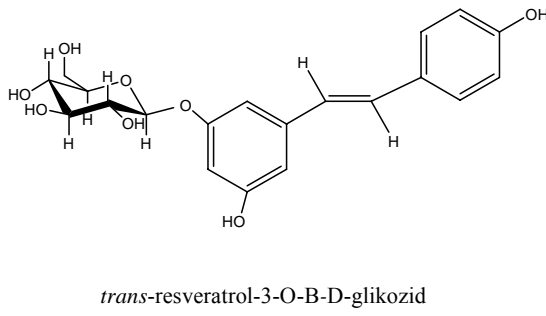
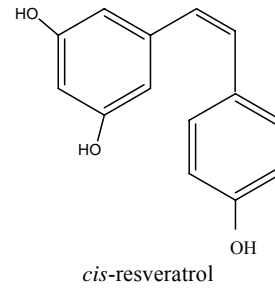
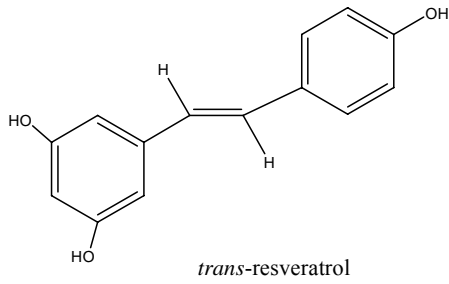
RS ve CHS kondenzasyon enzimleridir . Bu enzimler; enzime bağlı bir tetraketid ara bileşiği oluşturmak üzere 4-kumaroil-CoA (*p*-kumaroil CoA) bileşiğine 3 kez peş peşe malonil CoA kondenzasyonu reaksiyonunu gerçekleştirirler. Tetraketid ara bileşiğinin oluşumuna kadar bütün reaksiyonlar her iki enzim ile aynı şekilde gerçekleştirilir. Sadece RS tarafından katalizlenen son halka katlanması farklı gerçekleşir [7]. RS ve CHS enzimlerinin gerçekleştirdikleri yukarıda açıklanan reaksiyonlar Şekil 2.1. de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Resveratrol ve kalkon biyosentezi

## 2.2. Resveratrolün İzomerleri, Konjugatları ve Türevleri

Stilbenoid yapıda bir fitoaleksinin olan resveratrol *trans*-resveratrol ve *cis*-resveratrol olmak üzere iki izomere sahiptir. Bitkilerde *trans*-resveratrol izomeri daha çok bulunur ve daha etkindir. Aslında resveratrol izomerleri bitkilerde daha çok piceidler adı verilen *trans*-resveratrol-3-O-β-D-glikozid ve *cis*-resveratrol-3-O-β-D-glikozid olarak bulunurlar. Piceidler, resveratrol gibi etkindirler ve insan bağırsaklarından resveratrole göre daha çok emilirler. Piceidler haricinde resveratrolün bitkilerde az miktarlarda gözlenen *trans*-resveratrol-3-O-β-D-glukuronid, *trans*-resveratrol-3-sülfat ve pterostilben gibi konjugatları da bulunmaktadır. Pinosilvin ve bir resveratrol türevi olan piceatannol, resveratrol gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip diğer doğal stilbenoid fitoaleksindir.



Şekil 2.2. Bazı önemli stilbenoidler



### 2.3. Resveratrolün Biyolojik Fonksiyonları

Resveratrol çok önemli biyolojik fonksiyonlara sahip bir bileşiktir. Bu biyolojik fonksiyonlarının arasında antimikrobiyal olması, antioksidanlığı, kardiyovasküler sistem koruyuculuğu, kanser önleyebilmesi ve tedavi edebilmesi, iltihap gidericiliği, antiviral olması gibi özellikleri sayılabilir [3,8-16].

Resveratrol kuvvetli antimikrobiyal bir bileşiktir ve özellikle antifungal özelliktedir. Bu bileşiğin insan için patojen olan birçok mantara karşı etkin olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün antibakteriyel özelliği de söz konudur. Örneğin, resveratrolün insan derisinde rahatsızlığa sebep olan bir çok bakterinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir [8-10].

Resveratrol antioksidan bir bileşiktir. Bu bileşik serbest radikalleri ve diğer oksidanları giderici özeliğe sahiptir. Resveratrol hücrel membran lipitlerinin ve bununla bağlı olarak hücrelerin korunmasında oldukça etkilidir. Bu özelliğini hidrojen peroksit veya lipid hidroperoksit bağımlı lipid peroksidasyonunu inhibe etmek sureti ile gerçekleştirir [10].

Literatürde resveratrolün kardiyovasküler sistem dostu bir bileşik olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün, lipitlerin sentezini azaltması, HDL kolesterol seviyesini (iyi kolesterol) yükseltmesi, lipit peroksidasyonunu önlemesi, LDL oksidasyonunu önlemesi, trombosit kümelenmesi ve vücut içinde kan pıhtılaşmasını önlemesi gibi özellikleri kardiyovasküler sistem sağlığı için oldukça önemlidir [11].

Resveratrolün, sadece kanser önleyici değil kanser tedavisi sağlayabilecek bir bileşik olduğuna dair bulgular giderek güçlenmektedir. Bu bileşiğin, kanserin başlamasını, gelişmesini, ilerlemesini ve hatta bazı kanser tiplerinin yayılmasını engelleyici özellikleri saptanmıştır. Resveratrol kansere karşı olan engelleyici özellikleri çeşitli şekillerde ortaya çıkarmaktadır. Resveratrol kanser hücrelerini apoptozisi (programlı hücre ölümü) tetikleyerek öldürebileceği gibi anti kanserojen etkisini bu hücrelerdeki hücre döngüsünü S ve G<sub>2</sub> evrelerinde kilitleyerek gösterebilir. Mitoz bölünme öncesi

S ve G<sub>2</sub> evrelerindeki bir kilitlenme hücre bölünmesini ve dolayısıyla kanseri önleyicidir. Resveratrol kanseri önleyici etkisini, nükleik asit sentezinde görev alan bazı enzimleri inhibe ederek de açığa çıkarmaktadır. Resveratrol, tümör oluşumu başlangıcına sebebiyet veren COX-2 (siklooksigenaz-2) enzimini inhibe ederek de kanseri engeller. Bununla birlikte resveratrolün, östrojenleri ve androjenleri inhibe ederek ve bazı genleri aktive veya inhibe etmek suretiyle de kanseri engellediği düşünülmektedir. Laboratuvar hayvanları ve kanser hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar resveratrolün özellikle lösemi, göğüs kanseri, prostat kanseri, yumurtalık kanseri, mide kanseri, pankreas kanseri, deri kanseri, özefagus kanseri, kolon kanseri gibi kanser çeşitleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan kanserojenlerle teşvik edilen kanser çalışmalarında resveratrolün bu hayvanlarda kanser gözlenme sıklığını düşürdüğünü göstermiştir. Literatürdeki bazı çalışmalar ise ilaca dirençli bazı kanser türlerinde resveratrolün kanser hücrelerini bu ilaçlara duyarlı kıldığını göstermiştir [12-14].

Resveratrol ayrıca iltihap giderici özellikleri de olan bir kimyasaldır. Resveratrol, iltihaplanmanın (yangı) ortaya çıkmasında etkin olan eikosanoidlerin sentezinden sorumlu lipoksigenaz ve siklooksigenaz enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak iltihap giderici olarak da etkin olarak görev yapar [15].

Resveratrolün antiviral özellikleri de saptanmıştır. Örneğin resveratrol ve bazı resveratrol türevlerinin SARS hastalığına sebep olan virüse karşı antiviral etkileri gösterilmiştir [16].

#### **2.4. Resveratrol Temini**

Daha öncede belirtildiği gibi resveratrol birçok önemli biyolojik fonksiyonlarına rağmen bütün bitkilerde bulunmaz [3-5]. Resveratrol sadece bazı bitkilerde ve çok az miktarlarda bulunur [4]. Bu bileşiğin miktarı bitkinin büyüme koşullarına ve daha çok da resveratrol oluşumuna neden olan faktörlere maruz kalmasına bağlıdır [17-20]. Bilim adamları resveratrolü bitkilerden izole etmek yerine bu bileşiği sentetik yöntemlerle elde etmeye yönelmişlerdir. Resveratrolün ilk sentezi 1941 yılında gerçekleştirilmiş ve günümüze kadar resveratrol ve resveratrol türevlerini

sentezlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir [17-24]. Sentez için genellikle önce çeşitli substitüentler içeren 2 benzen türevi bir katalizör varlığında kondenzasyona uğratılmakta daha sonra ise substitüentler değişime maruz bırakılarak resveratrol ve resveratrol türevleri sentezlenmektedir.

