

Perillil Alkol'ün Mikrobiyal Biyotransformasyonu

Şimal Şencan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz 2013

Microbial Biotransformation of Perillyl Alcohol

Şimal Şencan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

July 2013

Perillil Alkol'ün Mikrobiyal Biyotransformasyonu

Şimal Şencan

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

Temmuz 2013

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şimal Şencan'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Perillil Alkol'ün Mikrobiyal Biyotransformasyonu" 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. Tamer AKAR

Üye : Doç.Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Doç.Dr. Selma YARLIGAN UYSAL

Üye : Yrd.Doç.Dr. Müjgan ÖZKÜTÜK

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Perillil alkol lavanta, nane, kiraz, kereviz tohumu ve diğer bazı bitkilerin uçucu yağlarından izole edilmiş bir monoterpendir. Tıp alanında pankreas, meme ve karaciğer gibi önemli kanser türlerinin tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır. Kolon, deri ve akciğer kanserinde ise önleyici bir ajandır. Perillil alkol'ün, normal hücreleri etkilemeden tümör hücreleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada Perillil alkol'ün 18 farklı mikroorganizma ile ön biyotransformasyon denemeleri yapılmıştır. Metabolit elde edildiği düşünülen *Fusarium culmorum*, *Sporobolomyces pararoseus*, *Mucor ramannianus* ve *Corynespora cassiicola* küfleri ile miligram düzeyde mikrobiyal biyotransformasyon çalışmaları tekrarlanmış ve metabolit yapıları ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır. Perillil alkol'ün *Fusarium culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu saf bir metabolit elde edilmiştir. Elde edilen molekül 4-İzopropenil-siklohegzankarbaldehit olarak isimlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Perillil alkol, mikrobiyal biyotransformasyon, monoterpen, biyoteknoloji, spektroskopik yöntemler ve NMR

SUMMARY

Perillyl alcohol is a monoterpene isolated from the essential oils of lavender, peppermint, spearmint, cherries, celery seeds, and several other plants. In animal studies it has been shown to regress pancreatic, mammary, and liver tumors, to exhibit possible application as a chemopreventative agent for colon, skin, and lung cancer, and as a chemotherapeutic agent for neuroblastoma, and prostate and colon cancer. Perillyl alcohol is active in inducing apoptosis in tumor cells without affecting normal cells and can revert tumor cells back to a differentiated state.

In this study, the biotransformation of Perillyl alcohol with 18 different microorganisms were carried out. Biotransformation reactions with *Fusarium culmorum*, *Sporobolomyces pararoseus*, *Mucor ramannianus* and *Corynespora cassiicola* which are believed to produce metabolites were repeated in mg scale and the metabolite structures were elucidated by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra. Biotransformation of Perillyl alcohol with *Fusarium culmorum* produced a pure metabolite. The new metabolite is called 4-Isopropenyl-cyclohexanecarbaldehyde.

Keywords: Perillyl alcohol, microbial biotransformation, monoterpenes, biotechnology, spectroscopic methods and NMR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans çalışmalarım boyunca, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan kıymetli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Sayın İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında ve diğer her konuda ilgi alaka ve yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini paylaşmak ve öğretmekten asla çekinmeyen değerli hocam Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü Araş. Gör. Özge ÖZŞEN'e,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını ve imkanlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Fatih DEMİRCİ'ye ve analizlerde her zaman yardımcı olan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sayın Gökalep İŞCAN'a,

Çalışmalarına katkıda bulunan yüksek lisans arkadaşlarım en başta Ceren ELMACI'ya, sonrasında Seda GÖZER ve Nazife KAYA'ya ve çeşitli konularda yardımlarını aldığım Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi çalışanlarına,

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, bana güvenlerini eksik etmeyen günlere gelmemde en büyük paya sahip canım aileme,

Akademik hayatımda bana sonsuz desteğini veren hayat arkadaşım Cemal Ogün KÜRÜMOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şimal Şencan

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
 BÖLÜM-1: GİRİŞ VE AMAÇ	 1
 BÖLÜM-2: GENEL BİLGİLER	 2
2.1 Doğal Koku ve Tat Maddeleri.....	2
2.2. Terpenler ve Biyosentezi.....	3
2.3. Monoterpenler	8
2.3.1. Monoterpenlerin sınıflandırılması	8
2.3.1.1. Asiklik monoterpenler	9
2.3.1.2. Monosiklik monoterpenler	10
2.3.1.3. Bisiklik monoterpenler	12
2.3.1.4. Trisiklik monoterpenler	12
2.3.1.5. Diğer yapıdaki monoterpenler	12
2.3.2. Monoterpenlerin önemi ve biyolojik etkileri	13
2.4. Biyotransformasyon	15
2.4.1. Biyotransformasyon yöntemleri	15
2.4.1.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon	16
2.4.1.2. Stasyonere hücreler ile biyotransformasyon	16
2.4.1.3. Sporlar ile biyotransformasyon	16
2.4.1.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1.4. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon	16
2.4.2. Biyotransformasyon tepkimeleri ve kullanılan enzimler	17
2.4.3. Monoterpenlerin biyotransformasyonu	18
2.5. Perillil Alkol	19
BÖLÜM-3: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR	21
3.1. Genel DeneySEL Bilgiler	21
3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar	21
3.2.1. Materyal	22
3.2.2. Kimyasal maddeler ve çözücüler	22
3.2.3. Cihazlar	23
3.2.4. Mikroorganizmalar	24
3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları	25
3.3.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması	25
3.3.2. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besiyeri bileşenleri	25
3.3.2.1. Taze yatık agar besiyeri	25
3.3.2.2. α -medium	26
3.3.3. Mikroorganizmaların hazırlanması	26
3.3.4. Substratın hazırlanması	27
3.3.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu	27
3.3.6. Metabolitlerin izolasyonu	27
3.3.7. Metabolitlerin tanımlanması	28
3.4. Perillil Alkol ile Gerçekleştirilen Ön Denemeler	29

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

BÖLÜM-4: SONUÇLAR ve TARTIŞMA	32
4.1. Perillil Alkol'ün Biyotransformasyonu	32
4.1.1 Perillil alkol'ün <i>F. culmorum</i> ile biyotransformasyonu	32
4.1.2 Perillil alkol'ün <i>S. pararoseus</i> ile biyotransformasyonu	35
4.1.3 Perillil alkol'ün <i>M. ramannianus</i> ile biyotransformasyonu	36
4.1.4 Perillil alkol'ün <i>C. cassicola</i> ile biyotransformasyonu	37
4.2. Sonuç ve Öneriler	38
 BÖLÜM-5: KAYNAKLAR DİZİNİ.....	 39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Savfa</u>
1.1 Terpenlerin temel yapı birimleri	3
1.2 İzopren biriminin biyosentezi	6
1.3 Terpenlerin biyosentezi	7
1.4 Monoterpenlerin sınıflandırılması	8
1.5 Asiklik monoterpenler	9
1.6 Asiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri.....	9
1.7 Linalool enantiyomerleri	9
1.8 Monosiklik monoterpenler	10
1.9 Limonen molekülü enantiomerleri	10
1.10 Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri	10
1.11 Karvon molekülü enantiomerleri	11
1.12 Mentol'ün enantiyomer yapıları	11
1.13 Bisiklik monoterpenler ve oksijenli türevleri.....	12
1.14 Trisiklik monoterpenler	12
1.15 Diğer yapıdaki monoterpenler	12
1.16 Biyotransformasyon yöntemleri	15
1.17 Biyotransformasyon tepkime tipleri	17
1.18 Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan enzimler	17
1.19 Lavanta ve nane bitkisinin resimleri	19
1.20 Perillil alkol'ün molekül yapısı.....	19
2.1 Biyotransformasyon aşamaları	28
3.1 Perillil alkol'ün <i>F. culmorum</i> ile biyotransformasyon tepkimesi.....	33
3.1a M ₁ 'in ¹ H NMR spektrumu	33
3.1b M ₁ 'in ¹³ C-NMR spektrumu	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İzopren halkası sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması	3
1.2 Kimyasal yapılarına göre terpenlerin sınıflandırılması	4
1.3 Önemli aktivite gösteren bazı monoterpenler	14
1.4 Monoterpenlerin biyotransformasyonlarının avantaj ve dezavantajları	18
1.5 Perillil alkol ile ilgili kimyasal bilgiler	20
2.1 Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	22
2.2 Kullanılan mikroorganizmalar	24
2.3 Perillil alkol'ün 18 mikroorganizma ile ön deneme İTK sonuçları	29
3.1 Perillil alkol'ün <i>F. culmorum</i> ile biyotransformasyonu	32
3.2 Perillil alkol'ün <i>S. pararoseus</i> ile biyotransformasyonu	35
3.3 Perillil alkol'ün <i>M. ramannianus</i> ile biyotransformasyonu	36
3.4 Perillil alkol'ün <i>C. cassicola</i> ile biyotransformasyonu	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
ml	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mg/L	: Bir litre çözeltideki çözünen maddenin mikrogram cinsinden değeri
μl	: Mikrolitre
$^1\text{H-NMR}$	: Hidrojen nükleer manyetik spektroskopisi
$^{13}\text{C-NMR}$	: Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HMBC	: Uzun mesafe proton ve karbon etkileşimlerinin korrelasyonu
HSQC	: İki boyutlu heteronükleer korrelasyon spektroskopisi
ATCC	: Amerikan tıp kültür koleksiyonu
br.s	: Geniş tekli pik
CDCl_3	: Dötoro kloroform
d	: İkili pik
DMSO	: Dimetil sülfoksit
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
MHA	: Mueller hinton agar
MHB	: Müler hinton broth
MHz	: Megahertz
MIK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
devir/dk	: Dakikadaki devir sayısı
SGA	: Sabouraud %4 Glukoz Agar
TTC	: Trifenil tetrazolyum klorit

BÖLÜM 1- GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde doğal ürünlere olan talep hızla artmaktadır. Bu kapsamda koku ve tat maddeleri ile ilaç etken maddelerinin biyoteknolojik yöntemlerle üretimi son yıllarda önem kazanmıştır. Bu maddelerin üretiminde mikroorganizmalar ve izole enzim sistemleri biyolojik katalizörler olarak kullanılmaktadır. Madde üretiminde biyoteknolojik yöntemlerin tercih edilmesindeki ana unsurlar; proses sonunda üretilen maddelerin doğal olarak kabul edilmesi ve kullanılan yöntemlerin çevreye zarar vermemesidir. Endüstride gıda, koku, ilaç ve kozmetik sektörlerinde sıklıkla kullanılan aroma maddelerinin mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri ile elde edilmesi modern çağın en önemli araştırma konularından birisidir. Kimyasal yöntemlerle sentezlenmesi zor olan metabolitler biyotransformasyon yöntemiyle hızlı, ucuz, pratik ve kısa bir zamanda elde edilebilmektedir (Berger, 1995).

Doğal koku ve tat maddeleri genellikle terpen yapısına sahiplerdir. Bitkilerden ekstraksiyon ve buhar destilasyonu ile elde edilen terpenler uçucu yağlar olarak da bilinmektedir. Terpenlerin alt sınıfı olan monoterpenler, doğal maddeler içinde ilaç, koku ve tat maddesi olarak tercih edilen en önemli moleküllerdendir. Aroma özelliği taşıyan bu tür moleküllerin bitkilerden izolasyonları zor ve verimleri oldukça düşüktür. Bu nedenle ihtiyacı karşılayamamakta ve üretimlerinde alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda biyotransformasyon tepkimeleri alternatif bir yöntem olarak önem kazanmıştır. Biyotransformasyon çalışmalarında genellikle immobilize enzimler, hücre ekstraktları veya bütün hücre sistemleri kullanılmaktadır (Keskin, 2010; Tiejide and Stein, 1999).

