

Yeni Koku Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretimi

Türkan TİKNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Şubat 2014

Production of New Fragrance Compounds by Biotechnological Methods

Türkan TİKNA

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

February 2014

Yeni Koku Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemle Üretimi

Türkan TİKNA

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. İsmail KIRAN

Bu çalışma T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Sanayi Araştırma ve Geliştirme Genel Müdürlüğü tarafından 01.09.2010 tarih ve 00530.STZ.2010-1 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Şubat 2014

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Türkan Tikna'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Yeni Koku Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemle Üretimi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İsmail KIRAN

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Üye : Prof. Dr. Betül DEMİRCİ

Üye : Doç. Dr. Gökalg İŞCAN

Üye : Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Aroma, yani koku ve tat maddeleri gıda, içecek, kozmetik, deterjan, kimya ve ilaç sektörlerinde yaygın kullanım alanı olan katkı maddeleridir. Genelde doğal kaynaklardan veya kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. Aroma maddelerinin bitkilerden saflaştırılmaları genelde pahalı bir süreçtir. Kimyasal sentez ise yaygın kullanılan iyi bir alternatif olmakla birlikte kimyasal ürünlerin insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmesi ve tüketicilerin doğal ürünleri tercih etmeleri, kullanımlarını azaltmaktadır. Bu durum çevreye uyumlu ve doğal ürün üretimine yönelik talebi artırmış ve son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı önem kazanmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerde elde edilen aroma maddesi üretimi, günümüzde sadece düşük düzeyde gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada terpen yapısında olan α -iyonol bileşiğinin 19 farklı mikroorganizma ile ön denemeleri yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda α -İyonolün *A. Niger* ve *F. culmarum* ile biyotransformasyonları sonucu oluşan metabolit karışımlarının aroma özelliği gösterdiği belirlendi. Söz konusu biyotransformasyon tepkimeleri preparatif ölçekte tekrarlandı. Elde edilen metabolitler kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve yapıları GK-KS, 1D ve 2D NMR teknikleri ile aydınlatıldı. Her iki biyotransformasyon sonucu verimleri % 6,6 (*A. niger*) ve % 15,3 (*F. culmarum*) olan aynı metabolit elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Aroma maddeleri, biyoteknoloji, mikrobiyal transformasyon, α -iyonol, terpen

SUMMARY

Aroma compounds are flavour and fragrance which are highly important ingredients commonly used in many industries such as food, beverage, cosmetics, detergents and pharmaceuticals. Most of these compounds are produced by either chemical synthesis or extraction from plant sources. Obtaining aroma compounds from plants is expensive due to their isolation difficulties. Chemical synthesis serve as a good alternative for the production of aroma substances however they are not preferred due to harmful effects to the health and environment and the consumer's preference for natural products. This urged the need for the development of new environmentally friendly processes. In recent years, the utilisation of biotechnological processes for the production of aroma compounds appeared to be an important choice, however, still low percentages of are derived from bioprocesses.

In this study, pre-biotransformation of a terpene, α -ionol, was carried out by 19 different microorganisms. As a result it was found out that extract obtained from biotransformation of α -ionol with *A. niger* and *F. culmorum* showed aroma properties. These biotransformation reactions were repeated on preparative scale. The metabolites were purified by column chromatography and their structures were elucidated by using GC-MS, 1D and 2D NMR spectra. Both biotransformation reactions produced the same metabolite with % 6,6 (*A. niger*) and % 15,3 (*F. culmorum*) yield, respectively.

Keywords: Aroma compounds, biotechnology, microbial transformation, α -ionol, terpene

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans çalışmalarım boyunca, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, çalışmalarımı büyük bir titizlikle inceleyen, bilgilerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sayın İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımlarını ve imkânlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Fatih DEMİRCİ'ye,

Yüksek lisans esnasında bana çok büyük katkısı olan, bilgilerini paylaşan ve büyük bir destek gösteren, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü Araş. Gör. Özge ÖZŞEN'e, çalışmalarımın önemli kısımlarının mimarı olan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen değerli tez arkadaşım Nazife KAYA'ya, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli yüksek lisans arkadaşım Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümü Araş. Gör. Ahmet ESER'e, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü Laboratuvar teknisyeni Dilek DALYANCI'ya

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, her zaman sevgi ve hoşgörüsüyle yanımda olan değerli aileme,

Tez çalışmamı **00530.STZ.2010-1** nolu proje kapsamında destekleyen Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı ile Badebio Biyoteknoloji San. ve Tic. Ltd. Şti'ne,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Türkan TİKNA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
 2.KOKU VE TAT MADDELERİ	 3
2.1. Giriş.....	3
2.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Aroma Üretimi.....	4
2.2.1. Fermentasyon.....	9
2.2.2. Biyotransformasyon.....	10
2.3. Biyotransformasyon Yöntemiyle Elde Edilen Aroma Maddeleri	13
2.4. Terpenler.....	16
2.5. Megastigmanlar.....	20
2.6. Terpenlerin Biyolojik Etkileri.....	23
2.7. Terpenlerin Biyotransformasyonları.....	24
 3. MATERYAL, METOD VE DENEYSEL ÇALIŞMALAR	 28
3.1. Genel Deneysel Bilgiler	28
3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar	28
3.2.1. Materyal.....	28
3.2.2. Kimyasal maddeler ve çözücüler.....	29
3.2.3. Mikroorganizmalar.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları.....	30
3.3.1. Mikroorganizmaların üretimi ve çoğaltılması.....	30
3.3.1.1. Yatkı besı yeri.....	31
3.3.1.2. Sıvı besı yeri.....	31
3.3.2. Substrat hazırlanması ve ilavesi.....	32
3.3.3. Metabolitlerin ekstraksiyonu.....	32
3.3.4. Metabolitlerin izolasyonu.....	32
3.3.5. Metabolitlerin tanımlanması.....	33
 4. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	 35
4.1. Ön Deneme Sonuçları.....	35
4.2. Preparatif Ölçekte Çalışmalar.....	48
4.3. α -İyonol'un <i>A. niger</i> ve <i>F. culmorum</i> ile Biyotransformasyonu.....	49
4.4. Sonuçlar Değerlendirmesi ve Öneriler.....	53
 5. KAYNAKLAR DİZİNİ	 56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Mentol molekülündeki kiralite..... 5
2.2	Biyoteknoloji ve aroma üretimi..... 6
2.3.	Biyotransformasyon tepkimelerinin özellikleri..... 12
2.4.	Ferulik asitten biyotransformasyonla vanilin üretimi..... 13
2.5.	<i>Pseudomonas putida</i> tarafından gerçekleştirilen mandelik asit metabolizması..... 14
2.6.	<i>Yarrowia lipolytica</i> ile risinoleik asitin γ -delakton'a biyodönüşümü..... 15
2.7.	Terpen oluşumu..... 17
2.8.	İzopentenil pirofosfatın biyosentezi..... 19
2.9.	Terpenlerin biyosentezi 20
2.10.	β -Karoten'in degradasyonu ile oluşan α -İyonol yapısı..... 21
2.11.	Megastigman yapılarına örnek moleküller 21
2.12.	Farnesol molekülü 24
2.13.	α -Farnesen molekülü 26
2.14.	(-)- α - Bisabolol'ün <i>Bipolaris sorokiniana</i> ile biyotransformasyonu..... 26
2.15.	4 β -Hidroksiödesman-1,6-dion'un <i>G. roseum</i> ilebiyotransformasyonu.... 27
3.1.	Biyotransformasyon deneylerinde izlenen aşamaların şematik gösterimi... 34
4.1a.	α -İyonol'e ait ön deneme İTK sonuçları..... 36
4.1b.	α -İyonol'e ait ön deneme İTK sonuçları(devam)..... 37
4.2a	α -İyonol'ün ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları..... 38
4.2b.	α -İyonol'ün ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)..... 39
4.2c	α -İyonol'ün ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)..... 40
4.2d.	α -İyonol'ün ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)..... 41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2e. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	42
4.2f. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	43
4.2g. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	44
4.2h. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	45
4.2i. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	46
4.2j. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam).....	47
4.3. α -İyonol'un tahmini metabolitlerinin yapıları.....	48
4.4. α -İyonol'un <i>A. niger</i> ve <i>F.culmorum</i> ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK ve metabolit verileri.....	49
4.5. α -İyonol'un <i>A. niger</i> ve <i>F.culmorum</i> ile biyotransformasyonu.....	50
4.6a. M ₁ metabolitinin ¹ H NMR spektrumu.....	50
4.6b. M ₁ metabolitinin ¹³ C-NMR spektrumu	51
4.6c. M ₁ metabolitinin DEPT spektrumu.....	51
4.6d. M ₁ metabolitinin HMBC spektrumu.....	52
4.6e. M ₁ metabolitinin (GK/KS) kütle kromatogramı ve spekturumu.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Fermentasyon ve mikrobiyal biyodönüşümlerin genel özellikleri	7
2.2 Biyoteknolojik yolla üretilen bazı aroma maddeleri	8
2.3 Fermentasyonla üretilen bazı aroma maddeleri	9
2.4 Terpenlerin sınıflandırılması	17
2.5 α -İyonol'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	22
2.6 Perilil Alkol'ün biyolojik aktivitesi.....	23
3.1 Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	29
3.2 Kullanılan mikroorganizmalar	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
C	: Çözücü derişimi
^{13}C -NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
CDCl_3 :	: Dötoro kloroform
DEPT	: NMR tekniğı (-CH, -CH ₂ , -CH ₃ tespitinde kullanılır)
EtOAc	: Etil asetat
EtOH	: Etil alkol
g	: Gram
GK/KS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
H_2SO_4	: Sülfürik asit
HCl	: Hidroklorik asit
^1H -NMR	: Hidrojen nükleer manyetik spektroskopisi
HMBC	: Uzun mesafe proton ve karbon etkileşimlerinin korelasyonu
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MW	: Molekül ağırlığı
nm	: nanometre
ppm (mg/L)	: Bir litre çözeltideki çözünen maddenin miligram cinsinden değeri
rpm (devir/dk)	: Dakikadaki devir sayısı
UV	: Ultraviyole

BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ

Koku ve tat yani aroma maddeleri burun yoluyla ve ağızdayken geniz yoluyla algılanan uçucu, alifatik ve aromatik yapısında kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler gıdalarda çok sayıda ve düşük miktarda (nanogram ile mg arasında) bulunmalarına rağmen gıdanın kendine özgü duyuşal özelliğini belirlerler. Gıdaların aroması aldehitler, alkoller, ketonlar, esterler, laktonlar, terpenler, pirazinler, uçucu fenoller, kükürtlü bileşikler vb. gibi çeşitli kompleks madde ve gruplardan oluşmaktadır (Reineccius, 2006).

Koku ve tat maddeleri geleneksel olarak bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Ürün veriminin havanın etkisi ve bitki hastalıkları gibi etkilere bağıllılığı ve bu etkilerin kontrol edilmesinin güçlüğü alternatif kaynak arayışlarına yönelmiştir. Bunun sonucu olarak kimyasal sentezler ön plana çıkmıştır. Doğal maddelerden ekstraksiyon ile aroma üretimi devam etmekle birlikte mevcut aroma bileşiklerin çoğu (%84) kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. Fakat kimyasal sentezle elde edilen maddelerin tüketiciler gözünde sağlık açısından zararları olduğu algısı, pahalı olmasına rağmen doğal kökenli aroma maddelerine ilgiyi artırmıştır (Janssesns et al., 1992). Bu kapsamda biyoteknolojik bir yöntem olan mikrobiyal prosesler doğal kabul edilmiş ve son dönemde önem kazanmıştır (Soares et al., 2000).

Biyoteknolojik yaklaşım, doğal kaynaklardan ekstraksiyon ile aroma üretimi yöntemlerine göre ek avantajlar sağlamaktadır. Bunlar; iklim, tarımsal hastalık, zirai ilaç ve gübre kullanımından bağımsız olması, endüstriyel ölçekte üretim için mühendislik kullanılması, esnek tepkime koşulları, düşük maliyet ve çevre dostu teknoloji olmaları olarak sıralanabilir (Xu et al., 2007; Krings and Berger, 1998).

Bu tez çalışması kapsamında terpenoit yapısı olan α -iyonol molekülünün 19 farklı mikroorganizma ile mikrobiyal transformasyonu sonucu yeni doğal aroma maddelerinin eldesi amaçlanmıştır.

İlk bölümde tezin amacı tanımlanmış, ikinci bölümde tez konusuyla ilgili literatür araştırmalarıyla ilgili açıklayıcı bilgilere yer verilmiştir. Üçüncü bölümde araştırma sırasında yapılan deneysel bilgiler yer almaktadır. Dördüncü bölümde deneysel sonuçlar raporlanmış, sonuçlar yorumlanmış ve gerekli önerilere yer verilmiştir.

BÖLÜM 2: KOKU VE TAT MADDELERİ

2.1. Giriş

Aroma maddeleri, gıda ve beslenme ürünlerinin içeriklerine ilave edilen önemli bileşiklerdir. Sözkonusu maddelerin birinci amacı gıda maddesine lezzet vermektir. Aromalar gıda maddelerinin içerisine çok az miktarlarda ilave edilerek kullanılırlar (Krings and Berger, 1998).

Tek başlarına lezzetleri olmamalarına rağmen, katıldıkları gıda maddelerinin lezzetlerini arttırmaktadır. Çok az miktarlarda kullanıldıkları zaman bile etkileri fazladır. Bu maddelerin dildeki tat alma reseptörlerinin hassasiyetlerini arttırarak lezzeti zenginleştirdiği veya tükürük salgısını arttırarak bu işlevi yaptığı düşünülmektedir. Bu maddeler et, balık, sebze, meyve, tahıl, sıvı yağ ve kabuklu yemişlerde kullanılmaktadır (<http://www.zootechni.org.tr/upload/File/Gida%20Katki%20Maddeleri.pdf>).

Aromaların ve hoş kokuların gıda, kozmetik, kimyasal ve ilaç sektörü gibi geniş uygulama alanları mevcuttur. Marketlerde satılan birçok üründe aroma maddesi kimyasal sentezle üretilmiş ya da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan ekstre edilmiştir (Vandamme, 2003). Aromalar; doğal ve sentetik olarak üretilen aromalar olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde aroma maddeleri doğal ve yapay olarak ikiye ayrılmıştır. Doğal aroma maddeleri “uçucu yağlar, yağlı reçineler, protein hidrolizatları, baharat, meyve suyu, sebze veya sebze suyu, yenilebilir maya (ekmek ve bira mayası), bitki tomurcuk, kabuk, kök ve yaprakları, et, deniz ürünleri, kümes hayvanları, yumurta

ve süt ürünlerinin kızartılması, ısıtılması ve enzimle muamele edilmesinden sonra elde edilen distilatları veya esas işlevi aroma vermek olan fermentasyon ürünleri’’ şeklinde tanımlanmıştır. Avrupa Birliği Mevzuatı’nda ise doğal aroma maddeleri, “ bitkisel veya hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla elde edilen aroma verici madde veya madde karışımları’’ olarak ifade edilmiştir (Vandamme and Soetaert, 2002).

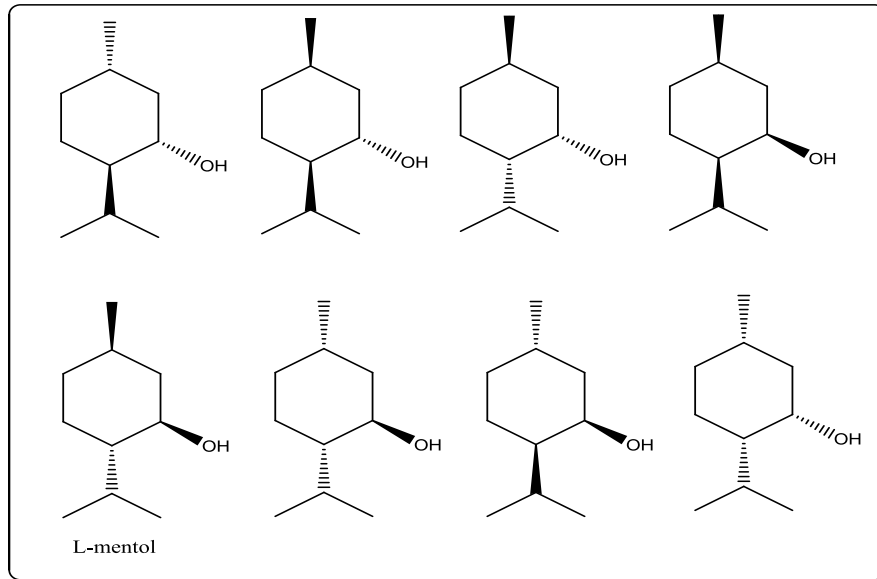
Her iki tanımda da bahsedildiği gibi aroma maddelerinin doğal olarak adlandırılması için elde edildiği hammaddenin de (substrat veya n bileşik) doğal olması gerekmektedir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1997). Birçok Avrupa ülkesinde doğal ve yapay aroma maddelerinin yanında doğala özdeş aroma maddeleri ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir. Kimyasal yollarla sentezlenen bu bileşikler, doğal formlarıyla aynı özellikleri gösterirler (Vandamme and Soetaert, 2002; Janssens et.al.,1992). Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre aroma maddeleri, doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, aroma karışımları, tepkime aromaları ve tütsü aromaları olarak sınıflandırılırlar (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1997).

2.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Aroma retimi

Eski zamanlardan beri, kompleks karışımlardan tek ürünlere kadar lezzet bileşikleri bitkisel kaynaklardan elde edilmiş veya fermentasyon ile üretilmiştir. Bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasıyla, daha fazla sentetik tatlar kullanılabilir hale gelmiştir. Bu ilerlemelere rağmen, birçok lezzet bileşikleri hala ekonomik nedenler ve tüketicinin doğal ürün tercih etmeleri sebebiyle bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir (Dziezak, 1986). Son yıllarda, piyasada var olan ve kullanılan sentetik aroma maddelerinin zehirli etkileri göz önünde bulundurulduğunda, doğal olmayan aroma

maddelerinin kullanımını kısıtlamış ve doğal aroma maddelerine olan talebi artırmıştır (Tyrrell, 1990).

Bitkilerden ekstraksiyon yoluyla doğal ürünler elde etmek zorlu bir süreci içermektedir. Bu yöntemde karşılaşılan güçlükler arasında; tarıma bağımlılık ve çevresindeki tüm faktörler (iklim, mevsim, sosyal ve siyasi durum), hammaddelerin azalan kaynakları, daha yüksek verimde ürün elde etmek için yüksek bütçeli harcamalar, oluşan ürünlerin miktar değişkenliği ve kalitesini sağlamada yaşanan sorunlar bulunmaktadır. Mentol molekülündeki kiralite Şekil.2.1’de gösterilmiştir. (Welsh et. al., 1989).

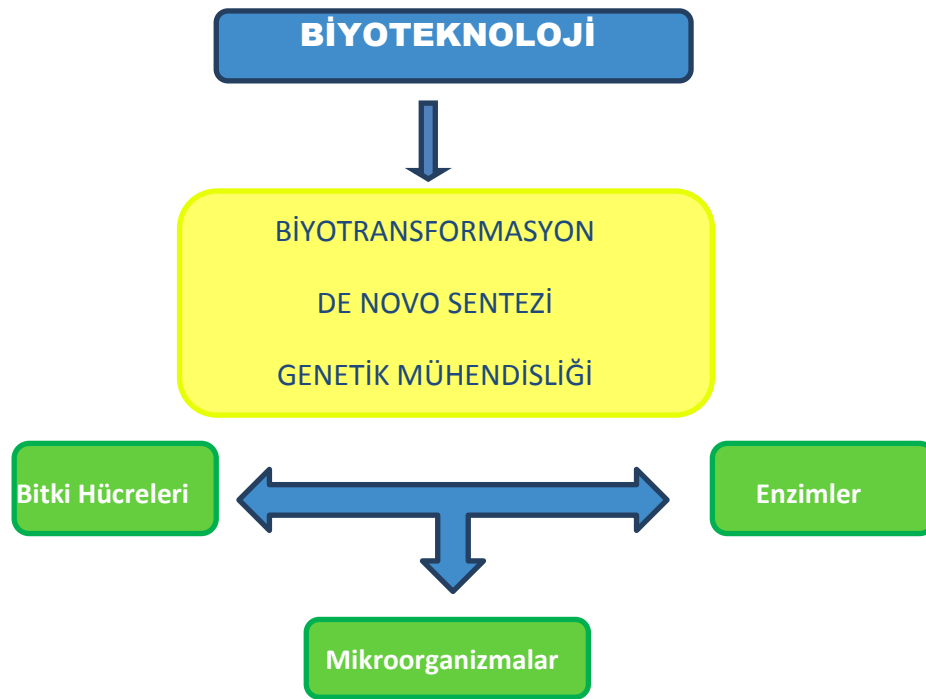


Şekil 2.1 Mentol molekülündeki kiralite

ABD ve Avrupa'da mevzuat uyarınca, biyoteknolojik yöntemlerle aroma maddelerinin üretimi çok cazip bir alternatif yöntemdir. Buna ek olarak kimyasal sentezle karşılaştırıldığında biyoteknolojik yaklaşım, sonraki ayırma basamaklarını ortadan kaldırarak kiralitenin etkisiyle koku algısını geliştirerek doğada olduğu gibi

kararlı enantiyomerik karışımlar sunmaktadır (Berger et. al., 2002). Örneğin 8 tane izomerik formdan sadece L-mentol karakteristik nane aromasını verir.