## 2.5. Çalışmanın Amacı

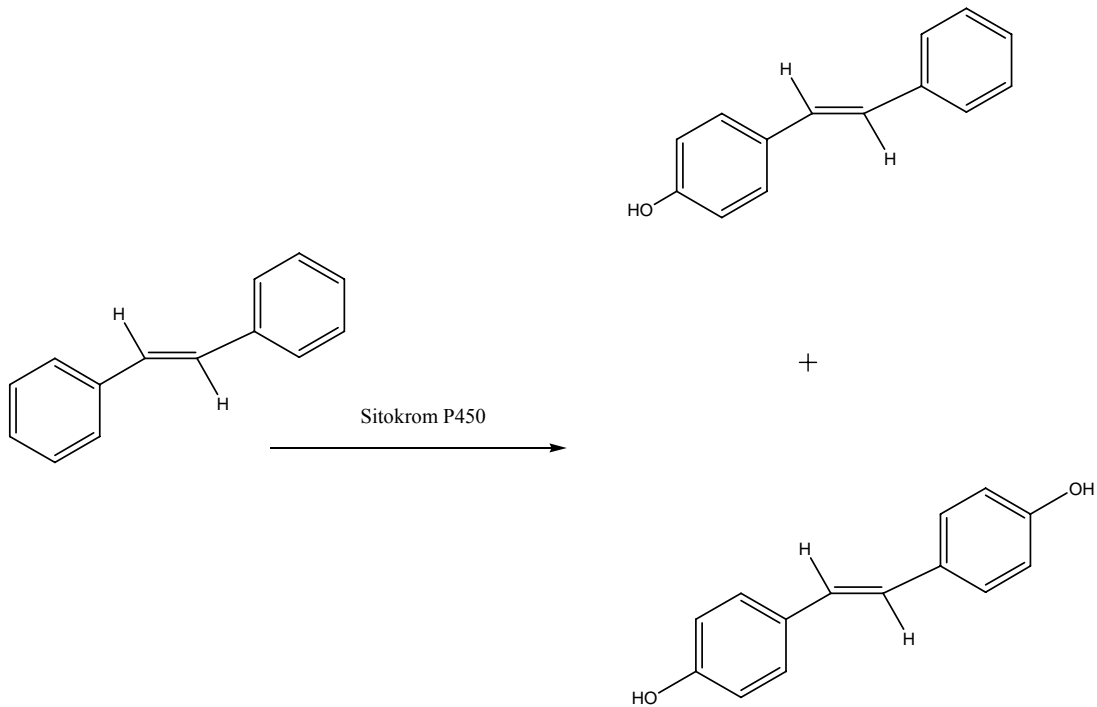
Canlılar hayatlarının birçok dönemlerinde kendilerine yabancı olan ve ksenobiyotikler adı verilen kimyasal maddeler ile karşılaşmaktadır [25]. Yabancı kimyasal maddeler karşılaştıkları canlılar için çoğu zaman sorun çıkarmaktadırlar. Bu maddelerin üzerinde enzimler veya enzimleri içeren hücre, doku, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları yolu ile meydana getirilen kimyasal değişikliklere biyotransformasyonlar adı verilir [26].

Biyotransformasyonların çoğunun sitokrom P450 enzimlerince gerçekleştirildiği gösterilmiştir [25]. Çoğu canlılarda gözlenen sitokrom P450 enzimleri, alifatik hidroksilasyon, allilik hidroksilasyon, aromatik hidroksilasyon, epoksidasyon, dealkilasyon, aldehytlerin indirgenmesi, ketonların indirgenmesi, esterlerin hidrolizi ve amidlerin hidrolizi gibi pek çok reaksiyonu katalizler. Sitokrom P450 enzimlerinin reaksiyonları, canlının yabancı bileşiklerden kurtulması için oldukça önemlidir [27]. Bu enzimlerin etkisi neticesinde daha polar yeni bileşiklere (metabolitlere) dönüşen yabancı bileşikler vücudu daha kolayca terk edebilmektedir. Bazen sitokrom P450 enzimleri istenmeyen bazı durumlara da yol açabilmektedir. Örneğin, bu enzimlerin etkisi ile çok halkalı aromatik hidrokarbonlar bu enzimlerin etkisi ile daha tehlikeli kanser yapıcı metabolitlerin oluşumuna imkan sağlayabilmektedirler [28].

Sitokrom P450 enzimlerinin bir reaksiyonu olan aromatik hidroksilasyon kısaca aromatik halkanın hidroksillenmesi olarak tanımlanabilir. Aromatik hidroksilasyon reaksiyonu mikroorganizmalar ile de gerçekleştirilebilmektedir [29].

(*E*)-Stilben (*trans*-stilben) bileşiği canlılarda doğal olarak bulunmayan apolar bir bileşiktir ve apolar olması sebebi ile canlı bünyesine kolayca dahil olabilmektedir [30]. Canlılar bu maddeye maruz kaldıklarında onu yapılarından uzaklaştırabilecekleri kadar polarlaştırmak için aromatik hidroksilasyona yönelebilirler [27].

Bu konudaki ilk ipuçları, insan ve farelerde (*E*)-stilben bileşiğinin metabolizasyonunun incelenmesinde açığa çıkmıştır. Bahsedilen çalışmada bu canlılara ait sitokrom P450 enzimlerinin (*E*)-stilben bileşiğini 4-hidroksi-*trans*-stilben ve 4,4'-dihidroksi-*trans*-stilben gibi hidroksillenmiş ürünlere dönüştürdüğü gözlenmiştir [30].



Şekil 2.3. İnsan ve farelerde (*E*)-stilben bileşiğinin metabolizasyonu

*Aspergillus niger* gibi sitokrom P450 enzimleri içeren bir mikroorganizma [29], benzer bir eğilim ile (*E*)-stilben bileşiğini aromatik hidroksilasyonlara maruz bırakabilir. Eğer bu gerçekleşirse mikrobiyal biyotransformasyonlar yolu ile resveratrol benzeri hidroksillenmiş stilbenoidler elde edilebilir.

Bu çalışmanın amacı (*E*)-stilben bileşiminin *Aspergillus niger* mikroorganizması ile biyotransformasyonunu gerçekleştirerek yeni bir yöntemle resveratrol gibi hidroksillenmiş stilbenoidler elde etme ihtimalini incelemektir.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

### 3.1. Materyal

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Nüve OT 020 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, KBr diskleri kullanılarak ATI Mattson Infinity Series FTIR spektrometre cihazı ile alındı. <sup>1</sup>H-NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. <sup>13</sup>C-NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Kolon kromatografisi için Merck kalite silika jel 60 (230-400 mesh) kullanıldı. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözen sistemi kullanılarak yapıldı. Bileşikler önce UV lambası altında gözlemlendi, daha sonra iyot buharına maruz bırakılarak belirgin hale getirildi. Erime noktaları Elektrotermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi. Besiyeri filtrasyonunun daha etkin olabilmesi için filtre kağıtları arasında uygun miktarlarda Celite kullanıldı.

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmasında kullanılan *Aspergillus niger* NRRL 330 küfü Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden yatık agar kültürü şeklinde bir adet stok kültür olarak tedarik edildi.

Çalışmada biyotransformasyonları *Aspergillus niger* küfü ile gerçekleştirilen (*E*)-stilben bileşiği Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden tedarik edildi

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Taze yatık agar kültürlerin hazırlanması

PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,35 g) karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri soğumadan 15 adet 22 mL'lik Universal marka patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildi ve otoklav içerisinde 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisinde erimiş haldeki besiyerleri, donmadan önce 45°'ye yakın bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besiyerleri elde edildi [31].

Stok fungal kültürdeki küflerin bir kısmı yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril şartlarda aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinin en gelişmişindeki küfler 15 günde bir 3 yeni yatık agar besiyerine steril şartlarda aktarıldı. Bu aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı [31].

### 3.2.2. *Aspergillus niger* küfünün besi yerinin hazırlanması

*Aspergillus niger* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir [31].

Tablo 3.1. Besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Glukoz	15,0 g
Sakkaroz	15,0 g
Polipepton	5,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	10 mg

### 3.3. (E)– Stilben’in *Aspergillus niger* ile Biyotransformasyonları

Çalışma süresince (E)–stilben bileşiminin *Aspergillus niger* ile 3 kez biyotransformasyonu gerçekleştirildi.

#### 3.3.1. (E)– Stilben’in *Aspergillus niger* ile 1. Biyotransformasyonu

Sterilize edilen 1 L besiyeri 12 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün boyunca 25°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Küf içeren erlenin muhtevassından diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL nakledildikten sonra bu erlenler de yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün süresince 25°C’de inkübasyona bırakıldı.

(E)-Stilben (500 mg) etanol (25 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 7 gün süresince 25 °C’ de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında erlenlerde renk değişimi gözlemlendi.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtre kağıtları arasında Celite kullanılarak filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besiyeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzütünün pH değeri %10’luk hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2’ye ayarlandı ve her seferinde 0,5 L etil asetat kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra 560 mg yağimsı bir madde elde edildi.

Başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde bir tanesi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip olmak üzere toplam üç bileşik gözlemlendi. Yağimsı madde daha sonra silika jel 60



üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan % 5'lik çözgen sistemi ile İTK'da gözlenen ilk bileşik (420 mg) beyaz bir toz şeklinde etil asetatın iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi. Elde edilen bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR ve FTIR spektrumları ile erime noktalarının karşılaştırılması ile anlaşıldı.

Kolon kromatografisi hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanılarak sürdürülmesine rağmen İTK çalışmasında gözlenen diğer 2 bileşik elde edilemedi.

### 3.3.2. (E)- Stilben'in *Aspergillus niger* ile 2. Biyotransformasyonu

Sterilize edilen 2 L besiyeri 24 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. En taze alt kültürdeki küf erlenlerinden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün boyunca 25°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Küf içeren erlenin muhtevassından diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL nakledildikten sonra bu erlenler de yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün süresince 25°C'de inkübasyona bırakıldı.

(E)-Stilben (1 g) etanol (50 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 10 gün süresince 25 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında erlenlerde yine renk değişimi gözlemlendi.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtre kağıtları arasında Celite kullanılarak filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besiyeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzüntünün pH değeri %10'luk hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2'ye ayarlandı ve her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak

ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (1,2 g) elde edildi.

Başlangıç maddesi ve elde edilen maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde bir tanesi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip olmak üzere toplam üç bileşik gözlemlendi. Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan % 5'lik çözgen sistemi ile İTK'da gözlenen ilk bileşik (800 mg) etil asetatın iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi. Elde edilen bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu bahsedilen bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR ve FTIR spektrumları ile erime noktalarının karşılaştırılması ile anlaşıldı.

Kolon kromatografisi çalışması % 5'lik çözgen sistemi ile devam ettirildiğinde ikinci bileşik (8 mg) etanolden iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi.

Erime noktası: 68 - 70 °C,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>: 3076, 3036, 2989, 1497, 1457, 1250, 905 ve 812,  $\delta_H$ (CDCl<sub>3</sub>) 3.86 (2H, s, 2 x CH), 7.26–7.45 (10 H, m, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

Kolon kromatografisi hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanılarak sürdürülmesine rağmen İTK çalışmasında gözlenen diğer bileşik elde edilemedi.