Bu çalışmada; bir monoterpen olan ve birçok endüstride kullanılan perillil alkol molekülünün yeni doğal türevlerinin mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri ile elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Perillil alkol molekülü 18 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyona uğratılmıştır.

BÖLÜM 2- GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Koku ve Tat Maddeleri

Amerikan Federal İlaç ve Gıda İdaresi yönetmeliklerine göre; uçucu yağ, esans veya ekstre, hidrolize protein, gıda değeri yerine koku ve tat fonksiyonu olan, enzimatik faaliyet sonucu elde edilen, baharat, meyve, ot, kabuk, kök, yaprak, deniz ürünü, süt, yumurta, su ürünü veya bunların fermantasyon ürünleri “Doğal koku ve tat maddesi” olarak adlandırılmaktadır (Servi vd., 1993). Kimyasal tepkimelerle elde edilen madde doğal sayılmazken biyotransformasyon ile elde edilen madde doğal olarak kabul edilmektedir (Harlander, 1999).

Canlılarda doğal maddeler primer metabolitler, sekonder metabolitler ve biyopolimerler olmak üzere üç temel grupta incelenir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin yapısını oluşturan primer metabolitlerin, hücresel yapıları oluşturan yüksek molekül ağırlıklı biyopolimerlerin ve bitkinin fizyolojik etkilerini ortaya koyan sekonder metabolitlerin tanınması yeni doğal koku ve tat maddelerinin üretiminde önem taşımaktadır (Demirci vd., 2010).

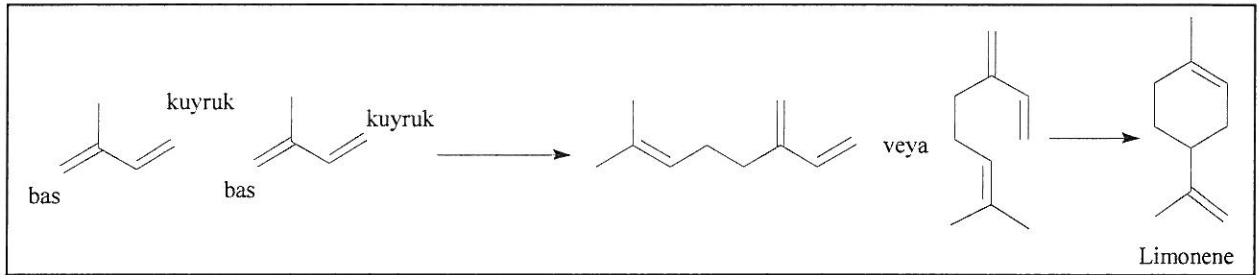
Primer metabolitler insan, hayvan, bitki ve prokaryotik mikroorganizmalarda ortak olarak bulunan ve canlının yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesini sağlayan moleküllere denir. Nükleik asitler, proteinler, yağlar ve karbonhidratlar primer metabolitlerdir (Hanson, 2003).

Sekonder metabolitler organizmaların temel yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan bağlantısı olmayan, ancak primer metabolitler kadar önemli maddelerdir. Sekonder metabolitler bitkilerin, çevresel şartlara uyum, savunma, korunma, hayatta kalma, neslini devam ettirme ve ekosistemle ilişkilerini sürdürmelerinde rol oynarlar. Glikozitler, tanenler, alkaloidler, ve izopren türevleri sekonder metabolitlerdir (Topal, 2000; Bailey and Mansfield, 1982).

2.2. Terpenler ve Biyosentezi

Terpenler aromatik bitkilere koku ve tat özeliği veren, antimikrobiyal etki gösterebilen uçucu yağların en önemli bileşik grubudur. Terpenlerin çoğu bitkilerde üretilip, böceklerde salgılanır. Terpenler çam ağacından elde edilen reçinede bulunan terebentinin ana maddesidir. Bu nedenle terpen sözcüğü “Terebentin” sözcüğünden türetilmiştir (Sert, 2011; Umay, 2007).

Terpenler $(C_5H_8)_n$ molekül formülüne sahip, izopren çekirdeği içeren izoprenoit moleküllerdir. Sahip oldukları izopren molekülü sayısına göre sınıflandırılırlar (Oskay, 1983). Terpenlerin sınıflandırılması Çizelge 1.1’de verilmiştir



Şekil 1.1. Terpenlerin temel yapı birimleri

Çizelge 1.1. İzopren halkası sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması

Sınıf	C atomu sayısı	İzopren ünitesi sayısı
Hemiterpen	5	1
Monoterpen	10	2
Seskiterpen	15	3
Diterpen	20	4
Sesterterpen	25	5
Triterpen	30	6
Tetraterpen	40	8
Politerpen	40’dan çok	8’den çok

Terpenler düz zincir, halkalı yapıda olabileceği gibi, aldehit, keton, fenol, alkol gibi kimyasal yapıları da içerebilirler. Yapısında oksijen bulunduran terpenlerin sonuna -oid eki getirilerek terpenoid şeklinde adlandırılırlar. İçerdikleri kimyasal gruplara göre terpenler sınıflandırılırlar (Akay, 2002). Terpenlerin sınıflandırılması Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Kimyasal yapılarına göre terpenlerin sınıflandırılması

Kimyasal Yapı	Terpen Sınıflandırması
Alkol	Linalol, geraniol
Ester ve alkol	Linalol, linalil asetat, mentol
Aldehit	Sinnamik aldehit
Keton	Karvon
Fenol	Eugenol, timol
Ester	Anethol
Peroksit	Askaridol

Uçucu özellik gösteren ve uçucu yağların bileşiminde yer alan terpenler mono- ve seskiterpenlerdir. Bu bileşikler aromatik bitki ve gıdaların aroma, tat, koku özelliklerinden sorumlu olan bileşiklerdir. Mentol, limonen ve citral (limon), geraniol ve timol (gül), pinen (çam ağaçları) önemli terpenlerdir (Akgül, 1993).

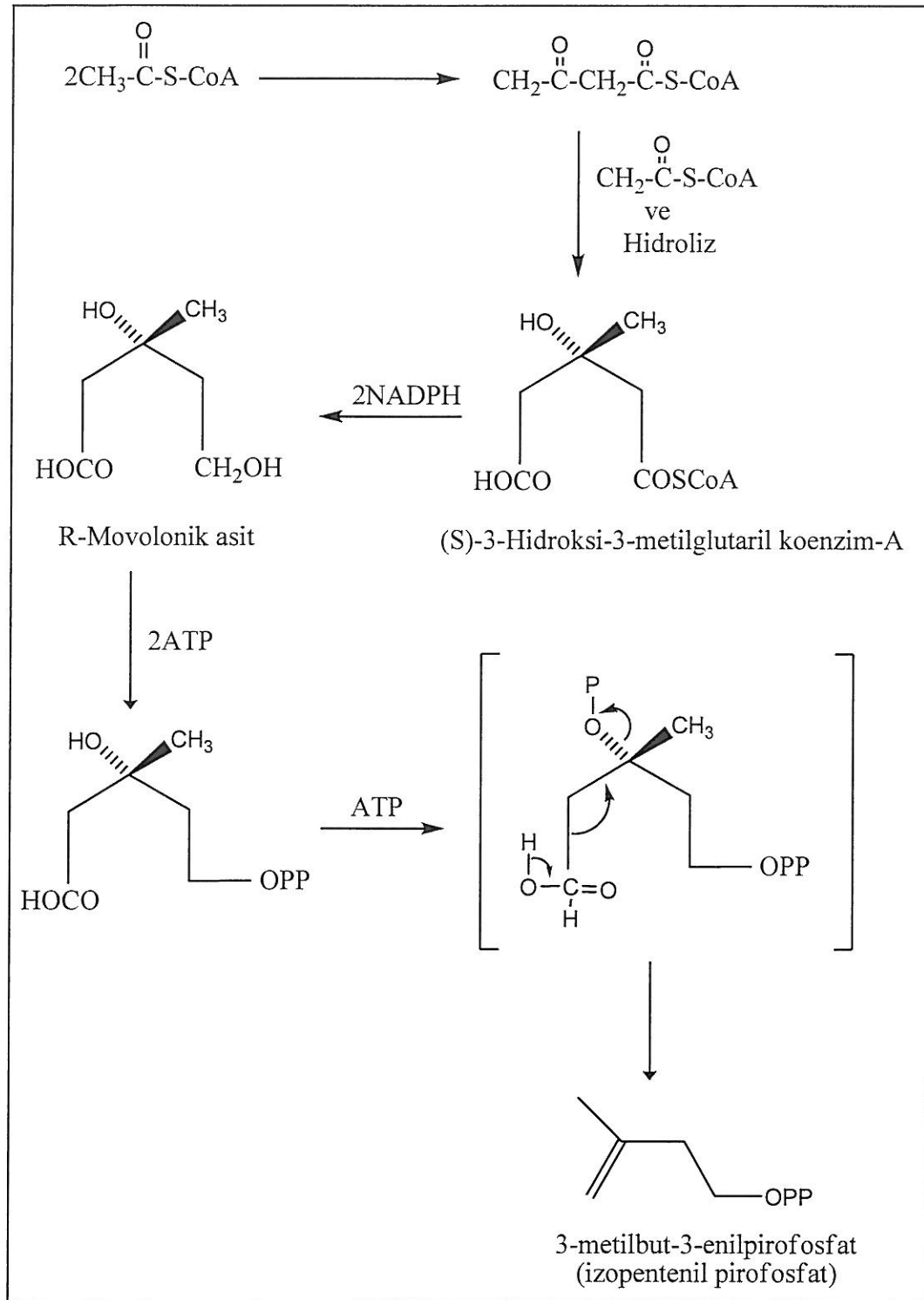
Terpen moleküllerini içeren uçucu yağlar bitkilerden ekstraksiyon ya da buhar distilasyonu ile elde edilirler. Elde edilen bu ekstraktlar gıda, parfümeri, ilaç sanayi başta olmak üzere, gıdalara hoş koku ve tat vermek, ilaçların sahip olduğu kötü kokuları maskelemek, parfüm endüstrisinde yeni kokular elde etmek, amacıyla kullanılırlar (David, 1999).

Terpenler, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi gibi temel fonksiyonlarında rol alamadıkları için sekonder metabolit sınıfına sokulmuştur. Ulaşılması kolay ve ucuz olan uçucu yağlar kendini yenileyebilir özellikleri nedeniyle terpenler yeni aroma maddelerinin geliştirilmesi çalışmalarına için önemli kaynaklardır (Akgül, 1993).

Terpenlerin biyosentezi mevalonik asit yolu ile gerçekleşir. Bu biyosentezin ilk basamakları tüm bitki, hayvan ve bakterilerde aynı şekilde olmaktadır. Öncelikle yağların oksidasyonundan ya da iki asetilkoenzim-A molekülünün tiyolaz enziminin katalizörlüğünde kondenzasyonundan asetilkoenzim-A oluşur. Başka bir asetilkoenzim-A molekülü ile aldol tipi bir kondenzasyon ve enzim ile hidrolitik parçalanma sonucu, (S)-3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA oluşur (Akay, 2002).

Bu molekülün tiyoester grubunun NADPH ile indirgenmesi ve spesifik redüktaz enziminin katalizörlüğünde (R)-mevalonik asit oluşur. İndirgenme basamağı tek yönlü, geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. (R)-Mevalonik asit, ATP ile fosforilasyon ve dekarboksilasyonla izopentanihipirofosfat'a (3-metilbut-3-enilpirofosfat) dönüştürülür. Bu tepkime adımları Şekil 1.2'de gösterilmiştir (Akay, 2002).

