

Yeni Tat Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretimi

Nazife KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Şubat 2014

Production of New Flavor Compounds by Biotechnological Methods

Nazife KAYA

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

February 2014

Yeni Tat Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretimi

Nazife KAYA

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 Nazife Kaya'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Yeni Tat 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. Gökalp İŞCAN

Üye : Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Koku ve tat maddeleri, özellikle gıda ve ilaç sanayi başta olmak üzere birçok alanda kullanılmakta ve dünya çapında büyük bir pazar oluşturmaktadır. Üretimleri genelde kimyasal sentez yöntemleriyle olmakta, fakat tüketiciler doğal tat maddelerini yapay olanlara oranla tercih etmektedir. Doğal bir üretim yöntemi olarak kabul edilen biyoteknolojik süreçler ve özellikle mikrobiyal transformasyon tepkimeleri son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Terpenler aroma maddelerinin içinde bulunduğu doğal bileşiklerin en geniş sınıfıdır. Bunun için yeni tat maddelerinin biyoteknolojik olarak üretiminde öncül molekül olarak kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada terpen C_{13} yapısında olan β -iyonol asetatın 19 farklı mikroorganizma ile ön biyotransformasyon çalışmaları gerçekleştirildi. β -iyonol asetatın *Fusarium solani* ile biyotransformasyonu sonucu metabolitler ürettiği GK/KS analizleri ile belirlendi. Biyotransformasyon deneyi preparatif ölçekte tekrarlandı. Oluşan metabolit karışımları kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırıldı. Saflaştırma sonucunda verimleri %3,3 (M_1), %4,5 (M_2) ve %10,5 (M_3) olan üç farklı metabolit elde edildi. Metabolitlerin yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Anahtar Kelimeler: Aroma maddeleri, β -iyonol asetat, biyoteknoloji, mikrobiyal transformasyon, terpenler

SUMMARY

Flavor and fragrance compounds have a wide range of use, in food, beverage, pharmaceutical industries and create a world wide market. Their productions are mostly based on chemical synthesis, but consumers prefer the natural flavor compounds. Biotechnological processes assumed as a natural way of production, especially microbiological transformation reactions gained importance in recent years. Terpenes are a wide class of compounds showing aroma properties. Therefore they are used as a starting material for biotechnological production of new flavor compounds.

In this study, pre-biotransformation of a terpene, β -ionol acetate, was carried out with 19 different microorganisms. It was found out that biotransformation of β -ionol acetate with *Fusarium solani* resulted in producing metabolites based on GC/MS analysis. The same biotransformation experiment was repeated on preparative scale. The formed metabolites were purified by column chromatography with 3,3% 4,5% and 10,5% yield, respectively. Metabolite structures were elucidated by using spectroscopic methods.

Keywords: Aroma compounds, β -ionol acetate, biotechnology, microbial transformation, terpenes

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini öğretmekten asla çekinmeyen değerli dostum ve 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 ve Doç. Dr. Gökâl İŞCAN'a,

Çalışmalarıma katkıda bulunan yüksek lisans arkadaşlarım en başta Türkan TİKNA'ya, sonrasında Şimal ŞENCAN, Ceren ELMACI ve Seda GÖZER'e ayrıca desteğini esirgemeyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümünden laboratuvar teknisyeni Dilek DALYANCI'ya,

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteğini ve ilgisini esirgemeyen canım aileme ve her alanda beni destekleyen ikinci ailem olan Erdoğan ailesine ve çok değerli eşim Şahin ERDOĞAN'a,

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.

Nazife KAYA

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. AROMA MADDELERİ	 3
2.1. Koku ve Tat Maddeleri	3
2.2. Doğal Koku ve Tat Maddeleri	7
2.3. Doğal Koku ve Tat Maddelerinin Üretimi	8
2.3.1. Biyoteknolojik yolla doğal koku ve tat maddesi üretimi	10
2.3.1.1. Enzimatik yolla doğal koku ve tat maddesi üretimi	11
2.3.1.2. Fermentasyon ile doğal koku ve tat maddesi üretimi	12
2.4. Biyotransformasyon	14
2.5. Mikrobiyal Transformasyon ile Doğal Koku ve Tat Maddesi Üretimi	16
2.6. Terpenler	21
2.7. Megastigmanlar	26
2.8. Mikrobiyal Transformasyon ile Üretilen Bazı Terpenler	29
 3. MATERYAL, METOD VE DENEYSEL ÇALIŞMALAR	 32
3.1. Genel Deneysel Bilgiler	32
3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Mikroorganizmalar	32

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları	34
3.3.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması	34
3.3.2. Mikroorganizmaların üretimi ve çoğaltılması	35
3.3.2.1. Yatık besi yeri	35
3.3.2.2. Sıvı besi yeri	35
3.3.3. Substrat hazırlanması ve ilavesi	36
3.3.4. Metabolitlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu	37
3.3.5. Metabolitlerin tanımlanması	38
4. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	40
4.1. Ön Deneme Sonuçları	40
4.2. β -iyonol Asetat'ın NMR Spektrumları	48
4.3. β -iyonol asetat'ın <i>Fusarium solani</i> ile Preparatif Ölçekte Biyotransformasyonu.	49
4.4. Sonuçların Değerlendirmesi ve Öneriler	57
5. KAYNAKLAR DİZİNİ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Aroma endüstrisinin ilk sentetik molekülleri	4
2.2. Koku ve tat maddelerinin bölgesel pazar payı oranları	7
2.3. Doğal koku ve tat maddelerinin üretim yöntemleri	9
2.4. Limonen izomerleri	11
2.5. Progesteronun mikrobiyal transformasyonu	14
2.6. <i>Pycnopus cinnabarinus</i> mikroorganizması ile ferulik asitten vanilin üretimi	18
2.7. 2-fenilalanin'den mikrobiyal transformasyon ile 2-feniletanol üretimi	19
2.8. <i>Yarrowia lipolytica</i> mikroorganizması ile risinoleik asitten γ -dekalakton üretimi	20
2.9. <i>Pseudomonas putida</i> mikroorganizması ile mandelik asitten benzaldehit üretimi	21
2.10. İzoprenlerin terpenleri oluşturma mekanizması	22
2.11a. İzopentenil pirofosfat'ın biyosentez yolu	23
2.11b. Terpenlerin biyosentez yolu	24
2.12. Bazı terpen yapıları	25
2.13. β -karoten'in degradasyonu ile oluşan bazı megastigman yapıları	27
2.14. Megastigman yapıları bazı koku ve tat maddeleri	27
2.15. α -pinen'in mikrobiyal transformasyonu ile verbenon üretimi	29
2.16. <i>Mucor</i> sp. mikroorganizması ile valansen'den nootkaton üretimi	30
3.1. Mikroorganizmaların hazırlığı ve pre-inkübasyon aşaması	36
3.2. Substrat ilavesi, inkübasyon ve filtrasyon aşamaları	37
3.3. Ekstraksiyon, çözücünün buharlaştırılması ve saflaştırma aşamaları	38
4.1. β -iyonol asetatın biyotransformasyonunda kullanılan mikroorganizmalar	41
4.2. Ön deneme ekstratlarının İTK sonuçları	42
4.3. Ön deneme ekstratlarının GK/KS kromatogramları	43
4.4a. β -iyonol asetat'ın ^1H NMR spektrumu	48
4.4b. β -iyonol asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5.	Santez sonuç raporunda verilen M ₃ metabolitinin yapısı 50
4.6	β -iyonol asetat'ın <i>Fusarium solani</i> ile biyotransformasyonu 50
4.7a.	M ₁ metabolitinin kromatogram ve kütle spektrumları 51
4.7b.	M ₁ metabolitinin ¹ H NMR spektrumu 52
4.7c.	M ₁ metabolitinin ¹³ C NMR spektrumu 52
4.8a.	M ₂ metabolitinin ¹ H NMR spektrumu 53
4.8b.	M ₂ metabolitinin APT spektrumu 53
4.9a.	M ₃ metabolitinin kromatogram ve kütle spektrumları 54
4.9b.	M ₃ metabolitinin ¹ H NMR spektrumu 55
4.9c.	M ₃ metabolitinin ¹³ C NMR spektrumu 55
4.9d.	M ₃ metabolitinin DEPT spektrumu 56
4.9e.	M ₃ metabolitinin HMBC spektrumu 56

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Aroma kimyasının gelişim kronolojisi	5
2.2. Bitki hücre ve doku kültürleri ile üretilen aroma maddeleri	10
2.3. Fermentasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri	12
2.4. Fermentasyon ve biyotransformasyon özelliklerinin karşılaştırılması	13
2.5. Mikrobiyal transformasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri	16
2.6. Terpenlerin sınıflandırılması	22
2.7. β -iyonol asetat ile ilgili bilgiler	28
2.8. Koku ve tat maddesi olarak kullanılan bazı terpenlerin mikrobiyal transformasyonları.....	31
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	33
3.2. Kullanılan mikroorganizmalar	34
4.1. β -iyonol asetat'ın <i>Fusarium solani</i> ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK ve metabolit verileri	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	: Santigrat derece
C	: Karbon
C-C	: Karbon - karbon bağı
CDCl ₃	: Dötero Kloroform
DMSO	: Dimetil sülfoksit
¹³ C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
CAS	: Kimyasal madde servisi
DEPT	: NMR tekniği (-CH, -CH ₂ , -CH ₃ tespitinde kullanılır)
EC	: Enzim komisyon numarası
EtOAc	: Etil asetat
EtOH	: Etil alkol
g	: Gram
GK/KS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HMBC	: Uzun mesafe proton ve karbon etkileşimlerinin korelasyonu
¹ H-NMR	: Hidrojen nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
HCl	: Hidroklorik asit
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
Ko-A	: Koenzim A
L	: Litre
M _A	: Molekül ağırlığı
MeOH	: Metil alkol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmHg	: Milimetre civa
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Na_2SO_4	: Sodyum sülfat
$n_D, 20^\circ\text{C}$	: 20°C 'de ölçülen kırılma indisi
nm	: Nanometre
PP	: Pirofosfat
ppm (mg/L)	: Bir litre çözeltideki çözünen maddenin miligram cinsinden değeri
rpm (devir/dk)	: Dakikadaki devir sayısı
UV	: Ultraviyole
45°	: 45 derecelik açı
\$	: Amerikan doları (para birimi)

BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ

Koku ve tat alma duyuları kullanılarak algılanan uçucu ve koku veren özellikteki kimyasallar aroma maddeleri olarak adlandırılır. Keskin kokuya sahip bu bileşikler genellikle yiyecek ve içeceklerde katkı maddesi olarak kullanılırlar. Koku ve tat maddeleri ya burundaki reseptörler ya da dildeki tat bölgeleri tarafından algılanan maddelerdir (Sell, 2006).

Koku ve tat maddelerinin kullanım alanları oldukça geniştir ve dünyadaki toplam pazarı en az 15 milyar Euro olarak tahmin edilmektedir (Berger, 2007). Üretimleri çeşitli yollarla gerçekleşmektedir. Ana kaynak olarak bitkiler kullanılmaktadır fakat bitkilerden üretimleri oldukça zor, verimi düşük ve maliyeti yüksektir. Bundan dolayı kimyasal sentezle elde edilen aroma maddelerinin kullanımı zamanla artmıştır. Fakat tüketicilerin doğal maddeye olan ilgisi ve yapay maddelerin insan sağlığı ve dünya ekosistemini bozan tehlike unsuru olarak görülmelerinden ötürü aroma endüstrisinin de bakış açısı değişmiştir. Son yıllarda doğal aroma maddesi üretimi önem kazanmış ve bir çok bilimsel çalışmaya konu olmuştur (Soares, et al., 2000; Aran, 2010).

Doğal aroma maddeleri Avrupa Birliği mevzuatıyla uyumlu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre; “bitkisel ve hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla elde edilen aroma verici madde veya madde karışımları” olarak tanımlanmıştır (Aran, 2010; TGKY, 1997). Son dönemlerde doğal bir yöntem olarak kabul edilen mikrobiyal transformasyon tepkimeleri, aroma maddelerinin üretiminde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Soares, et al., 2000; Aran, 2010).

Bu tez çalışmasında terpen yapısında olan β -iyonol asetatın 19 farklı maya ve fungus ile mikrobiyal transformasyonu sonucu yeni doğal aroma maddelerinin eldesi amaçlanmıştır.

İlk bölümde tezin amacı tanımlanmış, tezin konusu olan tat maddeleri ve biyoteknolojik yöntemler ile ilişkili detaylı bilgiler ikinci bölümde verilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan meteryaller ve metod üçüncü bölümde açıklanmıştır. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlar hakkındaki tartışma ve öneriler dördüncü bölümde sunulmuştur.

BÖLÜM 2: AROMA MADDELERİ

2.1. Koku ve Tat Maddeleri

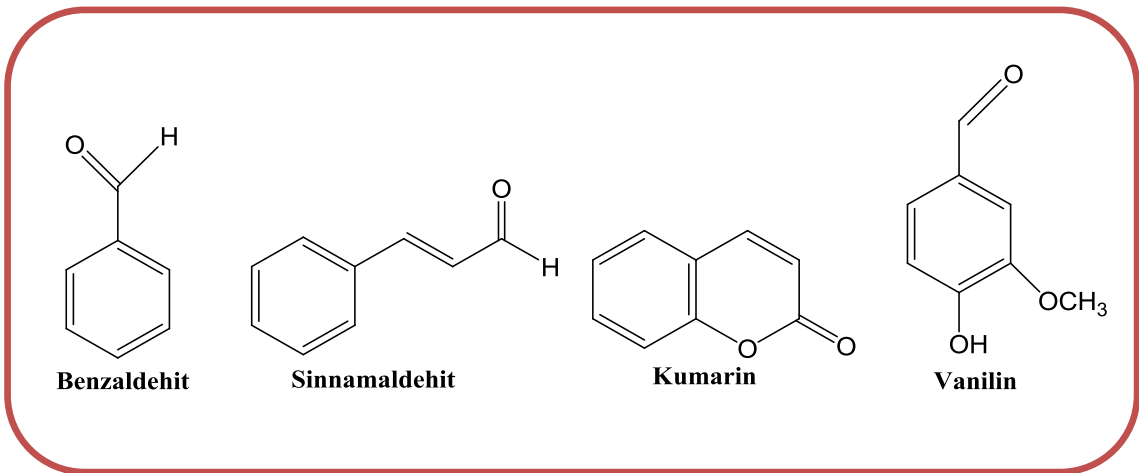
Bir maddenin koklanması ile alınan duyuya koku denir. Ürün ağızdayken algılanan koku duyusuna aroma, dilde alınan duyuya tat denir. Tat, çeşitli kimyasal ve fizikokimyasal özelliklere sahip çoğu uçucu ve uçucu olmayan bileşenlerin kompleks halindeki varlığının bir sonucudur. Uçucu olmayan bileşikler maddenin esas olarak tadını etkilerken, uçucu olanlar hem tadını hem de aromasını etkilemektedir. Koku ve tat maddelerine bu özelliği veren bileşikler alkol, aldehit, ester, dikarbonil, metil keton, lakton, terpen, fenolik bileşik ve kükürt içeren bileşik yapısında olabilirler. Koku maddeleri uçucu olup genellikle parfüm ve kozmetik alanlarında kullanılır. Tat maddeleri ise gıda sanayisinde kullanılır (Janssens, et. al., 1992; Urbach, 1997; Gatfield, 1988; Longo and Sanromán, 2006; <http://www.zootechni.org.tr/upload/File/GIDA%20KATKI%20MADDELERI.pdf>).

Koku ve tat maddeleri kullanımı insan tarihi kadar eskidir. Aroma maddelerinin ilk kullanım alanı kokudur. Günümüzde koku olarak kullandığımız parfüm, Latince olan ‘per fumum’ kelimesinden türetilmiştir. Bu kelimenin anlamı duman yoluyla veya kokulu duman anlamına gelmektedir. Yakın zamanda arkeologlar Kıbrıs’da 4000 yıl öncesine ait antik bir parfümeri keşfetmişlerdir. Ayrıca aroma maddeleri eski zamanlarda tıbbi amaçlar ve yiyeceklerde lezzet oluşturma amaçlı kullanılmışlardır (Sell, 2006; <http://news.nationalgeographic.com/news/2007/03/070329-oldest-perfumes.html>).

Kullanımı bu kadar eskiye dayanan, koku ve tat maddeleri bitkisel ve hayvansal kaynaklardan fiziksel yöntemler ile elde edilirdi. Fakat bu yöntemlerle aroma maddesi

üretiminde birçok zorlukla karşılaşıldığı için farklı yöntemler aranmaya başlanmıştır (Rodriguez and S'anchez, 2007).

19. yüzyılın sonlarına doğru organik kimya gelişmiş ve yeni sentetik kokular elde edilmiştir. Aroma maddelerinin ana yapılarını oluşturan bileşiklerin molekül yapıları belirlenmesinden sonra birçok sentetik koku ve tat maddesi üretilmeye başlanmıştır. Bu sayede ivme kazanan aroma endüstrisinin altın çağı yaşanmıştır. Benzaldehit ve sinnamaldehitin izolasyonu, kumarin üretimi, vanilinin kimyasal sentezi ve üretiminin yapılması (Bkz. Şekil 2.1) aroma endüstrisinin gelişmesini sağlayan önemli sentetik koku ve tat maddeleridir. Araştırmaların artmasıyla meyve aromaları ve renklendiriciler yapay olarak elde edilebilmiştir. Aroma endüstrisinin ilk öncüsü, Vanilinin sentetik olarak üretimi sağlayan Haarmann & Reimer'dir. Aroma endüstrisinde sentetik koku ve tat maddeleri önemli bir yer edinmiştir. Günümüzde aroma madde ihtiyacının %84'ü sentetik maddelerle karşılanmaktadır (Berger, 2007; Soares, et al., 2000; Armstrong and Yamazak, 1986). Aroma kimyasının gelişim kronolojisi Çizelge 2.1'de özetlenmiştir (Sell, 2006).