### 3.3.3. (E)– Stilben'in *Aspergillus niger* ile 3. Biyotransformasyonu

Sterilize edilen 2 L besiyeri 24 adet 250 mL'lik erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. İnkübasyonlar esnasındaki renk değişiminin sebebini anlamak için erlenlerden birisi sterilizasyon kontrolü olarak kullanılırken bir diğeri biyotransformasyon kontrolü olarak kullanıldı. Taze alt kültürdeki küf erlenlerinden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün boyunca 25°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Küf içeren erlenin muhtevasından sterilizasyon ve biyotransformasyon kontrolü haricindeki diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL nakledildikten sonra bütün erlenler 2 gün süresince 25°C’de inkübasyona bırakıldı.

(*E*)-Stilben (1 g) etanol (50 mL) içerisinde çözünerek sterilizasyon kontrolü haricindeki erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 10 gün süresince 25 °C’ de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında kontrol erlenleri haricinde yine renk değişimi gözlemlendi.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtre kağıtları arasında Celite kullanılarak filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besiyeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzüntünün pH değeri %10’luk hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2’ye ayarlandı ve her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (1.25 g) elde edildi.

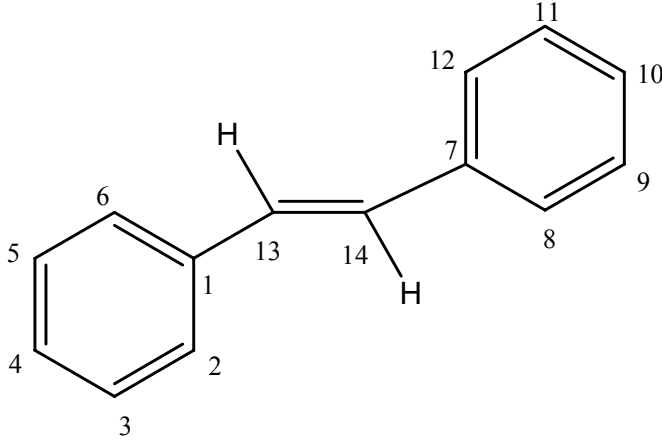
Başlangıç maddesi ve elde edilen madde ile bir İTK çalışması geliştirildiğinde bir tanesi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip olan üç bileşik gözlemlendi. Yağimsı madde silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan % 5’lik çözgen sistemi ile İTK’da gözlenen ilk bileşik (820 mg) etil asetatın iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi. Bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu her iki bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR ve FTIR spektrumları ile erime noktalarının karşılaştırılması ile anlaşıldı.

Kolon kromatografisi çalışması % 5’lik çözgen sistemi devam ettirildiğinde İTK’da gözlenen ikinci bileşik (10 mg) elde edildi. Bu bileşiğin bir önceki çalışmadan elde edilen ikinci bileşik ile aynı madde oldukları her iki bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR ve FTIR spektrumları ile erime noktalarının karşılaştırılması ile anlaşıldı.

Kolon kromatografisi çalışması hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanılarak sürdürülmesine rağmen İTK çalışmasında gözlenen son bileşik elde edilemedi.

## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Resveratrol ve benzeri stilbenoidlerin elde edebilmek için *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonları gerçekleştirilen (*E*)-stilben (1) bileşiğinin karbon iskeletinin numaralandırılması Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Başlangıç maddesinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması.

Biyotransformasyon çalışmalarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddelerinin hem de elde edilen bileşiklerin  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , FTIR spektrumları alındı ve erime noktaları tayin edildi.

(*E*)-Stilben ve bu bileşiğin *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonlarından elde edilen bileşiklere ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarının karşılaştırılması amacıyla bu spektrumlar Tablo 4.1.’de özetlenmiştir.

Tablo 4.1.’den de gözleneceği gibi (*E*)-stilben ve bileşik 1’e ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında birbirine yakın yerlerde dört sinyal gözlemlendi. Bu sonuç bileşik 1’in değişmeyen başlangıç maddesi olduğunu göstermekteydi.

Tablo 4.1. (*E*)-Stilben ve ilgili diğer bileşiklerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması

( <i>E</i> )-Stilben	Bileşik 1	Bileşik 2	Yarılma tipi	J sabiti	Proton
Kimyasal kayma	Kimyasal kayma	Kimyasal kayma			
7,48	7,50	-	m	-	2-H,6-H, 8-H ve 12-H
7,30	7,33	-	m	-	3-H,5-H, 9-H ve 11-H
7,21	7,23	-	m	-	4-H ve 10-H
7,10	7,11	-	s	-	13-H ve 14-H
-	-	3,86	s	-	13-H ve 14-H
-	-	*	**	-	***
* Bileşik 2'ye ait 12 protonun 10 tanesi 7,26 ppm ile 7,45 ppm arasında geldi					
** Yarılma tipi multipllet (m) şeklindeydi					
*** 3,86 da gelmeyen diğer protonlar (2-H,3-H,4-H,5-H,6-H,8-H,9-H,10-H,11-H ve 12-H)					

(*E*)-Stilben bileşiğinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumundaki 7,48 (m, 4H), 7,30 (m, 4H), ve 7,21 (m, 2H) ppm değerlerinde gözlenen aromatik 10 protona ait 3 sinyal 7,10 (s, 2H) ppm değerlerinde gözlenen 2 olefinik protona ait 1 sinyal, bileşik 2'ye ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenmedi. Bu dört sinyalin yerine 3,86 ppm'de 2 protona ait 1 adet singlet ve 7,26 ppm ile 7,45 ppm arasında gözlenen aromatik 10 protona ait 1 adet multipllet olarak 2 yeni sinyal gözlemlendi. (*E*)-stilben bileşiğinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunun 7,10 ppm'de gözlenen olefinik protonlar bileşik 2'nin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenmedi. Bu bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda bahsedilen protonların sinyali gözlenmezken daha üst alanda, 3,86 ppm'de başlangıç bileşiğinde olmayan yeni bir singlet (2H) gözlemlendi. Bu sonuç çift bağın oksidasyona uğradığını ve epoksit oluştuğunu gösteriyordu. Başlangıç maddesindeki çift bağa en yakın olan ve 7,48 ppm'de rezonansa gelen protonların (m, 2-H,6-H, 8-H ve 12-H) daha üst alanda, 7,26 ppm ile 7,45 ppm arasında multipllet olarak gözlenmesi çift bağın ortadan kalktığı fikrini desteklemekteydi. Bu gözlemler başlangıç maddesindeki çift bağın oksidasyona uğradığını ve bileşik 2'nin (*E*)-stilben oksit olabileceğini daha da destekler nitelikteydi.

(*E*)-Stilben ve bu bileşiğin *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin <sup>13</sup>C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması amacıyla bu spektrumlar Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. (*E*)-Stilben ve ilgili diğer bileşiklerin <sup>13</sup>C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması

	( <i>E</i> )-Stilben	Bileşik 1	Bileşik 2
<b>C-1</b>	137,28	137,24	136,99
<b>C-2</b>	126,48	126,40	128,44
<b>C-3</b>	128,66	128,54	128,00
<b>C-4</b>	127,59	127,50	125,40
<b>C-5</b>	128,66	128,54	128,00
<b>C-6</b>	126,48	126,40	128,44
<b>C-7</b>	137,28	137,24	136,99
<b>C-8</b>	126,48	126,40	128,44
<b>C-9</b>	128,66	128,54	128,00
<b>C-10</b>	127,59	127,50	125,40
<b>C-11</b>	128,66	128,54	128,00
<b>C-12</b>	126,48	126,40	128,44
<b>C-13</b>	128,66	128,54	62,80
<b>C-14</b>	128,66	128,54	62,80

(*E*)-Stilben ile bileşik 1'e ait <sup>13</sup>C-NMR spektrumları karşılaştırıldığında bu maddelerin aynı olduğu fikri daha da güçlendi. Başlangıç maddesi ile bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR spektrumları karşılaştırıldığında her iki spektrumda birbirlerine yakın yerlerde rezonanslara gelen toplam 14 karbon atomu sinyali gözlemlendi (Tablo 4.2, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

(*E*)-Stilben ile bileşik 2'ye ait <sup>13</sup>C-NMR spektrumları karşılaştırıldığında bazı farklılıklar gözlemlendi. (*E*)-Stilben bileşiğinin C-3, C-5, C-9 ve C-11 sinyalleri ile aynı yerde rezonansa gelen olefinik C atomları (C-13 ve C-14), bileşik 2'nin <sup>13</sup>C-NMR spektrumunda gözlenmedi. Bileşik 2'nin <sup>13</sup>C-NMR spektrumunda başlangıç maddesinde gözlenmeyen ve aynı yerde rezonansa gelen (62,80 ppm) iki yeni C atomu sinyali gözlemlendi. Bu sonuçlar başlangıç maddesindeki çift bağın oksidasyona uğradığını ve bileşik 2'nin (*E*)-stilben oksit olabileceği fikrini destekler nitelikteydi.