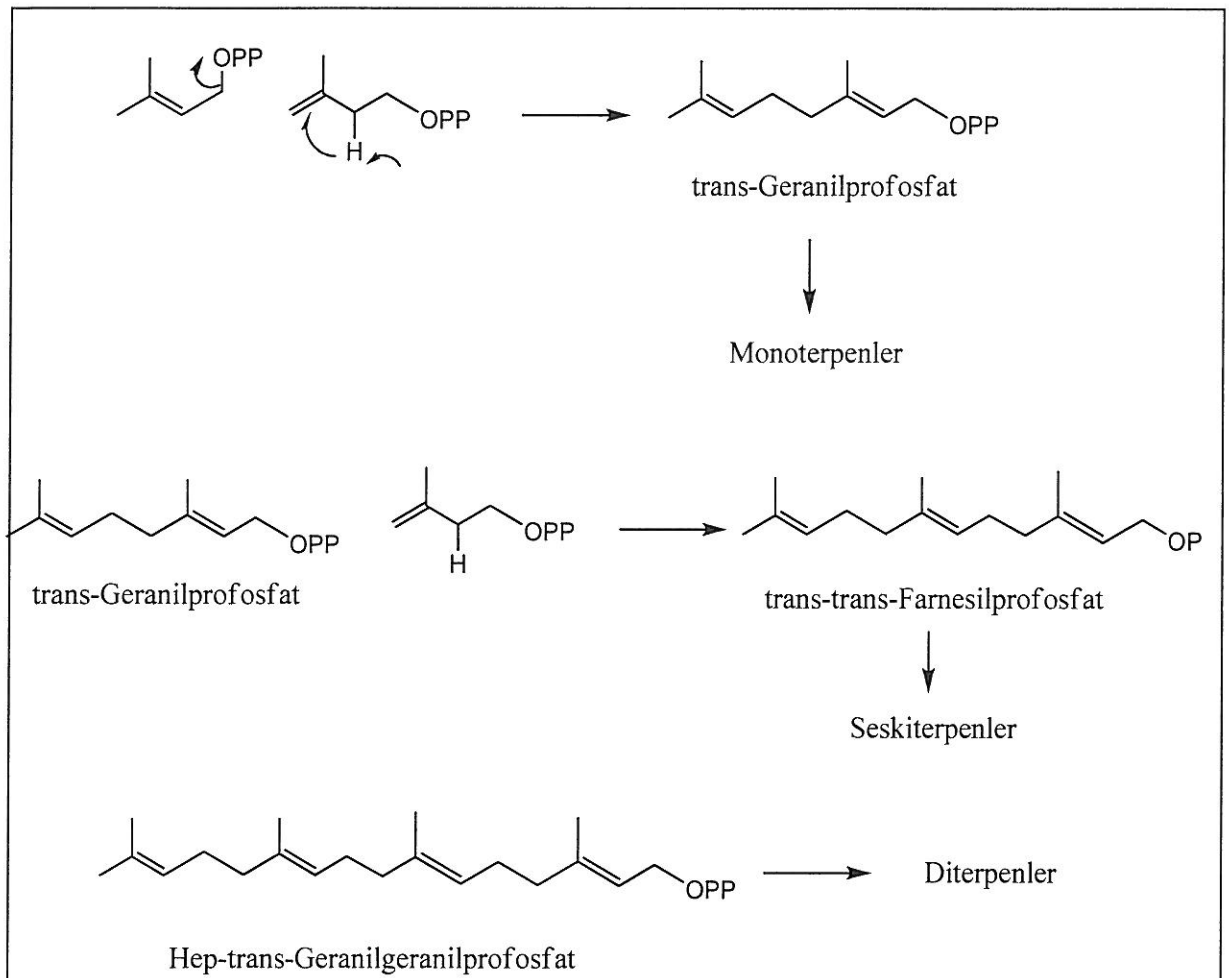
Bu basamakta izomerizasyon dimetilallilpirofosfat'ı verir. Bundan sonra bir çeşit kondenzasyon-polimerleşme ile izopentenihipirofosfat terpenlere dönüştürülür. Bu bileşikteki reaktif alillik pirofosfat grubunun çift bağla nükleofilik yer değiştirme ve proton kaybıyla trans-geranihipirofosfat ve bunun hidrolizinden de monoterpenler meydana gelir. Ayrıca trans-geranihipirofosfat başka bir izopentenihipirofosfat molekülü ile kondense olarak trans-farnesihipirofosfatı meydana getirir. Bunun da hidrolizinden seskiterpenler oluşur (Nelson, 2005). İzopren biriminin biyosentezi Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. İzopren biriminin biyosentezi (Mann, 1994)

Trans-geranil-geranilpirofosfat farklı bir enzimle olayın tekrarlanmasıyla her zaman oluşur. Diterpenler de bu bileşik sonucunda oluşur. Bu sürecin devamıyla uzun zincirli politerpen alkoller, doğal kauçuk gibi polimerler meydana gelir.

Terpenlerin biyosentezinin temel basamakları Şekil 1.3 de gösterilmiştir (Akay, 2002).



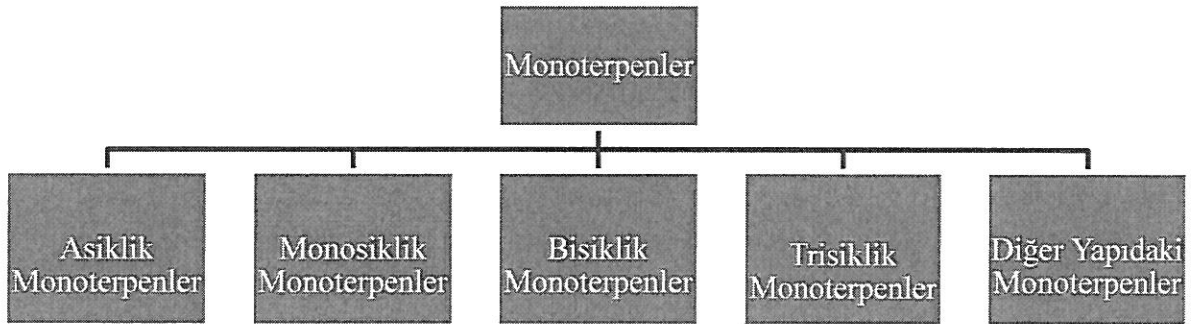
Şekil 1.3. Terpenlerin biyosentezi (Akay, 2002)

2.3. Monoterpenler

Monoterpenler 10 karbonlu iki izopren iskeletinden meydana gelir. Genelde uçucu yağ ve oleorezinlerin karakteristik bileşenleridir. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin salgı sistemlerinde depolanırlar. Diğer bitkilerde ise minör metabolitler olarak bulunurlar. Günümüzde yapısı tayin edilmiş yaklaşık 40 bin terpen ve 740 kadar monoterpen bilinmektedir (Çelik, 2009; Başer ve Demirci, 2007; Liu *et. al.*, 2005; Lange *et. al.*, 2000).

2.3.1. Monoterpenlerin sınıflandırılması

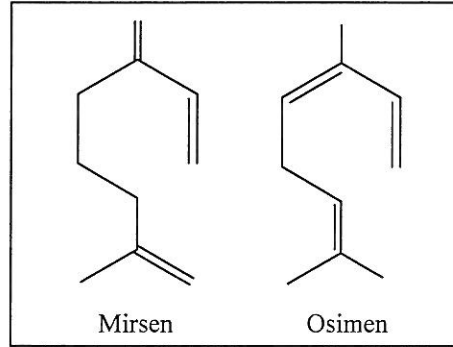
Monoterpenler genel olarak yapılarına göre 5 ana grupta sınıflandırılır (Umay, 2007). Monoterpenlerin sınıflandırılması Şekil 1.4’de verilmiştir.



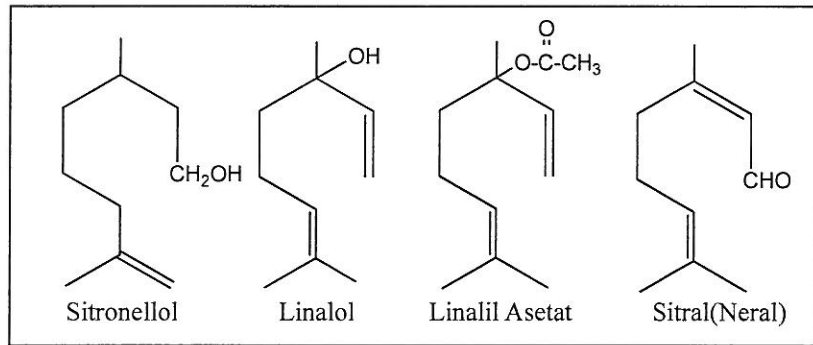
Şekil 1.4. Monoterpenlerin sınıflandırılması

2.3.1.1. Asiklik monoterpenler

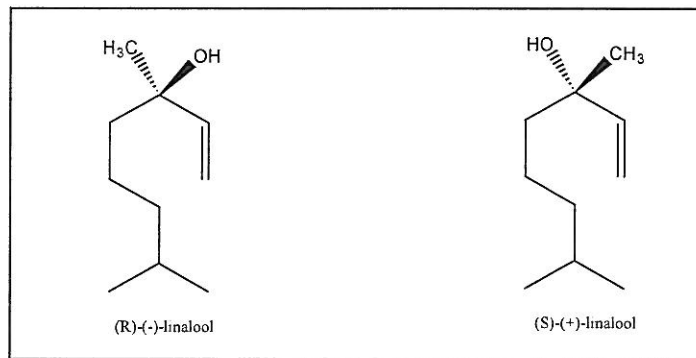
2,6-Dimetiloktan iskeletine sahip ve üç çift bağ içerirler. Asimetrik karbon atomları nedeniyle optikçe aktiftirler. Asiklik monoterpenlerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri bulunur (Pinder, 1960).



Şekil 1.5. Asiklik monoterpenler (Umay, 2007)



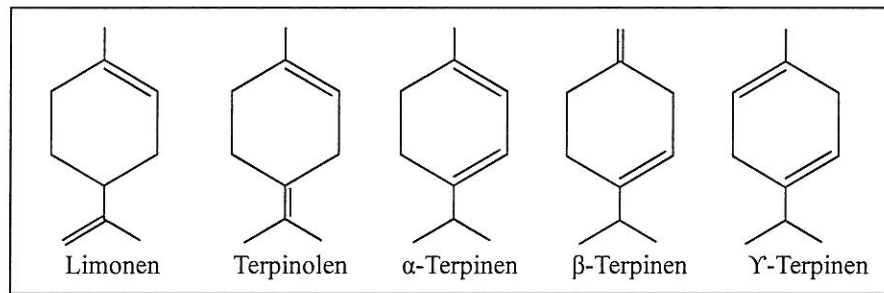
Şekil 1.6. Asiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri (Umay, 2007)



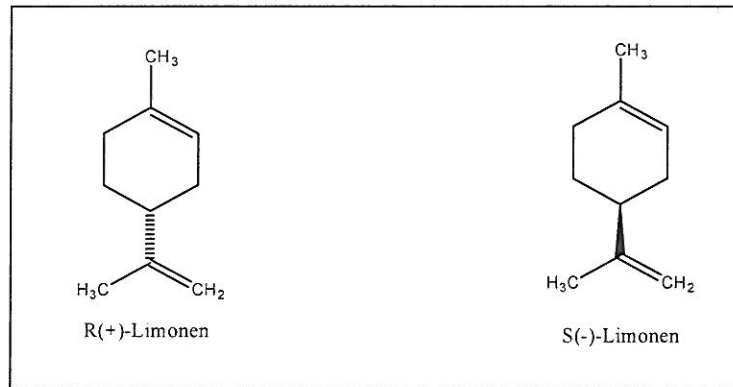
Şekil 1.7. Linalool enantiyomerleri (Çelik, 2009)

2.3.1.2. Monosiklik monoterpenler

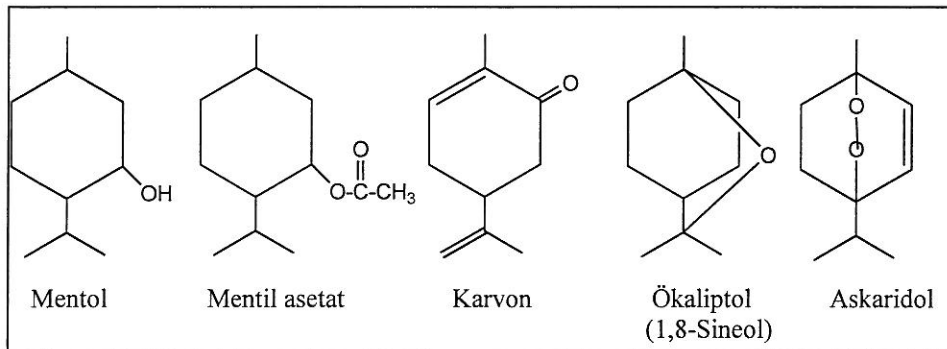
Monosiklik monoterpenler p-mentan iskeleti taşırlar. Bir halka ve 2 çift bağ taşıyan bu gruba örnek olarak limonen, terpinolen, mentol ve fellandren verilebilir. Bu sınıfta yer alan en önemli ticari hidrokarbon limonendir. D-limonen özellikle portakal, greyfurt ve limon yağlarında bulunur. Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grubu taşıyabilir (Turner, 2000).