Biyoteknoloji; tek basamaklı biyotransformasyon ve mikroorganizmaların, bitki hücrelerinin ve enzimlerin *de novo* sentezi gibi yöntem seçenekleri sunmaktadır. (Bkz. Şekil 2.2.) İzole edilmiş enzimlerle tek adımlı işlemler yürütmek mümkün iken, tam hücreler ürün karışımları ve kompleks hedefler için kullanılmaktadır. (Krings and Berger, 1998; Lindsay and Willis, 1989; Knorr, 1987).



Şekil 2.2. Biyoteknoloji ve aroma üretimi

Mikrobiyal yaklaşım tarafından sunulan seçenekler; *de novo* sentez ve biyodönüşüm/ biyotransformasyon tepkimeleridir (Krings and Berger 1998). *De novo* sentezinde makro moleküller (karbonhidrat, yağ ve proteinlerin) katabolize edilerek yıkım ürünleri oluşur. Daha sonra bu moleküller mikroorganizmaların ikincil

metabolizmaları sonucunda daha karmaşık aroma moleküllerine dönüştürülür (Rodriguez-Bustamante and Sánchez, 2007).

Fermentasyon ve mikrobiyal biyodönüşümlerin genel özellikleri Çizelge 2.1’de sunulmuştur (Winterhalter and Schrier, 1993).

Çizelge 2.1. Fermentasyon ve mikrobiyal biyodönüşümlerin genel özellikleri

Özellik	Fermentasyon	Mikrobiyal Biyodönüşüm
Mikroorganizmalar	Çoğalan hücreler	Çoğalma evresindeki ve durgun evredeki hücreler
Tepkime	Karmaşık tepkimeler	Basit (tek veya birkaç basamaklı) katalitik tepkimeler
Tepkime süresi	Uzun	Kısa
Substrat	Ucuz karbon ve azot kaynakları	Spesifik
Ürün	Doğal	Doğal veya yapay
Ürün miktarı	Az	Yüksek
Ürün saflaştırması	Zor	Kolay

Gıda, ilaç ve parfüm endüstrisinde sıkça kullanılan, biyoteknolojik yolla üretilen bazı aroma maddeleri ve bunları üreten mikroorganizmaların adlarını Çizelge 2.2’de sunulmuştur (Berger, 2009; Krings and Berger, 1998).

Çizelge 2.2. Biyoteknolojik yolla üretilen bazı aroma maddeleri

Aroma Maddesi	Mikroorganizma	Kaynak
Vanilin	<i>Pycnoporou cinnabarinus</i>	Falconnier et al., 1994
Benzaldehit	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Fabre et al., 1996
4-Metoksibenzaldehit	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Fabre et al., 1996
Metil salisilat	<i>Phellinus</i> sp.	Welsh, 1994; Manley, 1994
Metil benzoat, Etil benzoat 2-Feniletanol	<i>Polyporus tuberaster</i> , <i>Phellinus</i> sp.	Kawabe and Morita, 1993
Lenthionin	<i>Ascoidea hylecoeti</i>	Berger, 1995
Citronellol	<i>Lentinus edodes</i>	Yasumoto et al., 1994
Linalol	<i>Mycena pura</i>	Krings et al., 1995
Metil ketonlar	<i>Pleuroutus euosmus</i>	Berger, 1995
Kumarinler	<i>Wolfiporia cocos</i>	Krings et al., 1995
Pirazinler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.,	Hagedorn and Kaphammer, 1994; Armstrong and Brown, 1994; Manley, 1994
Laktonlar	<i>Aspergillus</i> sp.	Seitz, 1994
Uzun zincirli yağ asit esterleri	<i>Pseudomonas</i> sp.	Feron, et.al.,1996
Kükürt içeren maddeler	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Armstrong and Brown, 1994
Furaneol	<i>Marasmius alliaceus</i>	Rapior et al., 1997
Makrolit laktonlar	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Hecquet et al., 1996
Feniletanol ve Esterler	<i>Torulopsis bombicola</i>	Jeffcoat and Willis, 1998
Geraniol	<i>Kluyveromyces</i> sp.	Welsh, 1994
Kısa zincirli yağ asitleri	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Sharpell and Stemann, 1979
2-Asetil-1-pirolin	<i>Bacillus cereus</i>	Romanczyk et al., 1995
Nootkaton	Toprak bakterileri	Latrasse et al., 1985

2.2.1. Fermentasyon

Bütün hücre sistemleri karbonhidratların, yağların ve aminoasitlerin yıkımını gerçekleştirir ve elde ettikleri son yıkım ürünlerini başlangıç maddesi olarak kullanarak kompleks aroma moleküllerine dönüştürürler. (Bkz. Çizelge 2.3) Bu yöntem fermente edilmiş gıda maddeleri ile çeşitli aroma kimyasallarının üretimi sırasında geleneksel olarak kullanılan bir özelliktir (Engels and Visser 1994; Imhof and Bosset 1994; Jeon 1994; Pinches 1994; Hamada et al., 1991; Maarse 1991). Ortak maya kültürleri önemli ölçüde primer metabolit üretirler fakat bunun yanında kısa zincirli alkoller, ketonlar, metil ketonlar, aldehitler, pirazinler ve laktonlar gibi küçük miktarlarda aroma özeliği gösteren uçucu bileşikler de üretirler (Cogan 1995; Imhof and Bosset 1994).

Fermentasyon yoluyla aroma maddelerinin üretiminde verim genellikle düşüktür. Son yıllarda genetik mühendisliğinin sağladığı olanaklar sayesinde fermentasyon için kullanılan mikroorganizmalar ve fermentasyon ortamı geliştirilip ürün verimi artırılmıştır (Reineccius, 2006).

Çizelge 2.3. Fermentasyonla üretilen bazı aroma maddeleri

Mikroorganizma	Aroma Maddesi	Oluşan Koku	Kaynak
<i>Yarrowia lipolytica</i>	γ -Dekalakton	Şeftali	Neto et al., 2004
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Feniletanol	Gül	Vandamme, 2003
<i>Williopsis saturnus</i>	İzoamil asetat	Muz	Janssens et al., 1987
<i>Pichia anomala</i>	Etil asetat	Meyvemsî	Vanderhaegen et al, 2003
<i>Sporobolomyces odoros</i>	γ -Dekalakton	Şeftali	Neto et al., 2004
<i>Trichoderma</i> sp.	6-Pentil- α -piron	Hindistan cevizi	Rocha-Valadez et al., 2006
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Pirazin	Pişmiş gıda	Deetae et al., 2007

2.2.2. Biyotransformasyon

Biyotransformasyon biyolojik sistemlerin veya izole enzimlerin katalizör olarak kullanılarak kimyasal moleküllerin yapısal değişikliğe uğratılmaları olarak tanımlanabilir. Biyotransformasyonda hedeflenen ürün yani metabolit için substrat ile arasındaki dönüşümde enzimler ya da bütün hücreler kullanılmaktadır (Oreste and Hans-Peter, 2010).

Mikroorganizmalar çok farklı tipteki substratları metabolize edebilmektedirler (Arnold, 2000; Loughlin, 2000). Bitki hücreleri ile karşılaştırıldığında, mikroorganizmalar daha kolay gelişir. Hızlı büyüme oranları, fizyolojik kontrol ve genlerin manipülasyonu ile mikrobiyal hücreler biyotransformasyon için en uygun katalizör olarak kabul edilmektedir (Omeliński, 1923).

Canlılar hayatlarının belirli dönemlerinde ksenobiyotik olarak adlandırılan yabancı kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Bu maddelerin üzerinde enzimler veya enzimleri içeren hücre, doku, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları yoluyla meydana getirilen kimyasal değişikliklere de *biyotransformasyon* adı verilir. Bu tip biyotransformasyonların çoğu sitokrom P450 enzimleri ile gerçekleşmektedir (Onat vd., 2002; Yılmaz, 2005). Bu enzimlerin etkisi neticesinde genelde daha polar bileşiklere (metabolitler) dönüşen yabancı bileşikler vücudu daha kolay terkeder. Bu tür tepkimelerin mikroorganizmalar aracılığıyla bilinen substratlardan yola çıkarak, laboratuvar koşullarında yeni metabolitlerin sentezlenmesine ‘‘Mikrobiyal Transformasyon’’ adı verilmektedir (Roberts, 1992).

Biyotransformasyon tepkimelerinin kimyasal tepkimelere karşı birçok üstünlüğü vardır (Krings and Berger, 1998). Bunlar;

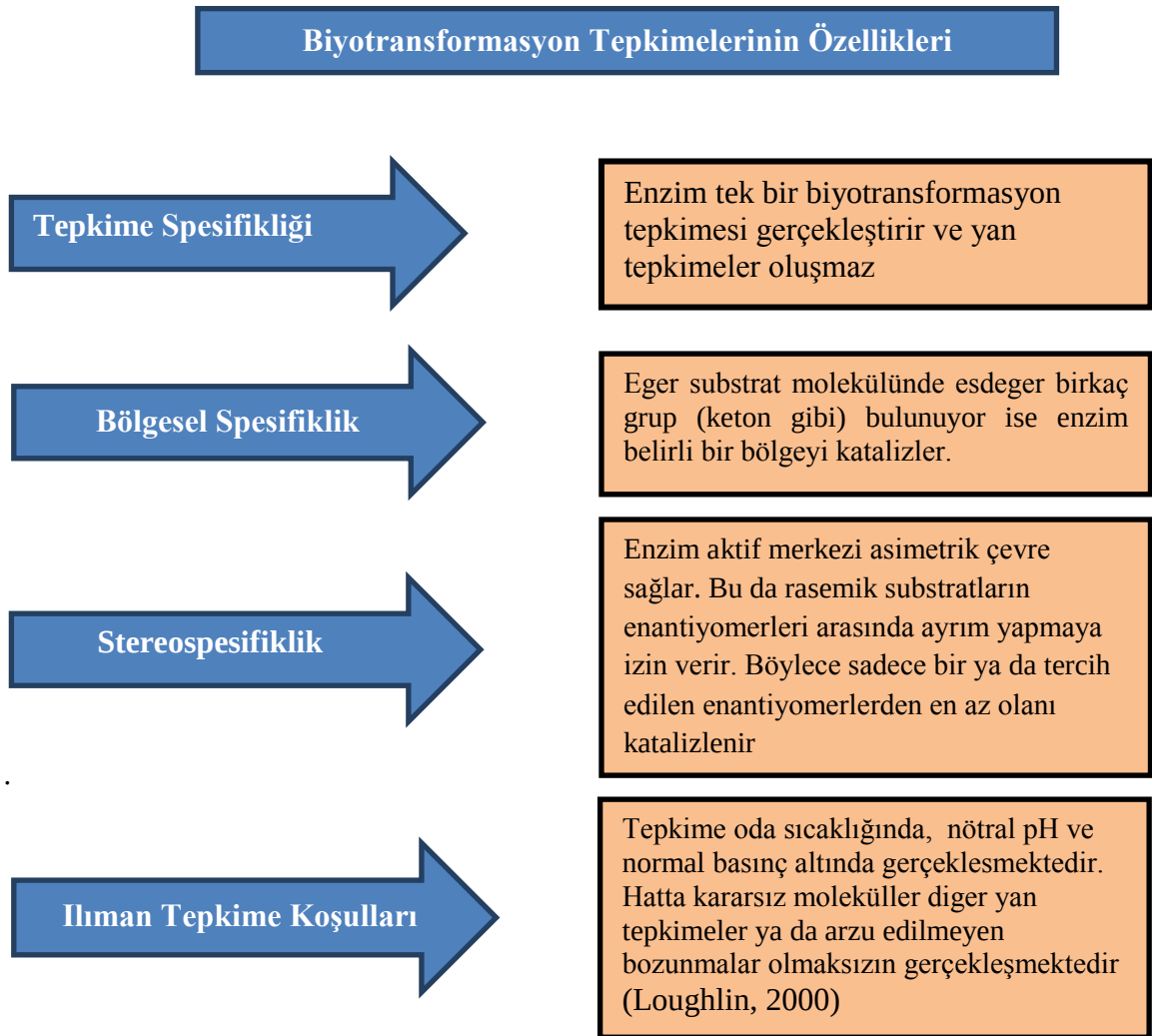
- kiral moleküller oluşturmaları veya korunması,
- kimyasal olarak inert olan karbon atomlarına fonksiyonel grup ilavesi,
- işlevsel moleküllerin fonksiyonel gruplarının seçici modifikasyonu
- kararlı rasemiklerin oluşması olarak sıralanabilir.

Mikrobiyal biyotransformasyonda verim fermentasyonla üretime göre genelde daha yüksektir. Mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri; yüksek substrat seçiciliği, az miktarda yan ürün oluşumu ve asıl ürünün kolay izole edilmesi ve saflaştırılması gibi önemli avantajlara sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem aroma maddelerinin yanında bazı katkı maddelerinin endüstriyel ölçekli üretimlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Peddie, 1990).

Biyotransformasyon tepkimeleri önemli terapötik bileşikler (doğada henüz bulunmayan) oluşturmak için bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Ji-Hua and Bo-Yang, 2010). Biyotransformasyon, fitokimyasalların kimyasal sentez yoluyla değiştirilemeyen kısımlarında değişiklikler yaparak onların analoglarını meydana getirir. İçerdiği tepkime türleri; hidroksilasyon, glikosilasyon, oksidoredüksiyon, hidrojenasyon, hidroliz, metilasyon, asetilasyon ve izomerizasyondur (Ishihara et al., 1996; Giri et al., 2001).

Biyotransformasyon tepkimeleri; sadece kullanılan mevcut fitokimyasalların diğer türevlerini elde etmesi yanında mevcut moleküllerin türevlendirilmesiyle analoglarının sentezini gerçekleştirerek mevcut moleküllerin etkilerini artırmayı amaçlar. Bu tür tepkimeler bitki hücreleri ve canlı kültürlerin katalizi ile elde edilen analogların kütüphanelerini oluştururlar ve aynı zamanda mevsimsel dalgalanmalar ve patolojik kısıtlamalardan bağımsız belirli kültür koşullarında kaynakların sürdürülebilirliğini sağlarlar. Elde edilen bileşikler doğal moleküllerin göze çarpan karakteristiklerine, geliştirilmiş seçicilik, güvenli fizikokimyasal özellikler, terapötik bileşikler için daha az

toksosite gibi özellikler sağlarlar. Biyotransformasyon tepkimeleri; terapötik bileşiklerin ve ticari olarak avantajlı fitomoleküllerin elde edilmesinde en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Kimyasal sentezde kullanılan tehlikeli kimyasalların kullanımını azaltıp yeşil kimyaya katkı sağladığı için de büyük ilgi görmektedir (Banerjee et al., 2012). Her geçen gün daha fazla ilgi çeken biyotransformasyon tepkimeleri; ilaç aktif maddeleri, esans maddeleri, gıda katkı maddeleri, enerji üretimi, antibiyotik üretimi ve amino asit elde edilmesinde kullanıldığı gibi toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre ile ilgili konularda da kullanılmaktadır. Biyotransformasyon tepkimelerinin özellikleri Şekil 2.3'te sunulmuştur. (Loughlin, 2000)

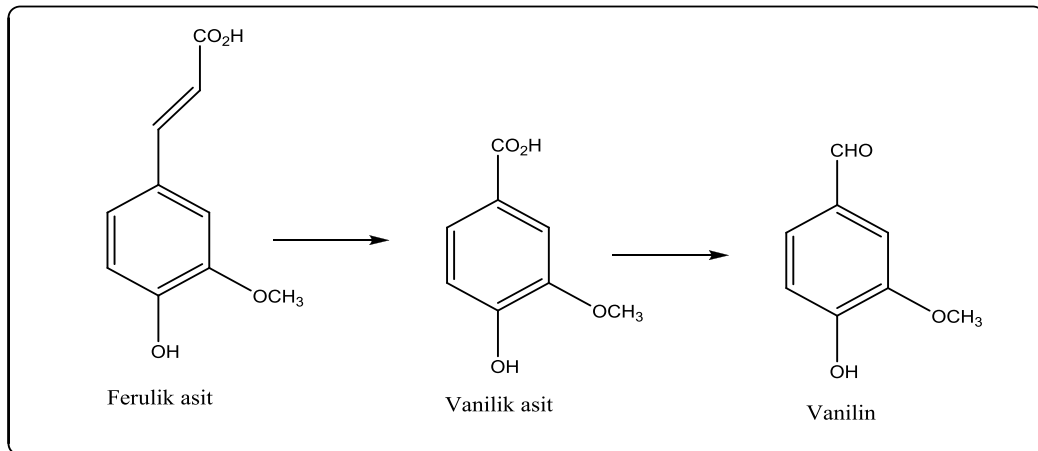


Şekil 2.3. Biyotransformasyon tepkimelerinin özellikleri

2.3. Biyotransformasyon Yöntemiyle Elde Edilen Aroma Maddeleri

Vanilin, dünyada en çok talep edilen aroma maddesidir ve esas olarak vanilya orkide ailesine mensup vanilya bitkisinden (*Vanilla planifolia*) elde edilmektedir. Tüm dünyadaki yıllık üretimi 12000 tondur. Bunun sadece % 0,2 bitkisel kaynaklardan elde edilir, diğer kısım kimyasal kaynaklıdır (Berger, 1995).

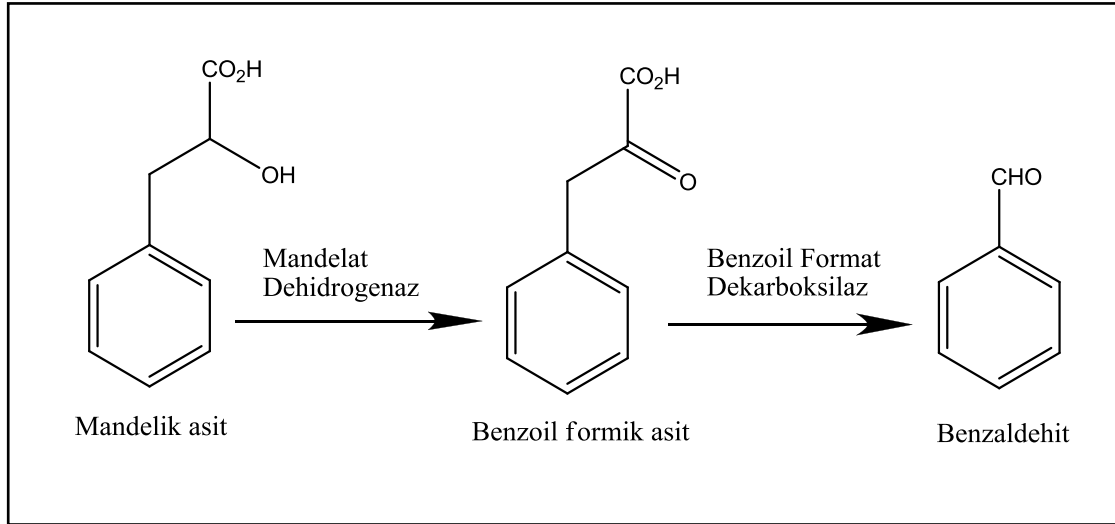
Vanilin üretiminde alternatif yollardan biri de mikrobiyal biyodönüşümdür. Mikroorganizmalar öjenol ve ferulik asidi substrat olarak kullanmaktadırlar. Öjenol karanfil yağının aromatik bileşenlerinden biri olup, piyasa değeri 5 \$/kg düzeyindedir. Ferulik asit ise birçok hububatta hücre duvarı bileşeni olarak bulunur. Ferulik asit hücre duvarında karbonhidratlarla esterleşmiş bir biçimde bulunmakta ve enzimatik uygulamalarla ayrılmaktadır (Walton et al., 2000). Melas ve buğday kepeğindeki ferulik asit, spesifik ferulik asit esterazlarla takviye edilmiş enzim karışımlarıyla serbest hale getirilmekte ve *Basidiomycetes* grubundan olan *Pycnopus cinnabarinus*'un farklı kültürleri kullanılarak ferulik asit vaniline dönüştürülmüştür.(Bkz. Şekil 2.4) (Thibault et al., 1998).



Şekil 2.4. Ferulik asitten biyotransformasyonla vanilin üretimi

Benzaldehit vanilinden sonra ikinci önemli aroma bileşenidir. Doğal benzaldehit, amigdalinden (meyve çekirdeklerinde bulunan siyanogenik glikozittir) elde edilir. Kiraz ve diğer doğal meyve lezzetleri vermede önemli bir bileşen olarak kullanılır (Krings and Berger, 1998).

Bazı çürükçül küfler fermentasyon ve biyodönüşüm yoluyla benzaldehit üretirler (Lamascolo et al., 1999 a). *Pseudomonas putida* suşu kullanılarak mandelik asitten benzaldehit üretilmektedir. (Bkz. Şekil 2.5.) Sonuçlara göre bu dönüşümdeki verim % 85'dir (Simmonds and Robinson, 1997). *Pycnopus cinnabarinus* kullanılarak L-fenilalanin'den 100 mg/L düzeyinde benzaldehit üretilmiş ve oluşan aromanın ekstraksiyonunda ortama stiren divinilbenzen kopolimer türü bir reçine eklendiğinden benzaldehit üretimi 8 kat (740 mg/L) artmıştır (Lomascolo et al., 1999 b).