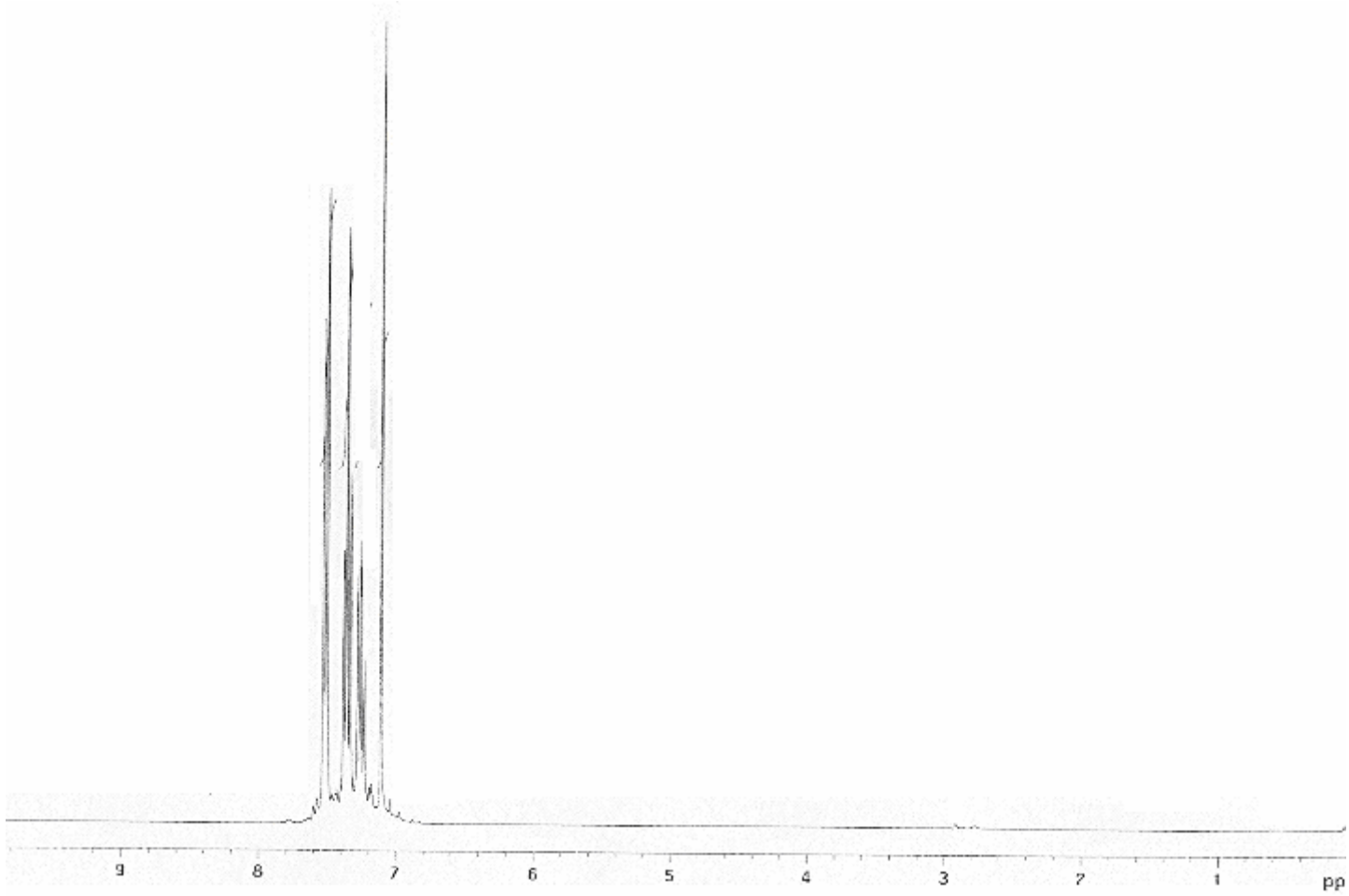
(*E*)-Stilben ile bileşik 1'e ait FTIR spektrumları incelendiğinde her iki bileşiğin aynı olduğu bir başka deyişle bileşik 1'in değişmeyen başlangıç maddesi olduğu anlaşıldı.

(*E*)-Stilben ile bileşik 2'ye ait FTIR spektrumları incelendiğinde, (*E*)-stilben FTIR spektrumunda olefinik C-H gruplarına ait olan 3032 ve 3018  $\text{cm}^{-1}$  'deki iki pik bileşik 2'nin FTIR spektrumunda gözlenmedi. Bu sonuç bileşik 2'nin çift bağ içermediğini gösterdi ve bileşik 2'nin (*E*)-stilben oksit olabileceği fikrini daha da desteklemekteydi.

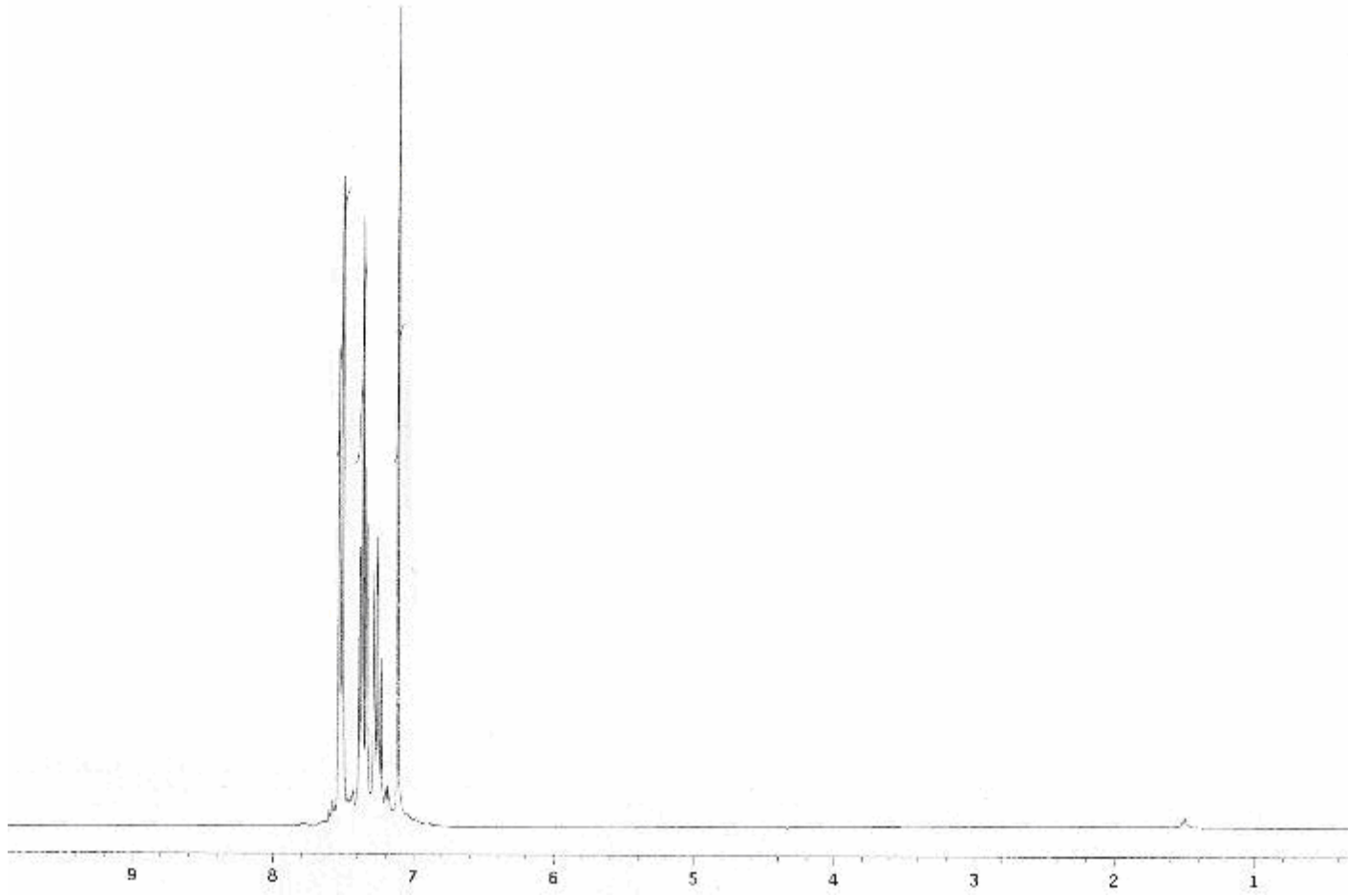
(*E*)-Stilben ile bileşik 1'in erime noktaları alındığında erime noktalarının oldukça yakın olduğu gözlemlendi. (*E*)-Stilben bileşiğinin erime noktası 120-123 °C olarak bulunurken bileşik 1'in erime noktası 122-124 °C olarak bulundu. Bu erime noktaları literatüre de (121-122 °C) uygunluk gösteriyordu [32]. Bileşik 2'nin erime noktası alındığında 68-70 °C olarak ölçüldü. Bu sonuç literatürdeki (*E*)-stilben oksit erime noktası (68-69 °C) ile de uyuşmaktaydı [33].

Bütün spektroskopik tekniklerden elde edilen bilgilerin ve erime noktalarının karşılaştırılması neticesinde (*E*)-stilben ile bileşik 1'in aynı maddeler olduğu bileşik 2'nin ise (*E*)-stilben oksit olduğu anlaşıldı.