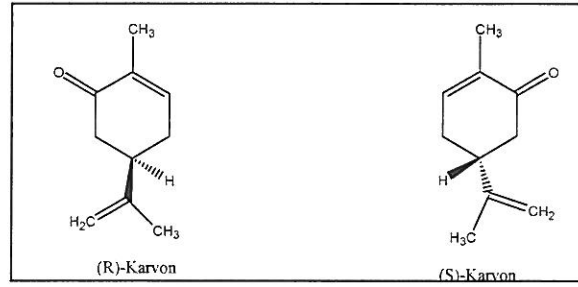
Şekil 1.8. Monosiklik monoterpenler (Umay, 2007)



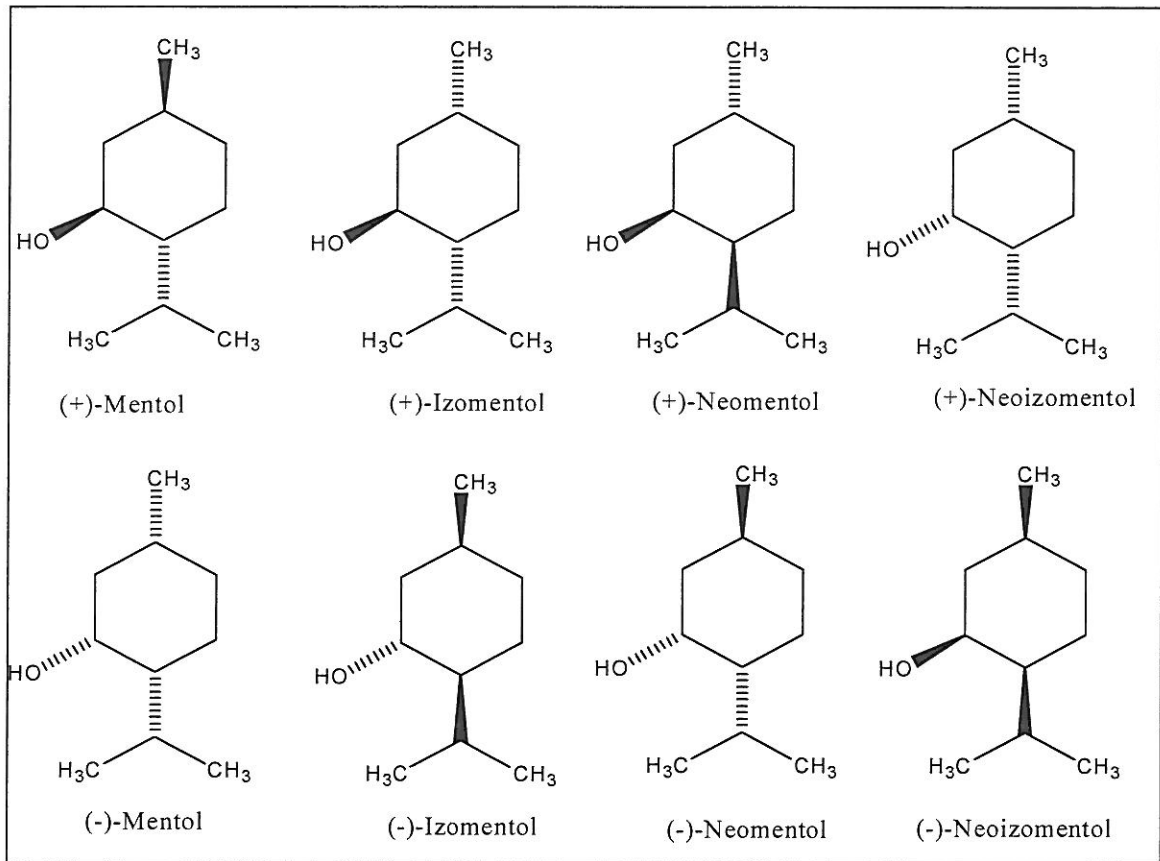
Şekil 1.9. Limonen molekülü enantiomerleri (Çelik, 2009)



Şekil 1.10. Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri (Umay, 2007)



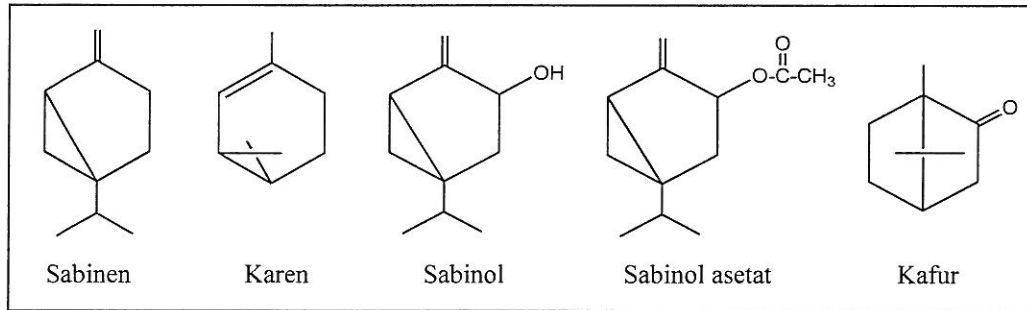
Şekil 1.11. Karvon molekülü enantiomerleri (Çelik, 2009)



Şekil 1.12. Mentol'ün enantiyomer yapıları (Çelik, 2009)

2.3.1.3. Bisiklik monoterpenler

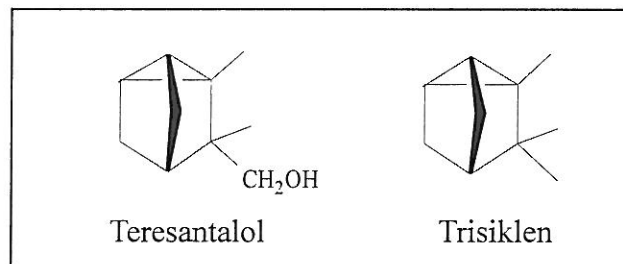
Bisiklik monoterpenlerin alkol, ester ya da ketonlu türevleri bulunur (Manley, 1987). . Bisiklik monoterpenler ve oksijenli türevleri Şekil 1.13’de verilmiştir.



Şekil 1.13. Bisiklik monoterpenler ve oksijenli türevleri (Umay, 2007)

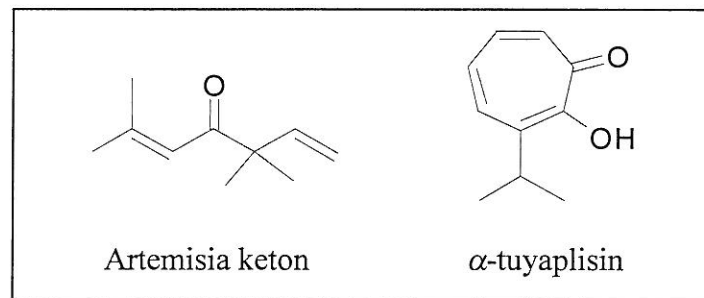
2.3.1.4. Trisiklik monoterpenler

Doğal trisiklik monoterpenlere sadece teresantalik asit yapısında bulunur. Trisiklik monoterpenler ve oksijenli türevleri Şekil 1.14’de verilmiştir



Şekil 1.14. Trisiklik monoterpenler (Demirci, 2000)

2.3.1.5. Diğer yapıdaki monoterpenler



Şekil 1.15. Diğer yapıdaki monoterpenler (Demirci, 2000)

2.3.2. Monoterpenlerin önemi ve biyolojik etkileri

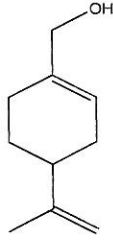
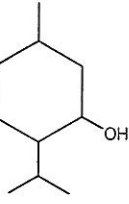
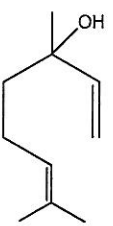
Monoterpenler genellikle koku ve tat özelliklerinden yararlanılarak aroma maddesi olarak parfüm ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Örneğin, timol koku ve gıda sanayinde çok önemli bir yere sahip olan mentol üretiminde başlangıç maddesi olarak kullanılır. Bu kullanımlarının yanı sıra ilaç sanayinde kötü koku ve tatları maskelemek için tercih edilmektedirler (Pybus and Sell, 1999; De-Oliveira *et. al.*, 1997).

Böcekler, bitkilerden salgılanan monoterpenleri alarak, birbirleri ile iletişimlerini sağlayan kimyasal feromonlere çevirirler. Bu özellikleri ile piretrinler insektisit, bornil asetat pestisit ve sitronellol ile pulegon böcek kovucu olarak tarım endüstrisinde etkili bir biçimde kullanılmaktadır (Karabacak, 2007; Vandamme and Soetaert, 2002; Tavera, 1999; Mann *et. al.*, 1994).

Endüstride en çok tercih edilen monoterpenler, limonen ve β -iyonondur. Limonen parfümeri, kozmetik ve gıda sanayinde, polimer kimyası, temizlik ürünlerinde hoş koku vermek amacıyla kullanılır. β -iyonon ise; kozmetik sanayinde; makyaj malzemeleri, parfümler, şampuanlar gibi bakım malzemelerine ek olarak, ev temizlik ürünlerinde kullanılır. Endüstride sıklıkla kullanılan diğer monoterpenler, linalool ve esterleri, L-mentol, (-)-karvon, α -terpineol ve pinendir (Keskin ve Yıldırım, 2010).