Şekil 2.1. Aroma endüstrisinin ilk sentetik molekülleri

Çizelge 2.1. Aroma kimyasının gelişim kronolojisi (Sell, 2006)

Yıl	Keşif Adı	Keşfeden Kişi
1701	Bazı çiçeklerden buhar damıtması ile sağlanan uçucu yağların gözlemi	Nicholas Lemery
1759	Nitrik asit buharı ile amber yağının reaksiyonu sonucu bir misk kokusunun elde edilmesi	Berlin Akademi
1800	Amber bileşenin kimya içindeki araştırması	Dumas
1833	Anetol, borneol ve kafurun ampirik formüllerinin bildirilmesi	Dumas
1834	Sinamik aldehit izolasyonu Nitrobenzenin hazırlanması	Dumas, Peligot Mitscherlich
1837	Benzaldehit izolasyonu	Liebig, Wohler
1843	Keklik üzümü yağının ana bileşeninin metil salisilat olduğu belirlenmiştir	Cahours
1853	Benzil alkolün hazırlanması Alifatik aldehitlerin sentezi	Cannaizzaro Piria
1856	Sinamik aldehit sentezi	Chiozza
1859-1860	Salisilik asit'in büyük ölçekte hazırlanması	Kolbe
1863	Benzaldehit'in hazırlanması	Cahours
1865	Benzen'in yapısının belirlenmesi	Kekule
1866	Sinamik asit yapısı saptandı	Erlenmeyer
1868	Kumarin sentezi	Perkin
1869	Heliotropin'in keşfi	Filtig, Mielk
1871	Heliotropin'in yapısı belirlendi	Barth
1874	Gayakol'den vanilin sentezi	Reimer, Tiemann
1876	Fenillaktetik aldehit'in keşfi	Radziszewski
1875-77	Sinemik asit sentezi	Perkin
1877	<i>p</i> -hidroksibenzaldehit'den anisaldehit üretimi	Tiemann, Herzfeld
1878	Terpin hidrat yapısı belirlendi	Tilden
1880	Kinolinler keşfedildi	Skraup
1884	Limonen ve dipenten tespit edildi	Wallach
1885	Terpinol'ün yapısı belirlendi	Wallach, Tiemann
1888	Nitro misklerin keşfi	Baur
1889	Sitronelal'in keşfi	Dodge
1890	Safrolden heliotropin sentezi	Eykman

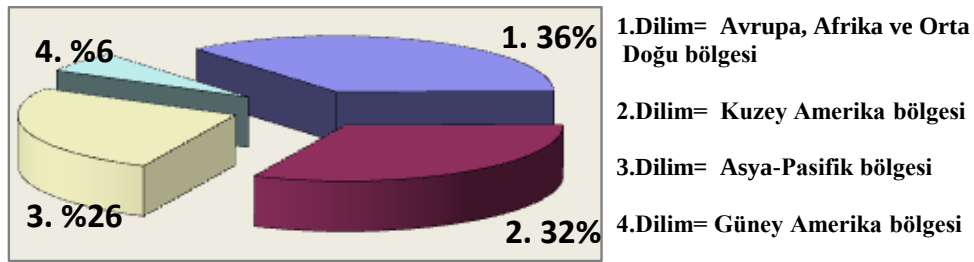
Çizelge 2.1. Aroma kimyasının gelişim kronolojisi (devam)

Yıl	Keşif Adı	Keşfeden Kişi
1891	Rhodinol keşfi	Eckhart
1893	İyonon'un sentezi	Tiemann, Kruger
1894	α -pinen'in yapısı belirlendi	Wagner
1898	Keton miskin keşfi	Baur, Thurgau
1903	Metil heptin karbonat ve homologlarının keşfi, Aromatiklik üzerinde yapılan temel çalışma	Mourreau, Delange Von Baeyer
1904	Muskon izolasyonu Aldehitlerin sentezlenmesinde glisidik metodu	Walbaum Darzens
1905	Sinnamik alkol'ün sentezi	Leser, Barbier
1908	γ -undekalakton'un keşfi	Jukov, Schestakow
1913	Farnesol'ün keşfi	Kerschbaum
1919	Siklamen aldehit'in keşfi Linalol'ün sentezi	Blanc Ruzicka, Fomasir
1923	α -amil sinamalaldehit'in keşfi Nerolidol'ün keşfi	Lesech, Descollonges Ruzicka
1926	Muskon yapısının belirlenmesi	Ruzicka, Kerschbaum
1933	Jasmonen'in yapısının belirlenmesi	Treff, Werner
1934	Muskon sentezi	Weber, Ziegler
1946	Terpenoitler için Wallach'un izopren kuralının tamamlanması	Robinson
1953	Linalol'ün yeni sentezi	Caroll, Kimel
1970	α ve β -damaskonlar'ın yeni sentezi	Demole

Aroma maddeleri doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Yapay olan sentetik aroma maddelerinin pazar payı hızla artmış olmasına rağmen tüketicilerin doğal ürünler tercih etmesi ve tabiata geri dönme isteği, doğal koku ve tat maddelerinin gelişimini sağlamıştır. Bu sayede doğal yollarla yeni aroma maddelerinin üretim yolları araştırılmaya başlanmıştır (Berger, 1995; Armstrong and Yamazak, 1986).

Koku ve tat maddelerinin tahmini pazar payı 15 milyar Euro'dur. Bunun yaklaşık olarak 6,5 milyar Euro'sunu tat maddeleri, 8,5 milyar Euro'sunu ise koku maddeleri oluşturmaktadır. Koku ve tat maddelerinin dünyadaki Pazar payı oranları

Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Bu maddelerin üretiminde 8 önemli küresel şirket dünya pazarının yaklaşık %60'ını elinde bulundurmaktadır. Bu şirketler; Givaudan, International Flavors&Fragrances, Firmenich and Symrise, Quest International, Takasago, T. Hasegawa, Sensient Technologies, Mastertaste, Danisco ve Mane'dir. İlk ikisi endüstrinin en önemli şirketleri olup ciroları yaklaşık 2 milyar Euro'dur (Berger, 2007).



Şekil 2.2. Koku ve tat maddelerinin bölgesel pazar payı oranları

2.2. Doğal Koku ve Tat Maddeleri

Son yıllarda tüketiciler, sentetik ürünlere oranla pahalı olmasına rağmen doğal ürünlerin kullanımına büyük önem vermektedir. Bu önem, kimyasal ürünlerin insan sağlığına ve doğaya zarar vermesinden ötürü uluslararası mevzuatlarda kullanımlarının kısıtlanması, insanların sağlıklı beslenme ve bilinçli yaşama eğilimlerinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde yaklaşık 10000 yapay koku maddesi bilinmekte ve 6400 doğal uçucu koku maddesi kullanılmaktadır (Aran, 2010; Hagedorn and Kaphammer, 1994).

Doğal koku ve tat maddesinin tanımı uluslararası mevzuatlarda kapsamlı bir şekilde yer almaktadır. Aroma maddelerinin üretildiği kaynaklar çok çeşitli ve farklıdır.

Amerikan Federal İlaç ve Gıda İdaresi yönetmeliğine göre doğal koku ve tat maddeleri şu aralıkta tanımlanmıştır: uçucu yağ; oleorezin; esans veya ekstre; hidrolize protein; gıda değerinden çok gıdalarda koku ve tat fonksiyonu olan kavrulmuş, ısıtılmış, enzimatik faaliyet sonucu elde edilmiş veya türetilmiş baharat, meyve, meyve suyu, yenilebilir mantar/maya, ot, kabuk, tomurcuk, kök, yaprak veya benzer bir bitkisel materyal, et, deniz ürünü, kümes hayvanı, yumurta, süt ürünü veya bunların fermentasyon ürünleri. Avrupa Birliği mevzuatına göre ise; bitkisel ve hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla elde edilen aroma verici madde veya madde karışımları doğal koku ve tat maddeleridir (Vandamme and Soetaert, 2002; Servi, et al., 1993).

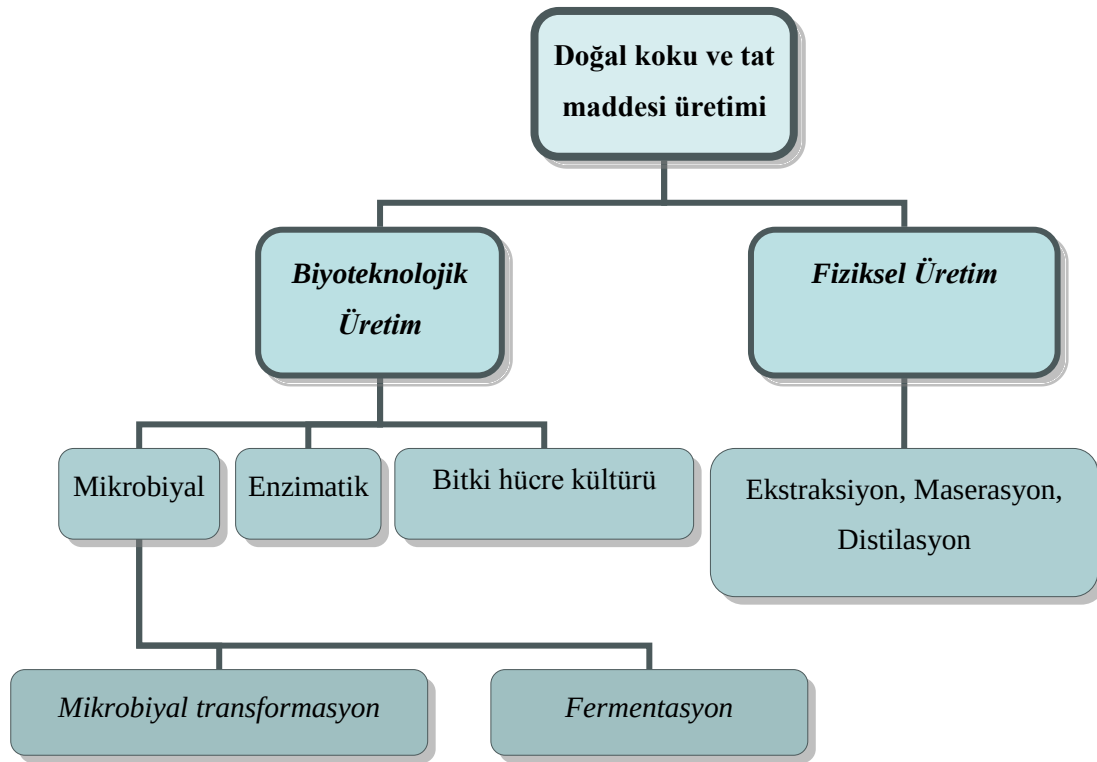
Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre ise aroma maddesinin doğal olması için, aroma vericiyi oluşturan bileşenlerin tamamının yada ağırlıkça en az %95'inin referans gösterilmiş kaynaktan elde edilmiş olması gerekir. Bu yönetmeliğe göre aroma maddeleri elde edilen kaynağa göre; doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, aroma karışımları, tepkime aromaları ve tütsü aromaları olarak sınıflandırılırlar (Türk Gıda Kodeksi Aroma Vericiler ve Aroma Verme Özelliği Taşıyan Gıda Bileşenleri Yönetmeliği, 2011).

2.3. Doğal Koku ve Tat Maddelerinin Üretimi

Doğal koku ve tat maddeleri eski zamanlardan itibaren bitkisel ve hayvansal kaynaklardan maserasyon, ekstraksiyon ve distilasyon gibi fiziksel yollarla elde edilirdi. Bu yöntemler günümüzde halen kullanılmasına rağmen bazı dezavantajlar içermektedir. Kaynaklarından aroma maddelerinin saflaştırılmasının çok iş gücüne ihtiyaç duyması ve elde edilen ekstrenin miktarının az olması bunlardan birkaç tanesidir. Ham madde temini, aromanın kalitesi ve elde edilecek miktarı, iklim ve mevsim değişiklikleri ile

farklılık göstermektedir. Ayrıca bitkisel hastalıklar kaynak sıkıntısı yaratabilmektedir (Soares, et al., 2000; Armstrong and Yamazak, 1986).

Fiziksel yolla üretim piyasadaki doğal koku ve tat madde ihtiyacını karşılayamamaktadır. Doğal aroma maddeleri tanımlarından da anlaşılacağı üzere, enzimatik ve mikrobiyolojik yöntemlerle üretilen maddeler, doğal olarak kabul edilmiştir. Biyoteknolojik yöntemler doğal koku ve tat maddeleri üretiminde alternatif bir yol olarak önem kazanmıştır. Doğal koku ve tat maddelerinin üretim yöntemleri Şekil 2.3’de özetlenmiştir (Aran, 2010; Armstrong and Yamazak, 1986).



Şekil 2.3. Doğal koku ve tat maddelerinin üretim yöntemleri

2.3.1. Biyoteknolojik yolla doğal koku ve tat maddesi üretimi

Biyoteknolojik yollarla doğal aroma maddesi üretiminde mikroorganizmalar, saf enzimler, bitki hücre ve doku kültürleri kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar kullanılarak aroma maddesi üretimi iki farklı prosesle gerçekleştirilmektedir. Bunlar fermentasyon (*de novo* sentezi) ve biyotransformasyon (biyodönüşüm) yöntemleridir (Aran, 2010).

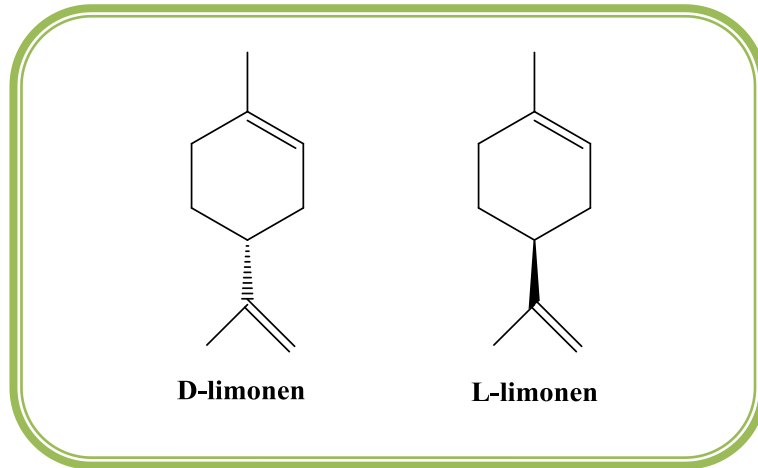
Bitki hücre ve doku kültürleri kullanılarak aroma maddesi üretimin üç yolu vardır. Bunlar; *mikroçoğaltım*, *bitki süspansiyon kültürlerinde de novo sentezi* ve *bütün hücre veya izole enzimleri ile biyotransformasyon* yöntemleridir. Mikroçoğaltım yöntemi ile geleneksel yöntemle üretimi zor olan bitkiler yetiştirilebilmektedir. Bitki hücre ve doku kültürleri kullanılarak iklim ve mevsim koşullarından etkilenmeden istenilen yer, zaman ve kalitede üretim yapılabilir. Fakat ürünlerin düşük verimli ve sürecin maliyetinin yüksek olmasından dolayı bu yöntem mikrobiyal ve enzimatik yöntemlere göre daha az tercih edilmektedir. Bu yöntemlerle üretilen bazı aroma maddelerine örnekler Çizelge 2.2'de verilmiştir (Berger, 2007).

Çizelge 2.2 Bitki hücre ve doku kültürleri ile üretilen aroma maddeleri

Aroma	Bitki	Metabolit	(Birikmiş) Miktar	Kaynak
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>	Dialil disülfür	%14	Madhavi et al., 1991 Ohsumi et al., 1993
Anason	<i>Pimpinella anisum</i>	Anetol /kavikol	%0,37	Ernst,1989
Vanilya	<i>Vanilla planifolia</i>	Vanilin	%0,099	Knorr, et al., 1993 Knuth and Sahai, 1991
Meyankökü	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glissirizin	Belirlenmemiş	Hayashi, et al., 1988

2.3.1.1. Enzimatik yolla doğal koku ve tat maddesi üretimi

Doğada bilinen 25000 enzim bulunmaktadır. Bunların yaklaşık 400 tanesi enzimatik yolla aroma maddesi üretmek ve stereoselektif organik sentez yapmak için ticari olarak kullanılmaktadır. Enzimatik tepkimeler mikroorganizmaların kullanıldığı yöntemlere göre daha yüksek verim sağlamaktadır. Ayrıca enzimler enantiyomer seçiciliğine sahip olduklarından, koku ve tat maddesi üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin limonen molekülünün d-limonen izomeri limonsu ve portakalsı bir kokuya sahipken; l-limonen izomeri çamsı bir kokuya sahiptir. Yapıları Şekil 2.4'de verilmiştir. Enzimatik tepkimelerin hızlı gerçekleşmesi ve genelde yan ürün oluşturmamaları aroma maddelerinin üretiminde tercih edilmelerine olanak sağlamaktadır. Fakat saf enzim eldesinin maliyetinin yüksek olması en büyük dezavantajlarıdır. Bu sebeple enzimatik yolla üretilen aroma maddelerinin maliyeti de yükselmektedir. Gıda biyoteknolojisinin de çoğunlukla, hidrolitik enzimler, transferazlar, oksidoredüktaz ve liyazlar kullanılmaktadır (Berger, 2007; Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).



Şekil 2.4. Limonen izomerleri

Liyaz grubuna ait bazı enzimler kullanılarak seskiterpenler sentezlenmiştir. Örneğin; Schalk ve Clark 2004 yılında farnesil difosfattan alifatik ve oksijenli yapılar içeren seskiterpenleri sentezlemeyi başarmıştır. Valensen molekülü de bu sentez yoluyla elde edilebilmektedir (Berger, 2007; Schalk and Clark, 2004).

2.3.1.2. Fermentasyon ile doğal koku ve tat maddesi üretimi

Fermentasyon çok uzun yıllardan beri yoğurt, ekmek ve şarap gibi gıdaların yapımında kullanılan biyoteknolojik bir yöntemdir. Bütün hücreler ortamda bulunan karbonhidrat, protein ve yağ gibi karbon kaynaklarını yıkıma uğrattıktan sonra daha kompleks yapılar olan aroma maddelerine dönüştürmektedir. Buna *de novo* sentezi de denir. Fermentasyon yöntemiyle elde edilen başlıca aroma maddeleri; terpenler, esterler, uçucu asitler, yüksek alkoller, karbonil bileşikler, laktonlar, pirazinler ve kükürtlü bileşiklerdir. Fermentasyon koku harici gıda, antibiyotik, ilaç etken maddesi, amino asit, enzim, kimyasal madde ve çözücü gibi alanların çoğunda endüstriyel boyutta üretilmektedir. Çizelge 2.3'de fermentasyon yöntemiyle üretilen bazı aroma maddeleri verilmiştir (Stanbury, et al., 1995; Pinches, 1994; Hamada, et al., 1991; Maarse, 1991).