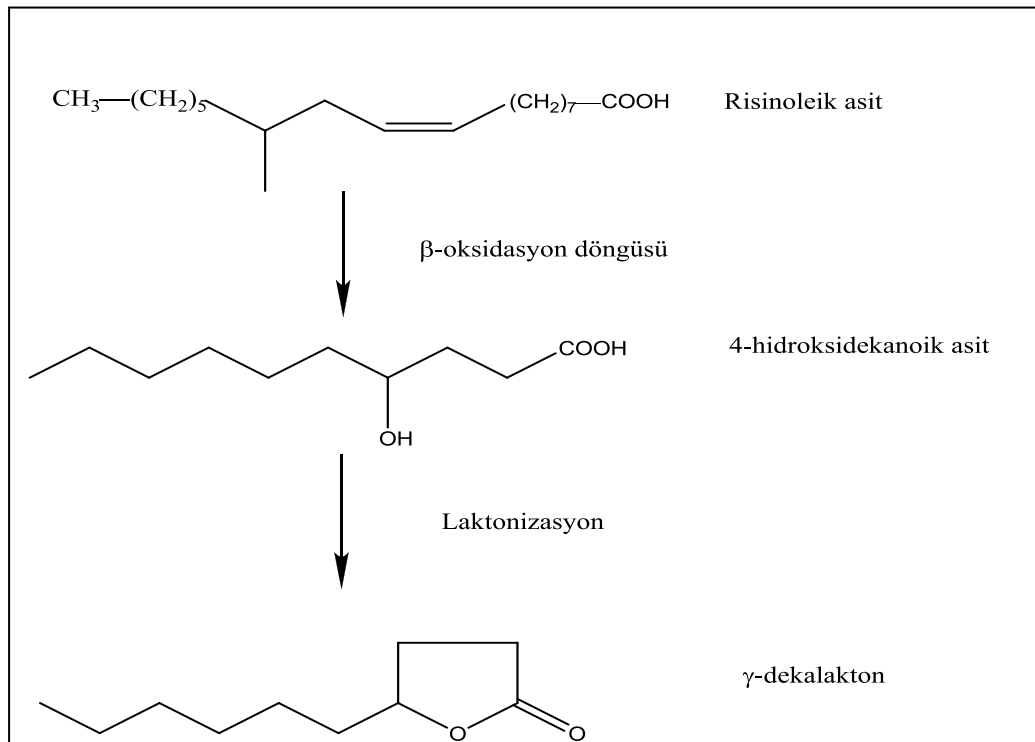


Şekil 2.5. *Pseudomonas putida* tarafından gerçekleştirilen mandelik asit metabolizması

Laktonlar sıklıkla kullanılan uçucu aromalardır. Laktonlar arasında yer alan 4- ve 5-alkanoitler, gıda aromaları gibi karakteristik duyuşal özelliklere sahiptirler (Gatfield, 1996). 4-Dekanolit; çilek, şeftali, kayısı gibi özellikler gösteren aroma bileşenidir.

1980'lerin başında biyoproseslerin kullanılmasıyla doğal 4-Dekanolit'in kg fiyatı 20,000 USD 1,200 USD düşmüştür (Feron et al., 1996). Genel olarak mikrobiyal laktonlar uzun zincirli hidroksi yağ asitlerin β -oksidasyonu ile üretilmektedir (Krings and Berger, 1998).

Yarrowia lipolytica mayası kullanarak hint yağının önemli bir bileşeni olan risinoleik asitten γ -dekalakton üretimi yapılmaktadır. Risinoleik asit 4 β -oksidasyon döngüsüyle 4-hidroksidekanoik asit'e parçalanmakta ve laktonize olarak düşük pH'da γ -dekalakton'a dönüşmektedir. (Bkz. Şekil 2.6) Bu yöntemle *Yarrowia lipolytica*'nın 75 saat içinde 9,5 g/L ve 12 g/L düzeyinde γ -dekalakton ürettiği belirtilmiştir. Ayrıca bu mayanın γ -dodekalakton, γ -nonalakton, δ -lakton ve doymamış laktonları ürettiği belirlenmiştir (Longo and Sanromán, 2006; Waché et al., 2003).



Şekil 2.6. *Yarrowia lipolytica* ile risinoleik asitin γ -Dekalakton'a biyodönüşümü

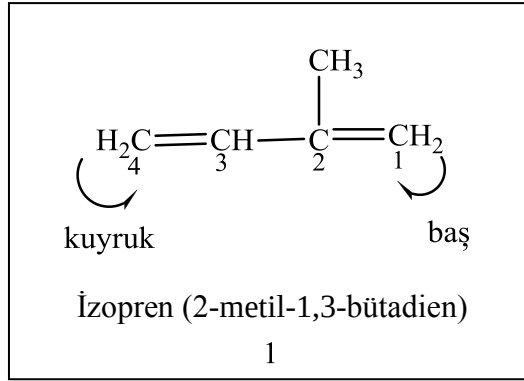
Laktonlar arasında diğ er önemli bileşik grubu ise Hindistan cevizinin bileşeni olan 6-pentil- -pironundur (Longo and Sanrom n, 2006). *Trichoderma* cinsine ait türlerin fermentasyon yolu ile 6-pentil- -piron'u yüksek verimde üretme yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir (Aran, 2010).

2.4. Terpenler

 nsanlar, uzun yıllardır bitkilerden organik bileşikler izole etmektedir. Bitkisel hammadde distilasyon işlemine tutulduğunda, uçucu yağlar olarak bilinen kokulu bileşikler elde edilir (Solomons and Fryle, 2002). Uçucu yağlar parfümeride yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağların yapısında ki bileşenlerin monoterpenler olduğu görülmüştür.

Terpenoitler olarak da bilinen terpenler 5 karbonlu izopren moleküllerinden olu mu lardır (Sakar ve Tanker, 1990). Uçucu yağlarda bulunan C ve H içeren oksijensiz terpenik maddelere hidrokarbon denilmektedir. Ayrıca doğal olarak bulunan her tür terpenin oksijen içeren türleri de vardır ve bunlar temelde alkol, aldehit veya keton formlarıdır. Bunlar ya dallanmış zincir şeklindedir, ya da siklik yapıda bulunurlar (Tanker and Tanker, 1990). Bugün gerek açık zincirli gerekse halkalı yapıda olan çeşitli fonksiyonel gruplara sahip 20,000 den fazla terpen bulunmaktadır (Gören, 2002).

(C₅H₈)_n Formülüne uyan terpenler ve oksijenli türevleri bitkisel uçucu yağların belli ba lı bileşiklerini oluştururlar. Terpen iki izopren (2-metil-1,3-bütadien) (bkz. ekil 2.7.) molekülünün ba -kuyruk kondenzasyonu sonucu meydana gelir.



Şekil 2.7. Terpen ünitesi: izopren

Bu kurala göre izopren ünitelerindeki 1 no'lu karbon (dallanmış taraftaki) baş olarak adlandırılırken, 4 no'lu karbon (dallanmanın olmadığı taraftaki) kuyruk olarak adlandırılır. (Bkz. Şekil 2.7) Terpenlerin sınıflandırılması içerdikleri karbon sayısına göre yapılmaktadır. Bundan dolayı iki izopren ünitesinin biyosentezi yoluyla oluşan 10 karbonlu moleküller monoterpenler, 15 karbonlu moleküller seskiterpenler ve 20 karbonlu moleküller ise diterpenler olarak adlandırılır. Terpenlerin sınıflandırılması Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Terpenlerin sınıflandırılması

İzopren Sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler	40
n	Politerpenler	(5) _n

Uçucu terpenler, su buharı destilasyonu ile sürüklenabilen genelde küçük moleküllü monoterpenler ve bazı seskiterpenlerdir. Uçucu olmayan terpenler ise büyük moleküllü seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler ve politerpenlerdir.

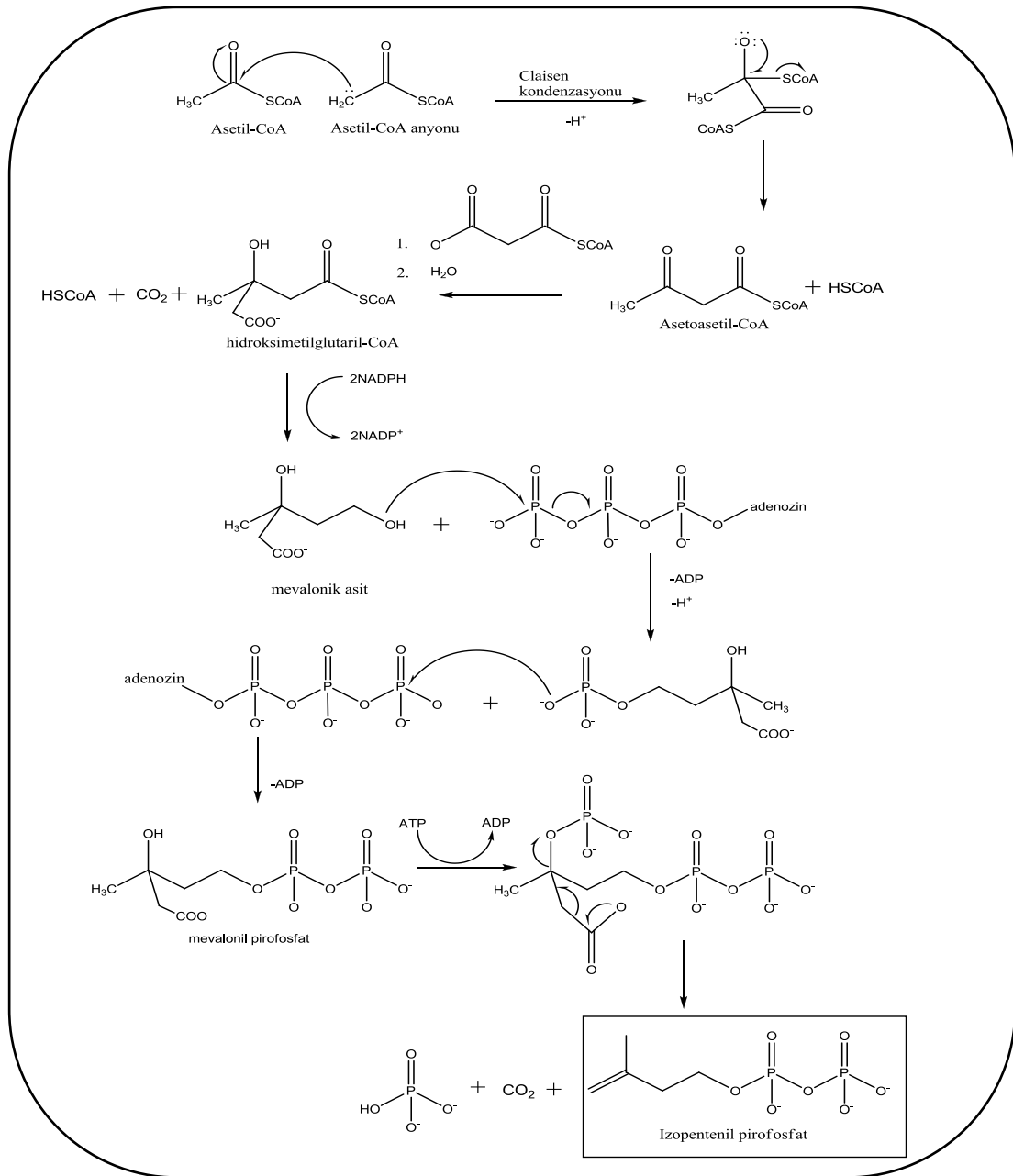
Uçucu yağlarda monoterpen yapısında olan maddelerle, bazı seskiterpenik maddelere rastlanmaktadır. Bunlar uçucu yağların özsuunda ve bazı bitkilerin dokularında bulunmaktadır. Bu yüzden uçucu yağların içinde erimiş olarak bulunurlar, ancak su buharı ile sürüklenemediklerinden, distilasyon sırasında uçucu yağa geçemezler. Di- ve triterpenler bitki ve ağaç sakız ve reçinelerinden elde edilir. Kauçuk en çok bilinen politerpendir (Finar, 1975).

Mono ve seskiterpenler bitkilerde bulunurken, daha yüksek karbonlu terpenler hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunurlar ve her iki canlı türlerinde de çok büyük biyolojik öneme sahiptirler. Örneğin, bir triterpen olan skualen steroid ve hormonların yapımında yapıtaşısı iken, bir tetraterpen olan β -karoten ise A vitamininin temel kaynağıdır (Gören, 2002).

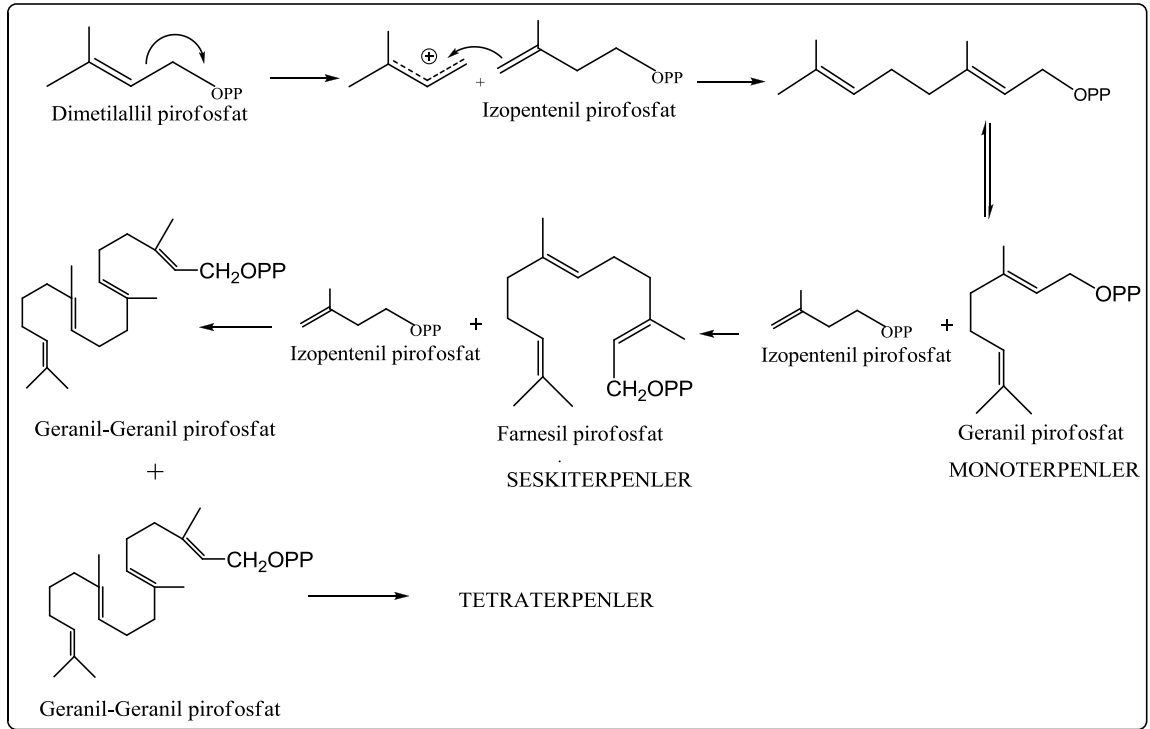
Terpenlerin oluşumunda izopren birimleri tek başına yeterli değildir. Bundan dolayı izopren molekülü terpenlerin yapısını oluşturabilecek tepkime aktivitesine sahip olan izopentenil pirofosfat halinde biyosenteze katılmaktadır. Bu olayda öncelikle Asetil-KoA bikarbonat anyonu ile Malonil-KoA'yı oluştururken, iki Asetil-KoA molekülü de birbiriyle kondenzasyona uğrayarak Asetoasetil-KoA molekülünü oluştururlar. Böylelikle Asetoasetil-KoA ve Malonil-KoA birbiri ile kondenzasyona uğrayarak ATP eşliğinde izopentenil pirofosfat'ı meydana getirirler (Bkz. Şekil 2.8) Elde edilen bu izopentenil pirofosfat terpenlerin oluşumunda rol oynar (Gören, 2002; McMurry, 1986).

İzopentenil pirofosfat bu haliyle de terpenlerin biyosentezine katılmak için hazır değildir. Bunun için izopentenil pirofosfat bir enzim yardımıyla izomerizasyona uğrayarak dimetil allil ester ile bir denge oluşturur. İzomerizasyon izopentenil

pirofosfata Markownikoff kuralına göre proton katılmasıyla ve oluşan karbokatyon ara ürününün Zaitseff kuralına göre düzenlenmesi ile gerçekleşir (Bruece-Yurkanis, 1998). Terpenlerin biyosentezi Şekil 2.9’da gösterilmektedir.



Şekil 2.8. İzopentenil pirofosfatın biyosentezi

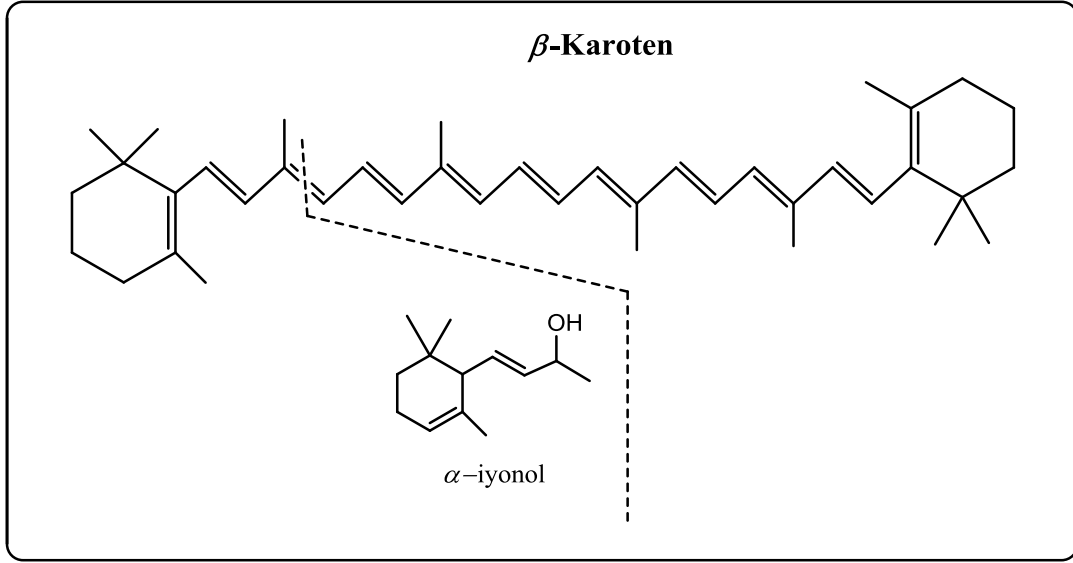


Şekil 2.9. Terpenlerin biyosentezi

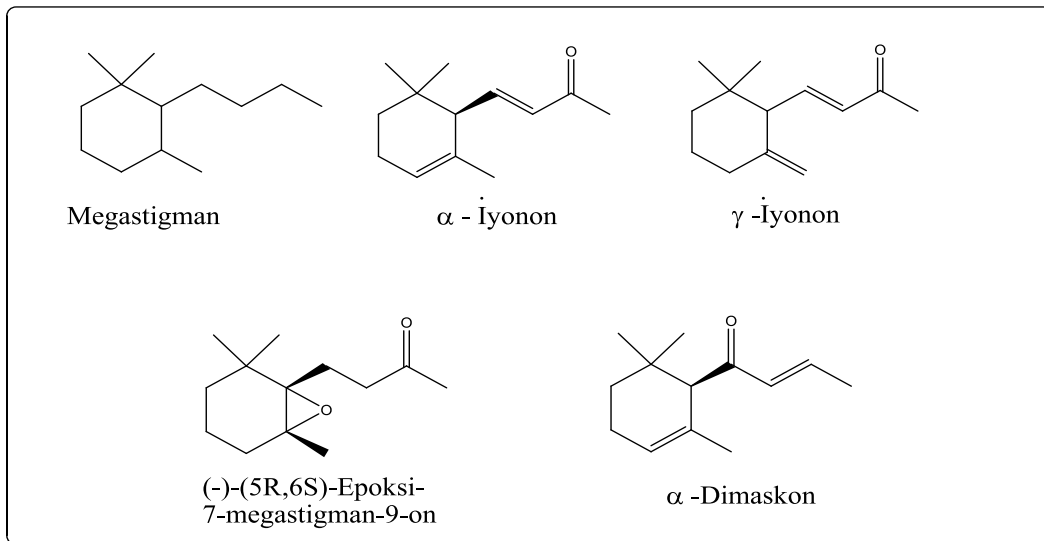
2.5. Megastigmanlar

Megastigmanlar 13 karbonlu bileşiklerden oluşmuştur ve nor-izoprenoitler olarak da adlandırılmaktadırlar. Megastigman yapısı, β -Karoten ve absizik asit'in temel iskelet yapısı olan 2-bütül-1,1,3-trimetilsikloheksan'dır. Önemli koku ve tat özelliklerine sahip bir megastigman olan β -İyonon, tetraterpen olan β -Karotenin degradasyonu sonucu oluşmaktadır. Şekil 2.10'de β -Karoten'in degradasyonu ile oluşan α -İyonol yapısı gösterilmiştir. Şekil 2.11'de megastigman yapılarına örnek moleküller gösterilmiştir (Breitmaier, 2006; Rowe, 2005).

Tez çalışmasında kullanılan α -İyonol molekülünün ana iskelet yapısı 13 karbonlu olup megastigman yapılarına benzemektedir. α -İyonol molekülüne ait kimyasal ve fiziksel özellikler özellikleri Çizelge 2.5’de gösterilmektedir.