Monoterpenler antibakteriyal, antifungal, antiviral, iştah açıcı, gastrointestinal rahatsızlıklarda, anestezi, analjezik, antioksidan, antiinflamatuvar vb. etkilerinden dolayı çok eski zamanlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan deneyler sonucu elde edilen verilere göre meme, pankreas, prostat karaciğer, akciğer vb. kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde etkin oldukları bildirilmiştir (Boon *et. al.*, 2000; Crowell, 1999). Önemli aktivite gösteren bazı monoterpenler Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Önemli aktivite gösteren bazı monoterpenler (Özşen, 2011)

Monoterpen	Biyolojik Aktivite	Kaynaklar
Perillil Alkol 	❖ Antiproliferatif aktivite ❖ Kemoterapötik aktivite ❖ Antikanserojen aktivite ❖ Antiplasmodif aktivite	- Xanthakis <i>et al.</i>, 2009 - Matos <i>et al.</i>, 2008 - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Olganier <i>et al.</i>, 2007
Mentol 	❖ Antiproliferatif aktivite ❖ Anestezik aktivite ❖ Antiparazitik aktivite	- Park <i>et al.</i>, 2009 - Watt <i>et al.</i>, 2008 - Kiuchi <i>et al.</i>, 2002
α-Terpineol 	❖ Antifungal aktivite ❖ Antibakteriyal aktivite ❖ Antioksidan aktivite	- Roman <i>et al.</i>, 2007 - Joy <i>et al.</i>, 2007 - Hassan and Radwan, 2010
Limonen 	❖ Antioksidan aktivite ❖ Antikanserojen aktivite ❖ Antianjiyojenik ❖ Antibakteriyal Aktivite ❖ İlaç geçirgenliğini artırma	- Juniur <i>et al.</i>, 2009 - Roman <i>et al.</i>, 2007 - Edris, 2007 - Jirovetz <i>et al.</i>, 2007 - Cornwell <i>et al.</i>, 1996
Linalool 	❖ Antibakteriyal aktivite ❖ Anti-inflamatuar aktivite	- Roman <i>et al.</i>, 2007 - Peana <i>et al.</i>, 2002

2.4. Biyotransformasyon

Canlı bir organizma veya enzim tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlerin gerçekleşmesi ve yararlı ürünlerin elde edilmesi biyotransformasyon olarak adlandırılır. Biyotransformasyon olayına en klasik örnek olarak asetik asit bakterileri tarafından alkolden sirke üretimi verilebilir (Cabral *et. al*, 1994; Martin, 1991). Kullanılan ilaçların vücuttan atılımı kolay ve zararsız olması için karaciğerde bulunan enzimler tarafından yükseltgeme, indirgeme, dekarboksilleme ve hidroliz tepkimeleri ile ilaçlar biyotransformasyona uğrarlar (İşcan, 2009; Berger, 1995; Rehm, 1984).

Biyoteknolojik çalışmalarının temelini oluşturan biyotransformasyon tepkimeleri ilaç üretimi, gıda, koku, esans maddelerinin üretimi, atık maddelerin geri kazandırılması ve enerji üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Faber, 2004; Hanson, 1995; Telefoncu, 1995).

2.4.1. Biyotransformasyon yöntemleri

Biyotransformasyon yöntemleri beş ana grupta incelenir (Telefoncu, 1995).



Şekil 1.16. Biyotransformasyon yöntemleri

2.4.1.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

İdeal besi yerinde üretilen hücreler üzerine ön-testlerle belirlenen derişimlerde biyotransformasyona uğratılacak substrat aynı ortama katılır.

2.4.1.2. Stasyoner hücreler ile biyotransformasyon

İdeal besi yerinde üretilen mikroorganizma filtrasyon ile ayrıldıktan sonra biyotransformasyon ortamına aktarılır ve substrat ilavesi gerçekleştirilir.

2.4.1.3. Sporlar ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar spor oluşumu için ideal koşullarda üretilir ve sporlar misellerden ayrılıp soğukta saklanır. Biyotransformasyon tepkimelerinde bu sporlar kullanılır.

2.4.1.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren alginat, selüloz, alginat gibi ortamlarda immobilize hale getirilir. İmmobilize hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir ve yeniden kullanılabilir.

2.4.1.5. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyonda immobilize hücreler kullanımı daha ekonomik olmasına rağmen istenmeyen yan tepkimelerin oluşması muhtemeldir. Saf enzimler tercih edildiğinde bu durum ortadan kalkar ancak yöntemin daha pahalı olmasına neden olur.

2.4.2. Biyotransformasyon tepkimeleri ve kullanılan enzimler

Biyotransformasyonlar sentetik yolla gerçekleşebilecek bütün tepkimelere eşdeğer düzeydeki tepkimeleri ve sentetik yolla gerçekleşemeyecek tepkimeleri de gerçekleştirmektedirler. Bu tepkime tipleri yedi şekilde sınıflandırılabilir (Faber, 2004; Anonymous, 1988; Armstrong, 1986).



Şekil 1.17. Biyotransformasyon tepkime tipleri



Şekil 1.18. Biyotransformasyon tepkimelerinde kullanılan enzimler

2.4.3. Monoterpenlerin biyotransformasyonu

Birçok araştırmaya konu olan monoterpenler, hoş koku ve tat özelliklerine sahip olduğu için ilgi çekmektedir. Biyotransformasyon tepkimeleri sonucu elde edilen yeni bileşiklerin de doğal madde özelliğine sahip olması, tüketicilerin doğal ürünlere talep etmeleri monoterpen biyotransformasyonlarının önemini arttırmaktadır (Krings and Berger, 1998).

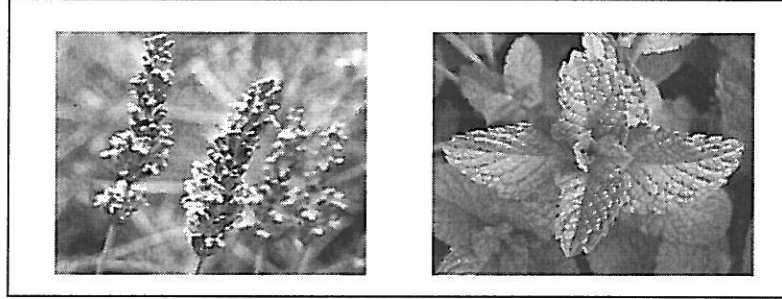
Monoterpenlerin biyotransformasyonları enzimler, hücre ekstraktları, canlı bakteriler, su yosunları, mayalar, küfler ile serbest ve immobilize enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Canlı sistemler daha ucuz bir kaynak oluştururken, yan ürünlerin oluşması biyotransformasyon tepkimeleri sonucu oluşan ürünlerin verimini düşürmektedir. Son yıllarda literatürde yapılan biyotransformasyon çalışmalarında canlı sistemler tercih edilmiştir. Bunun nedeni enzim izole edilme aşamalarının zor ve pahalı olmasıdır (Carla *et. al*, 2006; Van Der Werf *et. al*, 1997; Duchter *et. al*, 1995; Rollas, 1992; Kieslich, 1986). Monoterpenlerin biyotransformasyonlarının avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.4’de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Monoterpenlerin biyotransformasyonlarının avantaj ve dezavantajları

Monoterpenlerin Biyotransformasyonu	
Avantajlar	Dezavantajlar
❖ Doğal ve yeni koku ve tatlar üretilmesi	❖ Metabolitin uçucu olması
❖ Tek adımda ürünler elde edilmesi	❖ Metabolitin toksik olması
❖ Tehlikesiz, zararsız tepkimeler oluşması	❖ Sudaki çözünürlüklerin az olması
❖ Birçok maddeye uygulanabilir olması	❖ Verimin düşük olması
❖ Stereospesifik olarak katılım sağlanması	❖ Metabolitin stabil olmaması

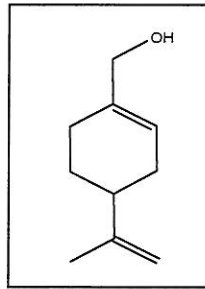
2.5. Perillil Alkol

Perillil alkol lavanta, nane, kiraz, kereviz tohumu ve diğerk bazı bitkilerin uçucu yağlarından izole edilmiş bir monoterpendir.



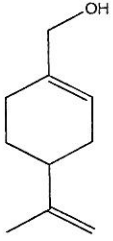
Şekil 1.19. Lavanta ve nane bitkisinin resimleri

Literatür çalışmalarında Perillil alkol'ün koku özelliğı gösterdiği ve bu özelliğinden yararlanılarak yeni koku maddelerinin oluşturulmasında başlangıç maddesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Ayrıca tıp alanında bazı önemli kanser türlerinin tedavisinde etkili olduğu ifade edilmiştir. Özellikle pankreas, meme ve karaciğer tümörlerinde gerilemeyi sağladığı; kolon, deri ve akciğer kanseri için önleyici bir ajan olduğu ve normal hücreleri etkilemeden tümör hücreleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Etki mekanizması açık olmamakla birlikte hücre büyümesi ve farklılaşmasındaki kontrol mekanizmalarında etkisinin bulunduğu düşünülmektedir (Crowell, 1999). Perillil alkol ile ilgili kimyasal bilgiler Çizelge 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1.20. Perillil alkol'ün molekül yapısı

Çizelge 1.5. Perillil alkol ile ilgili kimyasal bilgiler (Buckingham, 2000)

CAS numarası	18457-55-1
İsim	(S)-Perillil alkol
Molekül yapısı	
Formül	C ₁₀ H ₁₆ O
Molekül ağırlığı	152.23 g
Benzer isimlendirme	1-Siklohegzen-1-metanol4-(1-metilenil)-, (S)-;p-Menta-1,8-dien-7-ol, (S)-(-)- (8CI);(-)-(S)-Perillil alkol;(-)-Perillik alkol;
EINECS	208-639-9
Yoğunluk	0.94 g/cm ³
Kaynama noktası	119-121°C
Parlama noktası	110°C

BÖLÜM - 3: MATERYAL, METOD ve DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Genel Deneysel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Gerhardt THO 500 Laboshake çalkalamalı inkübatör, besiyerinde mikroorganizmaların inkübasyonun sağlanması için kullanıldı. Steril koşullardaki ekim işlemleri Herasafe steril kabininde gerçekleştirildi. Saflaştırmada kolon kromatografisi kullanıldı. Kolon kromatografisi için 60 (Merck, 230–400 mesh) tipi silika jel kullanıldı. İnce tabaka kromatografisi, 0.25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) üzerinde etil asetat-hekzan (60-800C) (1:1) çözgen sistemiyle izlendi. Kolon kromatografisinden elde edilen spotlar, anisaldehit, sülfürik asit, metanol, asetik asit olan reaktif ile renklendirdikten sonra ısıtılarak (110°C) belirgin hale getirildi. Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan bileşiklerin yapısı, spektral metotlar (¹H NMR, ¹³C NMR) kullanılarak aydınlatılmıştır. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spekturumları Bruker DPX 400 Fourier Transform spektrofotometresinde sırasıyla 400 ve 90 MHz’de Döteryo kloroform ile tetrametilsilan uluslar arası standartlar referansı alınarak yapıldı.

3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Çözücüler, Aletler, Mikroorganizmalar

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

3.2.1. Materyal

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan perillil alkol Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.2.2. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

• <i>n</i> -Hekzan	• Dietileter
• Aseton	• Diklorometan (CH ₂ Cl ₂)
• Dimetilsülfoksit (DMSO)	• Metanol (MeOH)
• Sodyum hidroksit (NaOH)	• Sülfürik asit
• Vanilin	• Hidroklorik asit (HCl)
• Glikoz	• Pepton
• Sakkaroz	• Nişasta (Oxoid)
• Potasyum hidroksit (KOH)	• Potasyum klorür (KCl)
• Sodyum hipofosfat (Na ₂ HPO ₄)	• Magnezyum sülfat (MgSO ₄)
• Maya ekstresi (Acumedia)	• İyot (I ₂)
• Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Acumedia/Oxoid)	• Susuz Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)
• Patates Dekstroz Agar (PDA) (Acumedia/Oxoid)	• Etilasetat (EtOAc)
• Silikajel 60G (Merck 773I, 4-40 mesh)	• Kloroform (CHCl ₃)
• Etanol (EtOH)	• Demir sülfat (FeSO ₄)
• Benzen	• Sodyum Nitrat (NaNO ₃)
• Potasyum karbonat	• Anisaldehit
• Sodyum klorür (NaCl)	• Potasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)
• Hazır İTK plakları	• Amonyum klorür

3.2.3. Cihazlar

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan cihazlar şunlardır:

- Gaz Kromatografisi /Kütle Spektrometrisi Sistemi (GC/MS), [Hewlett Packard GC/MSD 5890] ve [Shimadzu GC/MSD QP5050]
- Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi Sistemi (NMR), [JEOL JNM-EX90A, FT-NMR]; [Bruker AM-400, FT- NMR], ve [Varian Mercury 300, FT-NMR]
- Ultra Viyole Lambası (254-366 nm), [Camag]
- Otoklav [Systec VE 65]
- İnkübatör [Gerhardt THO 500 Laboshake]
- Steril Kabin [Herasafe]

3.2.4. Mikroorganizmalar

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan mikroorganizmalar

1	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	(F9)
2	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	(F10)
3	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549	(F11)
4	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	(F12)
5	<i>Penicillium claviforme</i> MR 376	(F17)
6	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737	(F20)
7	<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792	(F21)
8	<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	(F22)
9	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	(F23)
10	<i>Fusarium culmorum</i>	(F24)
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	(F27)
12	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170	(F30)
13	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385	(F31)
14	<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839	(F36)
15	<i>Neurospora crassa</i>	(F40)
16	<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62475	(F46)
17	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801	(F68)
18	<i>Phanerachaete chrysosporium</i> ME	(F69)

3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları

3.3.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Çalışmalarımızda kullanılan mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlandı. Alınan kültürler, +4°C’de muhafaza edildi.