Çizelge 2.3. Fermentasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri

Aroma Maddesi	Koku	Mikroorganizma	Kaynak
Benzaldehit	Badem	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Aran, 2010
Sitronellol	Portakal çiçeği	<i>Mycena pura</i>	Aran, 2010
γ-dekalakton	Şeftali	<i>Sporobolomyces odorus</i>	Neto, et al., 2004
6-pentil-α-piron	Hindistan Cevizi	<i>Trichoderma</i> sp.	Rocha-Valadez et al., 2006
Propiyonik asit	Ekşimiş süt	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Schrader et al., 2004
Feniletanol	Gül	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Vandamme, 2003
İzoamil asetat	Muz	<i>Williopsis saturnus</i>	Janssens et al., 1987;

Fermentasyonla aroma maddesi üretiminde; yüzey kültür ve derin kültür teknikleri kullanılmaktadır. Yüzey kültür yönteminde mikroorganizma besi ortamının yüzeyinde çoğalır ve mikroorganizma hücreleri ve metabolitlerini içeren bir tabaka oluşur. Ürün mikroorganizmanın türüne göre hücre dışına da salgılanabilir veya hücre içinde de kalabilir. Derin kültür tekniğinde ise mikroorganizmalar çözelti içerisinde büyür. Bu yöntem için uygun fermentör kullanmak gerekir. İki yöntem karşılaştırıldığında yüzey kültür yöntemi az maliyetli, yüksek verimli ve iyi özellikte ürün verdiği için derin kültür yöntemine tercih edilir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010; Couto and Sanromán, 2006; Pekin, 1993).

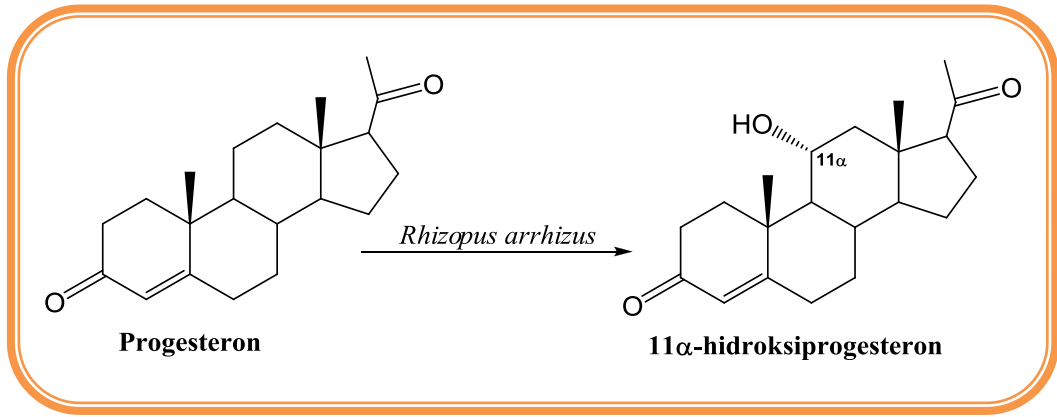
Fermentasyon yöntemiyle üretilmek istenen aroma maddesinin yanında daha fazla miktarda yan üründe üretilebilir. Bu durum üretilen aroma maddesinin verimini düşürür ve saflaştırmasını zorlaştırır. Bundan dolayı mikroorganizmaların kullanıldığı fermentasyon yerinesaf enzimlerin kullanıldığı biyotransformasyon yöntemi tercih edilebilmektedir. Çizelge 2.4'de fermentasyon ve biyotransformasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır (Winterhalter and Schreier, 1993).

Çizelge 2.4. Fermentasyon ve biyotransformasyon özelliklerinin karşılaştırılması

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

2.4. Biyotransformasyon

Biyotransformasyon; bütün hücre veya izole enzimlerin bir bileşiği katalizleyerek kendine benzer başka bir bileşiğe kimyasal dönüşümü olarak tanımlanabilir. Biyotransformasyon uzun zamandır farklı alanlarda kullanılan bir yöntemdir. Steroitlerin mikrobiyal transformasyonlarının yapılmasıyla biyotransformasyon modern uygulamalarda yer bulmuş ve bu alandaki çalışmaların hızla artmasına sebebiyet vermiştir. Steroitlerle yapılan ilk çalışmaların en iyi örneği Mamoli ve Vercellone'nin 1937'de mayaları kullanarak androstenedionu testosterona indirgemesidir. Daha sonra 1952'de Peterson ve Murray ise *Rhizopus arrhizus* fungusunu kullanarak progesteron molekülünün 11 α -pozisyonuna hidroksil grubu eklemiştir. Bu sayede progesteronun hem hidroksillendirmiş hem de rasemik seçiciliğini göstermiştir. Şekil 2.5'de progesteronun *Rhizopus arrhizus* mikroorganizması ile biyotransformasyonu verilmiştir (Dordick, et al., 1998; Crueger and Crueger, 1990; Kieselich, 1976).



Şekil 2.5. Progesteronun mikrobiyal transformasyonu

Biyotransformasyon tepkimelerinde bütün hücre veya izole enzim sistemleri kullanılabilir. Bütün hücre sistemleri, büyümenin hızlı olması, kısa sürede sonuç vermesi ve maliyetinin düşük olması nedenleriyle tercih edilir. Mikroorganizmalar

mayalanma sürecinde besi yeri bileşenlerini kullanarak farklı moleküllere dönüştürmekte, biyotransformasyon da ise besi yeri içine ilave edilen substratı dönüştürmektedir (Akar, 2005; Faber, 2004).

Biyotransformasyon tepkimeleri, hücreye giren yabancı maddeleri zararsız hale getirmek için hücre içinde gerçekleşen tepkimeler olarak da tanımlanabilir. Bu tepkimeler sayesinde zararsız hale getirilen madde hücre dışına daha kolay atılır. Bunlar oksidasyon, hidroliz, esterleşme, dehidrasyon, izomerizasyon, fosforilasyon, C-C bağlarının koparılması ve indirgenme gibi tepkimelerdir (Roberts, 1992; Crueger and Crueger, 1990).

Biyotransformasyon tepkimeleri klasik kimyasal tepkimelere göre uygun ve ılıman koşullarda yapılabilir ve doğa dostudur. Aynı zamanda maliyeti daha düşük ve daha kısa sürede ve daha fazla verim ile çalışılabilir. Biyotransformasyon tepkimelerinin rasemik seçiciliğinden dolayı enantiyomerlerinin birini dönüştürerek rasemik karışımların ayrılmasını da olanak sağlamaktadır. Bu sayede klasik kimyasal tepkimelerle gerçekleşemeyen tepkimeler biyotransformasyon tepkimeleriyle kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

Biyotransformasyon; koku ve aroma maddeleri üretimi yansıra ilaç etken maddeleri ve antibiyotik üretiminde de kullanılmaktadır. Ayrıca rasemik seçiciliğinden dolayı amino asit üretiminde kullanılır. Aynı zamanda toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi alanlarda da kullanılmaktadır. Bu uygulamalara polimer kimyasının önemli bir maddesi olan akrilamitin, akrilnitrilin *Rhodococcus rhodochrous* mikroorganizmasıyla biyotransformasyonu sonucu elde edilmesi, örnek olarak verilebilir. Akrilamitin Japonya’da yıllık üretim miktarı yaklaşık 30000 ton’dur (Liese and Filho, 1999).

2.5. Mikrobiyal Transformasyon ile Doğal Koku ve Tat Maddesi Üretimi

Mikrobiyal transformasyonlar; maliyetlerinin ucuz olması, kolay uygulanabilirliği ve çevre dostu teknoloji olması sebebiyle koku ve tat maddesi üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde biyotransformasyonla üretilen birçok koku ve tat maddesi olmasına rağmen halen çoğu araştırma düzeyindedir. Bu yöntemle endüstriyel düzeyde üretilen aroma maddelerin en önemlileri vanilin, γ -dekalakton, benzaldehit, izoamil asetat, 2-feniletanol'dür. Çizelge 2.5'de mikrobiyal transformasyonla üretilen bazı aroma maddeleri verilmiştir (Krings and Berger, 1998).

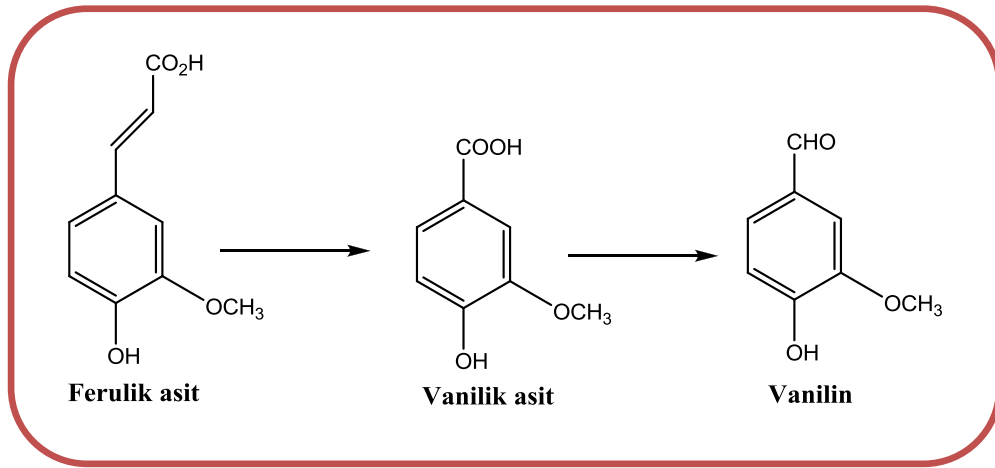
Çizelge 2.5. Mikrobiyal transformasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri

	Aroma Maddesi	Mikroorganizma	Kaynak
Küfler	Vanilin	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>	Falconnier, et al., 1994
	Benzaldehit	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Fabre, et al., 1996
	Metil salisilat	<i>Phellinus</i> sp.	Welsh, 1994; Manley, 1994
	Metil antranilat	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>	Falconnier, et al., 1994
	Jasmonatlar	<i>Botryodipoldia theobromae</i> , <i>Gibberella fujikurio</i>	Miersch, et al., 1993; Broadbent, et al., 1968
	Metil benzoat, Etil benzoat	<i>Polyporus tuberaster</i> ,	Kawabe and Morita, 1993
	2-feniletanol	<i>Ascoidea hylecoeti</i>	Berger, 1995
	Lentionin	<i>Lentinus edodes</i>	Yasumoto, et al., 1994
	Uzun zincirli yağ asit esterleri	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Armstrong and Brown, 1994
	Sitronellol	<i>Mycena pura</i>	Krings, et al., 1995
	Linalol	<i>Wolfiporia cocos</i>	Krings, et al., 1995
	Kumarinler	<i>Pleurotus euosmus</i>	Berger, 1995
	Metil ketonlar	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i>	Hagedorn and Kaphammer, 1994; Armstrong and Brown, 1994
	1-okten-3-ol, 1-okten-3-on	<i>Lentinus edodes</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>	Armstrong and Brown, 1994; Assaf, et al., 1995

Çizelge 2.5. Mikrobiyal transformasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri (devam)

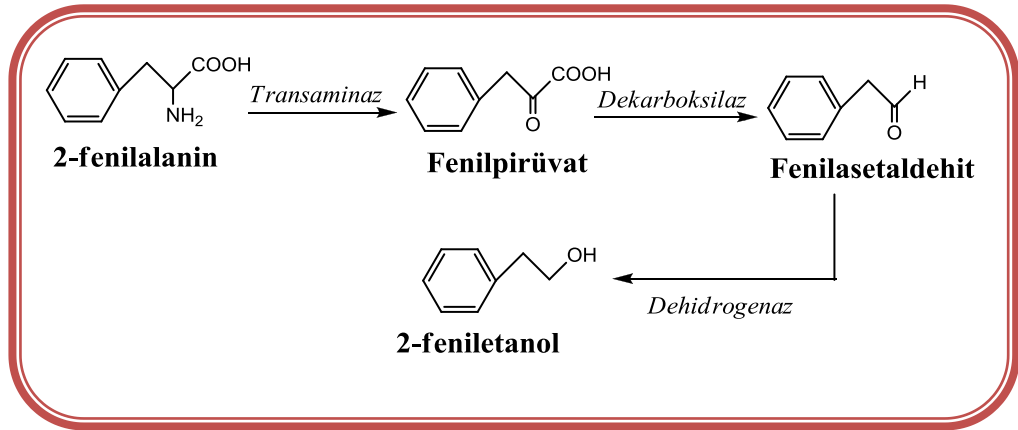
	Aroma Maddesi	Mikroorganizma	Kaynak
Küfler	Pirazinler	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Seitz, 1994
	Laktonlar	<i>Pseudomonas</i> sp.	Feron, et al.,1996
	Kükürt içeren uçucular	<i>Marasmius alliaceus</i>	Rapior, et al., 1997
	Furaneol	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Hecquet, et al., 1996
Mayalar	2-feniletanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hansenula anomala</i>	Longo and Sanroman, 2006
	Makrolitik Laktonlar	<i>Torulopsis bombicola</i>	Jeffcoat and Willis, 1998
	Feniletanol ve Esterler	<i>Kluyveromyces</i> sp.	Welsh, 1994
	Geraniol	<i>Kluyveromyces lactis</i>	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, <i>Enterobacteriaceae</i>	Latrasse, et al., 1985 Janssens, et al., 1992
	Metil ketonlar	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Armstrong and Brown, 1994
	Borneol, İzoborneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	Janssens, et al., 1992
	β -iyonon	<i>Xanthine oxidase</i>	Bosser and Belin, 1994
	Geosmin	<i>Streptomyces citreus</i>	Pollak and Berger, 1996

Endüstride doğal aroma maddelerin üretiminde mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri alternatif bir yol olmuştur. En güzel örneklerinden biri vanilin üretimidir. Dünya çapında vanilin yıllık üretimi 12000 tondur. Bunun sadece %0,5 bitkisel kaynağı olan vanilya orkidelerinden ekstre edilmektedir. Çoğu kısmı sentetik olarak üretilmekte olup, sentetik vanilin kilogramı 15 \$ düzeyindedir. Doğal vanilin fiyatı ise kilogram başına 1200 ve 4000 \$ arasında değişmektedir. Tüketicilerin doğal ürünlere karşı artan ilgisinden dolayı son yıllarda vanilin üretiminde mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla daha kolay bulunan ferulik asidin *Pycnoporou cinnabarinu* mikroorganizması ile biyotransformasyonu sonucu vanilin üretimi gerçekleştirilmektedir. Ayrıca endüstriyel çapta vanilin üretimi pirinç kepeğinden elde edilen ferulik asidin *Amycolatopsis* sp. HR167 mikroorganizması ile biyotransformasyonu sonucu kesikli beslemeli prosesle, 12 g/L miktarında üretilebilmektedir (Schrader, et al., 2004; Walton, et al., 2003; Thibault, et al., 1998). Şekil 2.6'da *Pycnoporou cinnabarinu* mikroorganizması ile ferulik asitten vanilin üretim tepkimesi verilmiştir.



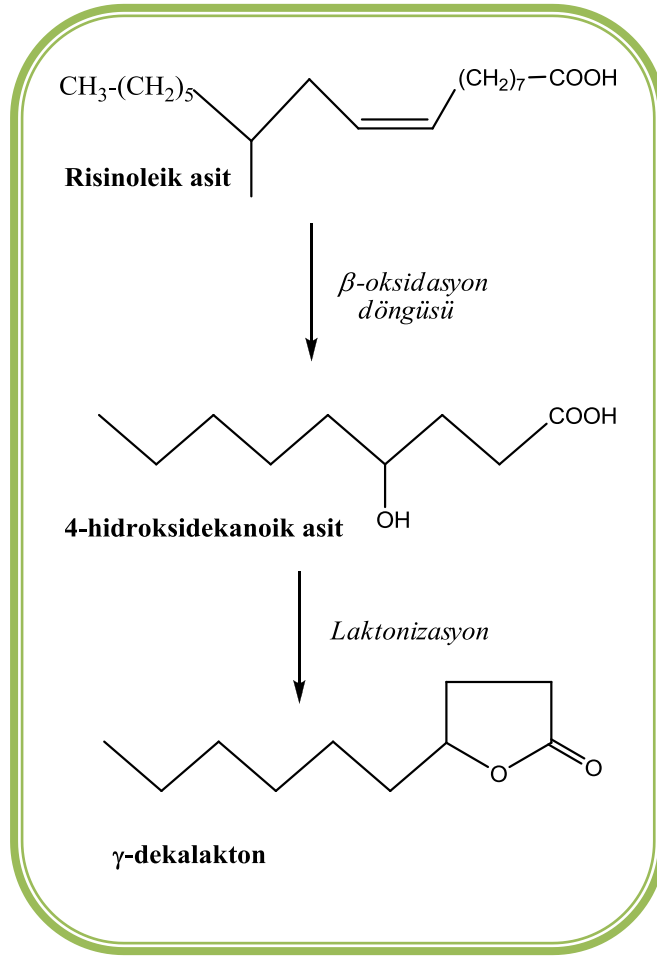
Şekil 2.6. *Pycnoporou cinnabarinu* mikroorganizması ile ferulik asitten vanilin üretimi

2-feniletanol, gül kokusu veren aroma, parfüm ve kozmetik sektöründe sıklıkla kullanılan koku ve tat maddesidir. Dünya çapında yıllık üretimi 7000 ton olan 2-feniletanol'ün bitkisel kaynağından elde edilen kilogram fiyatı 1000 \$'dır. Daha az maliyetli olan sentetik 2-feniletanol; toluen, benzen, stiren veya metil fenil asetatın petrokimyasal yollarla sentetik olarak üretilmektedir. 2-feniletanol doğal olarak 2-fenilalanin *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Hansenula anomala* gibi mikroorganizmaların biyotransformasyonu ile elde edilebilmektedir. Bu yolla 2-feniletanol 12,6 g/L miktarında üretilmiş olup, endüstriyel çapta üretimi için büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Şekil 2.7'de 2-fenilalanin'den mikrobiyal transformasyon ile 2-feniletanol üretimi gösterilmiştir (Longo and Sanroman, 2006; Schrader, et al., 2004).



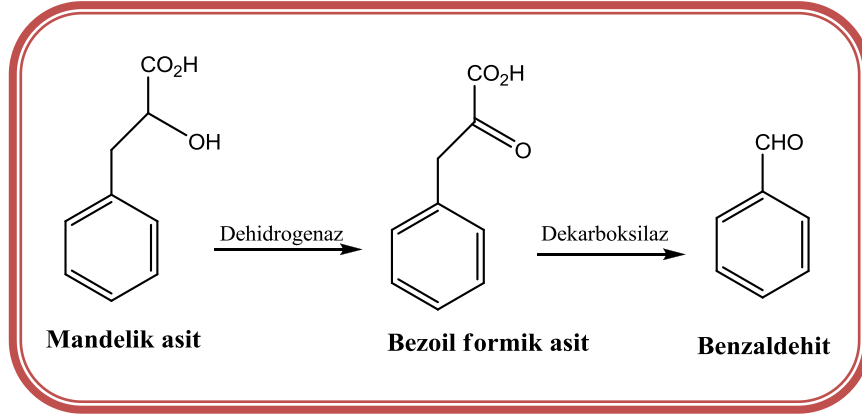
Şekil 2.7. 2-fenilalanin'den mikrobiyal transformasyon ile 2-feniletanol üretimi

Aroma endüstrisinde şeftali, kayısı ve hindistan cevizi gibi kokuları lakton molekülleri verir. Şeftali kokusu veren γ -dekalakton, endüstride mikrobiyal transformasyonla üretilen önemli bir aroma maddesidir. Uzun zincirli yağ asiti yapısında ve hint yağı bileşeni olan risinoleik asitin *Yarrowia lipolytica* mayası ile biyotransformasyonundan γ -dekalakton elde edilmektedir. Bu tepkime Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Bu yöntem ve mikroorganizma ile risinoleik asitten 75 saat içinde 9,5 g/L ve 12 g/L veriminde γ -dekalakton üretildiği rapor edilmiştir (Aguedo, et al., 2004; Wache, et al., 2003).