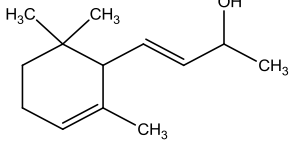
Şekil 2.10. β -Karoten’in degradasyonu ile oluşan α -iyonol yapısı



Şekil 2.11. Megastigman yapılarına örnek moleküller

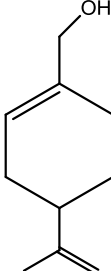
Çizelge 2.5. α -İyonol'un kimyasal ve fiziksel özellikleri

(http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4177456.htm)

Molekül yapısı	
Adı	α -İyonol
Formülü	C ₁₃ H ₂₂ O
IUPAC adlandırılması	4-(2,6,6-Trimetil-2-siklohekzenil)-3-büten-2-ol
Molekül ağırlığı	194,31
CAS numarası	25312-34-9
Yoğunluğu	0,918 g/ml 20 °C
Kaynama noktası	127 °C 15 mm Hg
Parlama sıcaklığı	93,4 °C
Kırılma indisi	<i>n</i> _{20/D} 1,491
Görünüm	Renksiz berrak sıvı
Kategori	Koku ve tat maddeleri
Koku tanımı	Çiçeksi koku

2.6. Terpenlerin Biyolojik Etkileri

Canlıların metabolizmasında çeşitli terpen yapılarını sekonder metabolit olarak sentezlemektedirler. Sekonder metabolitler; primer metabolitler gibi canlıların büyüme üreme gibi temel yaşamsal faaliyetlerinde rol oynamazlar. Fakat organizmada detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme gibi bir takım fonksiyonlarda etkinlik gösterirler. Sekonder metabolitler biyosentezleri sırasında sentezlendikleri yerlerden farklı özelleşmiş doku organ veya sistemlerde depolanırlar. Mutasyona uğrayabilen sekonder metabolitler antibiyotik, kemoterapotik, pestisid, immünsüpresif ve antilipolitik ajan, gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Büber ve Açıan, 2004; Oskay and Oskay, 2009). Çizelge 2.6’da Perilil Alkolün biyolojik aktivitesi verilmiştir.

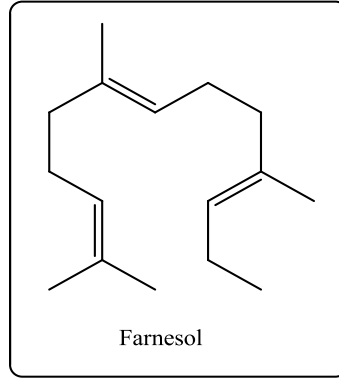
	Monoterpen	Biyolojik Aktivite	Kaynaklar
Perilil Alkol		❖ Antiproliferatif aktivite ❖ Kemoterapötik aktivite ❖ Antikanser aktivite ❖ Antiplasmodif aktivite	- Xanthakis <i>et al.</i>, 2009 - Matos <i>et al.</i>, 2008 - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Olagnier <i>et al.</i>, 2007

Çizelge 2.6. Perilil Alkol’ün biyolojik aktivitesi

Sekonder metabolit olan bazı terpen yapıları koku ve tat özelliği göstermektedir. Uçucu yağların bileşiminde Mono-, seksi- ve diterpen yapılarına rastlanmaktadır.

Sekonder metabolitler başta koku ve aroma sanayisinde, ilaç sanayinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır.

Farnesol, asiklik seskiterpendir. (Bkz. Şekil 2.12) Ambrette tohumlarının yağında bulunur (Finar, 1975). Leylak kokusundadır. Farnesol aynı zamanda böceklerde hormon görevi görür ve larva şeklinden güve şekline dönüşümü başlatır (Solomons and Fryhle, 2002).



Şekil 2.12. Farnesol molekülü

2.7. Terpenlerin Biyotransformasyonları

Terpenlerin, koku ve aromalardan başlayan ve farmakolojik aktivitelere, (antibakteriyel, antiviral ya da toksik özellikler) kadar değişen geniş kullanım alanları olmasından dolayı son zamanlarda bu bileşiklere olan ilgi artmıştır. Bu bileşiklerin sentezlenen yeni türevleri gelişmiş özellikler gösterebilirler ya da asimetrik sentez için yeni yapıtaşlarının potansiyel kaynağı olabilirler. Bu anlamda, terpenlerin biyodönüşümleri önemli bir rol oynar. Çünkü kimyasal olarak ulaşılması zor uzak pozisyonlar, yüksek regio ve stereoselektiflik ile biokatalitik olarak işlevselleştirilebilir.

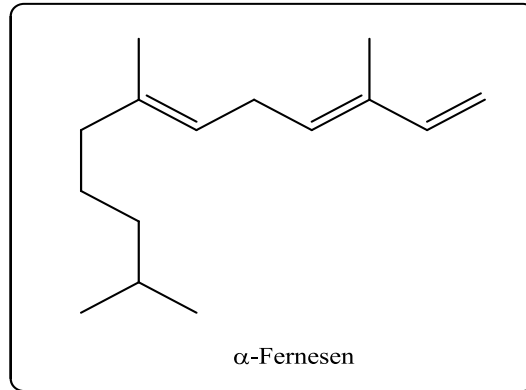
Örnek olarak işlevsel olmayan metilen gruplarının hidroksilasyonu verilebilir (Simeó and Sinisterra, 2009).

Terpen biyotransformasyonlarında karşılaşılan bazı sorunlar vardır. Bunlar (Krings and Berger, 1998) ;

- 1-Terpenoitlerin kimyasal kararsızlıkları,
- 2-Terpen materyallerinin sudaki az çözünürlükleri,
- 3-Ürünlerin ve materyellerin yüksek uçuculukları,
- 4-Ürünlerin ve öncülerin yüksek sitotoksitesi,
- 5-Düşük oranda transformasyon verimi.

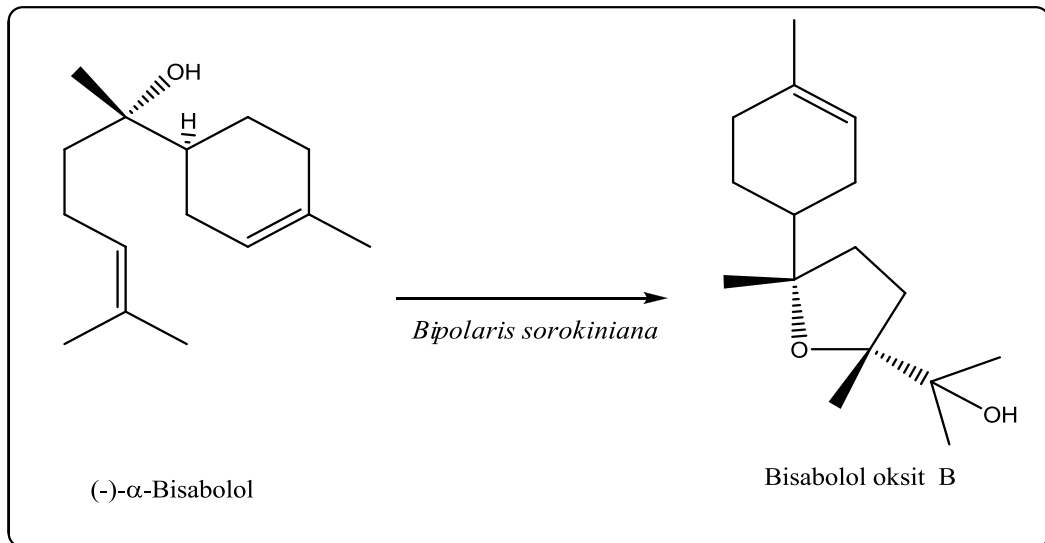
Birçok araştırmaya konu olan terpenler ile çalışmanın getirdiği sorun ve olumsuzlukların yanında ticari olarak ilaç, gıda, koku ve kozmetik endüstrisinin ilgisini çekmekte ve büyük bir ekonomik potansiyel olarak değerlendirilmektedir.

Farnesol ve türevleri, terpenoid biyosentezine katılan zincir biçiminde (asiklik) seskiterpenlerdir. (Bkz. Şekil 2.13) Terpen hidrokarbonuna (tercihen alilik konumda) oksijen ilavesiyle aroma maddesi olduğundan farnesen molekülüne oksijen ilave eden mikrobiyal kültürler araştırılmışlardır. Başlıca oksidasyon ürünü olan 3,7,11 trimetildodeka-1,3(E),5(E)10-tetraen-7-ol, hoş limonsu bir koku göstermiştir. Ölçümler, Gaz kromatografisi-olfaktotmeri aracılığıyla yapılmıştır. Özellikle, mangodan izole bir *Aspergillus niger* suşu kayısı benzeri kokusu ile yeni bir doğal bileşik olan iki diastereomerik terpen alkoller, ment-1-en-3-[2-metil-1, 3-butadienil]-8-ol molekülünü üretmiştir.



Şekil 2.13. α -Farnesen molekülü.

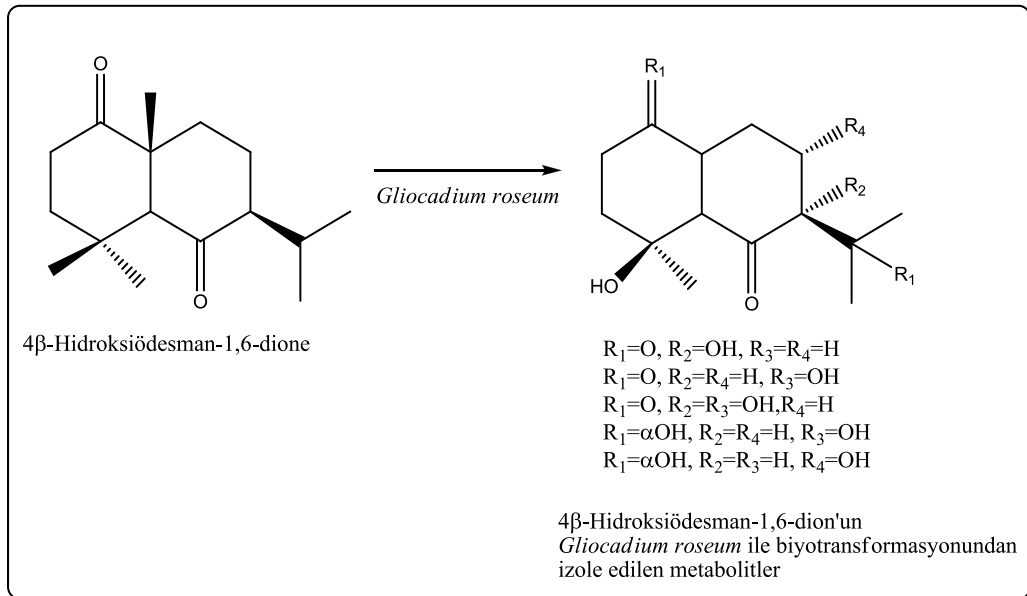
Limberger ve arkadaşları α -bisabolol'ün bisabolol-oksit B'ye *Bipolaris sorokiniana* fungusu tarafından etkin bir şekilde biyotransformasyonunu rapor etmişlerdir. (Bkz. Şekil 2.14) (Limberger et al., 2003). α -Bisabolol çiçek kokusu ve antiseptik özelliklerinden dolayı birçok doğal ürünün öncü maddesidir. Bu yüzden ilaç sektöründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son yöntemlerle yüksek regio ve stereoselektiflik gösteren tek diastereomer sentezinin verimi % 84 olarak gerçekleşmekte ve bu durum biyotransformasyon tepkimesini çekici kılmaktadır. Diğer yandan α -bisabolol'ün klorobenzoik asit ile kimyasal oksidasyonu seçici değildir ve tepkime sonucu düşük verimli epoksidasyon ürünlerinin karışımları oluşmaktadır.



Şekil 2.14. (-)- α - Bisabolol'ün *Bipolaris sorokiniana* ile biyotransformasyonu

Garcia-Granados ve araştırma grubu; germakrenler, ödesman, 4 β -hidroksiödesman-1,6-dion, gibi seskiterpenlerin biyotransformasyonları üzerine yoğun araştırmalar yapmışlardır (Garcia-Granados et. al., 2001; Garcia-Granados et. al., 2000; Garcia-Granados et. al., 1998)

Ödesman seskiterpenleri doğada yaygın bir şekilde bulunurlar ve önemli biyolojik özelliklere sahiplerdir (Sattar et. al., 1996; Rodriguez et. al., 1976). Antimikrobiyal, antifeedant ve antimalarial etkileriyle hücre büyüme inhibisyonu ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak faaliyet gösterirler. *Gliocadium roseum* adlı ipliksi mantarı tarafından gerçekleştirilen biyotransformasyonların uzak konumlara hidroksil gruplarının ilavesi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir. (Bkz. Şekil 2.15) (Orabi, 2000; Miyazawa et al., 1997).



Şekil 2.15. 4 β -Hidroksiödesman-1,6-dion'un *G. roseum* ile biyotransformasyonu

BÖLÜM 3: MATERYAL, METOD VE DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Genel Deneysel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin inkübasyonu ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan derin kültür tekniği için Gerhardt THO 500 Laboshake çalkalamalı inkübatör kullanıldı. Küflerin aktarılma ve steril koşullarda ekim işlemleri Herasafe steril kabininde gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktları buharlaştırıp çözücü fazından ayırma işlemleri ise Rotary Evaporatör RE 100 cihazı ile sağlandı. Kolon kromatografisi için Merck (1.09385.1000) silika jel 60 (230-400 mesh), İTK çalışmaları içinse 0,25mm kalınlığında silika jel plakaları (Merck silika jel GF254) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak etil asetat/*n*-hekzan (1:1) karışımı kullanıldı. Kolon kromatografisinden elde edilen spotlar, H₂SO₄ (8 mL), anisaldehit (0,5 mL), metanol (85 mL) ve asetik asitten (10 mL) oluşan belirteç ile renklendirildikten sonra ısıtılarak (110 °C) belirgin hale getirildi.

3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar

Bu bölümde biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan materyal, kimyasal maddeler, çözücüler, aletler ve mikroorganizmalarla ilgili genel bilgiler verilmiştir.

3.2.1. Materyal

α -İyonol molekülü, proje ortağı olan firma tarafından temin edilmiştir.

3.2.2. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

• <i>n</i> -Hekzan	• Metanol (MeOH)
• Aseton	• Susuz Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)
• Dimetilsülfoksit (DMSO)	• Etilasetat (EtOAc)
• Sodyum hidroksit (NaOH)	• Sülfürik asit
• Petrol Eteri	• Hidroklorik asit (HCl)
• D-Glukoz	• Pepton
• Sodyum hipofosfat (Na ₂ HPO ₄)	• Etanol (EtOH)
• Maya ekstresi (Acumedia)	• Anisaldehit
• Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Acumedia/Oxoid)	• Sodyum klorür (NaCl)
• Patates Dekstroz Agar (PDA) (Acumedia/Oxoid)	• Hazır İTK plakları
• Silikajel 60G (Merck 7731,4-40 mesh)	CDCl ₃

3.2.3. Mikroorganizmalar

Çalışmalarımızda kullanılan mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı ve Laboratuvarımızda mevcut koleksiyondan sağlandı. Alınan kültürler, +4°C’de muhafaza edildi. Çizelge 3.2’de tez çalışmasında kullanılan 19 farklı mikroorganizmanın adları verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan mikroorganizmalar

<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62475	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376
<i>Fusarium culmorum</i> (AÜ Fen Fakültesi)	<i>Phanerachaete chrysosporium</i> (AÜ Fen Fakültesi)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839
<i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385	<i>Neurospora crassa</i> (wild type)
<i>Alternaria alternata</i> NRRL 20593	<i>Aspergillus parasticus</i> NRLL 2999
<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRLL 317
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Penicillium adametzii</i> NRLL 317
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Penicillium chrysogenum</i> NRLL 792
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	<i>Fusarium soloni</i> ATCC 1284
<i>Fusarium moniliforme</i> NRLL 2374	

3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları

3.3.1. Mikroorganizmaların üretimi ve çoğaltılması

Kültür koleksiyonlarından alınan mikroorganizmalar ilk etapta hazırlanan katı yatık agar besi yerinde üretildi. Daha sonra hazırlanan α -medium sıvı besiyerinde aktarılarak çoğaltıldı (Özşen, 2011; Demirci, 2000).

3.3.1.1. Yatık besi yeri

Patates dekstrozu agar	7,8 g
Agar Agar	3,8 g

Karışımı distile su ile 200 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besi yeri hazırlandı. Hazırlanan besi yeri soğumadan 19 adet patolojik şişelere, şişe başı ortama 8 mL ilave edildi, otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C'de 20 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra şişeler içerisindeki erimiş haldeki besi yerleri donmadan önce 45°'ye yakın eğim oluşturacak şekilde steril kabinin içerisinde ve UV ışığı altında soğumaya bırakıldı. Bu besi yeri biyotransformasyon tepkimelerinde kullanılan mikroorganizmaların stoklanmasında ve sıvı besi yerine ilave edilmeden önce aktifleşmesini sağlamak amacıyla kullanıldı.

3.3.1.2. Sıvı besi yeri

D-Glukoz	20,0 g
Pepton	5,0 g
Maya ekstresi	5,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g
Distile Su	1000 mL

Distile suda çözülerek hazırlanan besi yeri, 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL besi yeri olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerin ağızları pamukla kapatıldı ve alüminyum folyo ile kaplandı. Otoklavda 1,5- 2 atmosfer basıncında, 121°C'de 20 dakika süre ile steril edildi. Bu besi yeri biyotransformasyon tepkimeleri için kullanıldı.

Yatık besi yerindeki en taze alt kültürdeki mikroorganizmalar, steril kabinde hazırlanan 100 mL'lik sıvı besi yerine her erlene bir öze ucu dolusu kadar ilave edildi. Erlenlerde yeterli miktarda mikroorganizma oluşabilmesi için 2-3 gün boyunca

çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C’de (120 rpm) pre-inkübasyona bırakıldı.

3.3.2. Substrat hazırlanması ve ilavesi

Daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan mikroorganizma içerisine inkübasyonun ikinci/üçüncü gününde; ön deneme çalışmaları için her 15 mg veya 1,5 mL substrat 2 mL asetonda çözülerek erlen sayısına göre hazırlanıp ilave edildi. Kolon kromatografisi yapılmak için hazırlanan büyük ölçekli çalışmalarda erlen başına 20 mg (veya 2 mL) substrat 2 mL asetonda çözülerek ilave edildi. İnkübasyon oda sıcaklığında çalışan dairesel çalkalayıcı üzerinde 8 gün boyunca sürdürüldü. Erlenler üzerine etil asetat ilave edilerek biyotransformasyon sona erdirildi. Daha sonra ekstraksiyon ve izolasyon aşamalarına geçildi.

3.3.3. Metabolitlerin ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak metabolit oluşumu izlendi. Deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 2 mL alındı ve 3–5 mL etil asetat (EtOAc) ilave edildi. Bir dakika süreyle vorteks kullanarak karıştırıldı. Etil asetatlı üst faz, başka bir pipet ile susuz Na₂SO₄’ta kurutulduktan sonra bir numune kabına aktarıldı ve azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırıldı. Oluşan metabolitlerin spotları etil asetat/*n*-hekzan(1:1) mobil fazı kullanılarak İTK ile kontrol edildi.

3.3.4. Metabolitlerin izolasyonu

Biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besiyerlerine 1/1 oranında EtOAc ilave edildi. Besiyeri iyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden vakum altında süzülerek mikrobiyal miseller uzaklaştırıldı. Elde edilen sıvı kısım, ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlar, susuz Na₂SO₄’ta kurutulduktan sonra yoğunlaşmaya

bırakıldı. Elde edilen kalıntı, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak, *n*-hekzan ve etil asetat kullanıldı (artan gradient sistemi: %10 etil asetat/*n*-hekzan karışımı ile başlayarak,%100 etil asetat ile sonlandırılır).

3.3.5. Metabolitlerin tanımlanması

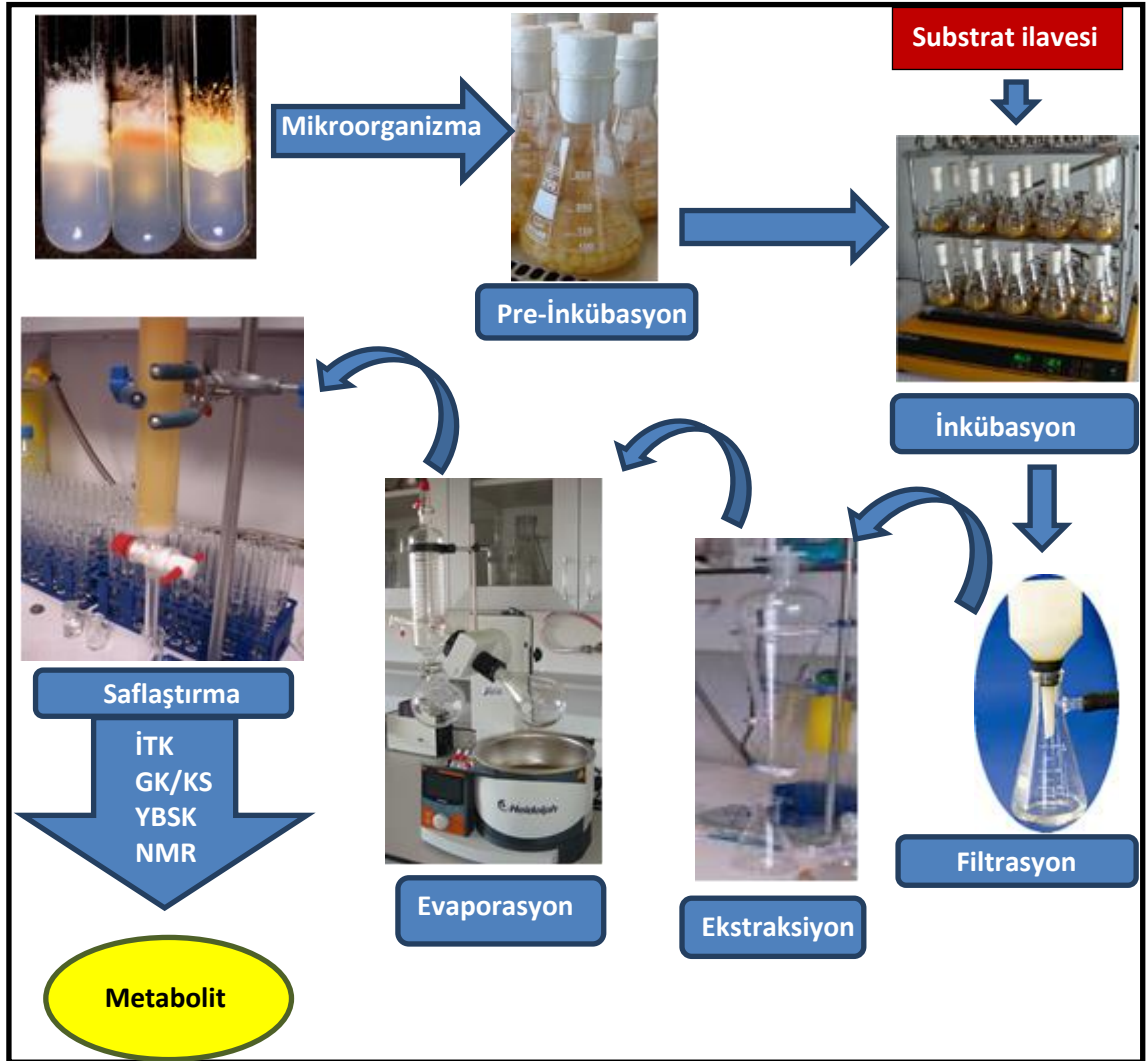
Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, GK/KS gibi spektroskopik metotlar kullanılarak aydınlatıldı. Biyotransformasyon deneylerinde izlenen aşamalar Şekil 3.1’de gösterilmektedir.