3.3.2. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besi yeri bileşenleri

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, mikroorganizmalar yeterli büyüklüğe geldiğinde, agarlı katı besi yerinden, özelliklerine göre farklı sıvı besi yerlerine ilave edildi.

3.3.2.1. Taze yatık agar besi yeri

Patates dekstroz agar	5,85 g
Agar	1,2 g
Saf su	150 mL

Hazırlanan besi yeri kaynatılıp soğumadan 15 adet cam şişeye ilave edildi, otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C’de 15 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 1 gün boyunca bırakılarak hazırlandı. Bu besi yeri biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmaların stoklanmasında ve sıvı besi yerine ilave edilmeden önce aktifleşmesini sağlamak için kullanıldı.

3.3.2.2. α -medium

Glikoz	20,0 g
Pepton	5,0 g
Maya ekstresi	5,0 g
NaCl	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g
Saf Su	1000 mL

Besi yeri bileşenlerinin saf suda çözülerek hazırlanan çözelti, 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL besi yeri olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerin ağzıları alüminyum folyo ile kaplı pamukla kapatıldı. Otoklavda 1,1 atmosfer basıncında, 121°C'de 15 dakika süre ile steril edildi. Bu besi yeri biyotransformasyon tepkimeleri için kullanıldı.

3.3.3. Mikroorganizmaların hazırlanması

Hazırlanan α -medium besi yerinden 100 mL alınarak, 250 mL'lik erlenlere paylaştırıldı. Daha önce katı besi yerinde stoklanan mikroorganizmalar her erlene bir öze ucu dolusu kadar steril kabinde ilave edildi. Erlenlerde yeterli miktarda mikroorganizma oluşabilmesi için 3 gün boyunca çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de (120 rpm) inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların yeterli miktarda büyümesi sağlandıktan sonra diğer erlenlere eşit miktarlarda olacak şekilde ve steril koşullarda mikroorganizmalar aktarıldı. Sıvı besi yerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.3.4. Substrat hazırlanması ve ilavesi

Daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan mikroorganizma içerisine inkübasyonun 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.

3.3.5. Metabolitlerin ekstraksiyonu

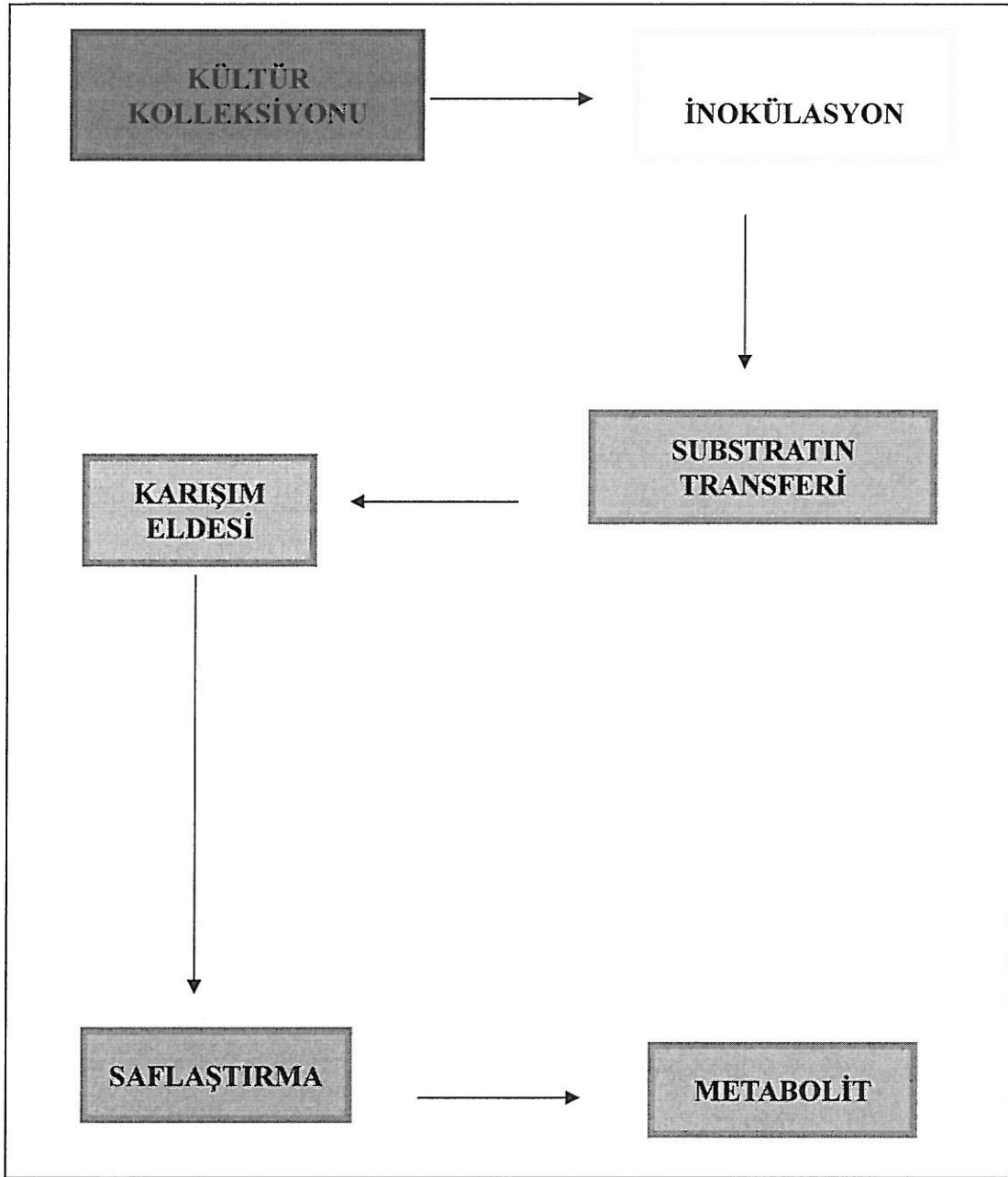
Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak metabolit oluşumu izlendi. Deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 2 mL alındı ve 3–5 mL etil asetat (EtOAc) ilave edildi. Bir dakika süreyle vorteks kullanarak karıştırıldı. Etil asetatlı üst faz, başka bir pipet ile susuz Na_2SO_4 'ta kurutulduktan sonra bir numune kabına aktarıldı ve azot gazı kullanılarak çözücü uzaklaştırıldı. Oluşan metabolitlerin spotları İTK ile kontrol edildi.

3.3.6. 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 misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar, ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı EtOAc ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlar, susuz Na_2SO_4 'ta kurutulduktan sonra yoğunlaşmaya bırakıldı. Elde edilen kalıntı, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak ile hegzan ve etil asetat kullanıldı.

3.3.7. Metabolitlerin tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, NMR ve GC-MS gibi spektroskopik metotlar kullanılarak aydınlatıldı. Biyotransformasyon aşamaları Şekil 2.1’de verilmiştir.

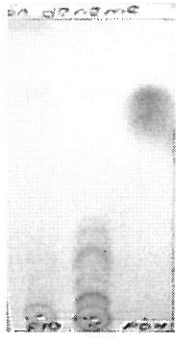
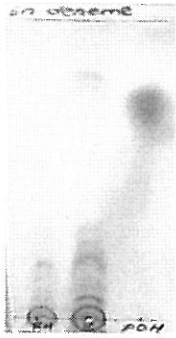
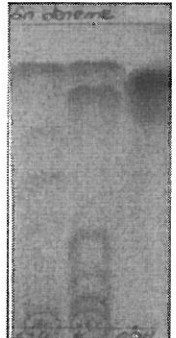


Şekil 2.1. Biyotransformasyon aşamaları

3.4. Perillil Alkol'ün Ön Deneme Çalışmaları

Perillil alkol'ün 18 mikroorganizma ile yapılan ön deneme İTK sonuçları Çizelge 2.3'de yer almaktadır.

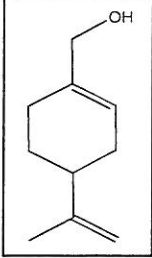
Çizelge 2.3. Perillil alkol'ün 18 mikroorganizma ile ön deneme İTK sonuçları

1.Spot (Sol): Standart 2.Spot (Orta): Ekstrakt 3.Spot (Sağ): Substrat	 (1)  (2)  (3)  (4)  (5)  (6)  (7)  (8)  (9)  (10)  (11)  (12)
--	---

Çizelge 2.3.(devam) Perilil alkol'ün 18 mikroorganizma ile ön deneme İTK sonuçları

1.Spot (Sol): Standart 2.Spot (Orta): Ekstrakt 3.Spot (Sağ): Substrat	(13) (14) (15) (16) (17) (18)
--	--

Çizelge 2.3.(devam) Perillil alkol'ün 18 mikroorganizma ile ön deneme İTK sonuçları

 Perillil alkol	(1) Perillil alkol'ün <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (2) Perillil alkol'ün <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (3) Perillil alkol'ün <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10549 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (4) Perillil alkol'ün <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (5) Perillil alkol'ün <i>Penicillium claviforme</i> MR 376 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (6) Perillil alkol'ün <i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (7) Perillil alkol'ün <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 792 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (8) Perillil alkol'ün <i>Fusarium solani</i> ATCC 1284 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (9) Perillil alkol'ün <i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (10) Perillil alkol'ün <i>Fusarium culmorum</i> ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (11) Perillil alkol'ün <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (12) Perillil alkol'ün <i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (13) Perillil alkol'ün <i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (14) Perillil alkol'ün <i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (15) Perillil alkol'ün <i>Neurospora crassa</i> (wild type) ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (16) Perillil alkol'ün <i>Corynespora cassicola</i> DSM 62475 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (17) Perillil alkol'ün <i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801 ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si. (18) Perillil alkol'ün <i>Phanerachaete chrysosporium</i> ME ile biyotransformasyon ekstrakt itk'si.
---	---

BÖLÜM - 4: DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

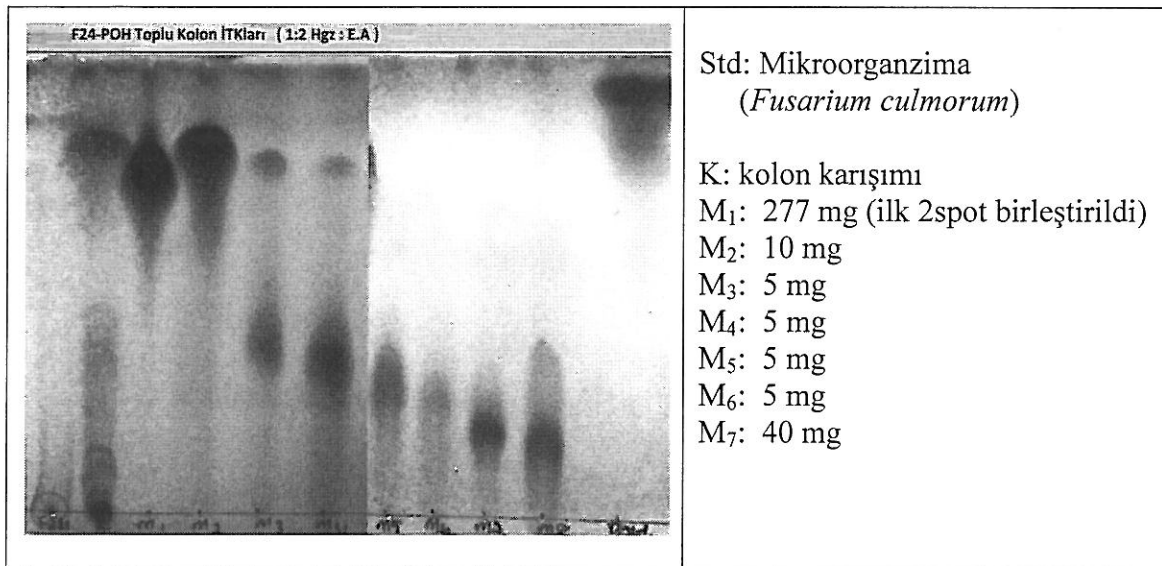
4.1. Perillil Alkol'ün Biotransformasyonu

Önceki bölümde anlatıldığı üzere yapılan ön deneme sonuçlarına göre saf metabolit elde edilebilecek mikroorganizmalarla biyotransformasyon gerçekleştirip kolon kromatografisi yapıldı.