Şekil 2.8. *Yarrowia lipolytica* mikroorganizması ile risinoleik asitten γ -dekalakton üretimi

Bir diğ er önemli endüstriyel koku ve tat maddesi ise benzaldehitir. Benzaldehit acı badem aromasına sahiptir. Sentetik olarak fenol üretimi esnasında yan ürün olarak elde edilir. Bu yolla dünya ç apında yıllık 7000 ton miktarında üretilmektedir ve kilogram fiyatı 3 \$'dır. Doğ al benzaldehit üretimi yıllık 100 ton miktarındadır. Benzaldehit mandelik asitten *Pseudomonas putida* mikroorganizmasının biyotransformasyonu ile %85 verimle üretilmiştir. Bu dönüşüm Ş ekil 2.9'da gösterilmektedir (Berger, 2007; Simmonds and Robinson, 1997).



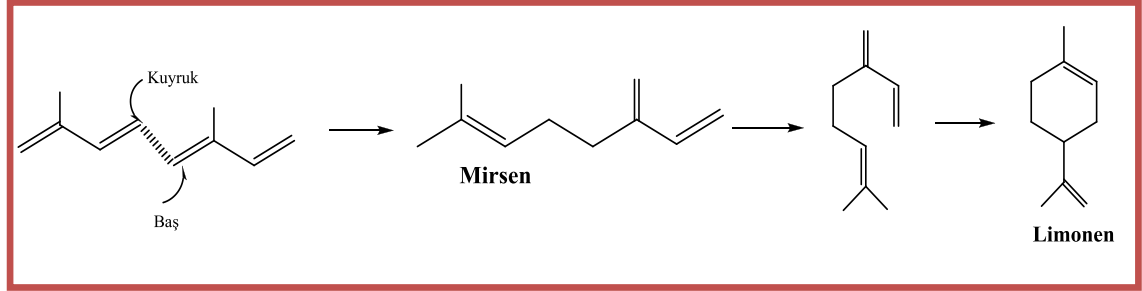
Şekil 2.9. *Pseudomonas putida* mikroorganizması ile mandelik asitten benzaldehit üretimi

2.6. Terpenler

Terpenler; koku ve tat maddelerinde içinde bulunduğu doğal bileşiklerin en geniş ailesidir. Terpen sözcüğü Yunanca “Terebentin” sözcüğünden gelmektedir. Kekula 1880 yılında C₁₀H₁₈ yapısındaki bileşiklere terpen ismini vermiştir. Terpen moleküllerinin yapılarında oksijen bulunduranlara terpenoidler denir. Bitki, mikroorganizma ve hayvanlardan izole edilen 30000’den fazla terpenoid molekülü vardır. Terpenoidler, koku ve aroma endüstrisinde kullanılan uçucu yağların önemli bileşiklerini oluştururlar (Berger, 1995).

Hemen hemen tüm terpenler ısı ile bozunduklarında izopren yapısına dönüşmektedir. Buda terpenlerin molekül yapılarının izopren yapılarından oluştuğunu göstermektedir. İlk olarak Wallach 1887 yılında varsayımsal olarak terpenoidlerin iki veya daha çok izopren yapısından oluştuğunu önermiştir. Ruzicka 1920’de izoprenin açık yapısını çizmiştir. Ingold 1925 yılında doğal terpenlerin izopren yapılarının "baştan kuyruğa" birbirine katılması sonucu oluştuğunu ileri sürmüştür. Bu önerme sabit bir kural olmamakla beraber güzel bir yol gösterici prensip olmuştur. Şekil 2.10'da izopren

birimlerinin terpenleri oluşturma mekanizması gösterilmiştir (Berger, 2007; Çarıkçı, 2005).



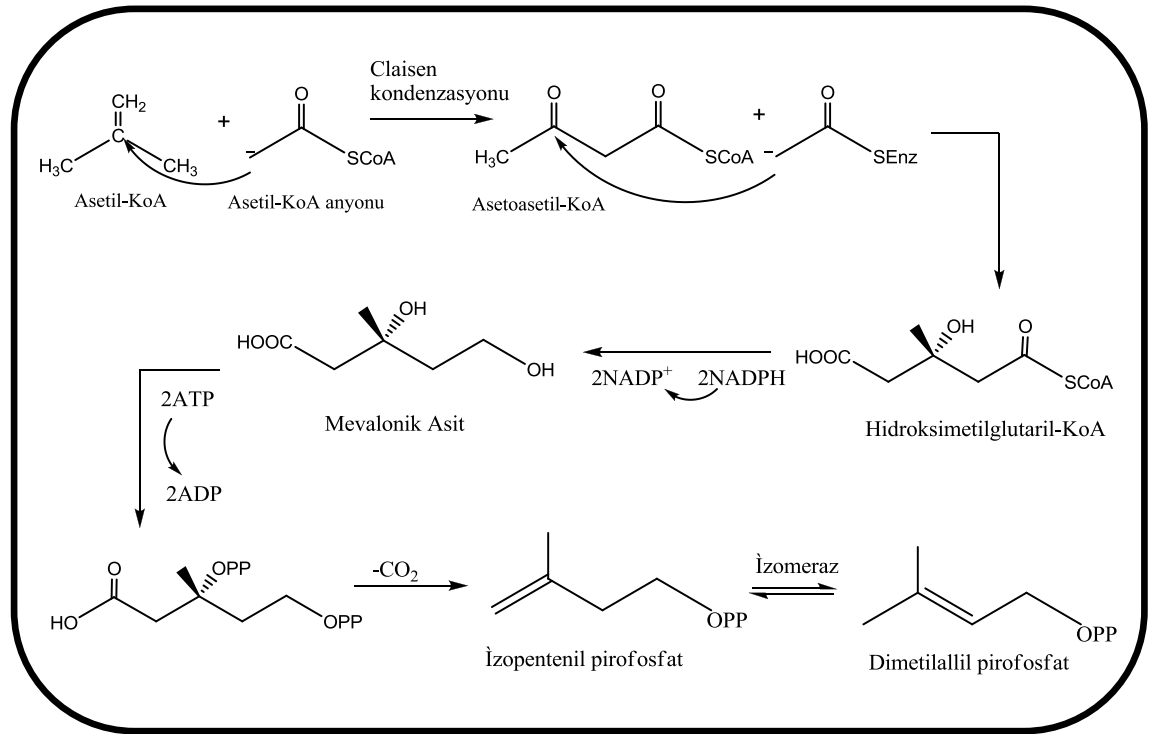
Şekil 2.10. İzoprenlerin terpenleri oluşturma mekanizması

Terpenler, içerdikleri karbon atom sayısına göre sınıflandırılırlar. Monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve sesterterpenler izopren yapılarının "baş-kuyruk" birleşmesiyle oluşmuşlardır. Fakat triterpenler ve karotenoitler, C_{15} ve C_{20} birimlerin baş-baş birleşmesi ile oluşmuştur. Çizelge 2.6'da karbon sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması verilmiştir (Karabacak, 2007).

Çizelge 2.6. Terpenlerin sınıflandırılması

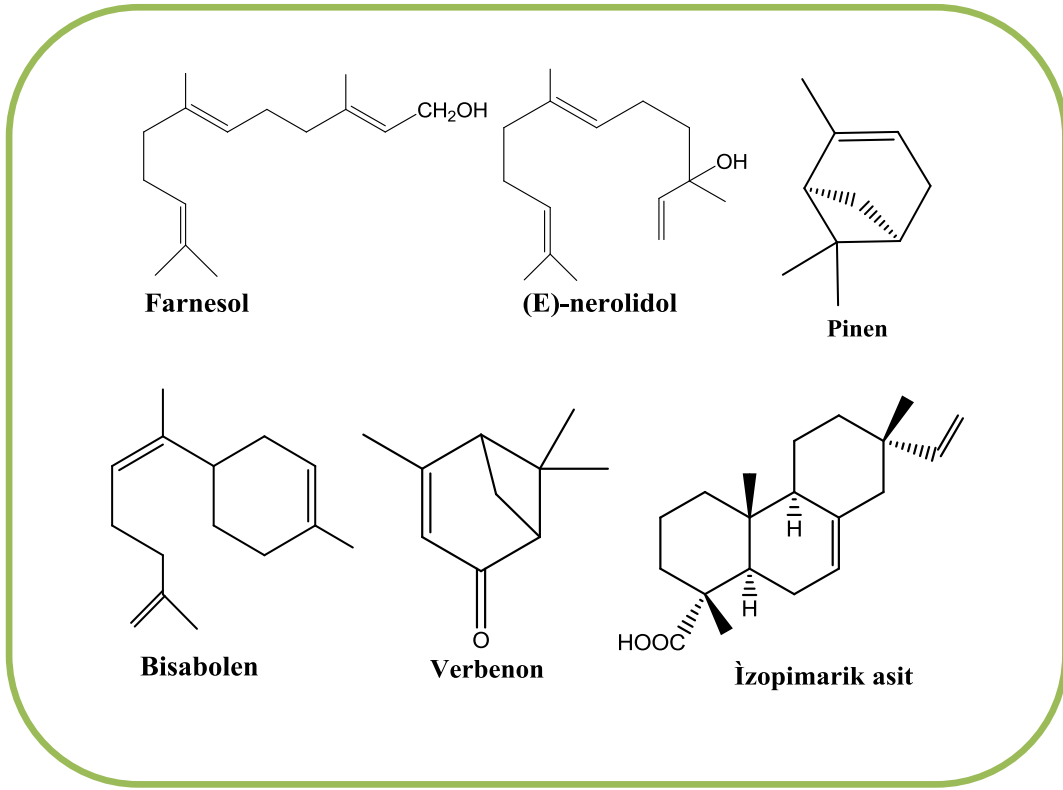
Sınıf	C atomu sayısı	İzopren ünitesi sayısı
Hemiterpen	5	1
Monoterpen	10	2
Seskiterpen	15	3
Diterpen	20	4
Sesterterpen	25	5
Triterpen	30	6
Tetraterpen	40	8
Politerpen	40'dan çok	8'den çok

1950 yılında Rubzika, Wallach'ın hipotezini geliştirerek biyogenetik izopren kuralını önermiştir. Terpenlerin biyosentezinde şeker oksidasyona uğrayarak asetil koenzim A molekülünü oluşturur. Asetil koenzim A mevalonat yolu olarak bilinen bir dizi tepkime sonucu mevalonik asidi oluşturur. Mevalonik asit, ATP (Adenozin trifosfat) ile fosfatlanarak izopentenil pirofosfata dönüşür. Son olarak izopentenil pirofosfat'ın enzim izomerasyonu ile dimetil allil izomeri oluşur. Bu izomerlerin kondenzasyonu ile terpen sınıfları oluşur (Berger, 2007). Şekil 2.11a'da izopentenil pirofosfat'ın biyosentez yolu ve Şekil 2.11b'de terpenlerin biyosentez yolu gösterilmiştir.



Şekil 2.11a. İzopentenil pirofosfat'ın biyosentez yolu

Terpenler fiziksel özelliklerine göre uçucu terpenler ve uçucu olmayan terpenler olarak ikiye ayrılır. Uçucu terpenler küçük moleküllü monoterpenler ve bazı seskiterpenlerdir. Uçucu olmayan terpenler ise büyük moleküllü seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpen ve politerpenlerdir. Terpen grubunda yer alan uçucu yağlar; parfümeride, gıda katkı maddelerinde, aroma terapide, geleneksel ve alternatif tıpta oldukça yaygın kullanılmaktadır (Finar, et al., 1975). Şekil 2.12'de bazı terpen yapılarına örnek verilmiştir.



Şekil 2.12. Bazı terpen yapıları

Terpenlerin biyotransformasyonlarında karşılaşılan bir takım sorunlar vardır. Bu dezavantajları şunlardır (Berger, 1995):

- ❖ Biyotransformasyon ürün verimlerinin düşük olması,
- ❖ Materyal ve metabolitlerin uçucu olmasıdır,
- ❖ Sudaki çözünürlüklerinin az olması,

- ❖ Materyal ve metabolitlerin kararlı olmaması.

Terpenlerin biyotransformasyon çalışmalarında bir takım sorunlar olmasına rağmen koku, aroma, gıda, kozmetik ve ilaç gibi endüstriyel alanlarda ekonomik açıdan bir potansiyel olarak görülmektedir. Terpen biyotransformasyonlarının potansiyel olarak görülmesini sağlayan avantajlar şunlardır (Berger, 1995):

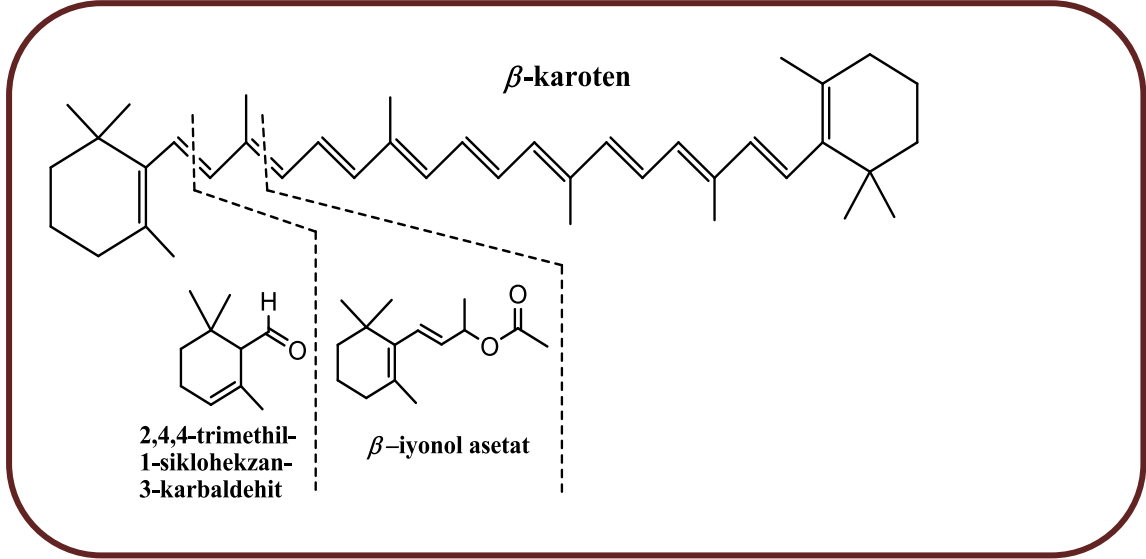
- ❖ Doğal koku ve tat maddelerinin üretilmesi
- ❖ Yeni doğal koku ve tat maddelerinin üretilmesi
- ❖ Tek adımda ürünlerin elde edilmesi
- ❖ Birçok maddeye uygulanabilir olması
- ❖ Biyokatalizörlerin belli konumlara stereospesifik katılımı sağlaması

2.7. Megastigmanlar

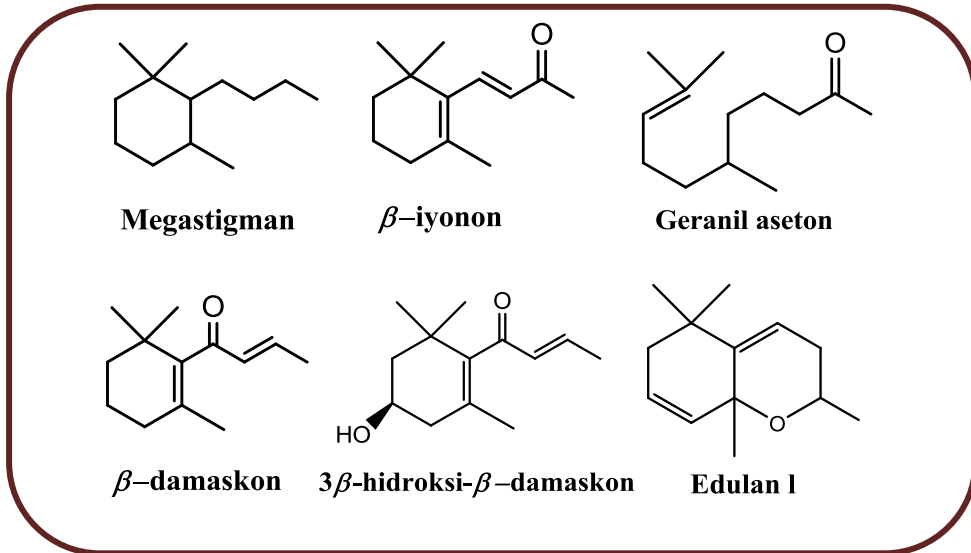
Megastigmanlar 13 karbonlu moleküllerden oluşan geniş bir sınıftır. Aynı zamanda bu yapılar nor-izoprenoitler olarak da adlandırılmaktadır. Megastigman yapısı, β -karoten ve absizik asit'in temel iskelet yapısı olan 2-bütül-1,1,3-trimetilsikloheksan'dır. Karotenoitlerin degradasyonu sonucu megastigman yapılarının oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca bu grup önemli koku ve tat maddelerini kapsamaktadır. Şekil 2.13'de β -karoten'in degradasyonu ile oluşan bazı megastigman yapıları ve Şekil 2.14'de megastigman yapıları bazı koku ve tat maddeleri gösterilmiştir (Breitmaier, 2006; Rowe, 2005).

Tez çalışmasında kullanılan β -iyonol asetat molekülünün ana iskelet yapısı 13 karbonlu olup megastigman yapılarına benzemektedir. Tetraterpen yapısı olan β -karoten'nin parçalanması ile oluşan moleküllerin biyosentezi ile β -iyonol asetat elde

edilmektedir (Bkz. Şekil 2.13). Çizelge 2.7’de β -iyonol asetat ile ilgili bilgiler verilmiştir (<http://www.bedoukian.com/products/product.asp?id=266>).