✓ *Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)*

^1H NMR (500 Mhz) ve ^{13}C NMR (125 Mhz) spektrumları, Bruker DPX FT NMR sistemi ile alınmıştır.

✓ *Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GK/KS)*

Mikrobiyal transformasyonda kullanılacak uçucu yağ dahil tüm substratların ve oluşan metabolitlerin kütle spektrumlarının alınması için kullanılmıştır. Bu amaçla Shimadzu GC 2010 sistemi, CP-Sil 5 CB (25m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak Helyum (1 mL/dak akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C’dir. 70eV elektron enerjisiyle, 35-450 *m/z* kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C’de 10 dak, 4°C/dak artışla 260°C’ye yükseltip 260°C’de 5 dak bekletilmiştir, toplam 65 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Tanımlamada, TBAM Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams LIBR (TP), MassFinder 3.1 Kütüphane tarama yazılımları kullanılmıştır.



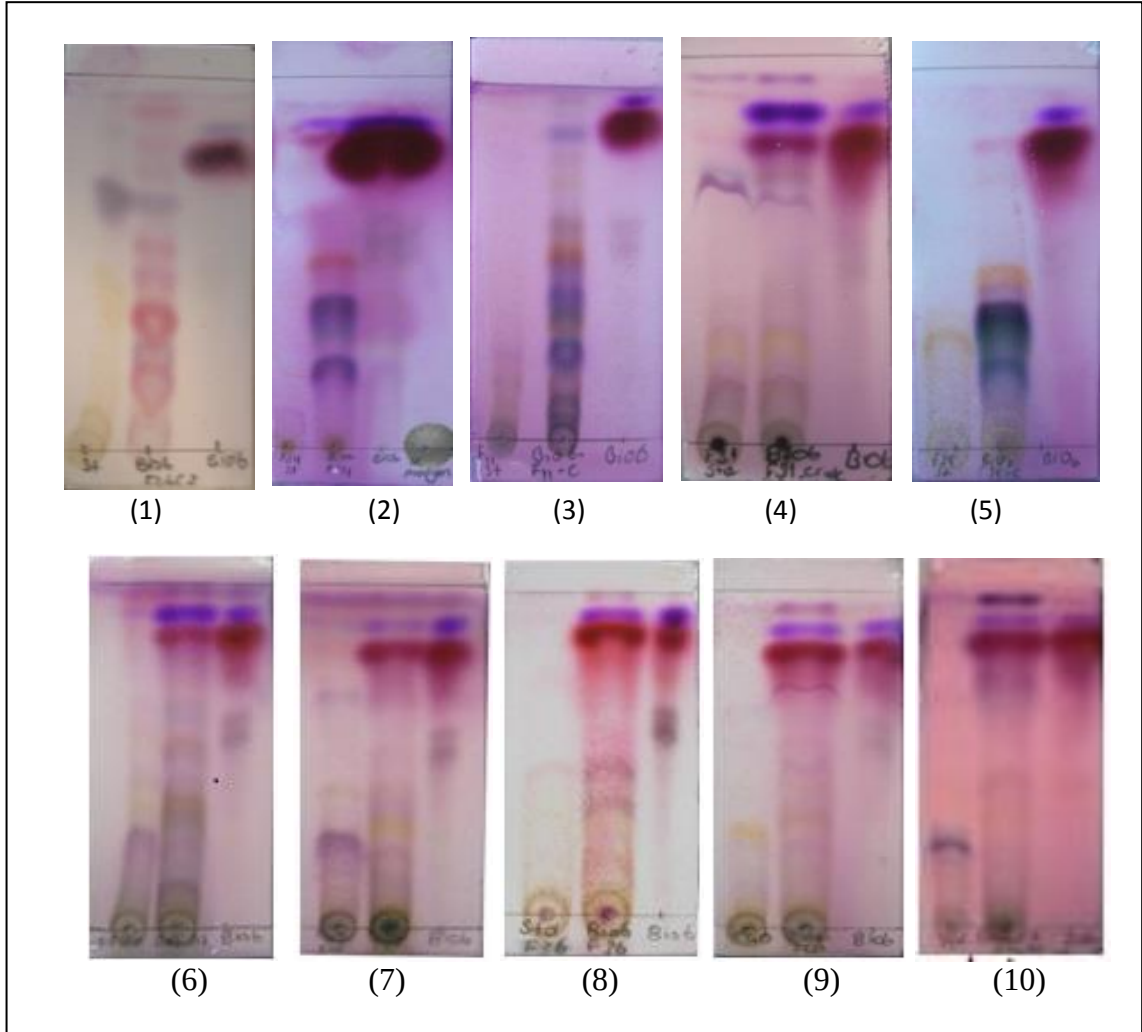
Şekil 3.1. Biotransformasyon deneylerinde izlenen aşamaların şematik gösterimi

BÖLÜM 4: SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Ön Deneme Sonuçları

19 farklı mikroorganizmayla yapılan ön deneme sonuçları ve İTK ayrımları verileri Şekil 4.1a ve Şekil 4.1b' de sunulmuştur. α -İyonol'un;

- (1) *Corynespora cassiicola* DSM 62475 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (2) *Fusarium culmorum* ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (3) *Aspergillus niger* ATCC 10549 ile biyotransformasyon ekstrakt İTK ayrımı,
- (4) *Sporobolomyces pararoseus* ATCC 11385 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (5) *Alternaria alternata* NRRL 20593 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (6) *Penicillium claviforme* MR 376 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (7) *Phanerachaete chrysosporium* ME ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (8) *Mucor ramannianus* ATCC 1839 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (9) *Neurospora crassa*(wild type) ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (10) *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (11) *Hansenula anomala* ATCC 20170 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (12) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (13) *Aspergillus niger* NRRL 326 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (14) *Trametes versicolor* ATCC 200801 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (15) *Aspergillus alliaceus* NRLL 317 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (16) *Penicillium adametzii* NRLL 317 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (17) *Penicillium chrysogenum* NRLL 792 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (18) *Fusarium solani* ATCC 1284 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,
- (19) *Fusarium moniliforme* NRLL 2374 ile biyotransformasyon ekstresi İTK ayrımı,



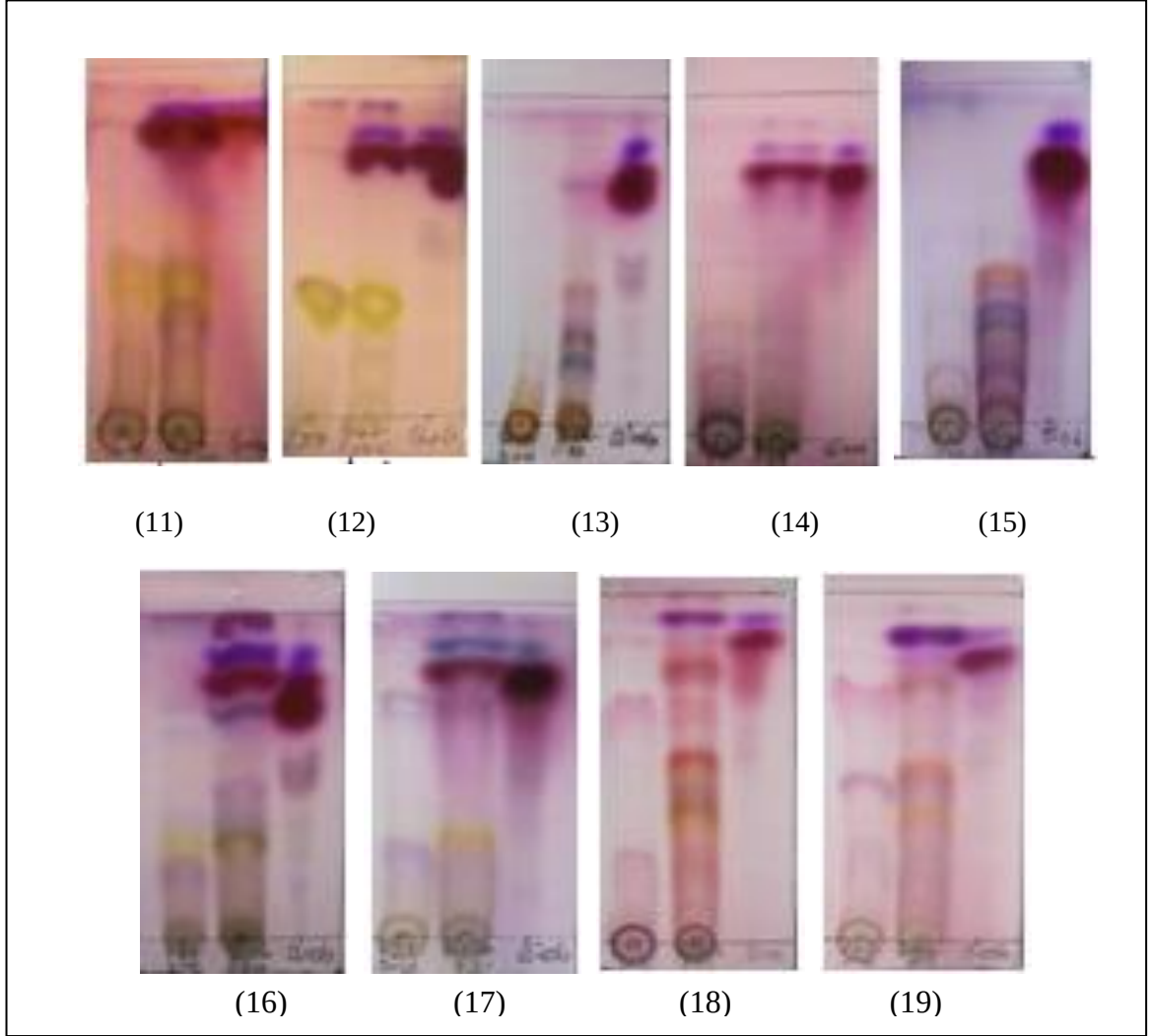
[1. spot: Standart madde (sol); 2. spot: Karışım maddesi (orta); 3. spot: Substrat (sağ)]

1.Standart madde: Fungus metabolitleri

2.Karışım maddesi: Biyotransformasyon tepkimesi ektresi

3.Substrat

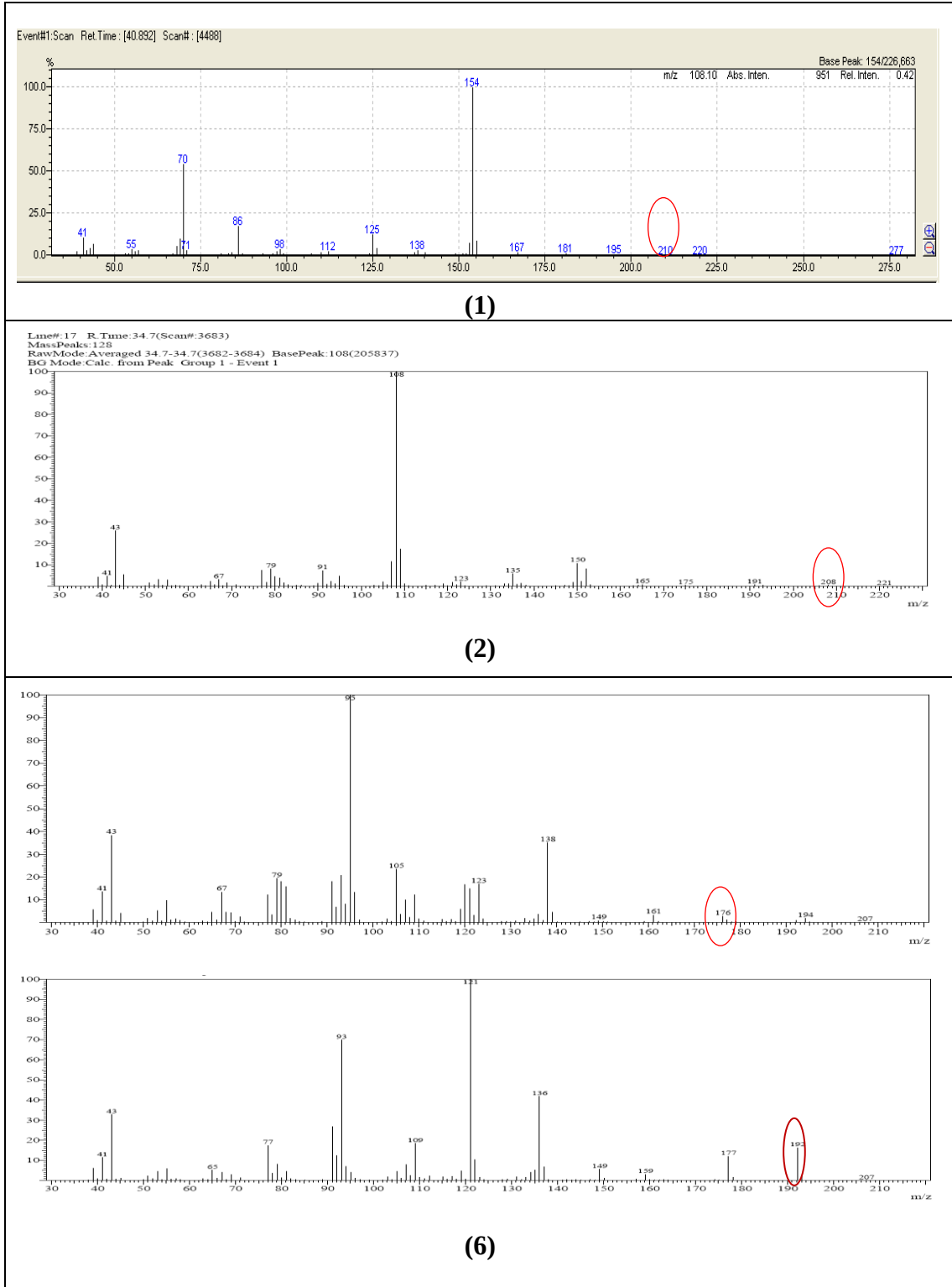
Şekil 4.1a. α -İyonol'e ait ön deneme İTK sonuçları



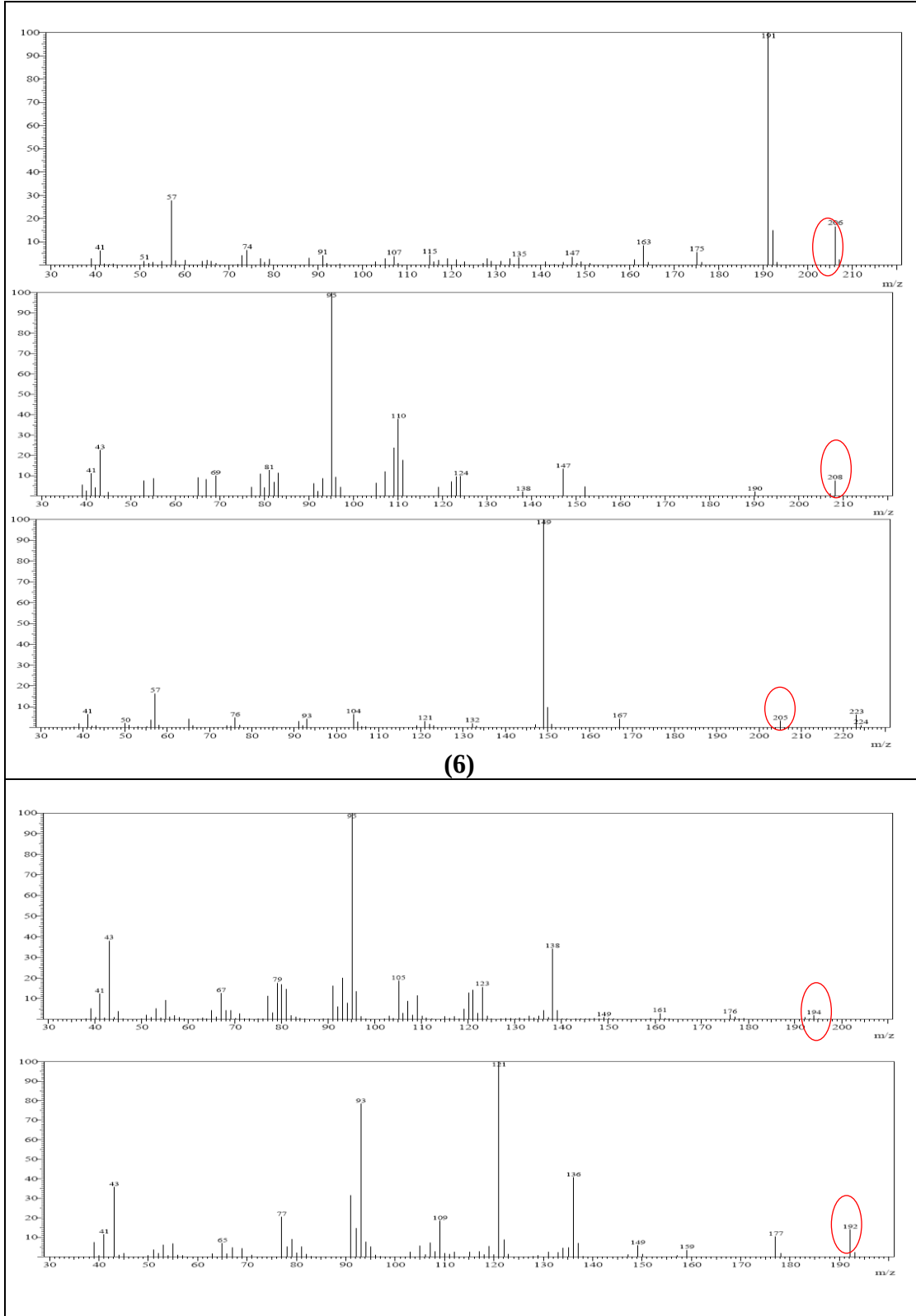
[1. spot: Standart madde (sol); 2. spot: Karışım maddesi (orta); 3. spot: Substrat (sağ)]

Şekil 4.1b. α -İyonol'e ait ön deneme İTK sonuçları (devam)

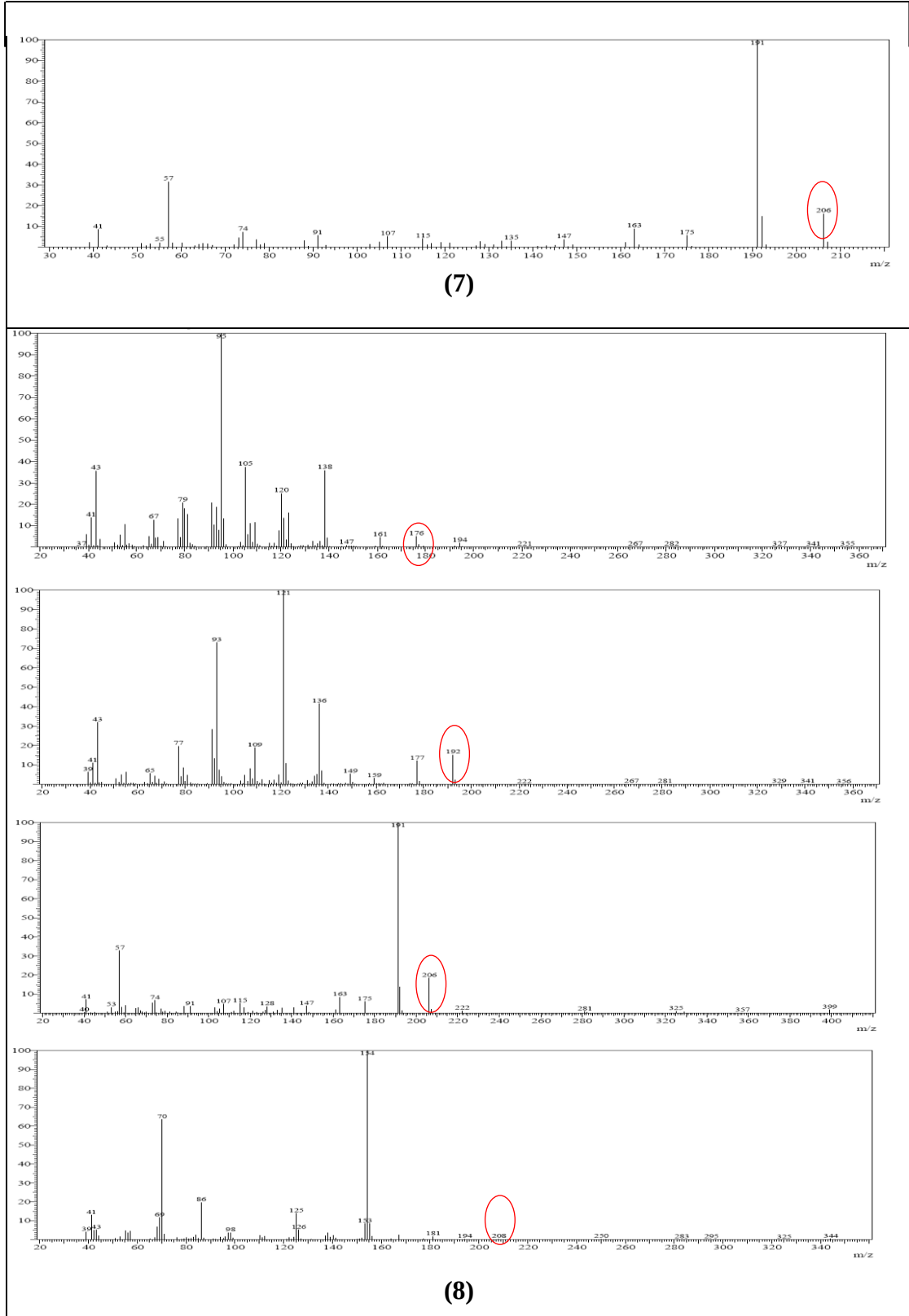
İTK çalışmalarında silika jel plakaları; 1/1 oranında etil asetat/*n*-hekzan karışımında yürütüldü. Metabolit spotları, İTK plakaları üzerine H_2SO_4 , anisaldehyt, metanol ve asetik asitten oluşan reaktif karışımı plakaların üstüne püskürtülmesi ve daha sonra $110^\circ C$ 'de ısıtılması sonucu belirgin hale getirildi. Yapılan ön denemelerde tepkime sonucu oluşan metabolit karışımların GK/KS analizleri yapıldı. Oluşan metabolitlerin kütle spekturumları Şekil 4.2.'de verilmiştir.