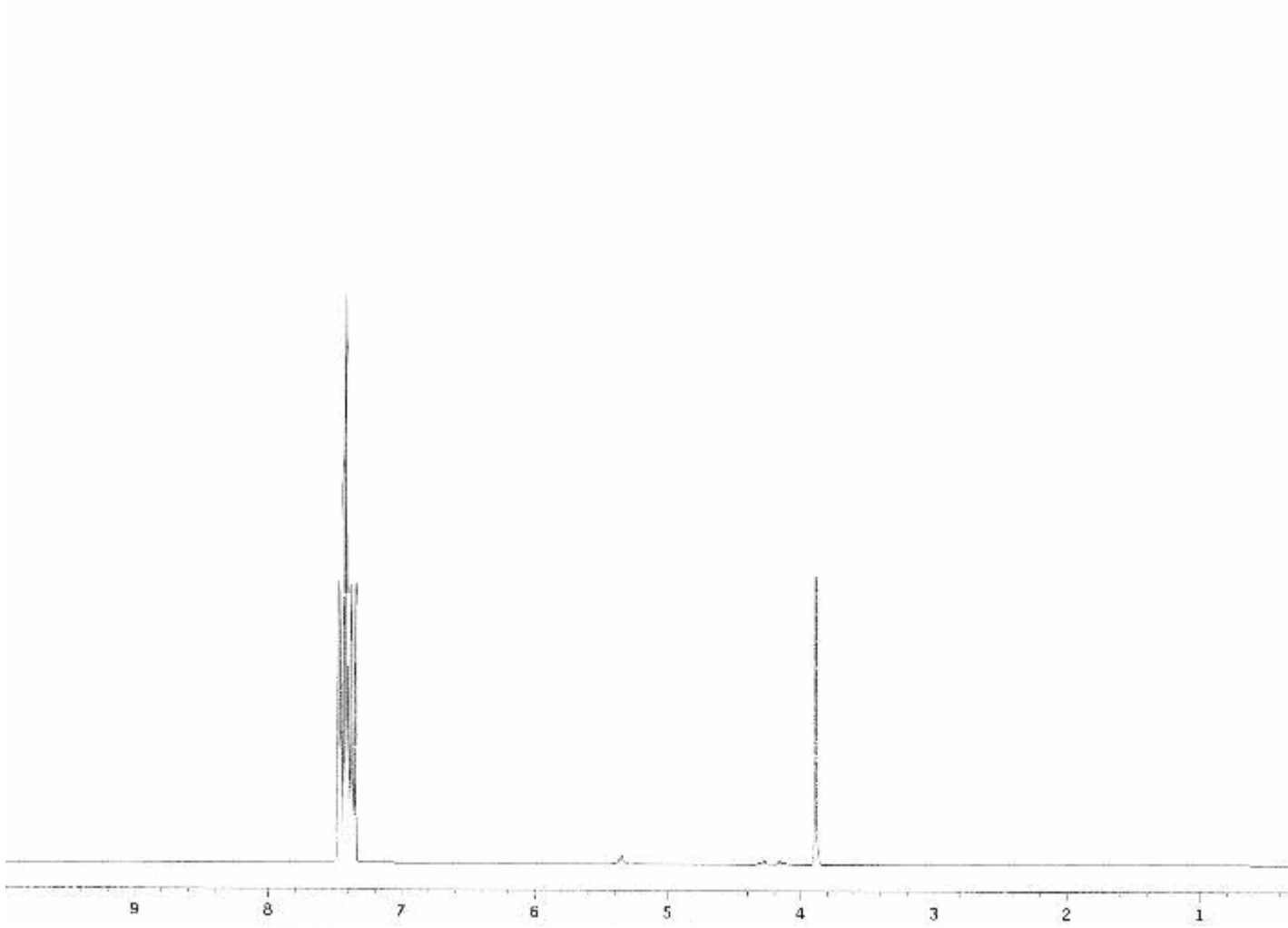




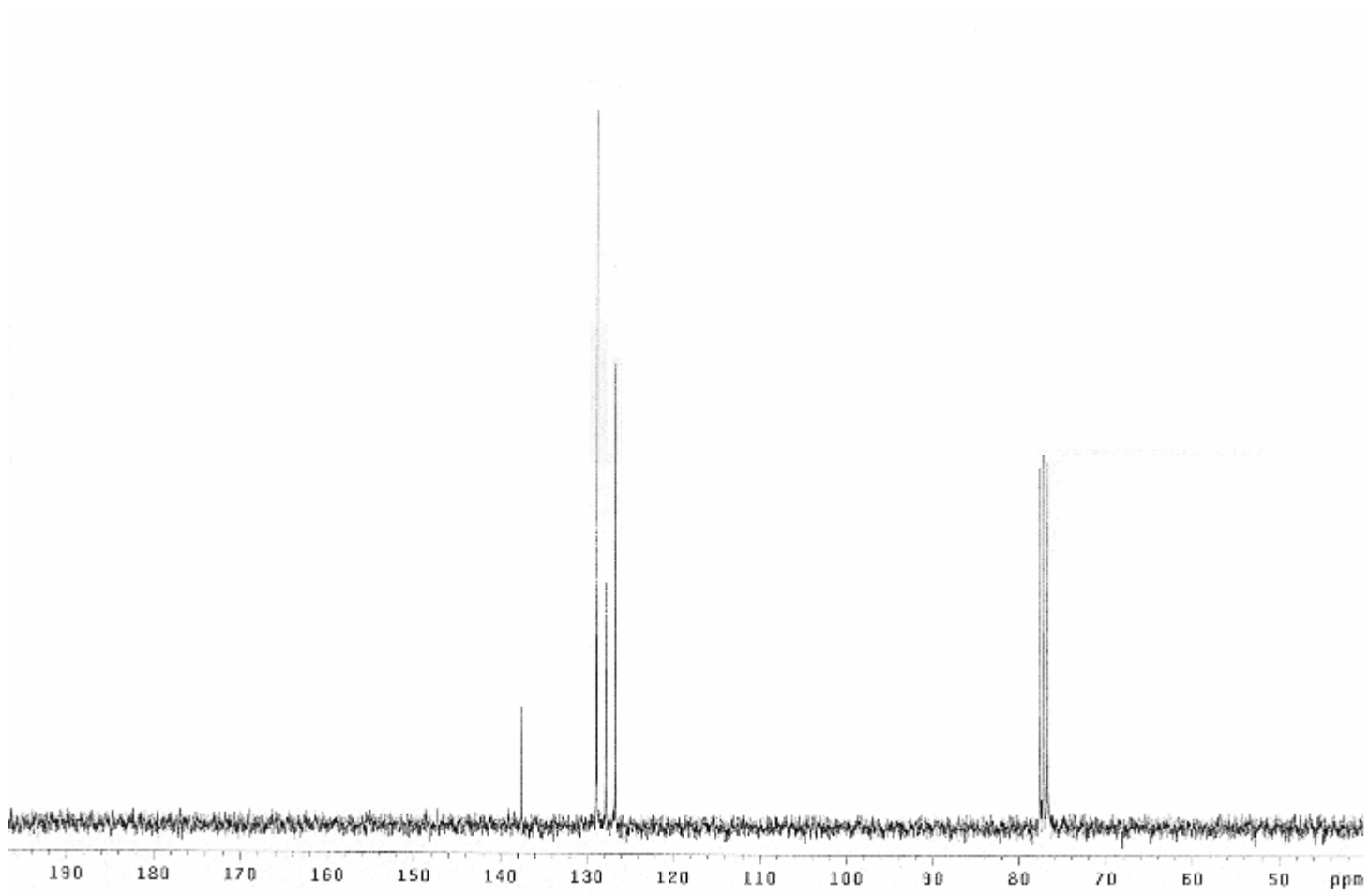
Şekil 4.2. (*E*)-Stilben'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



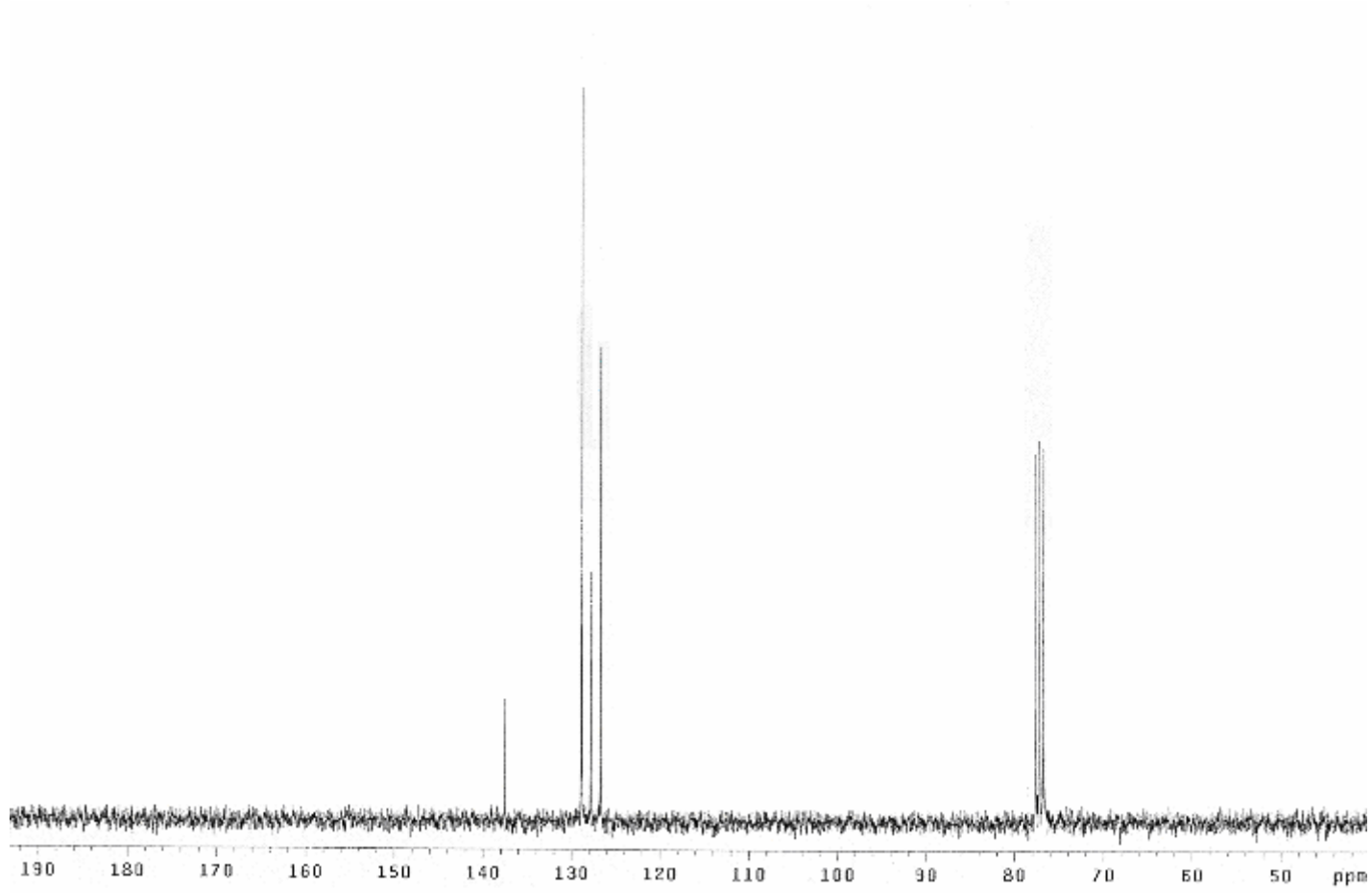
Şekil 4.3. Değişmeyen başlangıç maddesinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