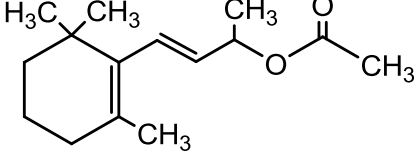


Şekil 2.13. β -karoten’in degradasyonu ile oluşan bazı megastigman yapıları



Şekil 2.14. Megastigman yapılı bazı koku ve tat maddeleri

Çizelge 2.7. β -iyonol asetat ile ilgili bilgiler

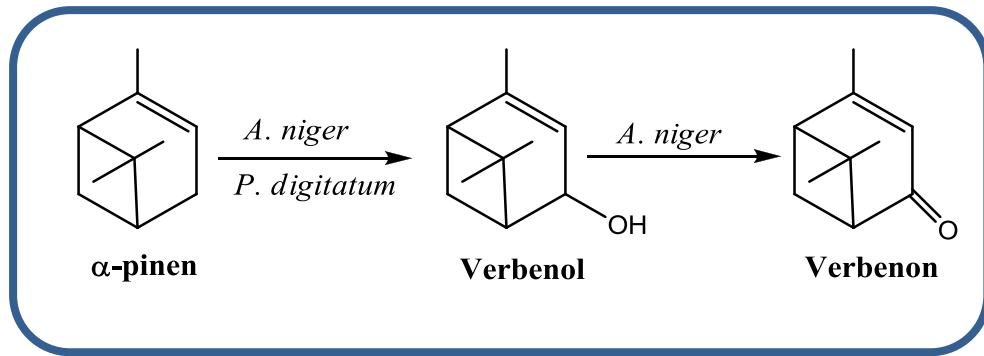
Molekül yapısı	
Adı	β -iyonol asetat
Formülü	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
IUPAC adlandırılması	3-büten-2-ol, 4-(2,6,6-trimetil-1-siklohekzen-1-il) asetat
Sinonimler	4-(2,6,6-trimetil-1-siklohekzen-1-il)-3-büten-2-il asetat; 3-büten-2-ol, 4-(2,6,6-trimetil-1-siklohekzen-1-il)-2-asetat
Molekül ağırlığı (M _A)	236,35
CAS numarası	22030–19–9
Minimum Saflığı	%92
Yoğunluğu	0.944 g/mL, 25°C
Kaynama noktası	90°C 4 mmHg
Parlama sıcaklığı	98.9°C
Kırılma indisi	n _D , 20 °C = 1,482
Çözünürlük	Suda çözünmez Alkolde çözünür
Görünüm	Soluk sarı renkli sıvı
Kategori	Koku ve tat maddeleri
Koku tanımı	Doğala yakın ahududu kokusu

(<http://www.bedoukian.com/products/product.asp?id=266>)

2.8. Mikrobiyal Transformasyon ile Üretilen Bazı Terpenler

Terpenlerle ilgili literatürde pek çok biyotransformasyon tepkimesi rapor edilmiştir. Fakat bu bölümde endüstriyel öneme sahip olan ve koku ve tat özelliği taşıyan terpen moleküllerinin mikrobiyal transformasyonlarına birkaç örnek verilecektir.

Verbenon bir monoterpen yapısı olup biberiye yağının etken maddesidir. Verbenon limonen ve α -pinen'in mikrobiyal transformasyonu ile elde edilebilir. Fakat α -pinen ile daha yüksek verim alınmaktadır. Verbenon, *Aspergillus niger* mikroorganizması kullanılarak α -pinen'den iki adımda elde edilir. Bu tepkime ile 200 mg/L α -pinen 32,8 mg/L verbenon'a dönüşür. Bu tepkimenin ilk adımında verbenol elde edilir. Verbenon üretimindeki bu tepkimenin ilk adımında *Penicillium digitatum*'da kullanılmaktadır. Şekil 2.15'de α -pinen'in mikrobiyal transformasyonu ile verbenon üretimi verilmiştir (Berger, 2007).

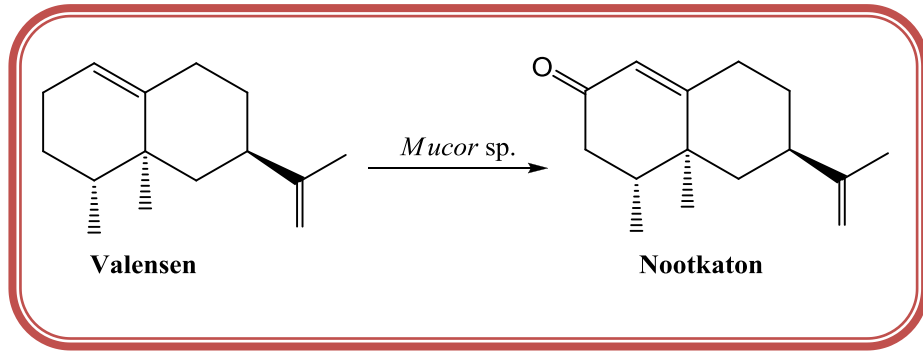


Şekil 2.15. α -pinen'in mikrobiyal transformasyonu ile verbenon üretimi

Portakal yağında seskiterpen yapılı valensen hidrokarbonu vardır. Valensen biyotransformasyon ile nootkatone dönüşmektedir. Nootkaton, greyfurt gibi acı bir narenciye tada ve çok az ekşimsi bir kokuya sahiptir. Endüstride birçok yiyecek ve içeceklerde narenciye aromasına sahip gıda aroması olarak kullanılır. Ayrıca son

zamanlarda kozmetik endüstrisi tarafından bedensel yağ oranını düşürmek için doğal nootkaton talep edilmektedir (Ohloff, 1994).

Nootkaton valensen'den *Rhodococcus* bakterisinin biyotransformasyonu ile üretilmiş ve patentlenmiştir. Ayrıca, *Mucor* türü mikroorganizmalar ile substratın %82 dönüştürülerek nootkaton elde edilmiştir. Farklı olarak *Botryosphaeria dothidea* ve *Botryodiplodia theobromae* mikroorganizmaların biyotransformasyonları ile de nootkaton üretilmiştir. Şekil 2.16'da mikrobiyal transformasyon ile valensen'den nootkatone üretimi verilmiştir (Furusawa, et al., 2005; Kaspera, et al., 2005; Okuda, et al., 1994). Verilen örnekler haricinde koku ve tat maddesi olarak kullanılan bazı terpenlerin mikrobiyal transformasyonları Çizelge 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.16. *Mucor* sp. mikroorganizması ile valencene'den nootkaton üretimi

Çizelge2.8. Koku ve tat maddesi olarak kullanılan bazı terpenlerin mikrobiyal transformasyonları

Aroma Maddesi	Substrat	Mikroorganizma	Kaynak
Perilil alkol	Limonen	<i>Pseudomonas putida</i> DSM12264, <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Berger, 2007
Karvon	Limonen	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> PWD4, <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Pleurotus sapidus</i>	Berger, 2007
Bisabolol oksit B	(-)- α -Bisabolol	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Limberger, et al., 2003
12-hidroksi-trans-nerolidol (α -sinensal eldesinde kullanılan maddedir)	Trans-nerolidol	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142, <i>Rhodococcus rubropertinctus</i> DSM 43197	Arfmann, et al., 1988; Hrdlicka, et al., 2004
10-hidroksi paçulol (norpaçulenol eldesinde kullanılan maddedir)	Paçulol	<i>Pithomyces species</i>	Suhara, et al., 1981
Sclareolide (Ambrox eldesinde kullanılan maddedir)	Sclareol	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 20918	Farbood, et al., 1990
3 α -hidroksikadina-4,10(15)-dien; 4S- 3 α -hidroksikadin-10(15)-en; 12- hidroksikadin-4,10(15)-dien-3-on	Kadina-4,10(15)-dien-3-on	<i>Curvularia lunata</i> ATCC 12017	Dwight and Paul, 2002
1,11,13-trihidroksi- β -selinen	β -Selenen	<i>Glomerella cingulata</i>	Mitsuo, et al., 1996

BÖLÜM 3: MATERYAL, METOD VE DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Genel Deneyisel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besi yeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin aktive edilmesi 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), kromatografi esnasında gerçekleştirilen İTK çalışmaları içinse 0,25 mm kalınlığında silika jel plakaları (Merck silika jel GF254) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak etil asetat ve *n*-hekzan (1:1) karışımı tercih edildi. Kolon kromatografisinden elde edilen spotlar, H₂SO₄ (8 mL), anisaldehit (0,5 mL), metanol (85 mL) ve asetik asitten (10 mL) oluşan reaktif çözeltisiyle renklendirildikten sonra ısıtılarak belirgin hale getirildi.

3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Mikroorganizmalar

β -iyonol asetat, proje ortağı olan firma tarafından temin edilmiştir. Biyotransformasyon deneyleri esnasında kullanılan mikroorganizmaları stok kültürden aktarmak ve geliştirmek için gerekli besiyeri bileşenleri, biyotransformasyon aşamasını sonlandırmak için gerekli diğer kimyasal maddeler, ekstraksiyon işlemleri sırasında kullanılan çözücüler, saflaştırma işlemleri için kromatografik yöntemlerde kullanılan diğer kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

• <i>n</i> -Hekzan	• Etil asetat (EtOAC)	• D-glukoz
• Aseton	• Etanol (EtOH)	• Pepton
• Susuz sodyum sülfat (Na ₂ SO ₄)	• Sodyum hidroksit (NaOH)	• Metanol (MeOH)
• Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	• Petrol eteri	• Hidroklorik asit (HCl)
• Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	• Agar agar	• Asetik asit
• Maya ekstresi	• Anisaldehit	• Patates dekstroza agar
• Sodyum klorür (NaCl)	• Dötero kloroform (CDCl ₃)	• Dimetil sülfoksit (DMSO)

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan cihazlar şunlardır:

- Ultra Viyole Lambası (254–366 nm), [Camag]
- Otoklav [Systec VE 65]
- İnkübatör [Gerhardt THO 500 Laboshake]
- Steril Kabin [Herasafe]

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

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 ve çoğaltılması

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

3.3.2.1. Yatık besisi yeri

Patates dekstroza agar	7,8 g
Agar Agar	8,0 g

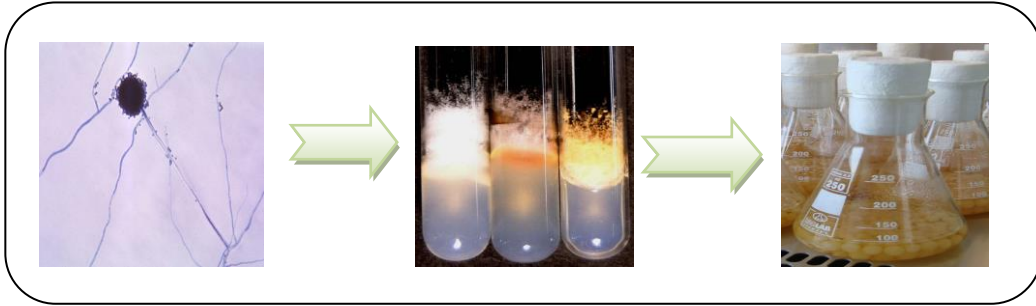
Karışımı distile su ile 200 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besisi yeri hazırlandı. Hazırlanan besisi yeri soğumadan 19 adet patolojik şişelere, şişe başı ortama 8 mL ilave edildi, otoklavda 1,5–2 atmosfer basıncında, 121°C'de 20 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra şişeler içerisindeki erimiş haldeki besisi yerleri donmadan önce 45°'ye yakın eğim oluşturacak şekilde steril kabinin içerisinde ve UV ışığı altında 24 saat boyunca soğumaya bırakılmak suretiyle hazırlandı. Bu besisi yeri biyotransformasyon tepkimelerinde kullanılan mikroorganizmaların stoklanmasında ve sıvı besisi yerine ilave edilmeden önce aktifleşmesini sağlamak için kullanıldı (Özşen, 2011).

3.3.2.2. Sıvı besisi 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

Besi yeri bileşenleri, distile suda çözülerek 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL besi yeri olacak şekilde ilave edildi. Erlenlerin ağızları alüminyum folyo ile kaplı pamukla kapatıldı. Otoklavda 1,5–2 atmosfer basıncında, 121°C'de 20 dakika süre ile steril edildi. Bu besi yeri biyotransformasyon tepkimeleri için kullanıldı (Özşen, 2011).

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. Yeterli miktarda büyümesi sağlanan mikroorganizmalar, büyük ölçekte diğer erlenlere eşit miktarlarda olacak şekilde, steril koşullarda aktarıldı. Sıvı besi yerlerine ekimi yapılan bu kültürler yine çalkalamalı inkübatör üzerinde 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Ön deneme çalışmalarında substrat ilavesi 3 günlük pre-inkübasyon sürecinden hemen sonra yapıldı. Aşamalar Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Mikroorganizmaların hazırlığı ve pre-inkübasyon aşaması

3.3.3. Substrat hazırlanması ve ilavesi

Her substrat (0,5 mL veya 500 mg) 40 mL aseton içerisinde çözüldükten sonra, daha önceki bölümde belirtildiği gibi çoğaltılan küf içerisinde inkübasyonun üçüncü gününde her erlene eşit hacimde ilave edildi. İnkübasyon oda sıcaklığında çalışan dairesel çalkalayıcı üzerinde 8 gün boyunca sürdürüldü. Bu sürenin sonunda

biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve metabolit oluşumunun maksimum düzeye olduğu ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edildi. Erlenler üzerine etil asetat ilavesi ile biyotransformasyon sona erdirildi. Daha sonra ekstraksiyon ve izolasyon aşamalarına geçildi. Bu aşamalar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



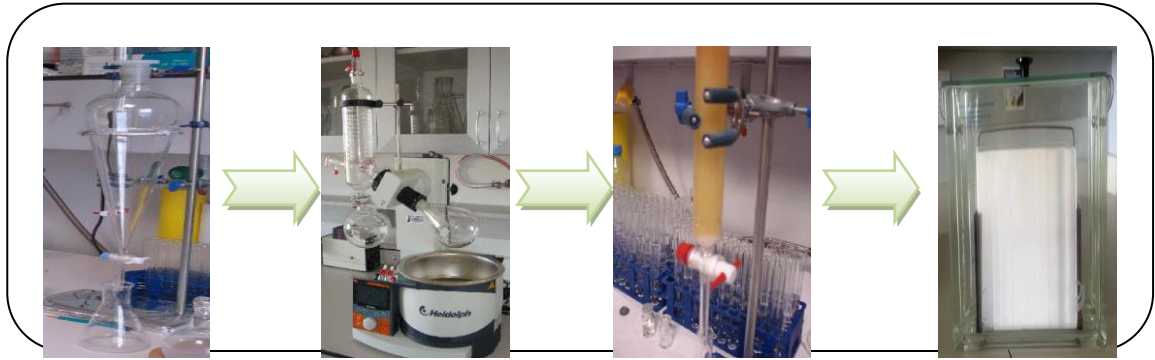
Şekil 3.2. Substrat ilavesi, inkübasyon ve filtrasyon aşamaları

3.3.4. Metabolitlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak metabolit oluşumu izlendi. Ön denemeler için; deney tüpüne steril uçlu pipetör ile biyotransformasyon besi ortamından 3 mL alındı ve 3–5 mL etil asetat 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 İTK ile kontrol edildi.

Büyük ölçekli çalışmalarda ise; biyotransformasyon işlemini durdurmak ve ekstraksiyonu başlatmak amacıyla besi yerlerine 1/1 oranında etil asetat ilave edildi. Besi yeri iyice çalkalandıktan sonra, Buchner hunisinden nuche erlenine vakum altında süzülerek, mikrobiyal misellerden kurtarılan ve birleştirilen sıvı kısımlar, ayırma hunisinde hacimlerinin yaklaşık 2 katı etil asetat ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan

ekstreler, susuz Na_2SO_4 'ta kurutulduktan sonra evaporasyon ile yoğunlaşmaya bırakıldı. Elde edilen karışım, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolonda çözücü sistemi olarak petrol eteri - etil asetat ve ya *n*-hekzan - etil asetat kullanıldı (artan gradient sistemi: %10 etil asetat ve *n*-hekzan karışımı ile başlayarak, %100 etil asetat ile sonlandırılır). Kolondan ayrılan fraksiyonlar İTK ile izlendi. Bu aşamalar Şekil 3.3'de gösterilmiştir



Şekil 3.3. Ekstraksiyon, çözücünün buharlaştırılması ve saflaştırma aşamaları

3.3.5. Metabolitlerin tanımlanması

Kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılan metabolitlerin yapıları, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, APT ve GK/KS gibi spektroskopik metotlar kullanılarak aydınlatıldı.

✓ *Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)*

^1H NMR (400 Mhz) ve ^{13}C NMR (100 Mhz) spektrumları, Varian Mercury 400 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, MassFinder 3.1 Kütüphane tarama yazılımları kullanılmıştır.