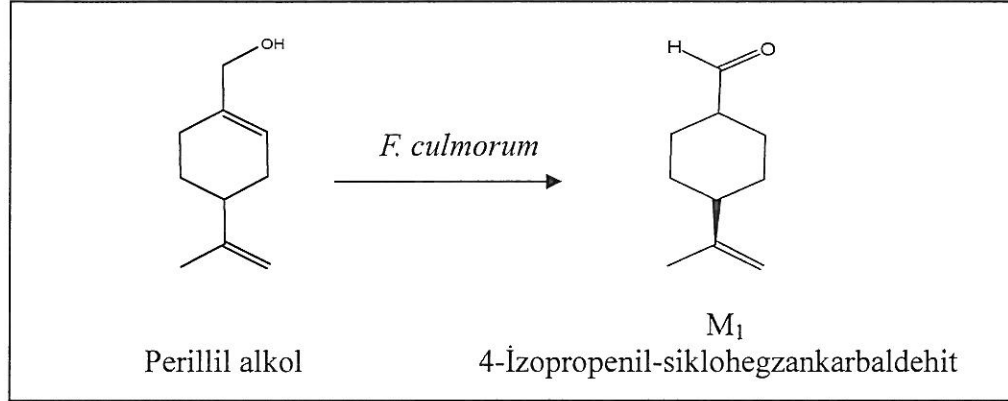
4.1.1 Perillil alkol'ün *Fusarium culmorum* ile biyotransformasyonu

Yapılan İTK'da başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan sekiz yeni spot gözlemlendi. Karışım kolon kromatografisi ile ayrıldı. Perillil alkol'ün *F. culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

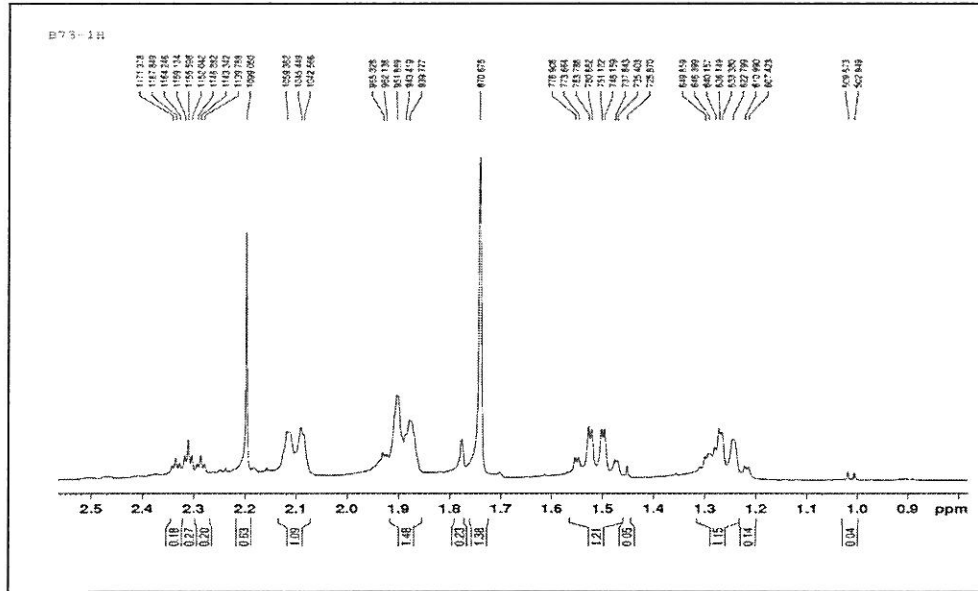
Çizelge 3.1. Perillil alkol'ün *F. culmorum* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri



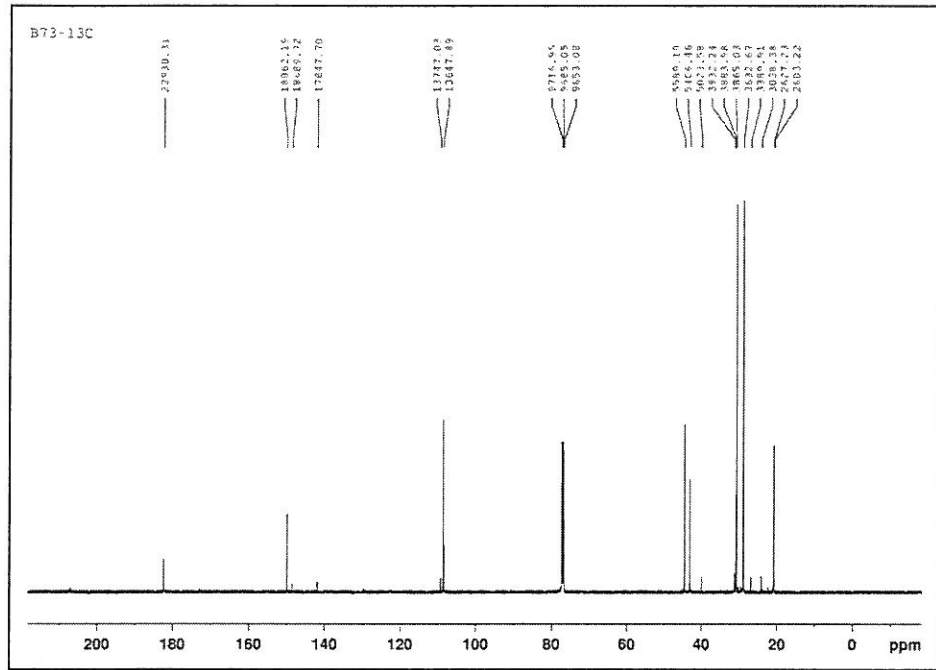
Kolonda %20'lik etil asetat-hegzan çözeltisi kullanılarak saflaştırılan ilk madde M_1 molekülü olup 277 mg, %55'lik verimle saf olarak elde edilmiş, spektroskopik yöntemlerle yapısı aydınlatılmıştır.



Şekil 3.1. Perillil alkol'ün *F. culmorum* ile biyotransformasyon tepkimesi



Şekil 3.1.a. M_1 'in ^1H NMR spektrumu

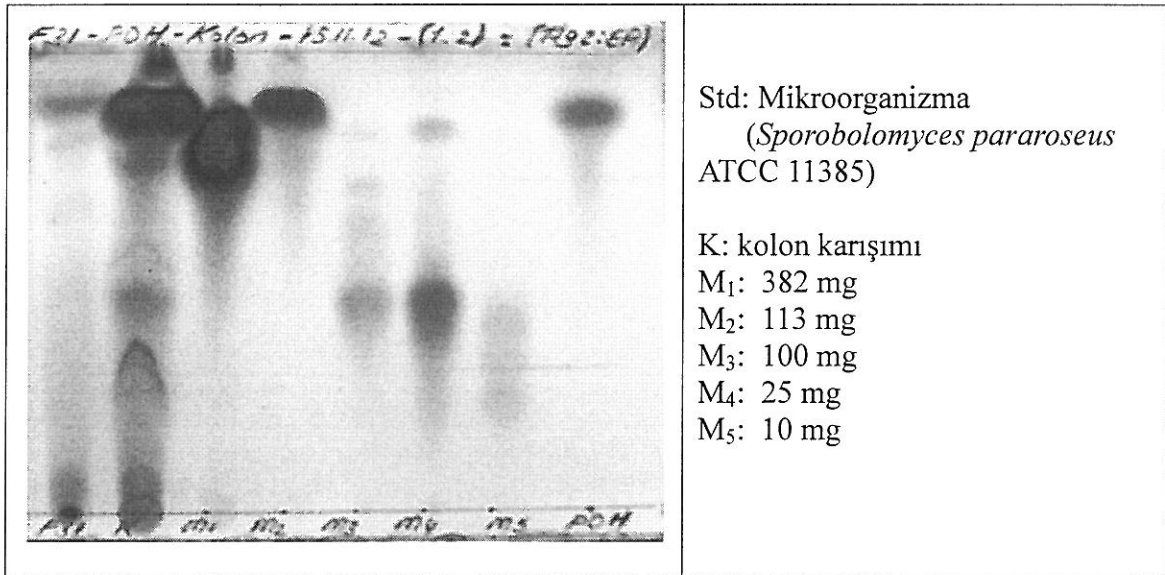


Şekil 3.1.b. M_1 'in ^{13}C -NMR spektrumu

4.1.2. Perillil alkol'ün *Sporobolomyces pararoseus* ile biyotransformasyonu

Perillil alkol molekülünün *Sporobolomyces pararoseus* küfö ile gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu elde edilen karışımın İTK'sı Çizelge 3.2'de verilmiştir. Yapılan İTK'da başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan beş yeni spot gözlemlendi Karışıma kolon kromatografisi uygulanarak mevcut metabolitler saflaştırılmaya çalışıldı, fakat saf olarak herhangi bir metabolit elde edilemedi. . Perillil alkol'ün *S. pararoseus* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

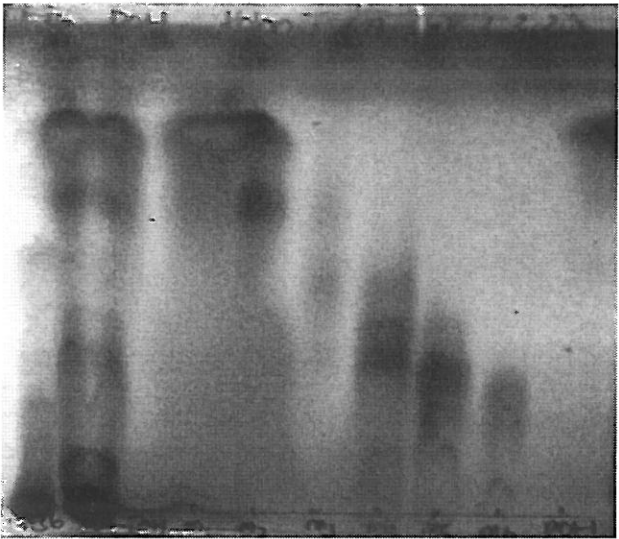
Çizelge 3.2. Perillil alkol'ün *S. pararoseus* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri



4.1.3. Perillil alkol'ün *Mucor ramannianus* ile biyotransformasyonu

Perillil alkol molekülünün *Mucor ramannianus* küfö ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen karışımın İTK'sı Çizelge 3.3'te verilmiştir. Yapılan İTK'da başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan altı yeni spot gözlemlendi Karışıma kolon kromatografisi uygulanarak nemetabolitler saflaştırılmaya çalışılmasına rağmen saf olarak herhangi bir metabolit elde edilemedi. Perillil alkol'ün *M. ramannianus* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Perillil alkol'ün *M. ramannianus* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri

	Std: Mikroorganizma (<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839) K: kolon karışımı M₁: 92 mg M₂: 42 mg M₃: 15 mg M₄: 41 mg M₅: 48 mg M₆: 15 mg
---	--

4.1.4. Perillil alkol'ün *Corynespora cassiicola* ile biyotransformasyonu

Perillil alkol molekülünün *Corynespora cassiicola* küfü ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimesi sonucu elde edilen karışımın İTK'sı Çizelge 3.4'de verilmiştir. Yapılan İTK'da başlangıç maddesi dışında başlangıç maddesinden daha polar olan üç yeni spot gözlemlendi. Karışıma kolon kromatografisi uygulanarak metabolitler saflaştırılmaya çalışıldı, fakat saf olarak herhangi bir metabolit elde edilemedi. Perillil alkol'ün *C. cassiicola* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Perillil alkol'ün *C. cassiicola* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK verileri

	Std: Mikroorganizma (<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62475) K: kolon karışımı M₁: 10 mg M₂: 60 mg M₃: 125 mg
---	---

4.2. Sonuç ve Öneriler

Perillil alkol 18 farklı mikroorganizma ile ön biyotransformasyon tepkimelerine uğratıldı. Metabolit oluştuğu düşünülen ön biyotransformasyon denemeleri mg düzeyde tekrarlandı. Oluşan metabolitler kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve metabolit yapıları NMR spektrumları ile aydınlatıldı.