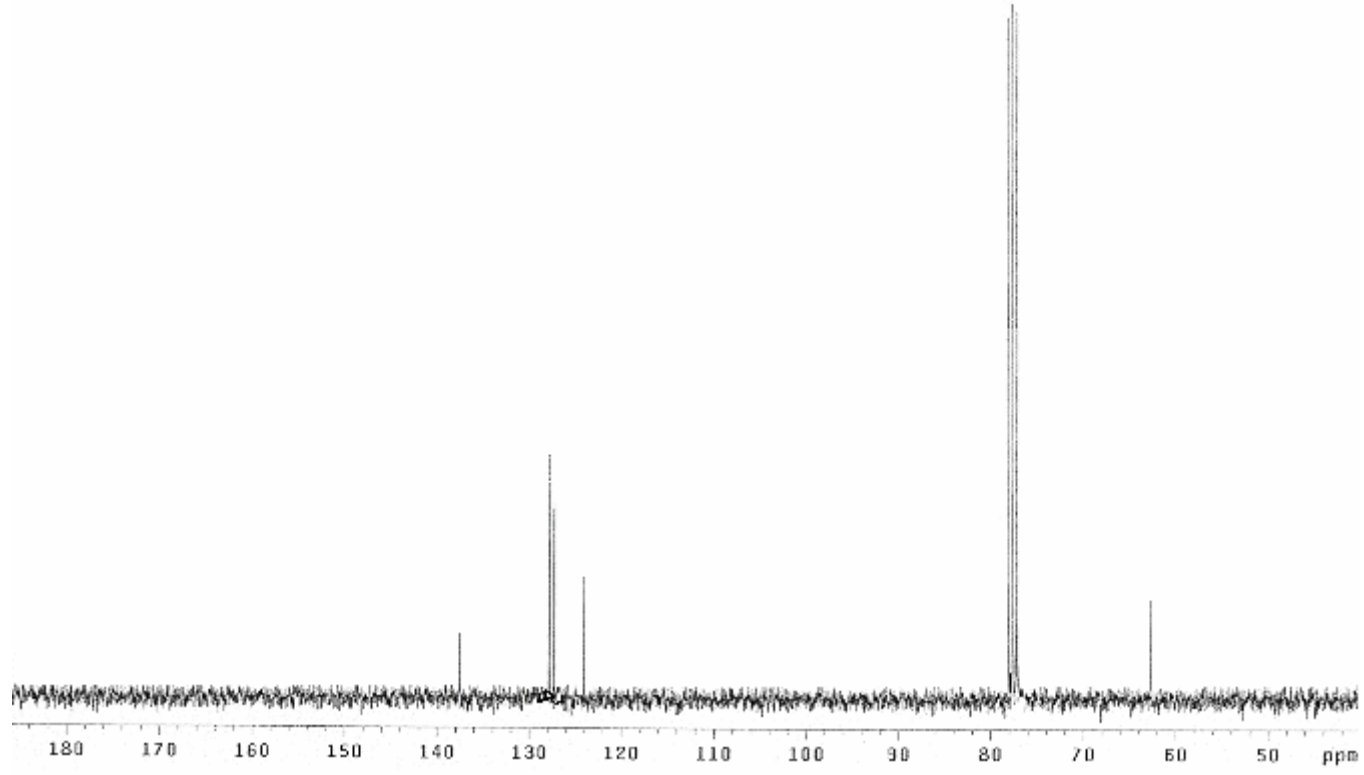
Şekil 4.4. (*E*)-Stilben oksit'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



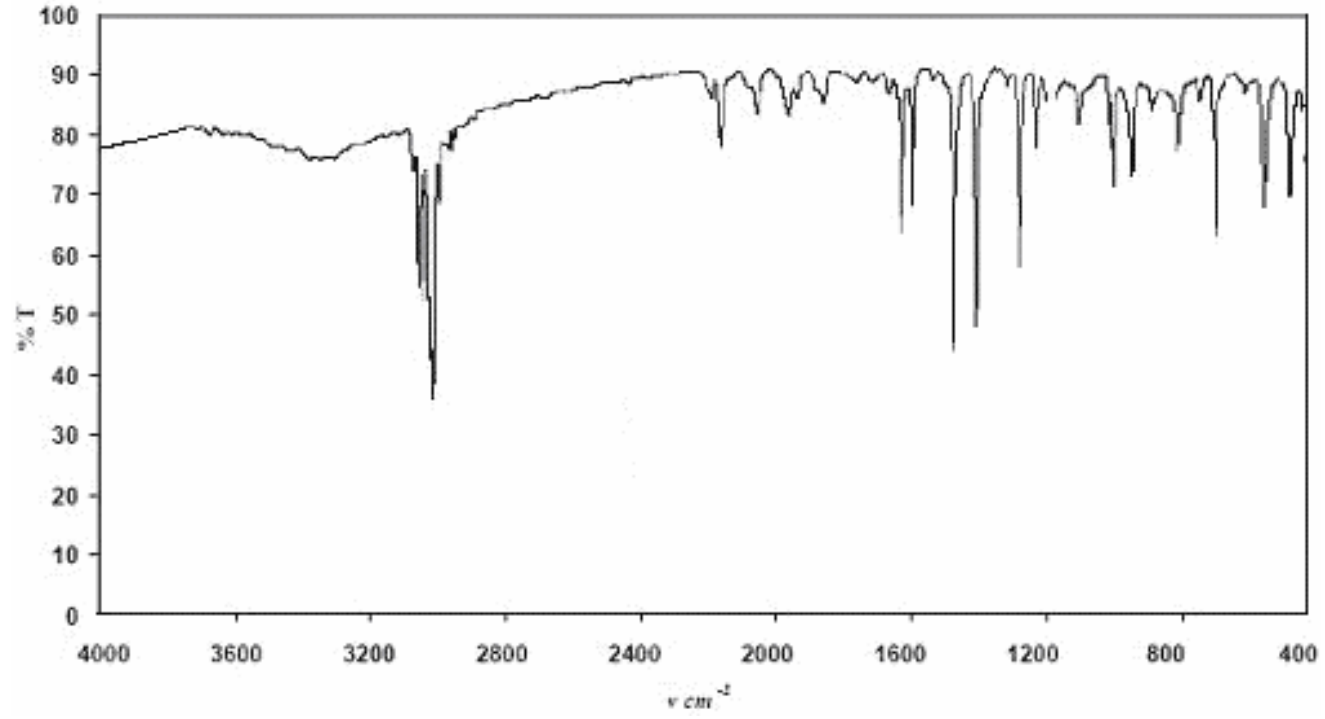
Şekil 4.5. (*E*)-Stilben'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



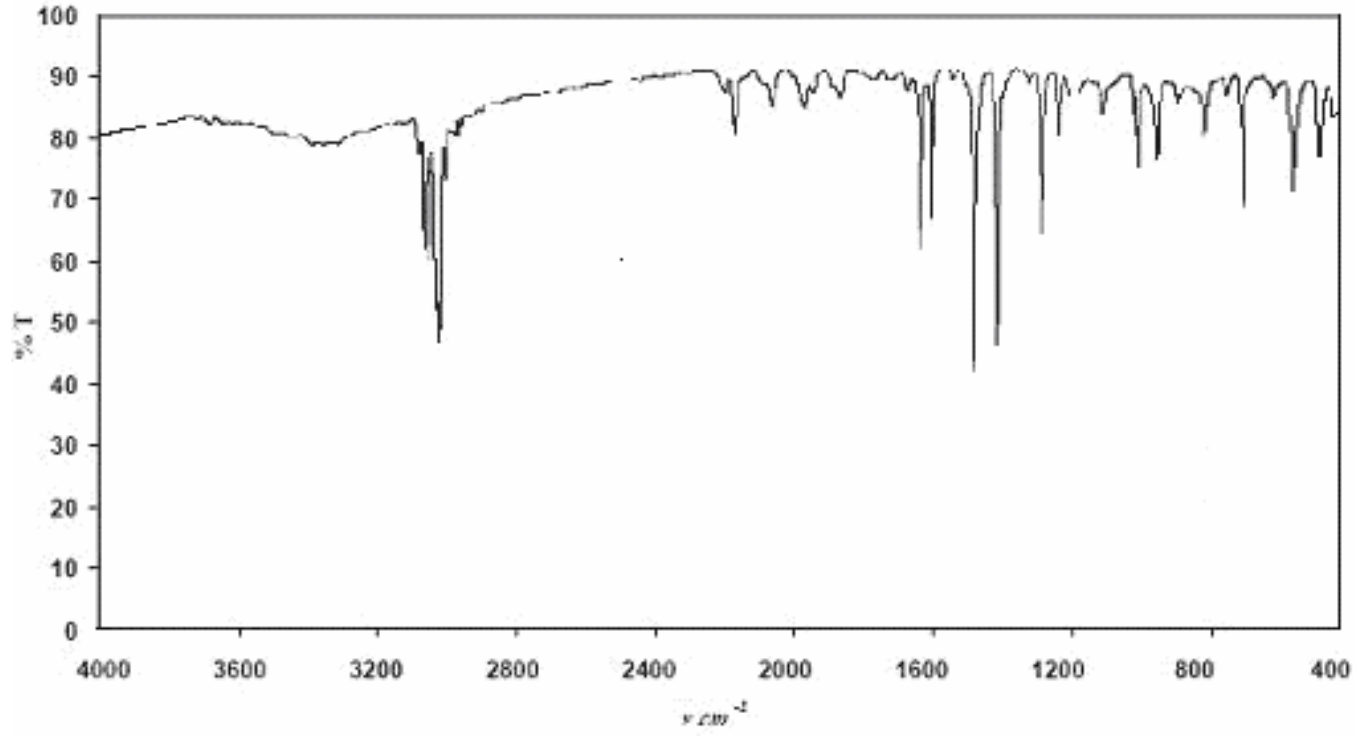
Şekil 4.6. Değişmeyen başlangıç maddesinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



Şekil 4.7. (*E*)-Stilben oksit'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