BÖLÜM 4 : SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

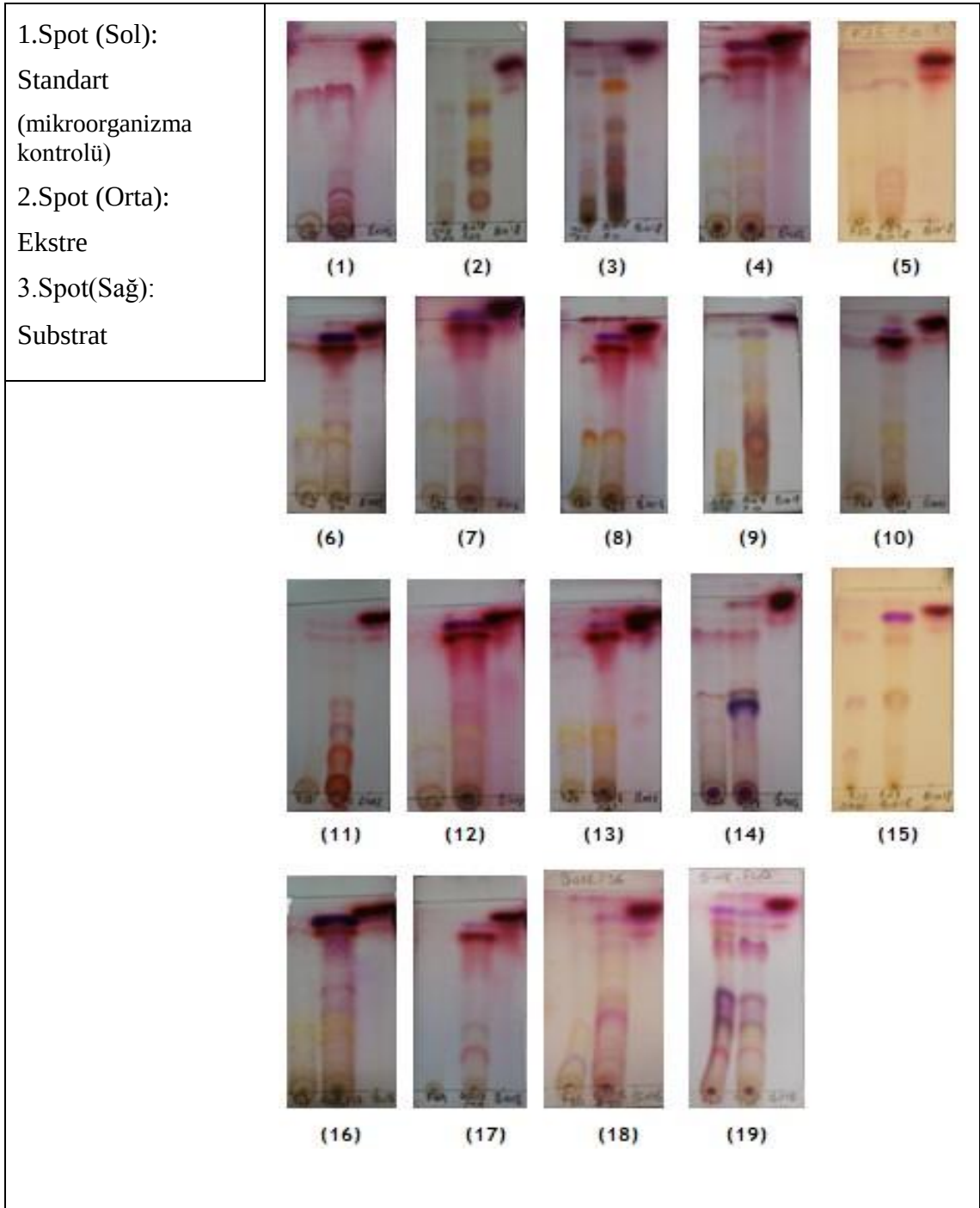
4.1. Ön Deneme Sonuçları

β -iyonol asetat'ın 19 farklı mikroorganizmayla ön denemeleri yapıldı. Ön deneme sonucu elde edilen ekstrelerin silika jel plakalarında ince tabaka kromatografisi (İTK) yapıldı. Silika jel plakaları; 1/1 oranında etil asetat ve *n*-hekzan karışımında yürütüldü. Metabolitlerin spotları H₂SO₄ (8 mL), anisaldehit (0,5 mL), metanol (85 mL) ve asetik asitten (10 mL) oluşan reaktif karışımın plakalar üzerine püskürtülmesi ve 98°C'de ısıtılması sonucu belirgin hale getirildi. Ayrıca ön deneme ekstrelerinin GK/KS analizleri yapıldı. Şekil 4.1'de mikroorganizmaların isimleri, Şekil 4.2'de ön denemelerin İTK sonuçları ve Şekil 4.3'de ekstrelerin GK/KS kromatogram sonuçları verilmiştir.

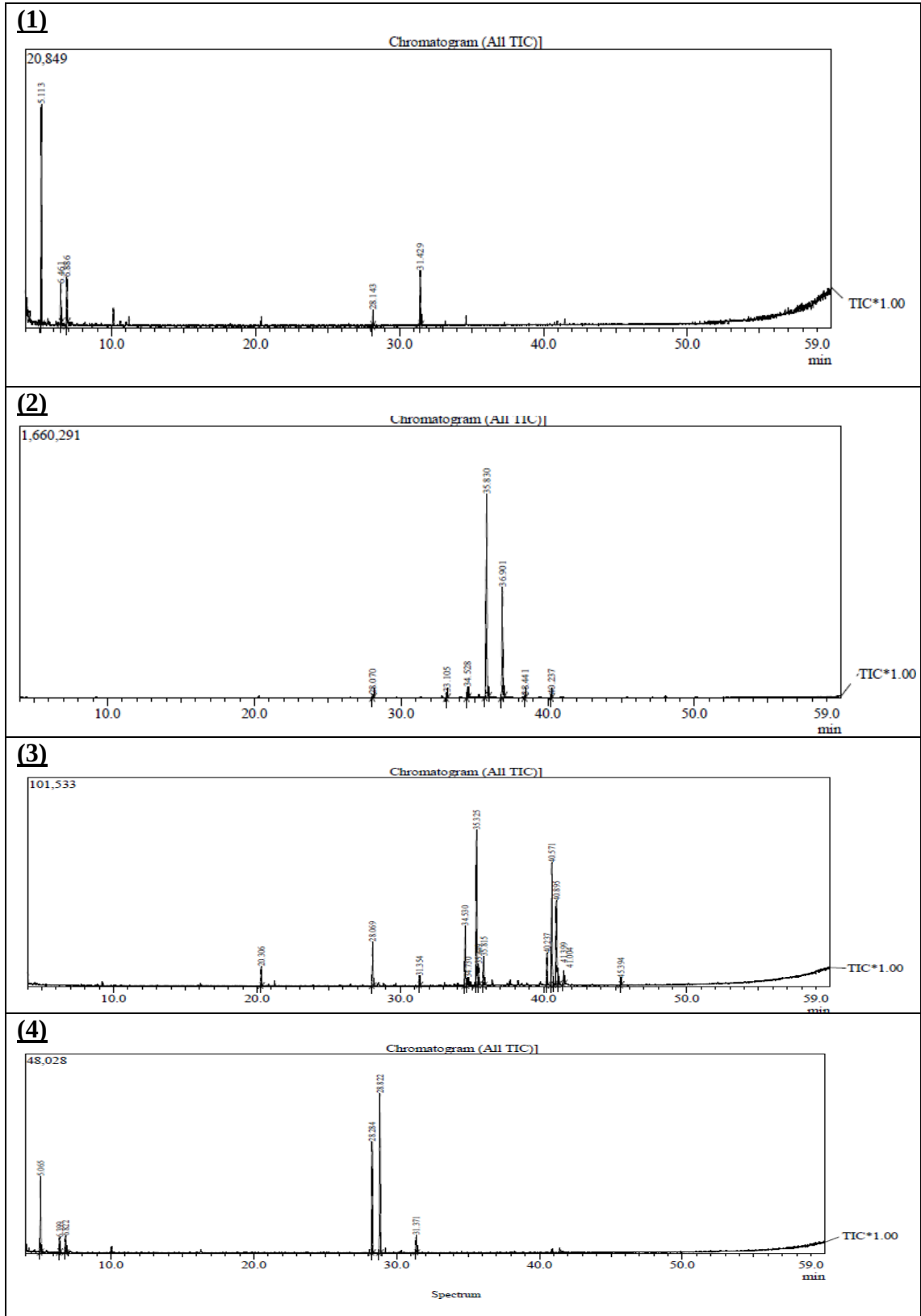
β -iyonol asetat'ın;

- (1) *Corynespora cassicola* DSM 62475 ile biyotransformasyonu.
- (2) *Fusarium culmorum* ile biyotransformasyonu.
- (3) *Aspergillus niger* ATCC 10549 ile biyotransformasyonu.
- (4) *Sporobolomyces pararoseus* ATCC 11385 ile biyotransformasyonu.
- (5) *Alternaria alternata* NRRL 20593 ile biyotransformasyonu.
- (6) *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 ile biyotransformasyonu.
- (7) *Hansenula anomala* ATCC 20170 ile biyotransformasyonu.
- (8) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ile biyotransformasyonu.
- (9) *Aspergillus niger* NRRL 326 ile biyotransformasyonu.
- (10) *Trametes versicolor* ATCC 200801 ile biyotransformasyonu.
- (11) *Aspergillus alliaceus* NRLL 317 ile biyotransformasyonu.
- (12) *Penicillium adametzii* NRLL 737 ile biyotransformasyonu.
- (13) *Penicillium chrysogenum* NRLL 792 ile biyotransformasyonu.
- (14) *Fusarium solani* ATCC 1284 ile biyotransformasyonu.
- (15) *Fusarium moniliforme* NRLL 2374 ile biyotransformasyonu.
- (16) *Penicillium claviforme* MR 376 ile biyotransformasyonu.
- (17) *Phanerachaete chrysosporium* ile biyotransformasyonu.
- (18) *Mucor ramannianus* ATCC 1839 ile biyotransformasyonu.
- (19) *Neurospora crassa* ile biyotransformasyonu.

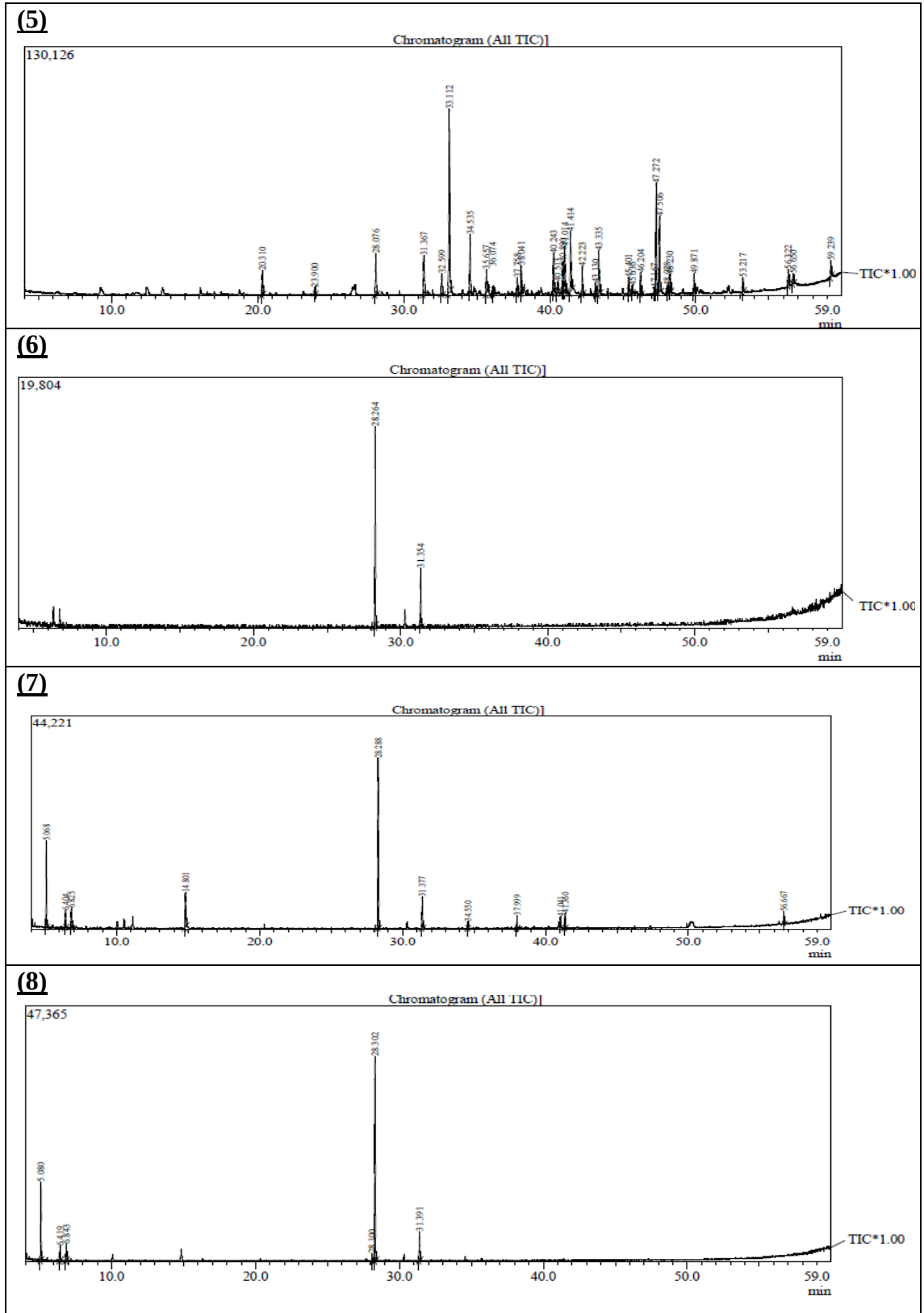
Şekil 4.1. β -iyonol asetatın biyotransformasyonunda kullanılan mikroorganizmalar



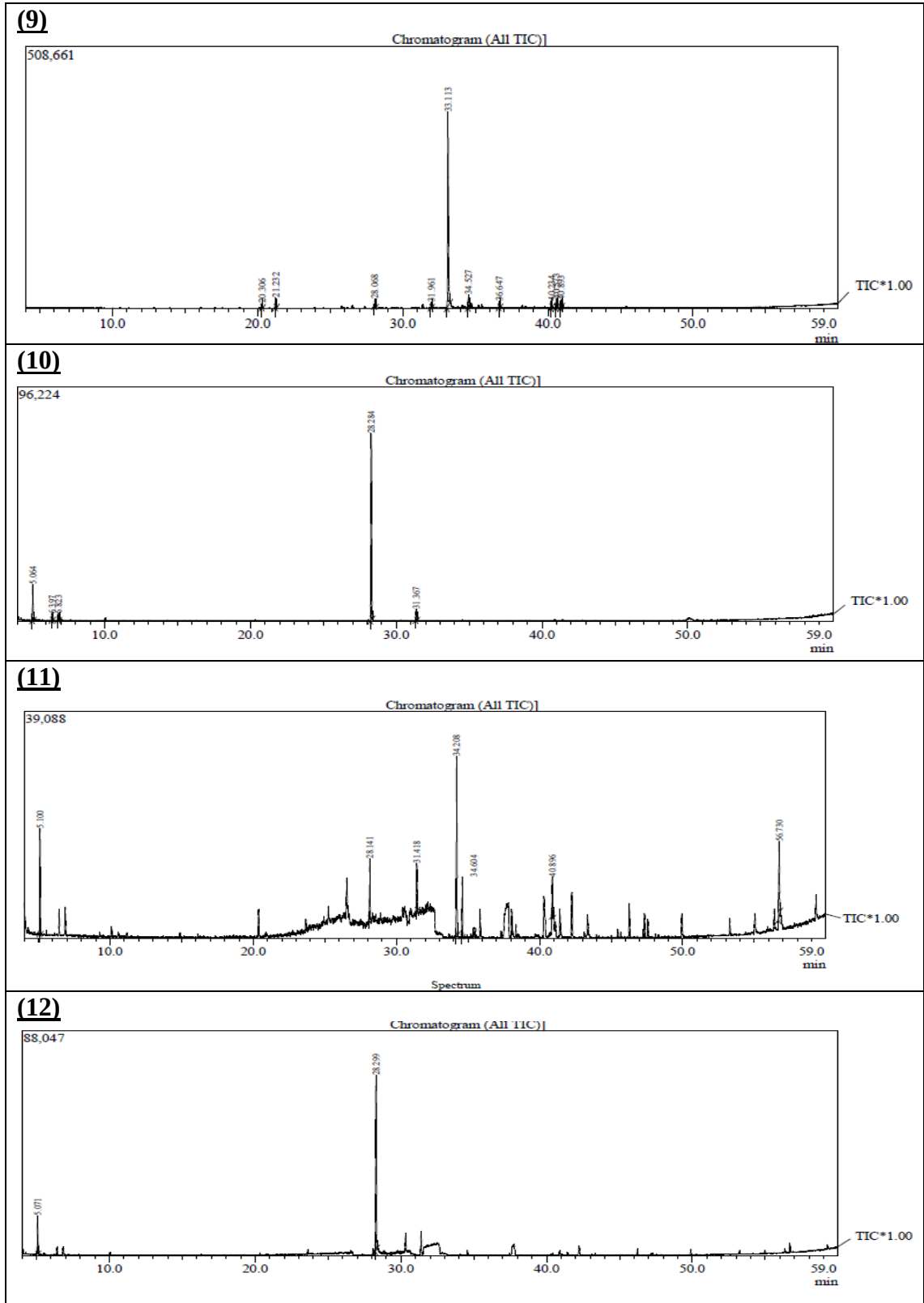
Şekil 4.2. Ön deneme ekstralarının İTK sonuçları



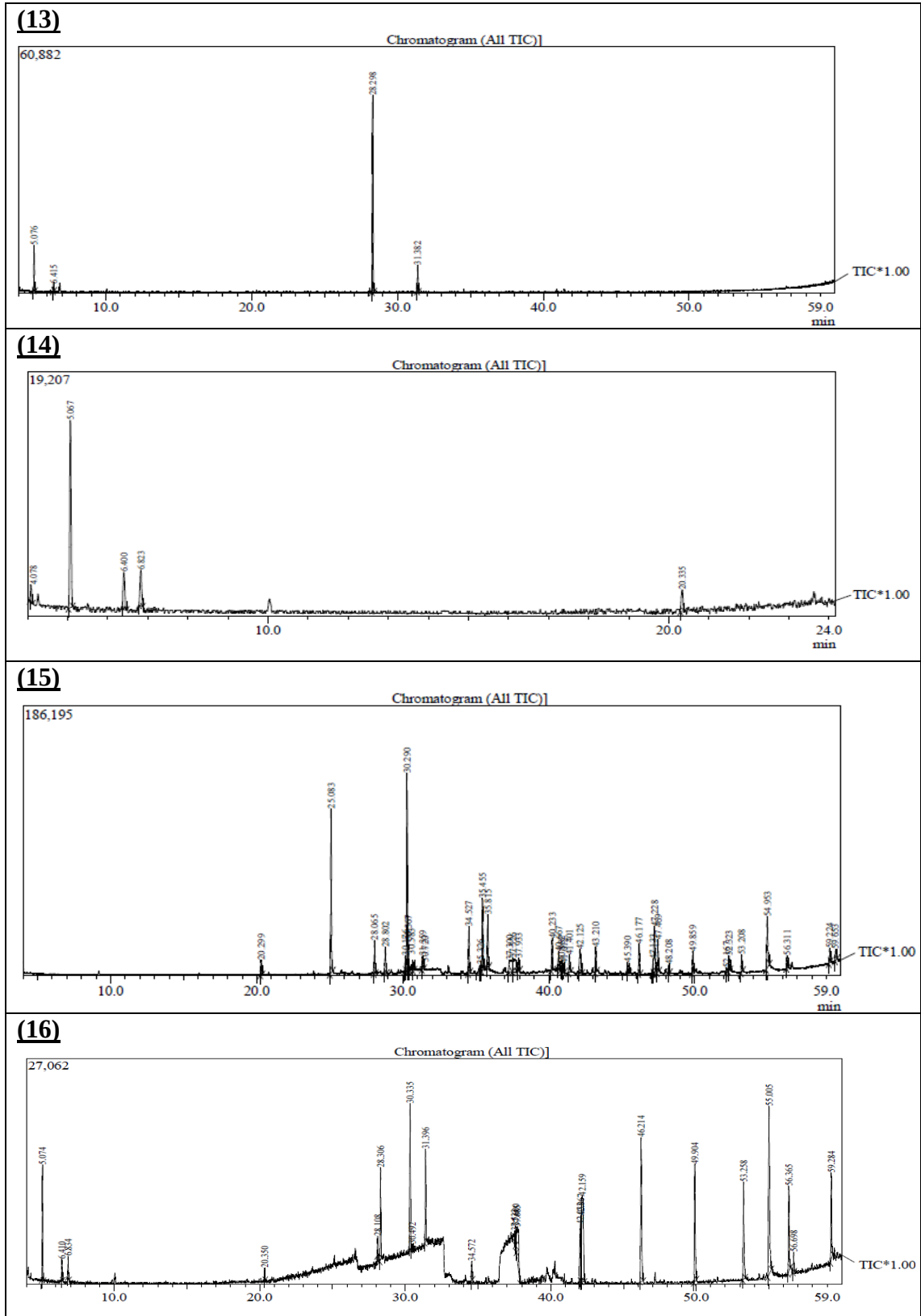
Şekil 4.3. Ön deneme ekstralarının GK/KS kromatogramları