Ön biyotransformasyon tepkime karışımlarının İTK'ları incelendiğinde, birçok mikroorganizmanın Perillil alkol'ü dönüşüme uğrattığı ve birden fazla metabolit ürettiği tespit edildi. Bu nedenle oluşan metabolitlerin birçoğu saflaştırılamadı. Sadece *Fusarium culmorum* mikroorganizması ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucu 1 metabolit saflaştırılıp ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak; molekül 4-İzopropenil-siklohegzankarbaldehit olarak isimlendirildi.

Çalışmalarımızda kolon kromatografisi yerine HPLC ya da Flash Kolon kromatografisi kullanılsaydı verim daha fazla ve saflaştırılan yeni metabolit sayısı daha fazla olabilirdi.

BÖLÜM - 5: KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akay, F., 2002, İnula Heterolepis Uçucu Yağının Kalitatif ve Kantitatif Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 172 s.
- Akgül, A., 1993, Baharat Bilimi ve Teknolojisi Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, Damla Matbaacılık, 127-133
- Anonymous, 1988, Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Resmi Gazete Sayı No.19746
- Armstrong, D.W and Yamazaki, H., 1986, Natural Flavours Production, Trends in Biotechnology, No.4,264-268
- Başer, K.H.C., Demirci, F., 2007, Chemistry of Essential Oils, Flavours and Fragrances, R.G.Berger(Ed), Springer Berlin Heidelberg New York, 43-83
- Bailey, J.A. and Mansfield, J.W., 1982, Phytoalexins, Blackie and Son L., Glasgow and London, 333 p.
- Berger, R. G., Aroma Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, 1995.
- Boon, P. J. M., Van Der Boon, D., and Mulder, G. J., 2000, Cytotoxicity and Biotransformation of the Anticancer Drug Perillyl Alcohol in PC12 Cells and in the Rat, Toxicol. Appl. Pharmacol. 167, 55-62
- Buckingham, J., 2000, Dictionary of Natural Products, Chapman & Hall, London
- Carla, C. C. R., Carvalho, M., De Manuela, R. Da Fonseca, 2006, Biotransformation of Terpenes, Biotechnology Advances, 24, 134-142.
- Cabral, J. .M. S., Best, D., Boross, L. and Tramper, J., 1994, Applied Biocatalysis, Harwood Academic Publ.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cornwell, P.A., Barry, B.W., Bouwstra, J.A. and Gooris, G.S., 1996, Models of Action of Terpene Penetration Enhancers in Human Skin; Differential Scanning Calorimetry, Small-angle X-ray Diffraction and Enhancer Uptake Studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 127, 1, 9–26.
- Crowell, P. L., 1999, Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes, *J. Nutr.* 129, 775S-778S.
- Çelik, T., 2009, İzoforon'un Alternario Alterata ile Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Yüksek Lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- David, E.K., 1994, Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol.2, Isoprenoids, Carotenoids, and Steroids, Elsevier, Oxford
- Demirci, F., Özek, G., Kırimer, N., İşcan, G., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B. ve Altıntaş, A., 2010, Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, Anadolu Üniversitesi, 2100, 209 s.
- Demirci, F., 2000, Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137s.
- De-Oliveria, A.C.A.X., Ribeiro-Pinto, L.F. and Paumgarten, F.J.R., 1997, In Vitro Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by β -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds, *Toxicology Letters*, 92, 1, 39-46.
- Dutcher, E., and Derendorf, H., 1995, Biotransformation In: Drug Actions, pp. 19-31, Medpharm. Sci. Pub., Stuttgart, Germany.
- Edris, A.E., 2007, Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A review, *Phytotherapy Research*, 21, 4, 308-323.
- Faber, K., 2004, Biotransformations in organic chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg, 454p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hanson, J.R., 2003, Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 135 p.
- Hanson, J.R., 1995, An introduction to biotransformations in organic chemistry, Oxford University Press, Oxford, 92p.
- Harlander, S., 1999, Biotechnology for the Production of Flavoring Materials-In: Source Book of Flavors, Reineccius, G. (Ed), Aspen Pub. Inc., 2nd ed. Maryland 6,155-175,.
- Hassan, R.A. and Radwan, H.M., 2010, The Lipids and Volatile Oil Constituents of *Leucaena glauca* (L.) Benth. Growing in Egypt and Their Biological Activity, Journal of Applied Sciences Research, 6, 5, 478-482.
- İşcan, G., 2009, Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 83 s.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G. and Eller, G., 2007, Composition and Antimicrobial Activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiovenda Essential Flower, Leaf and Stem Oils From Cameroon, Journal of Essential Oil Research, 19, 485-489.
- Joy, B., Rejan, A. and Abraham, E., 2007, Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil From *Hedychium coronarium*, Phytotherapy Research, 21, 5, 439-443.
- Juniur, M.R.M., Rocha e Silva, T.A.A., Franchi, G.C., Nowill, A., Pastore, G.M. and Hyslop, S., 2009, Antioxidant Potential of Aroma Compounds Obtained by Limonene Biotransformations of Orange Essential Oil, Food Chemistry, 116, 1, 8-12.
- Karabacak, Ç., 2007, Bazı *Scutellaria orientalis* Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 95 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Keskin, Y.S., 2010, Bazı Terpenlerin Biyotransformasyonunun İncelenmesi, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 113 s.
- Keskin, Y.S. ve Yıldırım, K., 2010, *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ve *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile β -iyonon Bileşiğinin Biyotransformasyonu, S.A.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 14, 1, 20-24.
- Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumph, B., Thede, B., and Washausen, P., 1986, Transformations of Terpenoids, In: Progress in Essential Oil Res., Proceeding of the International Symposium on Essential Oils, Brunke, E. J., (Ed.), pp. 367-394, Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J. and Aoki T., 2002, Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity From *Chenopodium ambrosioides*, Journal of Natural Products, 65, 509–512.
- Krings, U., Berger, R.G., 1998, Biotechnological Production of Flavours and Fragrances, Applied Microbiology and Biotechnology, 49,1-8.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R., 2000, Isoprenoid Biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes, Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(24), 13172-13177.
- Liu, Y., Wang, H., 2005, Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering, J. Integrative Plant Biology, 47(7), 769-782.
- Mann, J., 1994, Chemical Aspects of Biosynthesis, Oxford University Press, 91 p.
- Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V., and Harborne, J. B., 1994, Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance, Longmann Sci. & Tech., Essex.
- Manley, C.H., 1987, Processing and Biotechnology as a Source of Flavors Perfumer & Flavorist, 11-12

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martin, A. M., 1991, Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products, Elsevier Applied Science London.
- Matos, J.M., Schmidt C.M., Thomas, H.J., Cummings, O.W., Wiebke, E.A., Madura, J.A., Patrick, L.J. and Crowell, P.L., 2008, A Pilot Study of Perillyl Alcohol in Pancreatic Cancer, *Journal of Surgical Research*, 147, 2, 194-199.
- Nelson, D. L., 2005, *Biyokimyanın İlkeleri*, (Çev.Editörü N. Kılıç), Palme Yayıncılık, 313, 771-816, 1152s.
- Oskay, E., 1983, *Organik Kimya*, Hacettepe Yayınları, A-17, 3. Baskı, 566 s.
- 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 Antiplasmodial and Antifungal Drug Research, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 22, 6075-6078.
- Özşen, Ö., 2011, İzoforon Analoglarının Sentezi, Biyotransformasyonu ve Biyolojik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 62p.
- Park, E-J., Kim, S-H., Kim, B-J., Kim, S-Y., So, I. and Jeon, J-H., 2009, Menthol Enhances an Antiproliferative Activity of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in LNCaP Cells, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44, 125-130.
- Peana, A.T., D'Akuila, P.S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P. and Moretti, M.D.L., 2002, Anti-inflammatory Activity of Linalool and Linalyl Acetate Constituents of Essential Oils, *Phytomedicine*, 9, 8, 721-726.
- Pinder, A.R., 1960, *The Chemistry of the Terpenes*, New York, 221 p.
- Pybus, D. and Sell, C., 1999, *The Chemistry of Fragrances*, Royal Society of Chemistry, London.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rehm, H. J., and REED, G., 1984, *Biotechnology: A Comprehensive Treatise, Biotransformations*, Kieslich K. (Ed.), Vol. 6a, Verlag Chemie, Weinhiem
- Rollas, S., 1992, *İlâçların Metabolizması (Biyotransformasyon)*, Marmara Üniversitesi Yayınları No:525, Eczacılık Fakültesi No:10, İstanbul.
- Roman, P., Kandefer-Szerszen M., Trytek, M. and Fiedurek, J., 2007, Terpenes: Substances Useful in Human Healthcare, *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 55, 315-327.
- Servi, S., Barbeni, M., and Caella, P., *New Avenues in Natural Products: Strategies in the Biogenesis of Flavours*, In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Fungati C., and Rahman, A., (Ed.), pp. 295-345, Vol.13, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1993.
- Tavera, H. L., 1999, Monoterpenes in Essential Oils: Biosynthesis and Properties, *Adv. Exper. Med. Biol.* 464, 49-62
- Telefoncu, A., 1995, *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No: 152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 356s.
- Tiejde, J. M., and Stein, J. L., 1999, Microbial Diversity: Strategies for its Recovery: In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd Ed. Demain A. L., and Davies J. E. (Ed.), pp. 682-692, ASM Press, Washington DC.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batur, M. ve Çeltik, Ö., 2000, Türkiye'nin tarımsal mikroflorasının endüstriyel öneme sahip bazı Enzimatik aktivitelerinin incelenmesi. *Amilaz, proteaz, lipaz. Journal of Biology*, 24:79-93.
- Turner, G.W., Gershenzon, J., and Croteau, R.B., 2000, Development of Peltate Gladular Trichomes of Peppermint, *Plant Physiology*, 665-679

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Umay, A., 2007, *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 45 s.
- Watt, E.E., Betts, B.A., Kotey, F.O., Humbert, D.J., Griffith, T.N., Kelly, E.W., Veneskey, K.C., Gill, N., Rowan, K.C., Jenkins, A. and Hall, A.C., 2008, Menthol Shares General Anesthetic Activity and Sites of Action on The GABA_A Receptor With The Intravenous Agent, Propofol, *European Journal of Pharmacology*, 590, 1-3, 120-126.
- 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*, 27, 3, 1-9.
- Vandamme, E.J. and Soetaert W., 2002, Bioflavours and Fragrances via Fermentation and Biocatalysis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 1323-1332.
- Van Der Werf, M. J., De Bont, J. A. M., and Leak, D. J., 1997, Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 148-177.