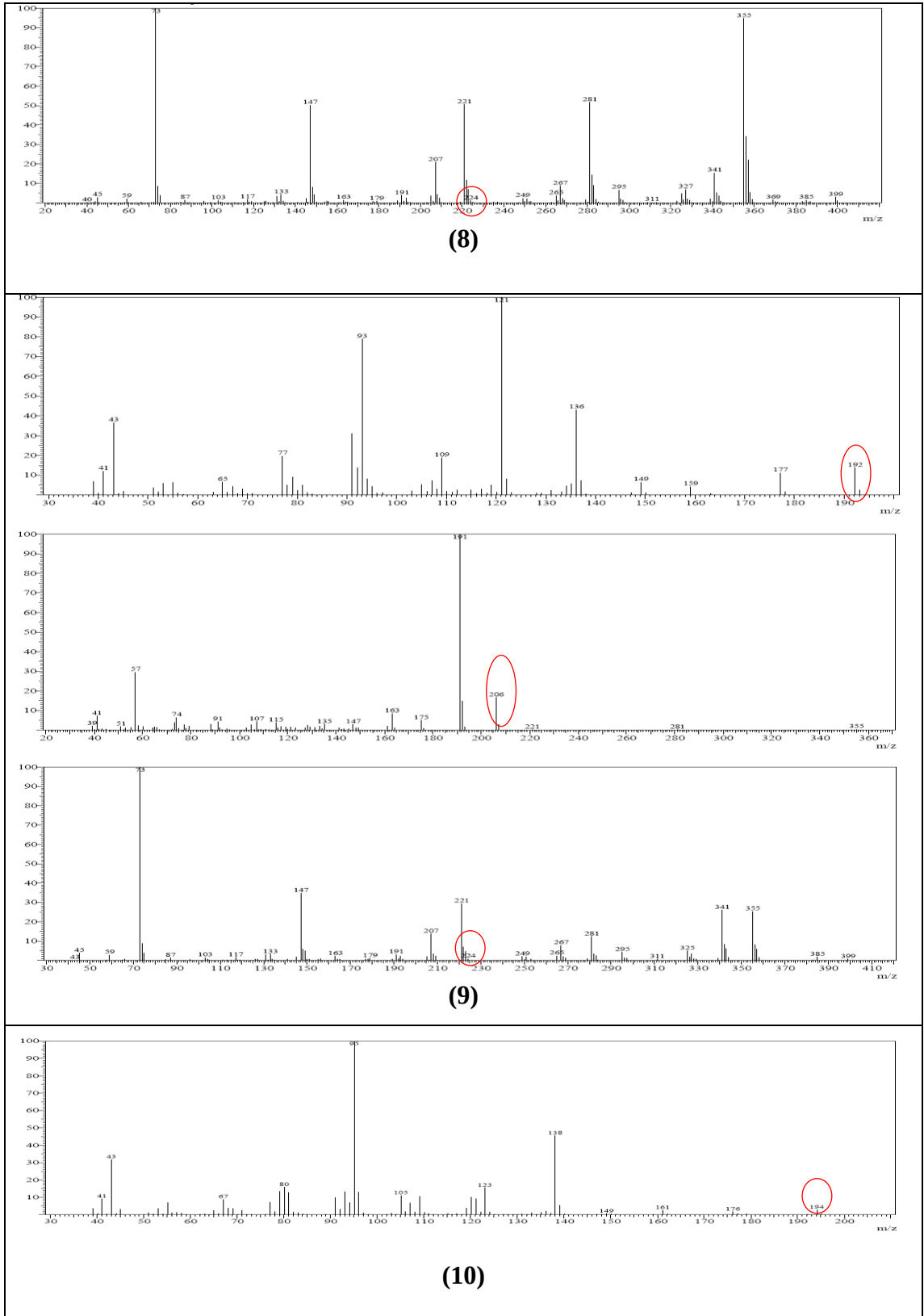
Şekil 4.2a. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları

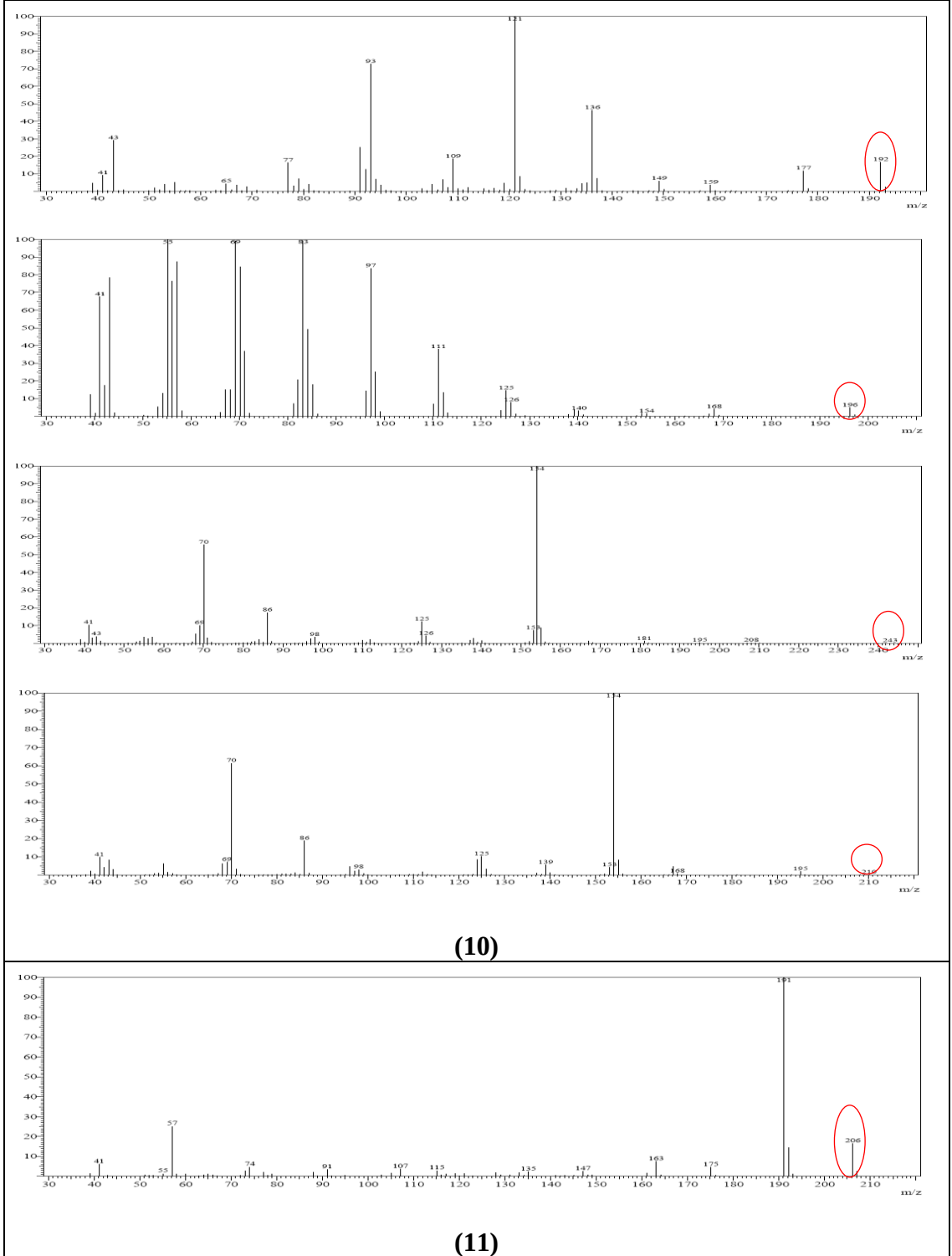


Şekil 4.2b. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin(GK/KS) kütle spektrumları (devam)

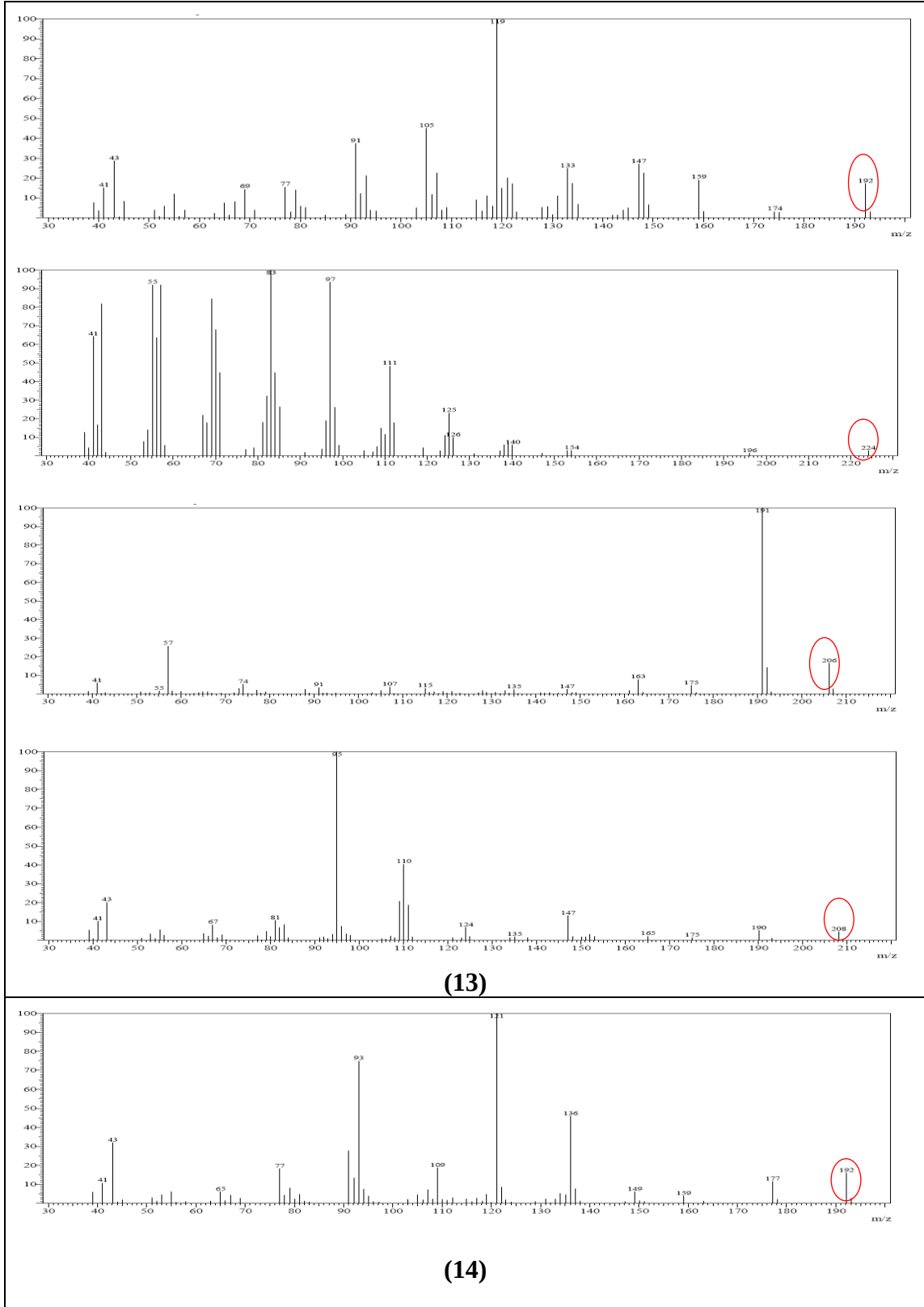


Şekil 4.2c. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin(GK/KS) kütle spektrumları (devam)

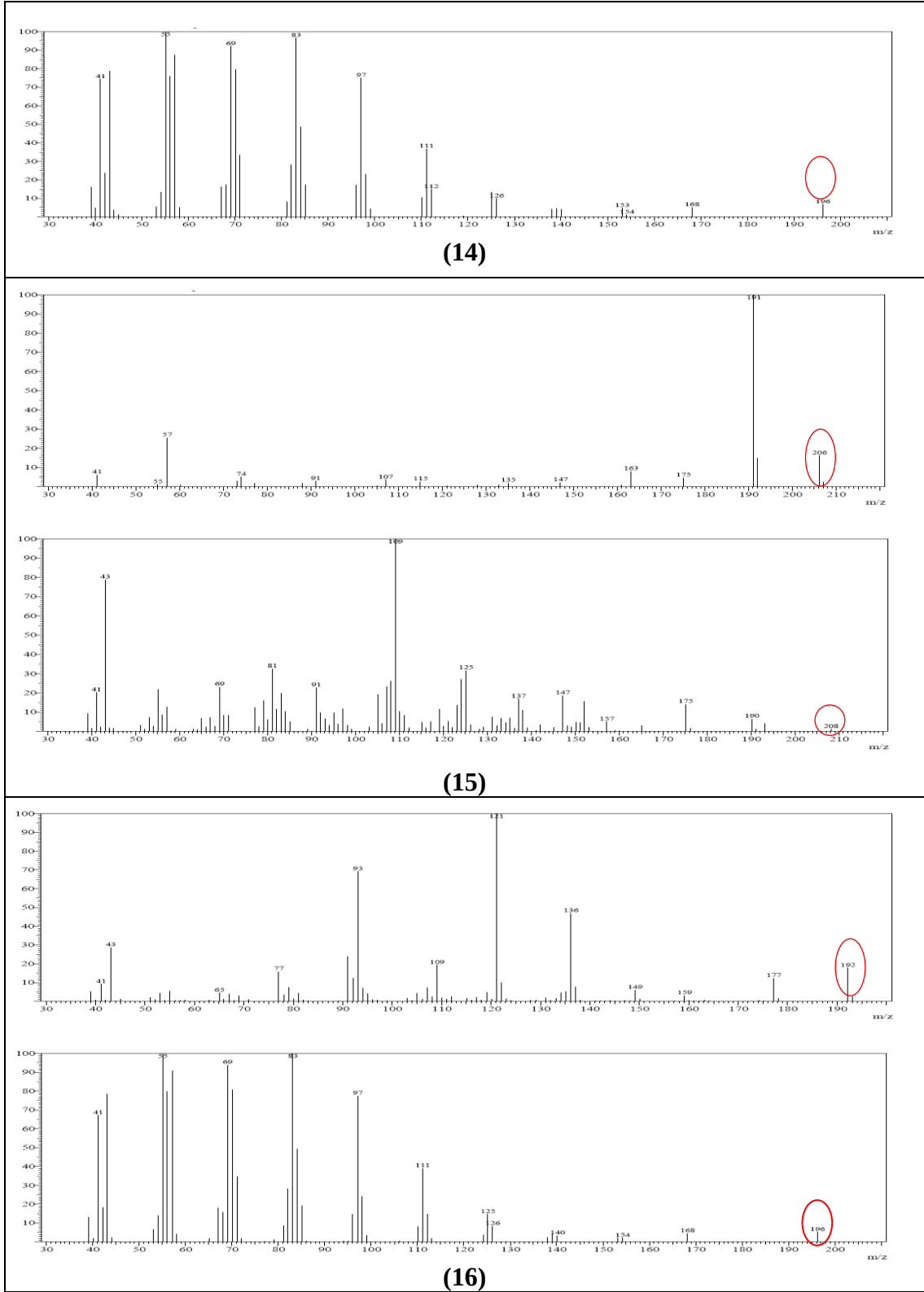




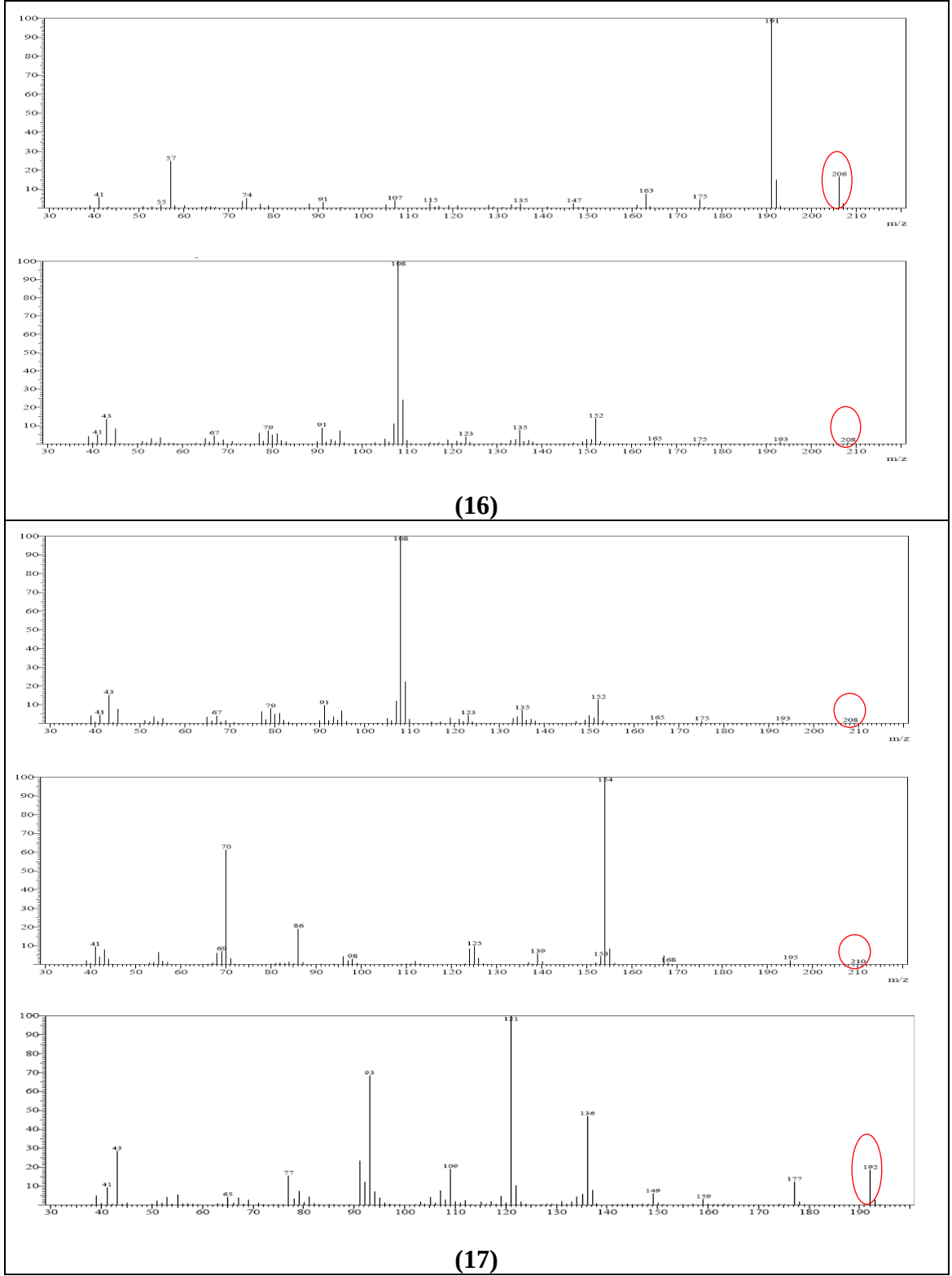
Şekil 4.2e. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)