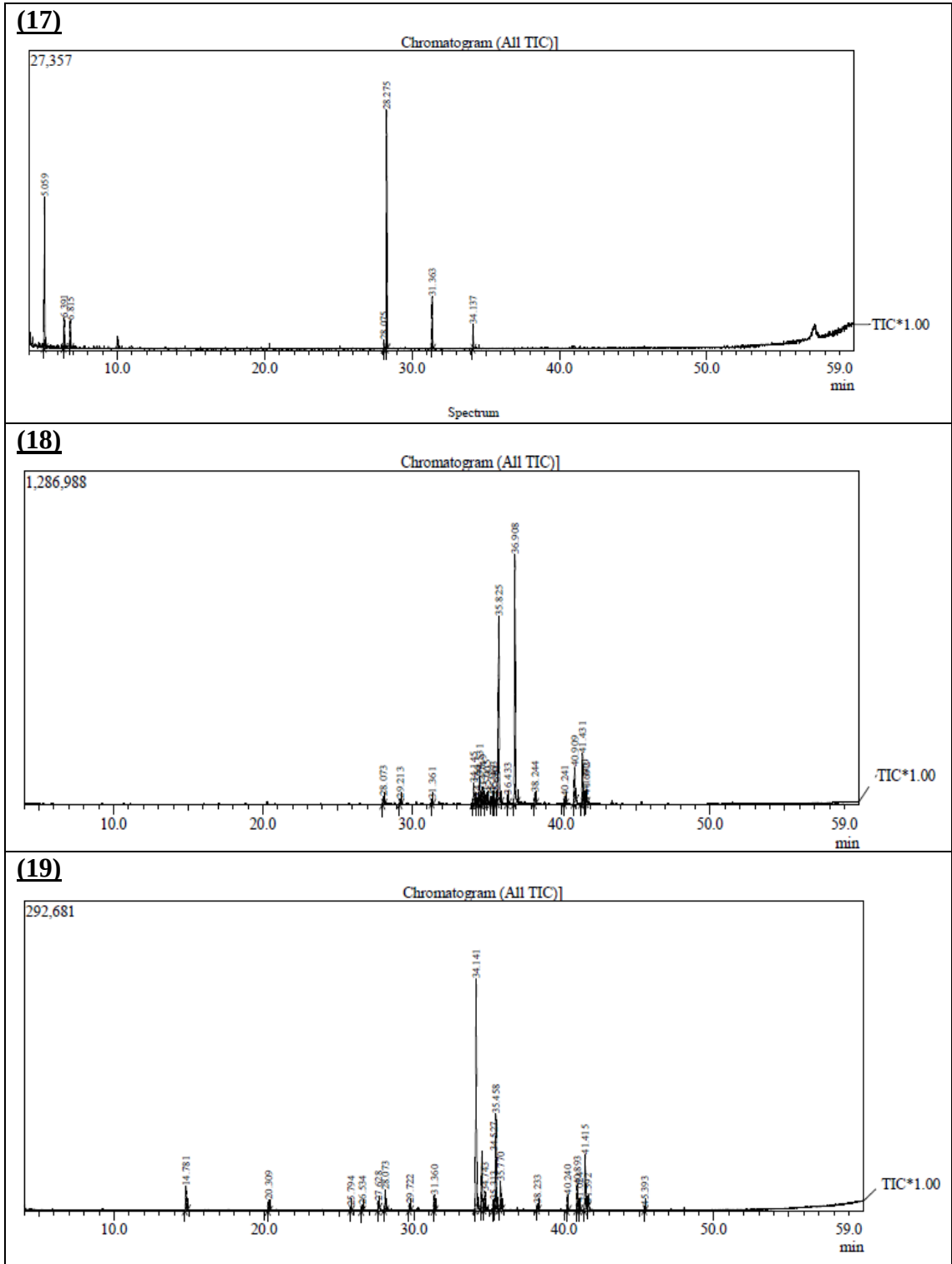
Şekil 4.3. Ön deneme ekstralarının GK/KS kromatogramları (devam)



Şekil 4.3. Ön deneme ekstralarının GK/KS kromatogramları (devam)



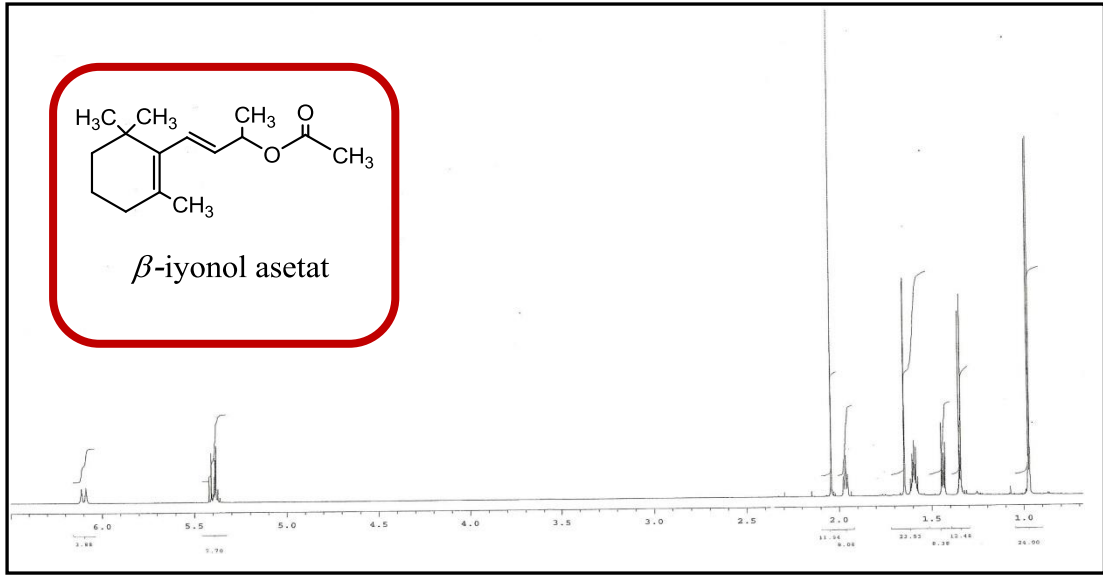
Şekil 4.3. Ön deneme ekstralarının GK/KS kromatogramları (devam)



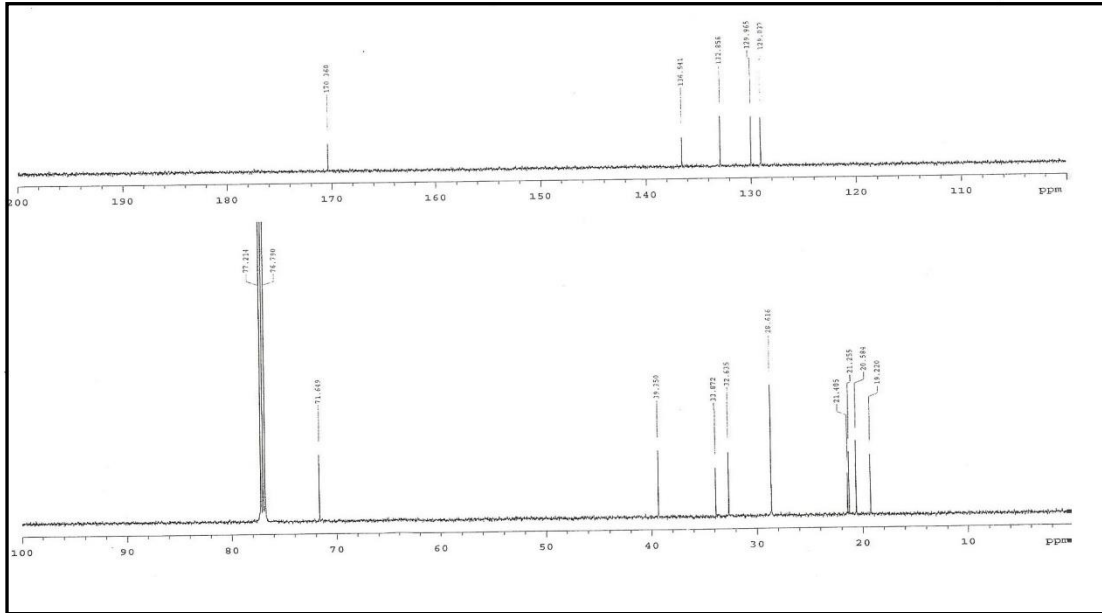
Şekil 4.3. Ön deneme ekstralarının GK/KS kromatogramları (devam)

4.2. β -iyonol Asetat'ın NMR Spektrumları

β -iyonol asetat'ın ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları Şekil 4.4a ve Şekil 4.4b'de verilmiştir.



Şekil 4.4a. β -iyonol asetat'ın ^1H NMR spektrumu

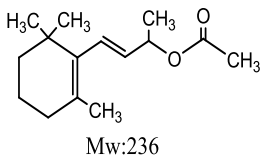
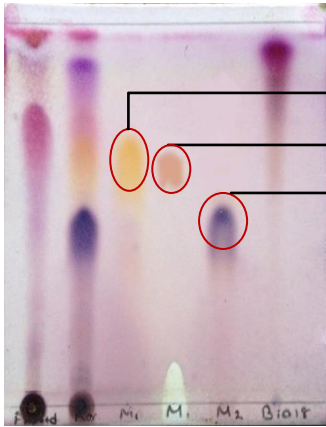


Şekil 4.4b. β -iyonol asetat'ın ^{13}C NMRspektrumu

4.3. β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ile Preparatif Ölçekte Biyotransformasyonu

Ön denemeler sonucu koku ve tat özelliği gösterdiği belirlenen β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ATCC 1284 ile biyodönüşüm sonucu oluşan ekstredeki metabolitlerin belirlenmesi amacıyla, ilgili biyotransformasyon deneyi preparatif ölçekte tekrarlanmıştır. Elde edilen karışımın İTK'sı yapılmış ve daha sonra kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Yapılan kolon İTK sonuçlarında görüldüğü üzere üç farklı metabolit saf olarak elde edilmiş ve NMR sonuçları ile yapıları aydınlatılmıştır. Bu metabolitler sırası ile kolonda %12'lik, %20'lik ve %23'lük etil asetat ve *n*-hekzan çözeltisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Birinci metabolit (M_1) 26 mg miktarında ve %3,3 verimle, ikinci metabolit (M_2) 28 mg miktarında ve %4,5 verimle ve üçüncü metabolit (M_3) 65 mg miktarında ve %10,5 verimle elde edilmiştir. Çizelge 4.1'de bu çalışmada elde edilen veriler sunulmuştur ve Şekil 4.6'da β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ile biyotransformasyon tepkimesi verilmiştir.

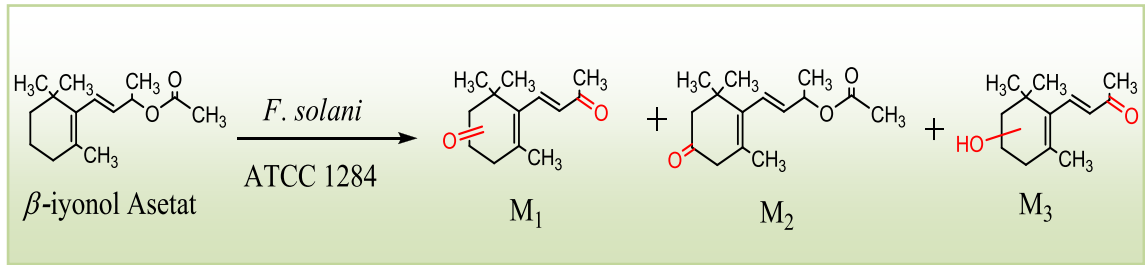
Çizelge 4.1. β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ile biyotransformasyonu sonucu elde edilen İTK ve metabolit verileri

Substrat	Mikroorganizma	Elde edilen metabolitlerin İTK sonucu
β-iyonol asetat  Mw:236	<i>F. solani</i> ATCC 1284	 Miktar / Verim M_1: 26mg, %3,3 M_2: 28mg, %4,5 M_3: 65mg, %10,5 1.spot: Standart 2. spot: Ekstre Bio18:β-iyonol asetat

00530.STZ.2010-1 nolu sentez projesinin sonuç raporunda β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ATCC 1284 mikroorganizmasıyla gerçekleşen biyotransformasyon tepkimesi sonucu M₃ metabolitinin yapısı Şekil 4.5'de gösterildiği gibi belirlenmiştir. Fakat eksik NMR analizleri sonuç raporu teslim edildikten sonra elimize ulaşmış ve tekrar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda M₃ metabolitinin yapısının Şekil 4.6' da gösterildiği gibi olduğu kanaatine varılmıştır.