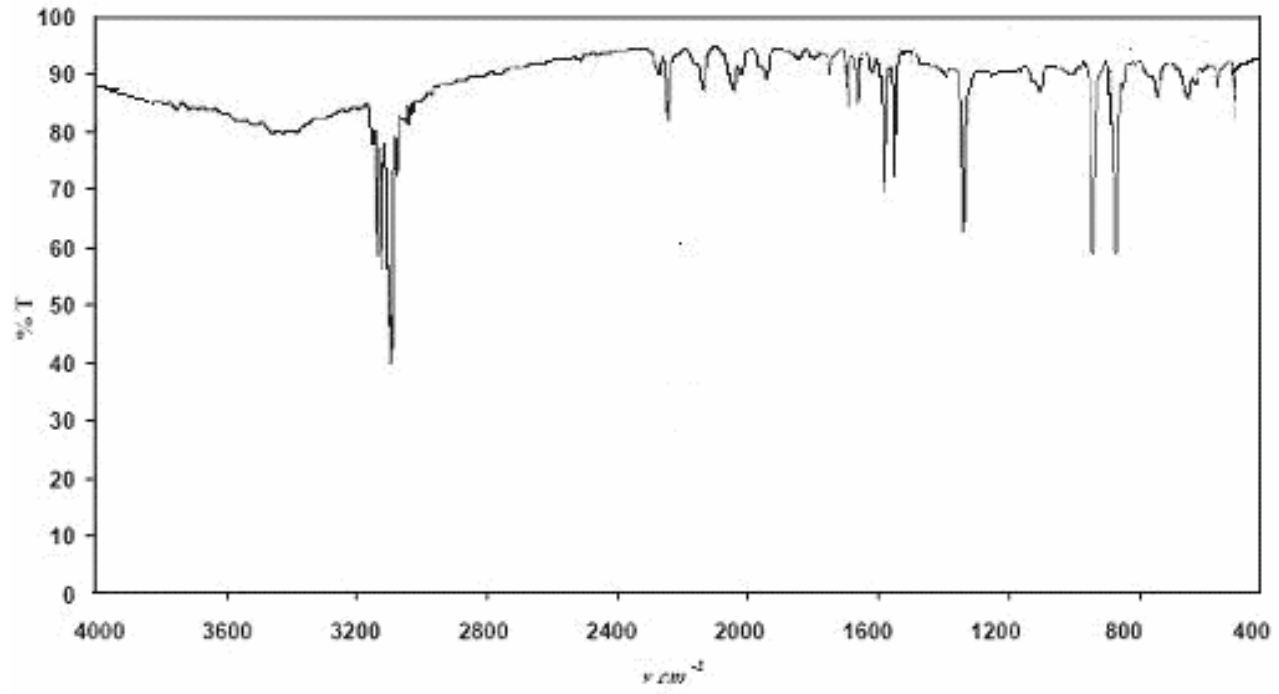


Şekil 4.8. (*E*)-Stilben'in FTIR spektrumu



Şekil 4.9. Değişmeyen başlangıç maddesinin FTIR spektrumu



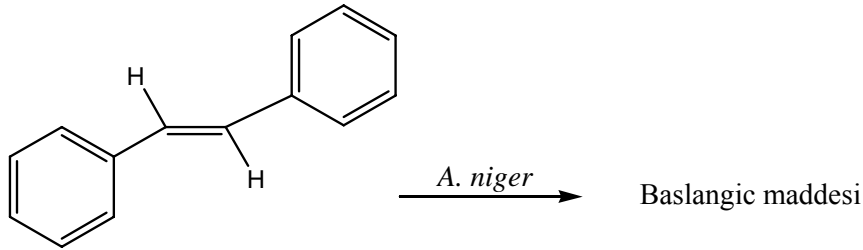


Şekil 4.10. (E)-Stilben oksit'in FTIR spektrumu

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR

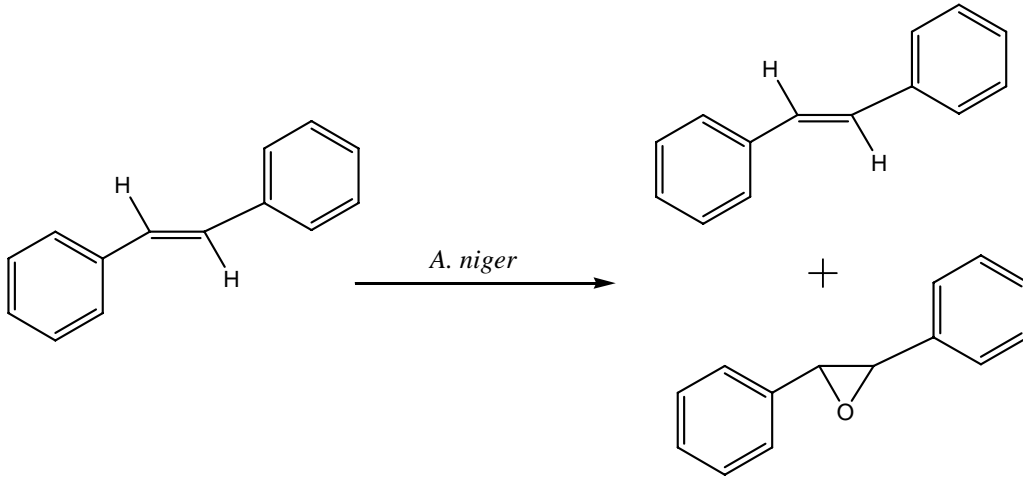
Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapı tayinleri (*E*)-stilben ve biyotransformasyondan elde edilen bileşiklerin  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, FTIR spektrumları ve erime noktaları alınarak yapıldı.

(*E*)-Stilben bileşiğinin (0,5 g) *Aspergillus niger* ile 7 gün süren ilk biyotransformasyonu esnasında erlenlerde renklenme gözlemlendi. Biyotransformasyon sonrasında gerçekleştirilen İTK çalışmasında 3 bileşik gözlenmesine rağmen sadece başlangıç maddesi (420 mg) elde edildi.



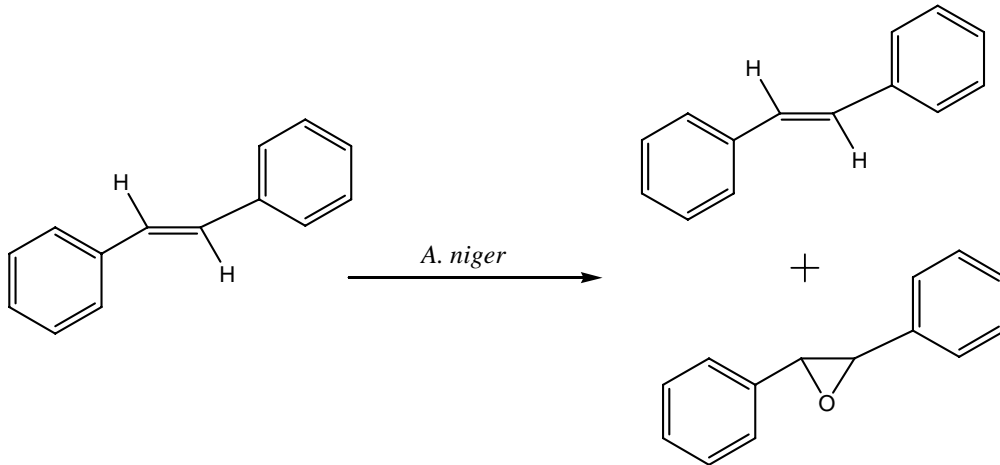
Şekil 5.1. (*E*)-Stilben'in *A. niger* ile 1. biyotransformasyonu

Daha fazla başlangıç maddesi (1 g) ile daha uzun süreli (10 gün) inkübasyon neticesinde İTK'da gözlenen diğer bileşikleri elde edebilmek için biyotransformasyon çalışması ikinci kez tekrarlandı. İkinci biyotransformasyon esnasında erlenlerde yine renklenme gözlemlendi. Bu biyotransformasyon çalışması sonucunda başlangıç maddesi (800 mg) ve İTK'da gözlenen ikinci bileşik olan (*E*)-stilben oksit (8 mg) elde edildi.



Şekil 5.2 (*E*)-Stilben'in *A. niger* ile 2. biyotransformasyonu

İTK'da gözlenen üçüncü bileşiği elde edebilmek ve ilk iki biyotransformasyon esnasında oluşan renklenmenin sebebinin ortaya çıkarılması için son bir biyotransformasyon çalışması daha gerçekleştirildi. Renklenmenin sebebinin anlamak için erlenlerden birisi sterilizasyon kontrolü diğeri ise biyotransformasyon kontrolü olarak kullanıldı. Üçüncü biyotransformasyon çalışması sonucunda başlangıç maddesi (820 mg) ile (*E*)-stilben oksit (10 mg) elde edilirken üçüncü bileşik yine elde edilemedi ve kontroller harici erlenlerde yine renklenme gözlemlendi.



Şekil 5.3 (*E*)-Stilben'in *A. niger* ile 3. biyotransformasyonu

Üçüncü biyotransformasyon çalışması esnasında kullanılan sterilizasyon kontrolü sadece otoklavda sterilize edilen besiyeri içeriyordu. Küf ve (*E*)-stilben ilave edilmeyen bu erlende inkübasyon esnasında renk değişimi gözlenmemesi renklenmenin sterilizasyon yetersizliğinden kaynaklanmadığını gösterdi. Eğer

sterilizasyon yetersizliği olsaydı sterilizasyon kontrolünde de renklenme gözlenebilirdi. Sterilizasyon kontrolünde renklenme gözlenseydi sterilizasyon yetersizliği sonucunda besiyerinde varlığını sürdüren mikroorganizmalardan dolayı bir renk değişimi olduğu söylenebilirdi. Son biyotransformasyon çalışmasında kullanılan biyotransfromasyon kontrol erleni ise steril besiyeri ve (*E*)-stilben bileşiği içerirken küf içermiyordu. Küf içermeyen bu erlende renklenme oluşmadı. Bu sonuç, kontrol erlenleri harici diğer erlenlerde küfün (*E*)-stilben bileşiğini yeni bileşiklere dönüştürdüğünü ve inkübasyon sonucu oluşan renklenmenin biyotransformasyon sonucunda oluşan bu bileşiklerden kaynaklandığı ortaya çıkardı.

## BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Çalışmanın amacı (*E*)-stilben bileşiğinin *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonu neticesinde resveratrol gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olan hidroksillenmiş stilbenoidler elde etmektir. Bu amaçla (*E*)-stilben bileşiğinin (500 mg) *Aspergillus niger* ile 7 gün inkübasyonu sonucunda İTK çalışmasında 3 bileşik gözlenmesine rağmen sadece ilk bileşik olan başlangıç maddesi elde edildi. İTK çalışmasında gözlenen diğer iki bileşiği elde etmek için daha fazla miktarda (*E*)-stilben (1 g) bileşiğinin 10 gün süren ikinci ve üçüncü biyotransformasyonları gerçekleştirildi. Son iki biyotransformasyon çalışması sonucunda başlangıç maddesinin çoğu ve çok az miktarlarda olmak üzere (*E*)-stilben oksit bileşiği elde edildi.

Bütün bu sonuçlar *Aspergillus niger* küfünün (*E*)-stilben bileşiğini beklenen şekilde metabolize edemediğini ve bu yolla resveratrol gibi hidroksillenmiş stilbenoidler elde edilemeyeceğini gösterdi. (*E*)-Stilben bileşiği *Aspergillus niger* tarafından aromatik hidroksilasyon ile resveratrol benzeri bileşiklere dönüştürülmek yerine çok düşük verimli bir epoksidasyon sonucunda (*E*)-stilben oksit bileşiğine dönüştürüldü.

Daha öncede belirtildiği gibi aromatik hidroksilasyon ve epoksidasyon reaksiyonları, çoğu canlılarda bulunan ve aynı zamanda neredeyse bütün biyotransformasyon reaksiyonlarını da katalizleyen sitokrom P450 enzimleri tarafından gerçekleştirilir [27]. (*E*)-Stilben bileşiğinin insanlarda ve farelerde aromatik hidroksilasyona maruz kalmasına rağmen aynı bileşiğin *Aspergillus niger* küfü ile düşük verimli epoksidasyonu, bu canlılarda farklı sitokrom P450 enzimlerinin bulunmasından kaynaklanabilir. Yapılan çalışmalar aynı substratlara bile farklı ilgileri olan yüzlerce farklı sitokrom P450 enzimi bulunduğunu göstermektedir [34].

Aynı çalışmanın diğer mikroorganizmalar ile denenmesi aromatik hidroksilasyon veya epoksidasyon ve hatta daha farklı bir reaksiyon ile sonuçlanabilir. Bu sebeple resveratrol ve benzeri hidroksillenmiş stilbenoidleri hazırlamak için daha farklı mikroorganizmalar ile (*E*)-stilben bileşiğinin biyotransformasyonları denenebilir. Örneğin, bu amaç için *Rhizopus*, *Cunninghamella* ve *Mucor* gibi biyotransformasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan diğer mikroorganizma cinslerine ait türler kullanılabilir [29].

## KAYNAKLAR

- [1] GRAYER, J.R., KOKUBUN,T., “Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants”, *Phytochemistry*, 56, 253-263, 2001.
- [2] HARBORNE, J.B., “The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 335-367,1999.
- [3] CREASY, L.L., CREASY, M.T., “Grape chemistry and the significance of resveratrol: An overview”, *Pharm Biol* 36, 8-13, 1998.
- [4] WENZEL, E., SOMOZA, V., “Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol”, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 1-10. 2005.
- [5] SCHRÖDER, G., BROWN, J.W.S., SCHRÖDER, J.,”Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase”, *European Journal of Biochemistry* 172, 161-169 (1988).
- [6] FLIEGMANN, J., SCHRÖDER, G., SCHANZ, S., BRITSCH, L., SCHRÖDER, J., “Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants”, *Plant Molecular Biology* 18, 489-503 (1992).
- [7] TROPF, S., LANZ, T., RENSING, S.A., SCHRÖDER, J., SCHRÖDER, G., “ Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution”, *Journal of Molecular Evolution* 38, 610-618 (1994).
- [8] FILIP V., PLOCKOVA, M., SMIDRKAL, J., SPICKOVA, Z., MELZUCH, K., SCHMIDT, S., “Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness” , *Food Chemistry*, 83 (4): 585-593, 2003.
- [9] CHAN, M.M.Y., “Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin”, *Biochemical Pharmacology*, 63 (2), 99-104, 2002.
- [10] SMIDRKAL, J., SPICKOVA, Z., MELZUCH, K., MELZUCH, SCHMIDT, S., “Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness”, *Biochemical Pharmacology* , 63 ( 2) , 99-104 , 2002.
- [11] GIUGLIANO, D., “Dietary antioxidants for cardiovascular prevention”, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 10, 38-44.

- [12] SAVOURET, J.F., QUESNE, M., "Resveratrol and cancer: a review", *Biomed Pharmacother*, 56, 84-87, 2002.
- [13] JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K.V., THOMAS, C.F., BEECHER, C.W., FONG, H.H., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., MEHTA, R.G., MOON, R.C., PEZZUTO, J.M., "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 449-466, 2005.
- [14] SURH, Y.J., "Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals", *Nat. Rev. Cancer* 3, 768 – 780, 2003.
- [15] EVANS, D.A., HIRSCH, J.B., DUSHENKOV, "Review: Phenolics, Inflammation and Nitrogenomics", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2503-2509, 2006.
- [16] LI, Y., LI, Z., ZHAO, W., WEN, R., MENG, Q., ZENG, Y., "Synthesis of Stilbene derivatives with inhibition of SARS coronavirus replication", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 1084-1089, 2006.
- [17] FERRE-FILMON, K., DELAUDE, L., DEMONCEAU, A., NOELS, A.F., "Catalytic Methods for the Synthesis of Stilbenes with an Emphasis on Their Phytoalexins" *Coordination Chemistry Reviews*, 248, 2323-2336, 2004.
- [18] ANDRUS, M.B., LIU, J., MEREDITH, E.L., NARTEY, E., "Synthesis of Resveratrol using a Direct Decarbonylative Heck Approach from Resorcylic Acid", *Tetrahedron Letters*, 44, 4819-4822, 2003.
- [19] GUIISO, M., MARRA, C., FARINA, A., "A New Efficient Resveratrol Synthesis" *Tetrahedron Letters*, 43, 597-598, 2002.
- [20] FERRE-FILMON, K.; DELAUDE, L., DEMONCEAU, A.; NOELS, A. F., "Stereoselective Synthesis of (E)-Hydroxystilbenoids by Ruthenium-Catalyzed Cross-Metathesis", *European Journal of Organic Chemistry*, 3319-3325, 2005.
- [21] BOTELLA, L., NAJERA, C., "Synthesis of Methylated Resveratrol and Analogues by Heck Reactions in Organic and Aqueous Solvents", *Tetrahedron*, 60, 5563-5570, 2004.
- [22] FARINA, A., FERRANTI, C., MARRA, C., "An Improved Synthesis of Resveratrol", *Natural Products Reports*, 20 (3), 247-252, 2006.
- [23] ANDRUS, M.B., LIU, J., "Synthesis of Polyhydroxylated Ester Analogs of the Stilbene Resveratrol using Decarbonylative Heck Couplings", *Tetrahedron Letters*, 47, 5811-5814, 2006.



- [24] SOLLADIE, G. PASTUREL-JACOPE, Y., MAIGNAN, J., "A Re-investigation of Resveratrol Synthesis by Perkin Reaction. Application to the Synthesis of Aryl Cinnamic Acids, *Tetrahedron*, 59, 3315-3321, 2003.
- [25] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., "İnsan Biyokimyası", Palme Yayıncılık, 659, Ankara, 2002.
- [26] YILMAZER, S., "Triclosan antibiyotiğinin *Cephalosporium aphidicola* Küfû ile Biyotransformasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, 3, Sakarya, 2005.
- [27] DEVLIN, T.M., "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations", Third Edition. Willey-Liss, 981-997, USA, 1992.
- [28] BAMFORTH, S.M., SINGELTON, I., "Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 723-736, 2005.
- [29] HANSON, J.R., "An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry", W.H. Freeman Spektrum, 1-58, New York, USA, 1995.
- [30] SANO, S., KITAMURA, S., SUGIHARA, K., OHTA, S., "Cytochrome P450 1A1/2 Mediated Metabolism of Trans-Stilbene in Rats and Humans", *Biol. Pharm. Bull.*, 25 (3), 397-400, 2002.
- [31] KIRAN, I., YILDIRIM, H.N., HANSON, J.R., HITCHCOCK "The Antifungal activity and Biotransformation of Diisophorone by the Fungus *Aspergillus niger*", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1366-1370, 2004.
- [32] FLEMING, I., FRACKENPOHL, J., ILA, H., "Cleavage of Sulfonamides with Phenyltrimethylsilyllithium", *J. Chem.Soc., Perkin Trans.*, 1, 1229-1235, 1998.
- [33] ZHONG, Q., JIANGUO, S., CHANGQING, L., RONGJIAN, L., "Phase transfer catalyzed reaction of some telluronium salts with aromatic aldehydes", *Synth. Commun.*, 21 (7), S 869-876, 1991.
- [34] DOKMECİ, İ., "Farmakoloji Temel Kavramlar", Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., 72-74, İstanbul, 2000.

## ÖZGEÇMİŞ

Elif GÜN, 1981 yılında Sakarya'da doğdu. İlk öğrenimini Sakarya Atatürk İlkokulunda, orta öğrenimini Sakarya Atatürk Ortaokulunda ve lise öğrenimini de Sakarya Atatürk Lisesinde tamamladı. 2004 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimini tamamladı ve Toprak İlaç ve Kimyevi Maddeler A.Ş. de kalite güvence uzmanı olarak çalışmaya başladı. 2004-2005 döneminde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.