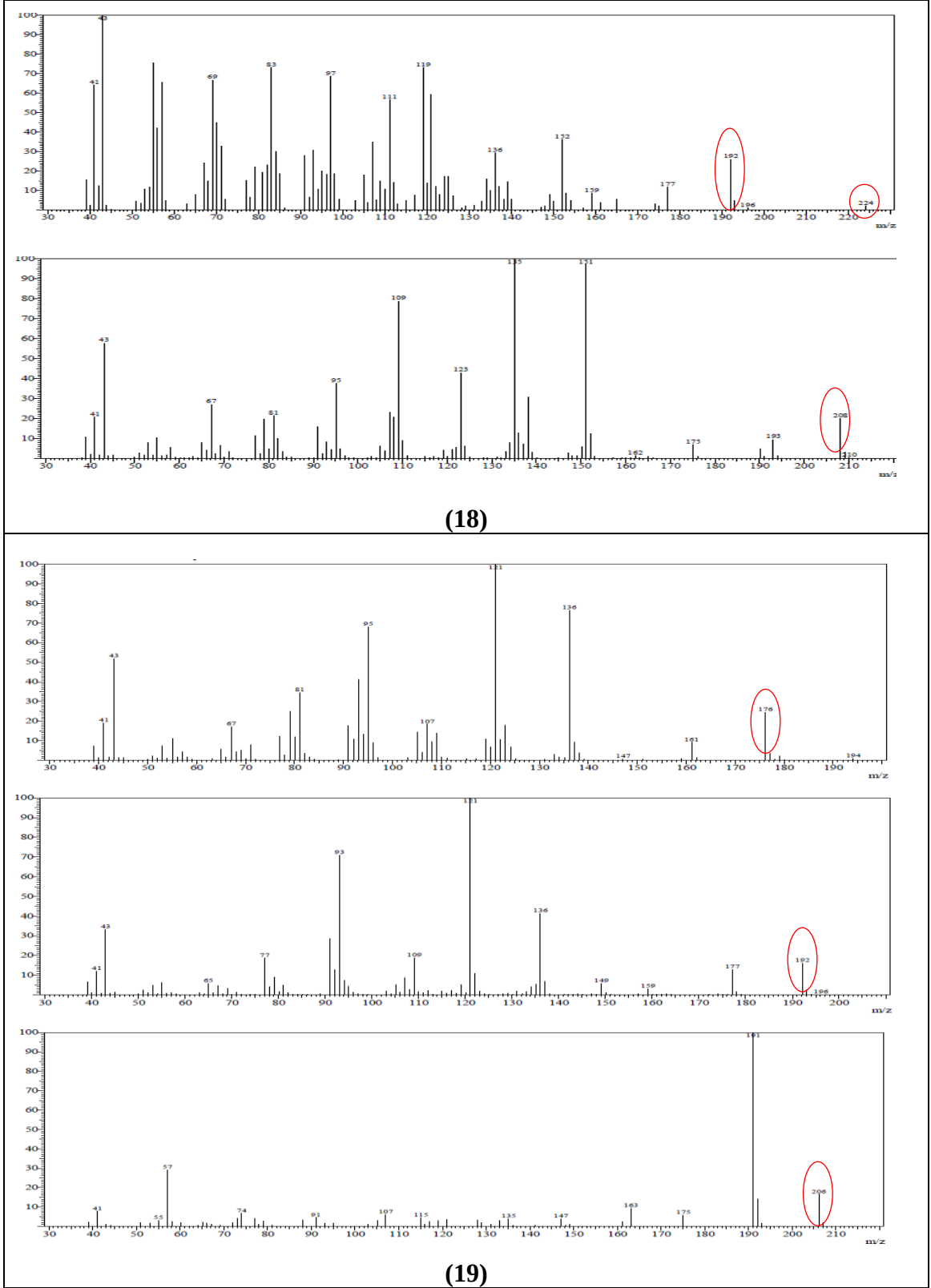
Şekil 4.2f. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)



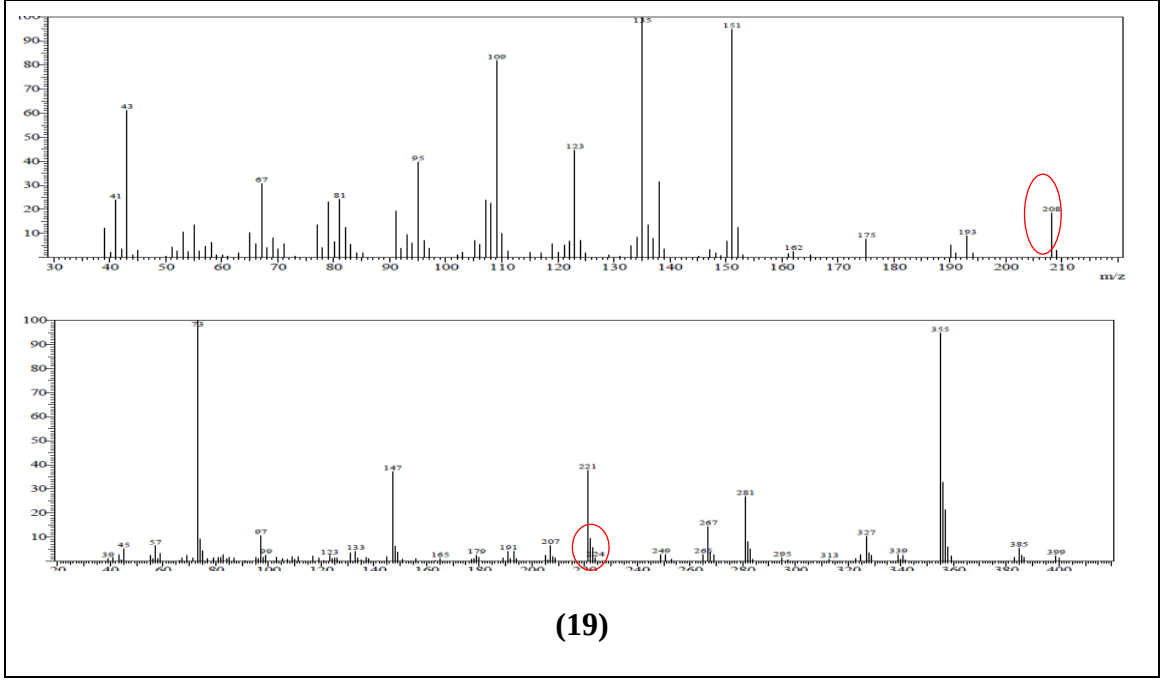
Şekil 4.2g. α -İyonol 'ün ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)



Şekil 4.2h. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)

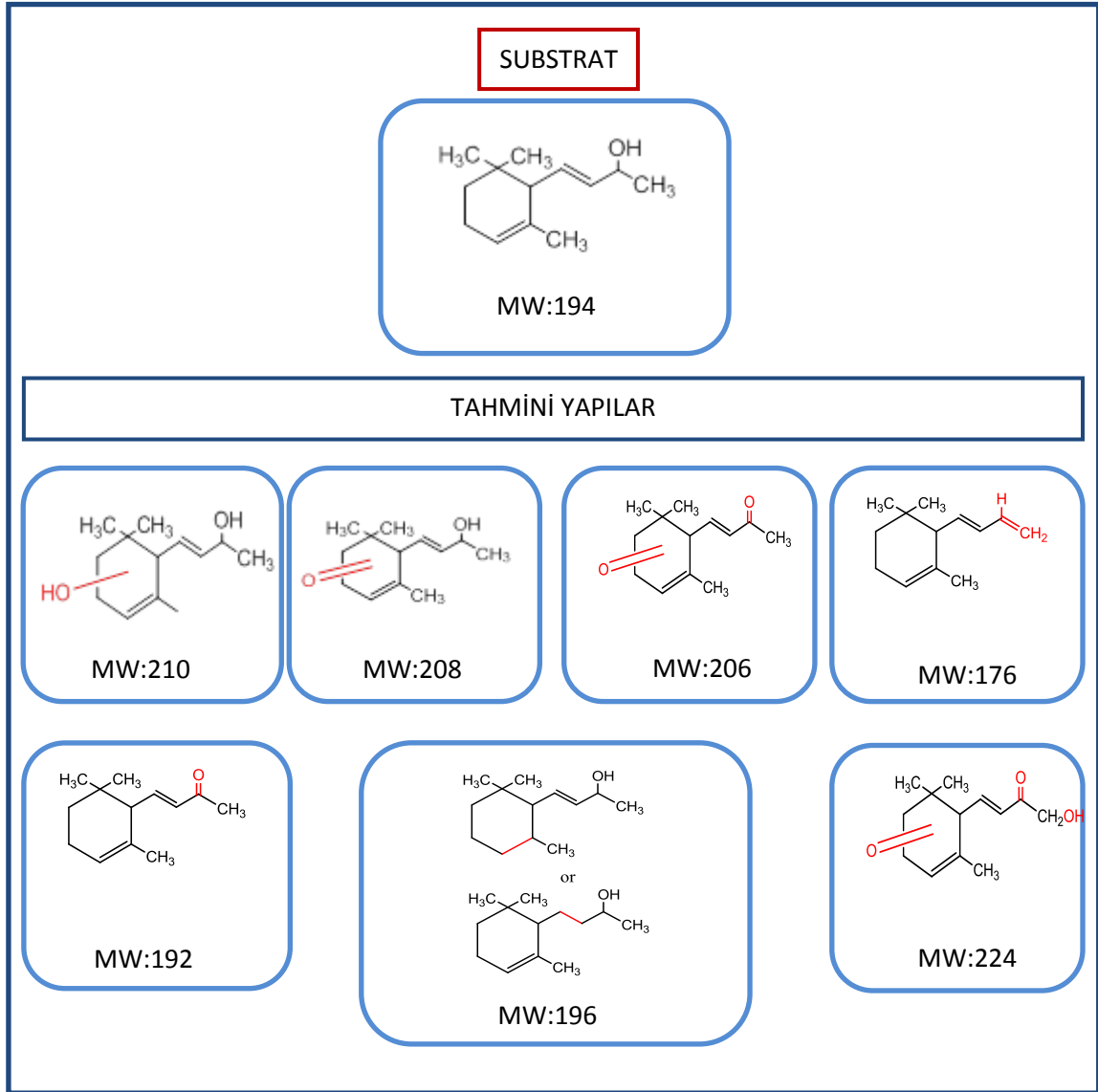


Şekil 4.21. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)



Şekil 4.2i. α -İyonol'un ön deneme sonucunda oluşan metabolitlerin (GK/KS) kütle spektrumları (devam)

Elde edilen metabolitlerin kütle (GK/KS) spekturumlarının yorumlanması sonucu oluşan tahmini yapılar Şekil 4.3'te verilmiştir.



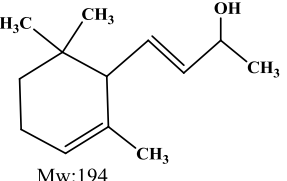
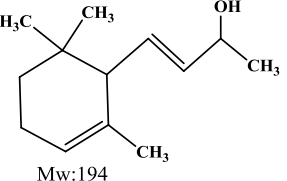
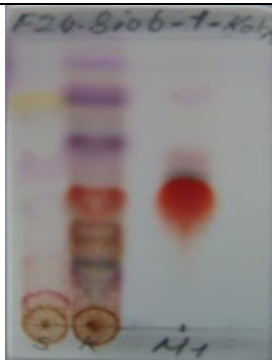
Şekil 4.3. α -İyonol'un tahmini metabolitlerinin yapıları

4.2. Preparatif Ölçekte Çalışmalar

Ön denemeler sonucu α -İyonol'un *A. niger* NRRL 326 ve *F. culmarum* mikroorganizmalarıyla biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolit karışımları önemli bulunmuştur. Karışımdaki metabolit yapılarının tanımlanması amacıyla ilgili biyotransformasyon tepkimeleri preparatif ölçekte yeniden çalışılmıştır.

4.3. α -İyonol'un *A. niger* ve *F. culmorum* ile Biotransformasyonu

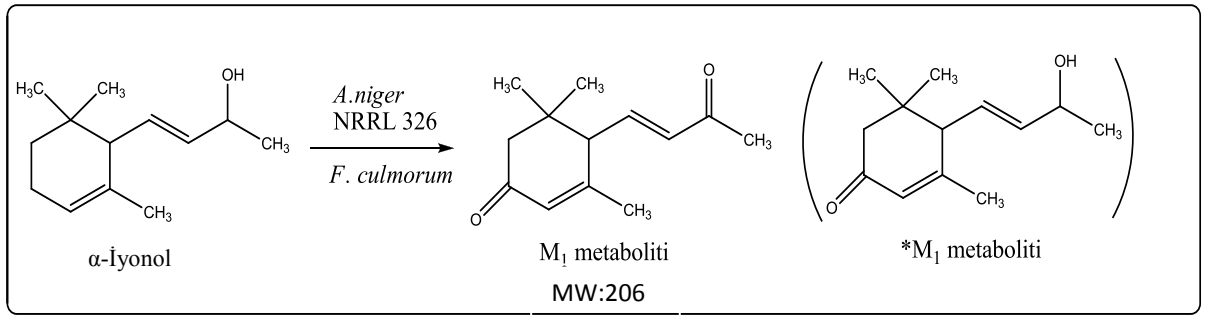
Biyotransformasyon sonucu oluşan karışımlara kolon kromatografisi uygulanarak saf metabolitler elde edildi. α -İyonol'un *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit M1 ve *F. culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolit N1 olarak adlandırıldı. Metabolitlerin saflaştırma sonrası İTK verileri Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Substrat	Mikroorganizma	Elde edilen saflaştırma sonrası İTK'sı
α -İyonol  Mw:194	<i>A. niger</i> NRRL 326 	 Std: Mikroorganizma K: Kolon karışımı M ₁ : 44 mg %6.6 M _{mix2} (karışık metabolit) M _{mix1} (karışık metabolit)
α -İyonol  Mw:194	<i>F. culmorum</i> 	 Std: Mikroorganizma K: Kolon karışımı N ₁ :92 mg %15.3

Şekil 4.4. α -İyonol'un *A. niger* ve *F.culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK ve metabolit verileri

M₁ molekülü [44 mg (% 6.6)] kolonda % 40 etil asetat/*n*-hekzan çözeltisi, N₁ molekülü [92 mg (% 15.3)] kolonda % 25 etil asetat/*n*-hekzan çözeltisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

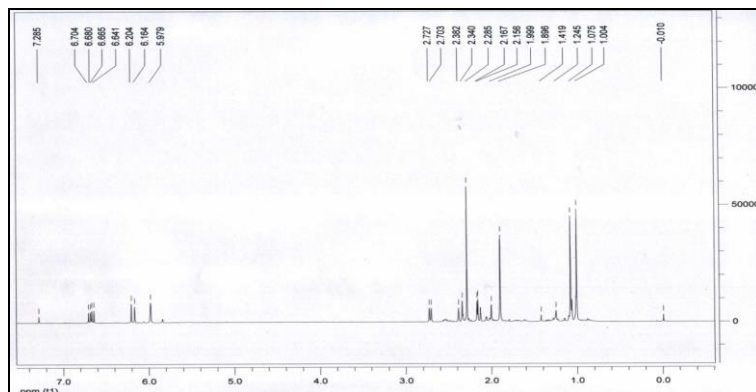
Oluşan metabolitlerin yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Yapılan yorumlamalar sonucunda α -iyonol'un *A. niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitin (M₁), α -iyonol'un *F. culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolit (N₁) ile aynı yapıda olduğu tespit edilmiştir. (Bkz. Şekil 4.5)



Şekil 4.5. α -İyonol'un *A. niger* NRRL 326 ve *F. culmorum* ile biyotransformasyonu

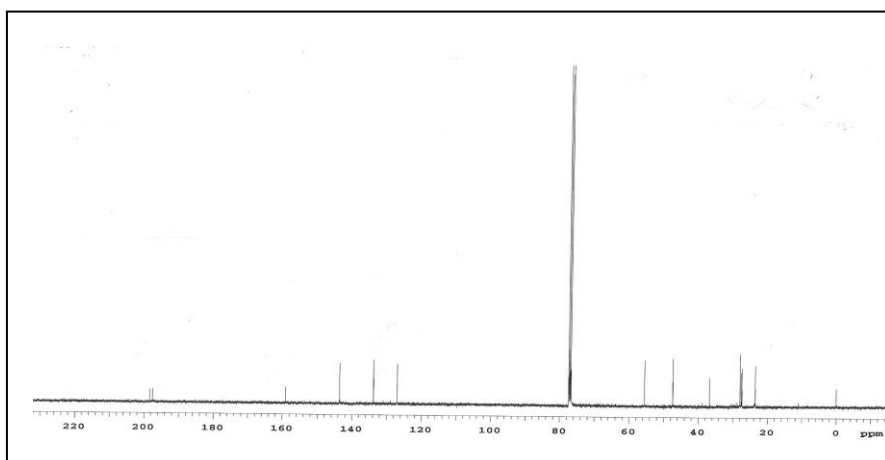
*Santez proje sonuç raporunda ilgili molekülün çizimi sehven keton yerine alkol olarak yazılmıştır

M₁ metabolitine ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.6a'da, ¹³C-NMR spektrumu Şekil 4.6b'de, DEPT spektrumu Şekil 4.6c'de, HMBC spektrumu Şekil 4.6d'de, kütle kromatogramı ve spekturumu Şekil 4.6e'de gösterilmektedir.



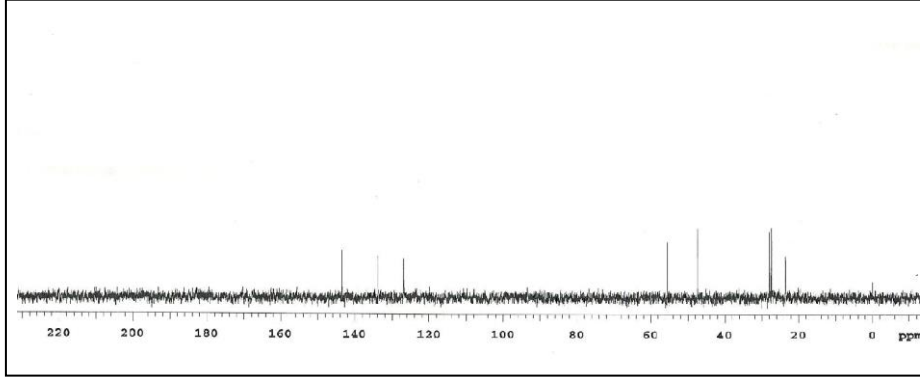
Şekil.4.6a. M₁ metabolitinin ¹H-NMR spektrumu

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.01 (3H, s, H-11), 1.08 (3H, s, H-12), 1.89 (3H, s, H-13), 2.28 (3H, s, H-10), 2.71 (1H, d, J = 10 Hz, H-6), 5.98 (1H, br s, 4-H), 6.18 (1H, br s, J = 15 Hz, H-8), 6.60 (1H, m, H-7)

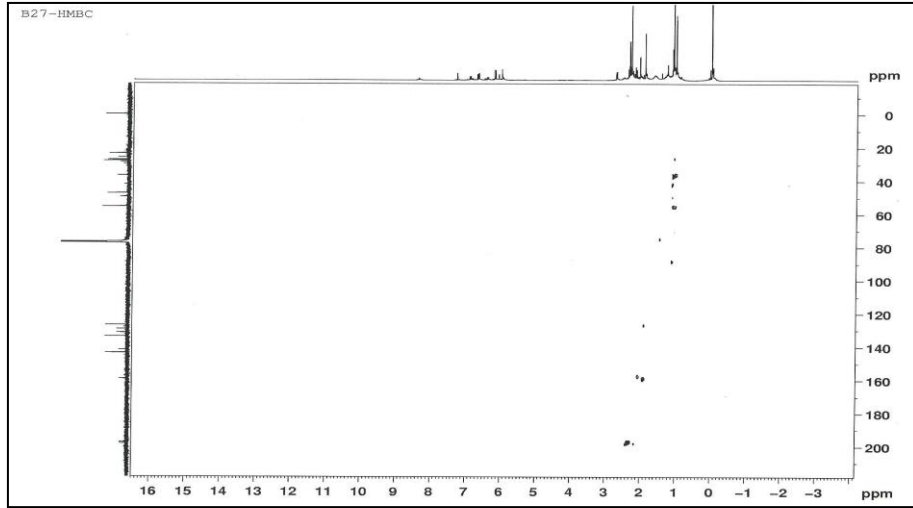


Şekil.4.6b. M₁ metabolitinin ¹³C-NMR spektrumu

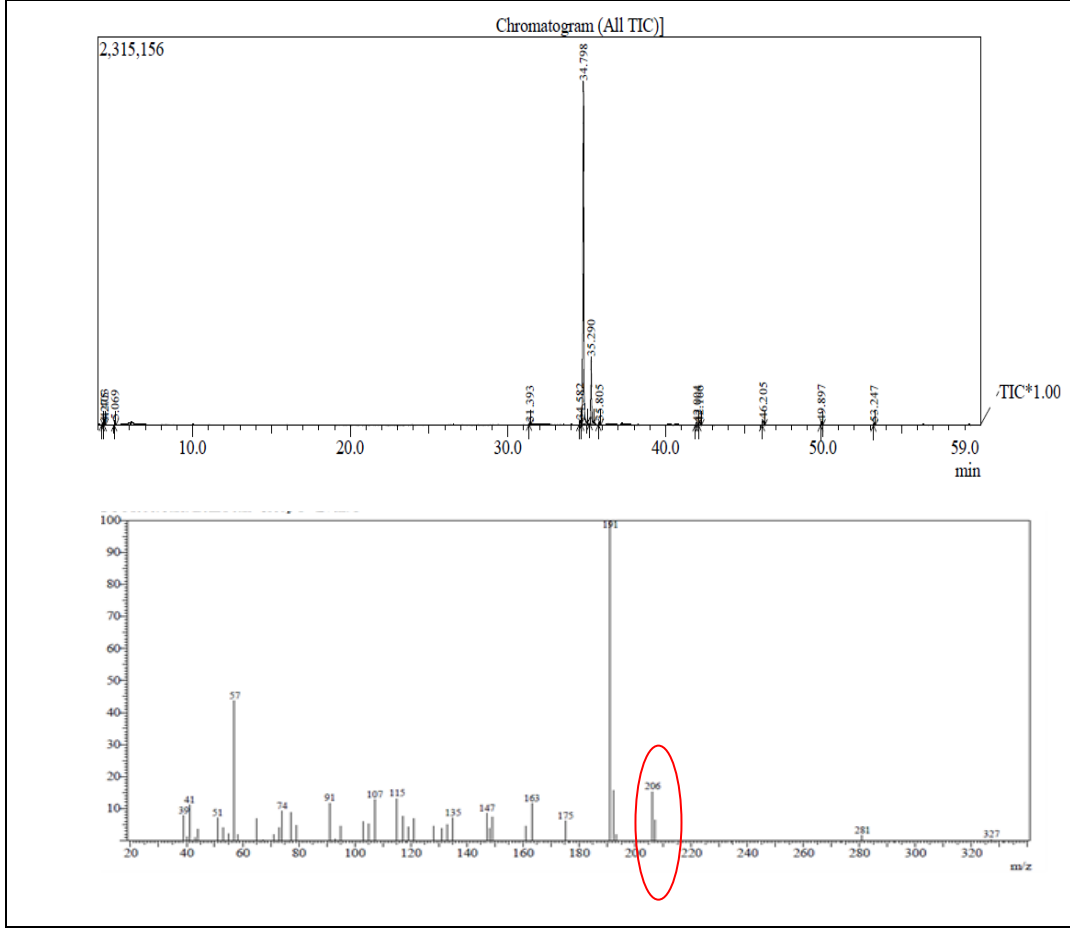
¹³C NMR (CDCl₃): δ 198.3 (C-3), 197.5 (C-9), 159.1 (C-5), 143.6 (C-7), 133.8 (C-8), 127.0 (C-4), 55.5 (C-6), 47.4 (C-2), 36.7 (C-1), 27.9 (C-10), 27.6 (C-12), 27.3 (C-11), 23.5 (C-13).



Şekil.4.6c. M_1 metabolitinin DEPT spektrumu



Şekil.4.6d. M_1 metabolitinin HMBC spektrumu



Şekil 4.6e. M₁ metabolitin (GK/KS) kütle kromotogramı ve spekturumu

4.4. Sonuçların Değerlendirmesi ve Öneriler

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1) α -İyonol molekülünün *A. niger* NRRL 326 ve *F. culmorum* mikroorganizmalarıyla yapılan Biyotransformasyon tepkimeleri sonucu öncelikle hidroksil grubu ilavesi ve daha sonra bu hidroksil grubunun keton yapısına dönüştüğü gözlenmiştir. Elde edilen metabolitin yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmış ve 3-okso- α -iyonon olarak isimlendirilmiştir.

- 2) Çoğunlukla birden fazla metabolit içeren karışımlar elde edilmiş, bu durum verimin düşmesine ve saflaştırmalarda zorluklar yaşanmasına neden olmuştur. Biyotransformasyon çalışmalarında mikroorganizmalar yerine izole enzim sistemlerinin kullanılmasının metabolit sayısını azaltacağı ve elde edilmesi muhtemel farklı metabolitlerin verimini mim yükseltilmesi mümkün olabilecektir.
- 3) Karışımdaki metabolitlerin polarite değerleri birbirine yakın olduğundan beraber gelmiş ve kolon kromatografisi ile saflaştırmada saf metabolit oranlarının düşmesine neden olmuştur.
- 4) Literatür araştırması sonucunda α -ionol molekülü ile gerçekleştirilen herhangi bir biyotransformasyon deneyine rastlanmamıştır. Fakat α -İyonon'un *Caragana chamlagu* bitki hücre kültürü ile biyotransformasyonu sonucunda 3-okso- α -iyonon molekülünün elde edildiği belirtilmiştir. Bu moleküle ait verilen spektroskopik veriler;
 $(\pm)$ -3-Okso- α -iyonon: yağımsı; $[\alpha]_D$: -4° (c 0.45, CHCl_3); IR (CHCl_3): ν 1660, 1625 cm^{-1} , ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.01 (3H, s, H-11), 1.08 (3H, s, H-12), 1.89 (3H, s, H-13), 2.28 (3H, s, H-10), 2.71 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-6), 5.98 (1H, br s, 4-H), 6.18 (1H, br s, $J = 15$ Hz, H-8), 6.60 (1H, q, $J = 6, 10$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 198.3 (C-3), 197.5 (C-9), 159.1 (C-5), 143.6 (C-7), 133.8 (C-8), 127.0 (C-4), 55.5 (C-6), 47.4 (C-2), 36.7 (C-1), 27.9 (C-10), 27.6 (C-12), 27.3 (C-11), 23.5 (C-13); HREIMS m/z : 206.1306 ($\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{O}_2$ için hesaplanan: 206.1307) (Sakamaki et al., 2004). Makalede verilen bu değerler, elde ettiğimiz M_1 metabolitinin yapısını doğrulamaktadır.

Öneriler:

- 1) Biyotransformasyon çalışmalarında mikroorganizmalar yerine izole enzim sistemlerinin kullanılması durumunda, metabolit sayılarının azalması sağlanabilir. Böylelikle tepkimelerin yüksek verimde gerçekleşmesi sağlanabilir.
- 2) Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda polariteleri birbirine yakın metabolitler elde edilmiştir. Bu tür metabolitlerin etkin bir şekilde saflaştırılması ve yüksek verim alma amacıyla HPLC, UPLC, Flash Kolon Kromatografisi gibi diğer kromatografik yöntemler kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aran, N., 2010, Gıda biyoteknolojisi, Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Ankara, 1, 493s.
- Armstrong, D.W. and Yamazak, H., 1986, A Biotechnological Approach, Natural Flavours Production, Trends in Biotechnological, 4, 264-268.
- Arnold, L., 2000, Small bugs big business the economic power of the microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514.
- Banerjee, S., Singh, S. and Rahman L.U., 2011, Biotransformation studies using hairy root cultures-a review, Biotechnology Advances 30, 461-468.
- Berger , R. G., 1995, Aroma biotechnology, Springer Verlang , Berlin, 450.
- Berger, R. G., Krings, U., and Zorn, H., 2002, Biotechnological flavour generation, Food flavour technology, A.J. Taylor (Eds), Sheffield, Academic Press, UK, 60-104
- Berger, R. G., 2009, Biotechnology of flavours-the next generation, Biotechnol Lett, 31, 1651-1659.
- Bosser, A., Belin, J. M., 1994, Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/ β -carotene system involving free radical formation, Biotechnol Prog, 10, 129-133.
- Breitmaier, E., 2006, Terpenes, Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 223 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buchanan, G.O., Williams, L.A.D., and Reese, P. B., 2000, Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Phytochemistry*, 54, 39-45.
- Bustamante, E.R. and Sánchez, S., 2007, Microbial production of C₁₃-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage, *Critical Reviews in Microbiology*, 33, 211-230
- Bruece-Yurkanis, P., 1998, *Organic Chemistry, Second Edition*, Prentice Hall, Chapter 23,
- Cogan , T.M., 1995, Flavour production by dairy starter cultures, *J Appl Bacteriol, Symp Suppl*, 79, 49-64
- Collins, D.O. and Reese, P.B., 2002, Biotransformation of Cadin-4,10(15)-dien-3-one and 3 α -hydroxycadina-4,10(15)-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Phytochemistry*, 59, 489-492
- Deetae, P., Bonnarme, P., Spinner, H. E. and Helinck, S., 2007, Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1161-1171.
- Demirci , F., 2000, Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137 s.
- Dziezak, J.D., 1986, Antioxidants, *Food Technol*, 40, 108 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Engels, W.J.M. and Visser, S., 1994, Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese, *Neth Milk Dairy J*, 48, 127-140.
- Fabre, C.E., Blanc P.J. and Goma, G., 1996, Production of benzaldehyde by several stains of *Ischnoderma benzoinum*, *Sci Aliment*, 16, 61-68.
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lasage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G. and Asther, M., 1994, Vanilin as product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, I, 937-:identification of metabolic pathways, *J Biotechnol*, 37, 123-132.
- Feron, G., Bonnarme, P. and Durand, A., 1996, Prospects for the microbial production of food flavours, *Trends Food Sci Technol*, 7, 285-293.
- Finar, J.L., 1975, The chemistry of natural products, *Organic Chemistry*, Longman, 5, 2, 354-459.
- Garcia-Granados, A., Gutiérrez, M.C., Martinez, A., Rivas, F. and Arias, J.M., 1998, Biotransformation of shiromool derivatives by *Rhizopus nigricans* cultures, chemical-microbiological synthesis of michelenolide analogues, *Tetrahedron*, 54, 3311-3320
- Garcia-Granados, A., Melguizo, E., Parra, A., Pérez, F. L., Simeó, Y., Viseras, B. and Arias, J. M., 2000, Chemical semisynthesis and biotransformation with *Rhizopus nigricans* of several sesquiterpenes, obtention of new 1 α -and 2 α -hydroxyselinane derivatives, *Tetrahedron*, 56, 6517-6526.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Garcia-Granados, A., Gutiérrez, M.C., Rivas, F. and Arias, J.M., 2001, Biotransformation of 4 β -hydroxyeudesmane-1,6-dione by *Gliocladium roseum* and *Exserohilum halodes*, *Phytochemistry*, 58, 891-895.
- Gatfield, I.L., 1996, Enzymatic and microbial generation of flavours, *World Inged*, 40, 31-35.
- Giri, A., Dhingra V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P. and Narasu, M.L., 2001, Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems, current trends and future prospects, *Biotechnol Adv*, 19, 175-99.
- Gören, A.C., 2002, Bazı *Sideritis*(*Sideritis argyrea*, *Sideritis dichotoma*, *Sideritis trojana*) türlerinin diterpenik bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 30 s.
- Hagedorn, S. and Kaphammer, B., 1994, Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals, *Annu Rev Microbiol*, 48, 773-800.
- Hamada, T., Sungishita, M., Fukushuma, Y., Fukase, T. and Motai, H., 1991, Continuous production of soy sauce by a bioreactor system, *Proc Biochem*, 26, 39-45.
- Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J. and Demuynck, C., 1996, Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*, *J Agric Food Chem*, 44, 1357-1360.
- Imhof, R. and Bosset, J.O., 1994, Relationships between microorganisms and formation of aroma compounds in fermented dairy products, *Z Lebensm Unters Forsch*, 198, 267-276

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T. and Nakajima, N., 1996, Review-biotransformation using plant cultured cells, *J Mol Catal B*, 23, 145-70.
- Janssens, L., de Poorter, H.L., Vandamme, E.J. and Schamp, N.M., 1987, Production of flavours by the yeast *Hansenula mraakii*, *Madedelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 54, 1907-1913.
- Janssens L., de Pooter, H. L., Schamp, N. M. and Vandamme, E. J., 1992, Production of flavours by microorganisms, *Process Biochemistry*, 27, 195-215.
- Jeffcoat, R. and Willis, B.J., 1998, A manufacturing proccess for hexadecanolide, *Dev Food Sci*, 18, 743.
- Jeon, I.J., 1994, Flavour chemistry of dairy lipids, Review of free fatty acids, *Lipids in food flavors*, ACS Monogr, 558, 196-207.
- Ji-Hua, L. and Bo-Yang, Y., 2010, Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds, *Curr Org Chem*, 14, 1400-1406.
- Kawabe, T. and Morita, H., 1993, volatile components in culture fluid of *Polyporus tuberaster*, *J. Agric Food Chem*, 41, 637-640.
- Keskin, S.Y. ve Yıldırım, K., 2010, *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 ile (-)-Nopol bileşiğinin biyotransformasyonları, *Fen Bilimleri Dergisi*, 14, 1, 16-19.
- Knorr, D., 1987, *Food Beotechnology*, New York

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kösali, Y.K., 2005, α -Hidroksi ketonların enantiyoseçimli olarak biyotransformasyonla üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 71 s.
- Krings, U., Abraham, B. and Berger, R.G., 1995, Plant impact volatiles from higher fungi-a biotechnological perspective, *Perf Flavor*, 20, 79-86.
- Krings, U. and Berger, R.G., 1998, Biotechnological production of flavours and fragrances, *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 1-8.
- Latrasse, A., Degorce-Dumans, J.R. and Leveau, J.Y., 1985, Production d'arômes par les microorganismes, *Sci Aliment*, 5, 1-26.
- Limberger, R.P., Ferreira, L., Castilhos, T., Aleixo, A.M., Petersen, R.Z., Germani, J.C., Zuanazzi, J.A., Fett-Neto, A.G. and Henriques, A.T., 2003, Ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (-)- α -bisabolol as exogenous substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 552-555.
- Lindsay, R.G. and Willis, B.J., 1989, *Biotechnology-challenges for the flavour and food industry*, Elsevier Applied Science, London, New York.
- Lomascolo, A., Lesage-Meessen, L., Labat, M., Navarro, D., Delattre, M. and Asther, M., 1999, Enhanced benzaldehyde formation by monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using a selective solid adsorbent in the culture medium, *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 653-65.(a)
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M. and Lesage-Meessen, L., 1999, Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry, *Trends in Biotechnology*, 17, 282-289.(b)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Longo, M.A., and Sanromán, M.A., 2006, Production of food aroma compounds, Food Technology and Biotechnology, 44, 335-353.
- Loughlin, W.A., 2000, Biotransformations in organic synthesis, Bioresource Technology, 74, 1, 49-62.
- Maarse, H., 1991, Volatile compounds in foods and beverages, Marcel Dekker Inc., New York, 1, 39 p.
- Manley, C. H., 1994, The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology, Wiley, New York, 19-39.
- Matos, J.M., M.D., Schmidt C.M., M.D., PhD., M.B.A., Thomas, H.J., M.D., Cummings, O.W., M.D., Wiebke, E.A., M.D., Madura, J.A., M.D., Patrick, Sr., L.J., M.D. and Crowell, P.L., Ph.D., 2008, A Pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer, Journal of Surgical Research, 147, 194-199.
- Miyazawa, M., Honio, Y. and Kameoka, H., 1997, Biotransformation of the sesquiterpenoid β -selinene using the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata* as biocatalyst, Phytochemistry, 44, 443-436.
- McMurry, J., 1986, Organic chemistry, Fourth Edition, Brooks Cole Publishing Company, 28, 1099-1123
- Neto, R.S., Pastore, G.M. and Macedo, G. A., 2004, Biocatalysis and biotransformation producing γ -Dekalaktone, Journal of Food Science, 69, 677-680.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olagnier, D., Costes, P., Berry, A., Linas, M-D., Urrutigoity, M., Dechy-Cabaret, O., and Benoit-Vical, F., 2007, Modifications of the chemical structure of terpenes in antiparasitic and antifungal drug research, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6075-6078.
- Omeliński, V.L., 1923, Aroma-producing microorganisms, *J. Bacteriol.*, 8, 4, 393-419.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002, İnsan biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 659 s.
- Orabi, K.Y., 2000, Microbial transformation of the eudesmane sesquiterpene plectranthone, *J. Nat. Prod.*, 63, 1709-1711.
- Oreste, G. and Hans-Peter, M., 2010, Industrial biotransformation, *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and Cell Technology*, edited by Michael C. Flickinger.
- Oskay, D., Oskay, M., 2009, Biotechnological importance of plant secondary metabolites, *E-Journal Of New World Sciences Academy*, 4, 2, 31-41.
- Özşen, Ö. E., 2011, İzoforon analoglarının sentezi, biyotransformasyonu ve biyolojik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 62 s.
- Peddie, A.B.H., 1990, Ester Formation in brewery fermentations, *Journal of Institute of Brewing*, 96, 327-331.
- Pinches, M., 1994, Cheese- developing the flavour, *Dairy Int.*, 59, 37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pollak, F. C. and Berger, R. G., 1996, Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109, 60, *Appl Environ Microbiol*, 62, 1295-1299.
- Rapier, S., Breheret, S., Talou, T. and Bessière, J.M., 1997, Volatile flavor constituents of fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic *Marasmius*), *J Agric Food Chem*, 45, 820-825.
- Reineccius, G., 2006, *Flavour Chemistry and Technology*, CRC Press, Boca Ration., 123-298.
- Roberts, S.M., 1992, *Preparative biotransformations: whole cell and isolated enzymes in organic synthesis*, John Wiley&Sons, Chichester.
- Roberts, J.E., Speedie, M.K. and Tyler, V.E., 1996, *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*, Balado, D., (Eds) Williams & Wilkins, USA, 81-107.
- Rocha-Valadez, J.A., Estrada, M., Galindo, E. and Leobardo, S.C., 2006, From shake flasks to stirred fermentors: scale-up of an extractive fermentation process for 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input, *Process Biochemistry*, 41, 1347-1352.
- Rodriguez-Bustamante, E., and Sánchez, S., 2007, Microbial production of C₁₃-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage, *Informa Healthcare*, 33, 211-230.
- Rodriguez, E., Towers, G.H.N. and Mitchell, J.C., 1976, Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry*, 15, 1573-1580.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roman P., Kandefer-Szerszen M., Trytek M. and Fiedurek J., 2007, Terpenes: Substances useful in human healthcare, Arch Immunol. Ther. Exp., 55, 315-327.
- Romanczyk, L.J., McClelland, C.A., Post, L.S. and Aitken, W.M., 1995, Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by *Several Bacillus Cereus* Strains isolated from cocoa Fermentation boxes, J Agric Food Chem, 43, 469-475.
- Rowe, D.J., 2005, Chemistry and technology of flavors and fragrances, Blackwell Publishing Ltd., UK, 336 p.
- Sakar, M. K., ve Tanker, N., 1990, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fak. Yay., 282-344.
- Sakamaki, H., Itoh, K., Chai, W., Hayashida, Y., Kitanaka, S. and Horiuchi, C., 2004, Biotransformation of (+,-)- α -ionone and β -ionone by cultured cells of *Caragana chamlagu*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 27, 177-181.
- Sattar, E. A., Galal, A.M., Mossa, G.S., Antitumor Germacranolides from *Anvillea garcinii*. J. Nat. Prod., 59, 403-405.
- Schrader, L., Etschmann, M.M.W., Sell, D., Hilmer, J. M. and Rabenhorst, J., 2004, Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects, Biotechnology Letters, 26, 463-472.
- Sharpell, F. and Stemann, C., 1979, Development of fermentation media for production of butyric acid, Moo-Young, M., (Eds.) Advances in Biotechnology Pergamon, Toronto, 2, 71-77.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seitz, E. W., 1994, Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavours and fragrances, Gabelman A. (Eds.), Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. Wiley, New York, 95-134.
- Simeó, Y. and Sinisterra J. V., 2009, Biotransformation of terpenoids, A green alternative for producing molecules with pharmacological activity, Mini-Reviews Organic Chemistry, 6, 128-134.
- Simmonds, J., and Robinson, G.K., 1997, Novel biotransformations to produce aromatic and heterocyclic aldehydes. Enzyme and Microbial Technology, 21, 367-374.
- Soares, M., Christen P., Pandey, A., Raimbault, M. and Soccol, C.R., 2000, A Novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue, Bioprocess Engineering, 23, 695-699.
- Solomons, G. and Fryhle, C., 2002, Organik Kimya, 1152-1155.
- Tanker, M. and Tanker, N., 1990, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Fakültesi Yay., 65-34
- Thibault, J. F., Asher, M., Ceccaldi, B. C., Couteau, D., Delattre, M., Duarte, J. C., Faulds, C., Heldt-Hansen, H. P., Kron, P., Lesage-Meessen, L., Micard, V. M. G. C., Renard, C., Tuohy, M., Van Hulle, S. and Williamson, G., 1998, Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 31, 530-536.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1997, Dünya Yayıncılık, İstanbul

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tyrrell, M.H., 1990, Food Technol, 44, 68.
- Vandamme, E.J. and Soetaert, W., 2002, Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77, 1323-1332.
- Vandamme, E.J., 2003, Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes, Fungal Diversity, 13, 153-166.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G. and Verachtert, H., 2003, Bioflavouring and beer refermentation, Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 140-150.
- Walton, N. J., Narbad, A., Faulds, C. B. and Williamson, A., 2000, Novel approaches to the biosynthesis of vanillin, Current Opinion in Biotechnology, 11, 490-496.
- Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.M. and Belin, J.M., 2003, Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*, Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 393-400.
- Welsh, F.W., Murray, W.D., and Williams, R.E., 1989, Microbial and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals, Crit.Rev.Biotechnol, 9, 2, 105-169.
- Welsh, F. W., 1994, Overview of bioprocess flavor and fragrance production, Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients, Gabelman, A., (Eds), Wiley, New York, 1-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Winterhalter, P. and Schreier, P., 1993, Biotechnology, challenge for the flavor industry, Flavor Science, American Chemical Society, 225-258.

Xanthakis, E., Magkouta, S., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C. and Kolisis, F.N., 2009, Enzymatic synthesis of perillyl alcohol derivatives and investigations of their antiproliferative activity, Biocatalysis and Biotransformations, 1-9.

Xu, P., Hua, D. and Ma, C., 2007, Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production, Trends in Biotechnology, 25, 571-576.

Yasumoto, K., Iwami, K. and Mitsuda, H., 1994, Enzymatic formation of shi-ta-ke aroma from non-volatile precursor(s)-lenthionine from lentinic acid, proceedings of the 9th international scientific congress on the cultivation of edible fungi, Tokyo, 371-383.

Yılmaz, S., 2005, Triclosan antibiyotiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 63 s.

Yılmaztekin, M., Erten, H. ve Cabaroğlu, T., 2008, Production of isoamyl acetate from sugar beet molasses by *Williopsis saturnus*, Journal of The Institute of Brewing, 114, 34-38

(http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4177456.htm)

<http://www.zoetekni.org.tr/upload/File/GIDA%20KATKI%20MADDELERI.pdf>