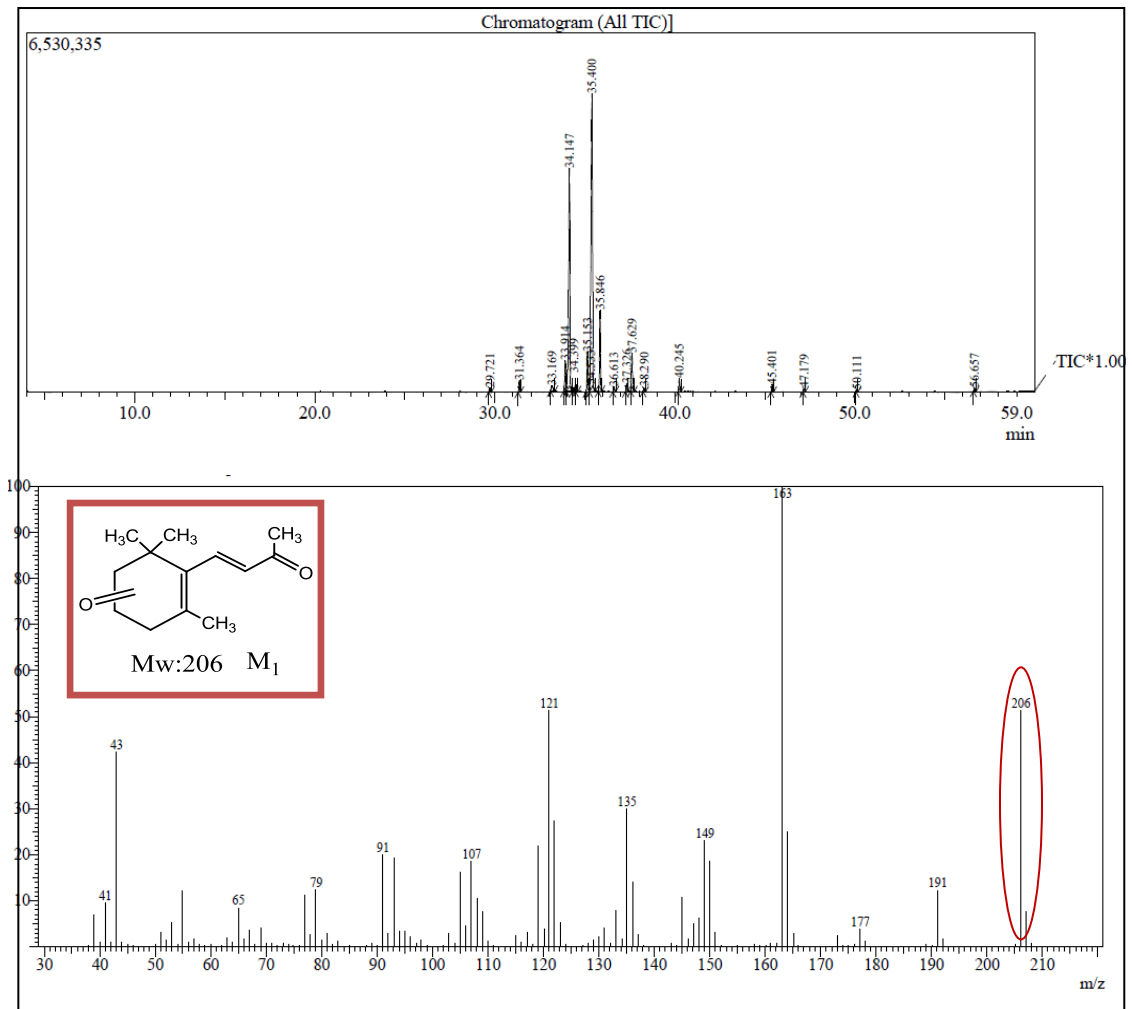


Şekil 4.5. Sentez sonuç raporunda verilen M₃ metabolitinin yapısı

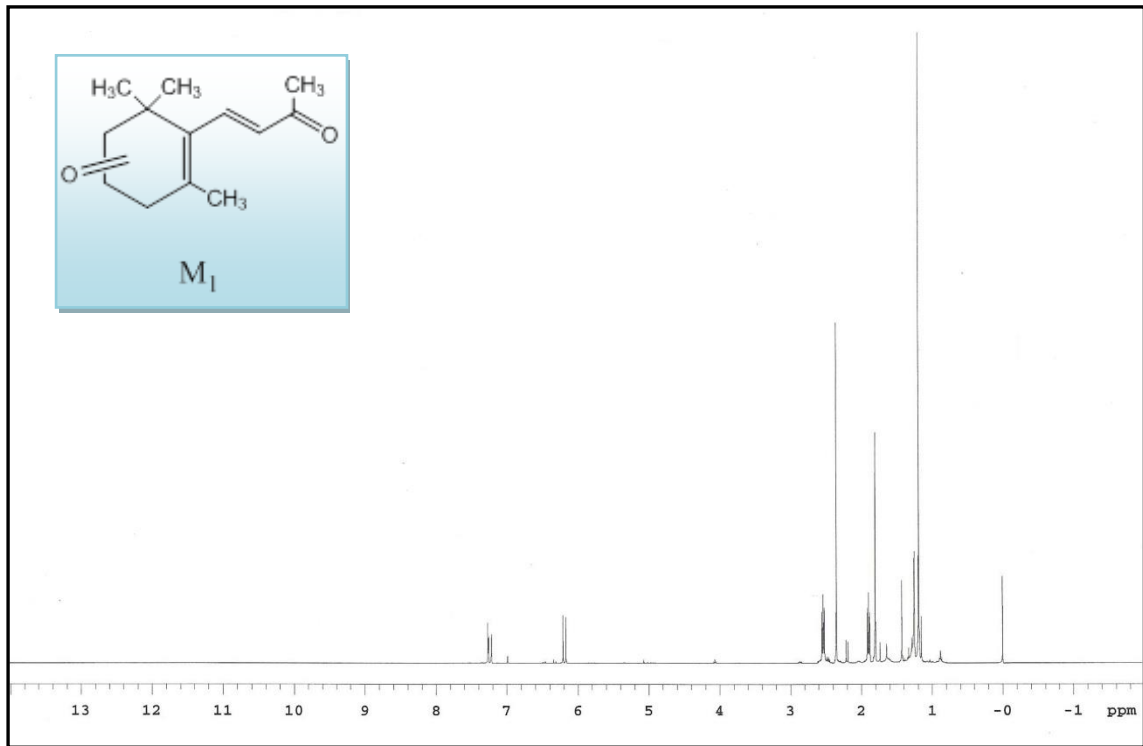


Şekil 4.6. β -iyonol asetat'ın *Fusarium solani* ile biyotransformasyonu

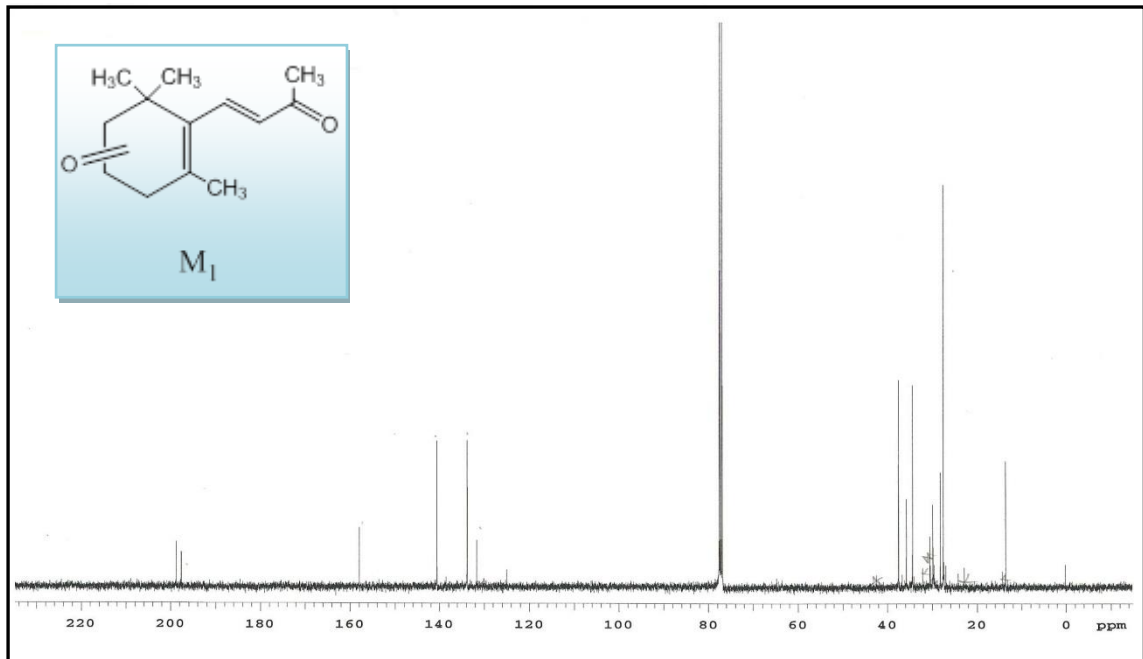
Elde edilen birinci metabolit (M_1) yapısı GK/KS, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve DEPT analizleri ile aydınlatılmıştır. Bu analiz spektrumları incelendiğinde β -iyonol asetat'ın halkalı yapısına bir keton grubunun ilave edildiği ve yan zincirdeki asetat grubunun hidrolizi sonucu oluşan alkol grubunun keton yapısına dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Fakat 2D NMR bilgileri istenilen yeterlilikte olmadığından dolayı keton yapısının halkalı yapıda hangi karbona bağlandığı tespit edilememiştir. Metabolite ait GK/KS, ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları Şekil 4.7a, Şekil 4.7b ve Şekil 4.7c'de verilmiştir.



Şekil 4.7a. M_1 metabolitinin kromatogram ve kütle spektrumları

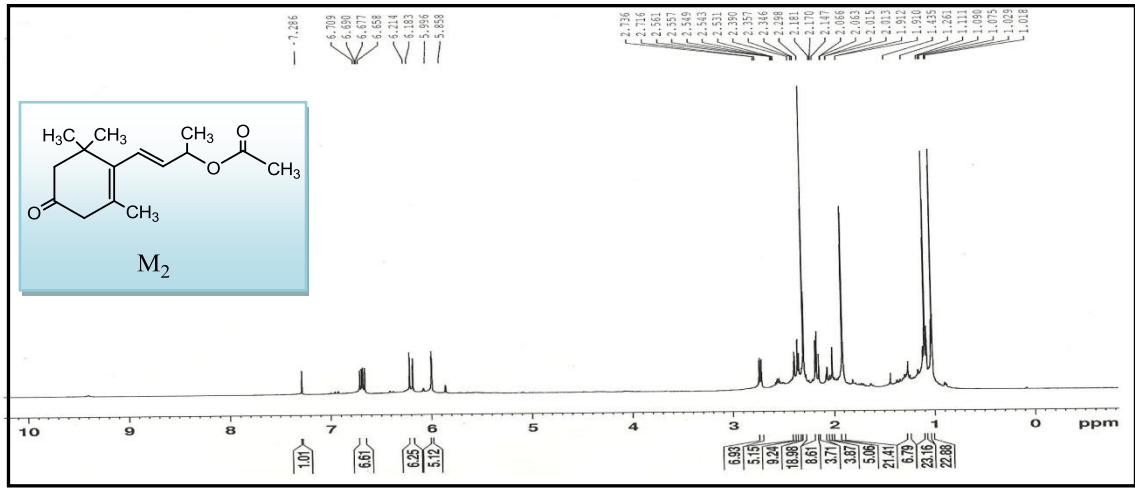


Şekil 4.7b. M_1 metabolitinin ^1H NMR spektrumu

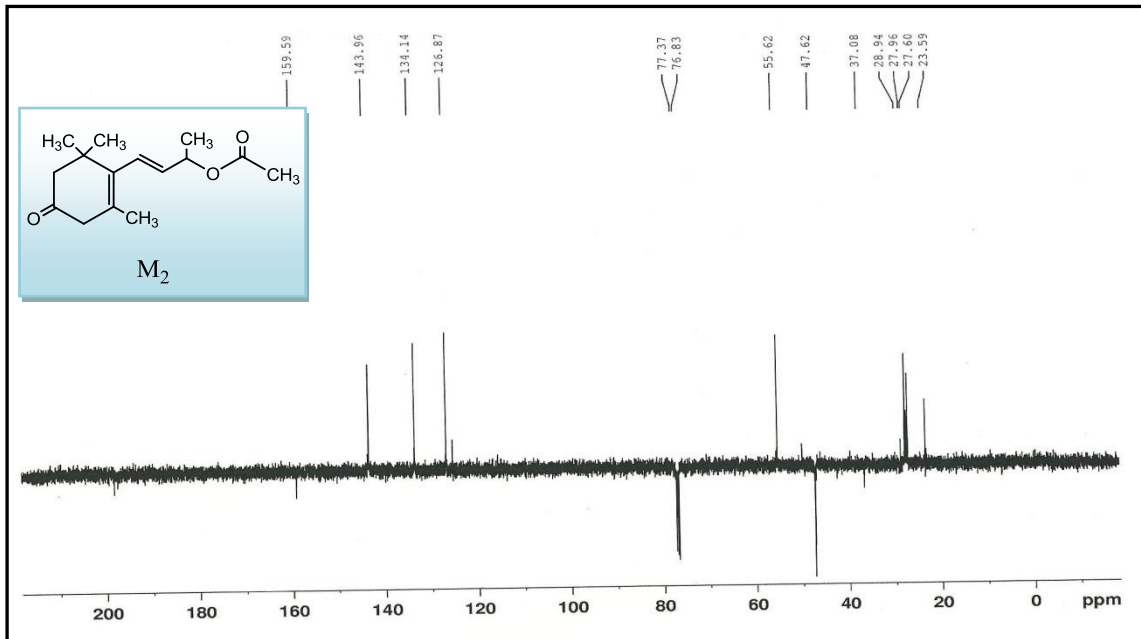


Şekil 4.7c. M_1 metabolitinin ^{13}C NMR spektrumu

Elde edilen ikinci metabolit (M_2) yapısı ^1H NMR, ve APT analizleri ile aydınlatılmıştır. Bu analiz spektrumları incelendiğinde, yapıya keton ilavesi ile β -iyonol asetat'ın keton içeren türevine dönüştüğü kanaatine varılmıştır (Şekil 4.6). Metabolite ait ^1H NMR ve APT spektrumları Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b'de verilmiştir. Tahmini yapı aşağıda sunulmuştur.

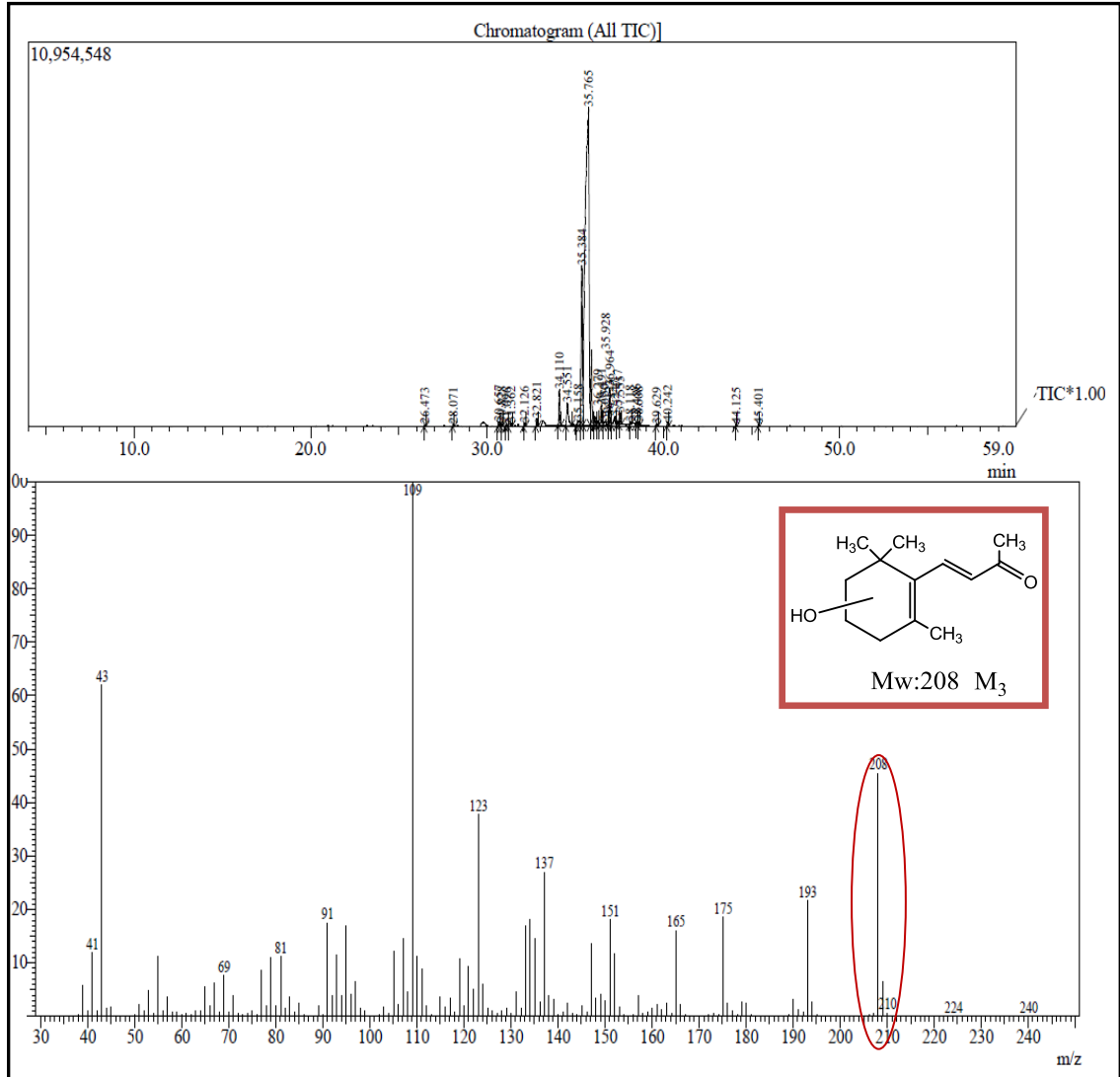


Şekil 4.8a. M_2 metabolitinin ^1H NMR spektrumu

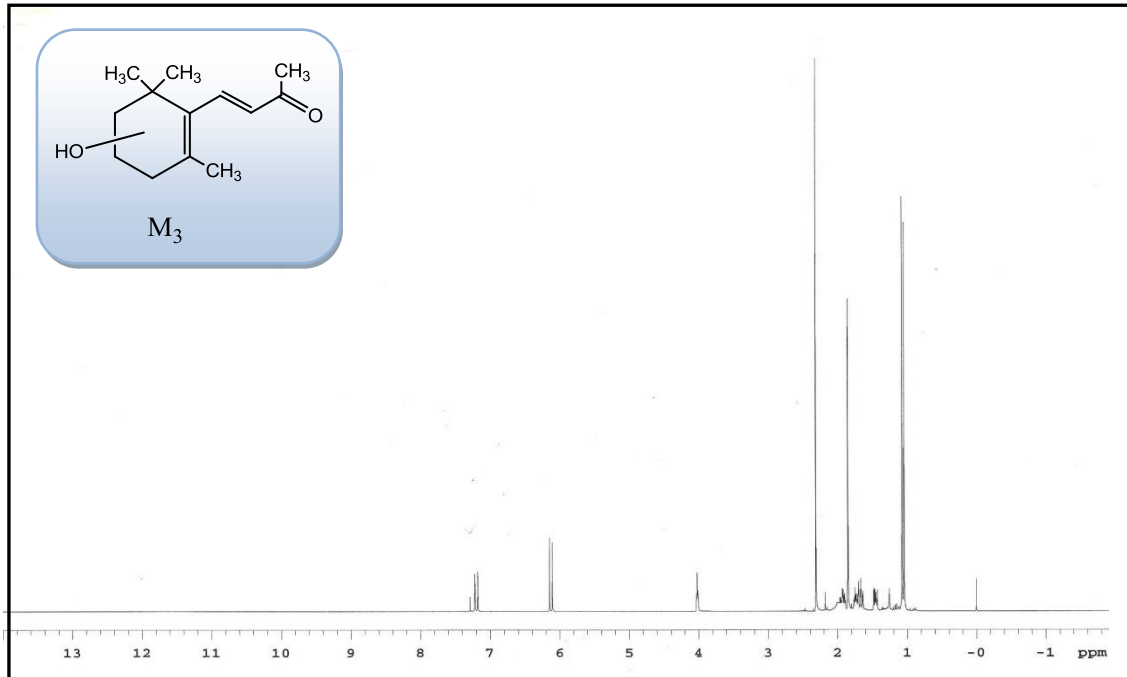


Şekil 4.8b. M_2 metabolitinin APT spektrumu

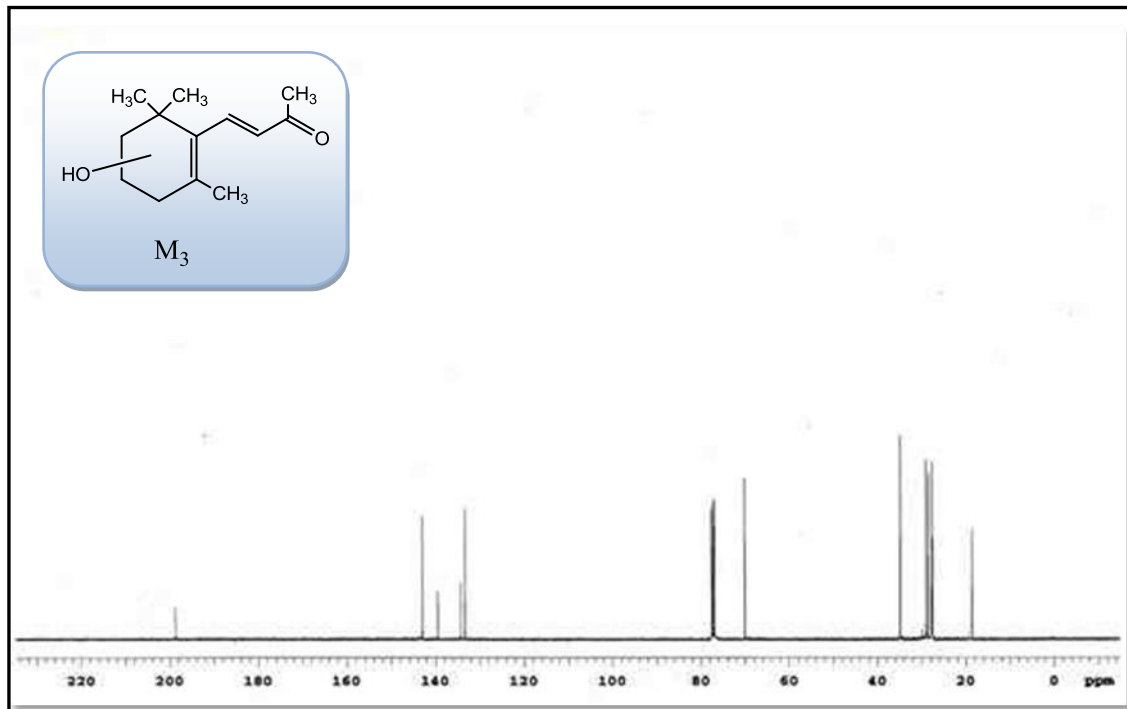
Saf olarak elde edilen üçüncü metabolitin (M_3) yapısı; GK/KS, ^1H NMR ve ^{13}C NMR analizleri ile aydınlatılmıştır. ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde, β -iyonol asetat'ın halkalı yapısına bir hidroksil grubunun ilave edildiği ve yan zincirdeki asetat grubunun hidrolizi sonucu oluşan alkol grubunun keton yapısına dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Fakat 2D NMR bilgileri istenilen yeterlilikte olmadığından dolayı hidrol grubunun halkalı yapıda hangi karbona bağlandığı tespit edilememiştir. İlgili metabolite (M_3) ait GK/KS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT ve HMBC spektrumları Şekil 4.9a, Şekil 4.9b, Şekil 4.9c, Şekil 4.9d ve Şekil 4.9e'de verilmiştir.



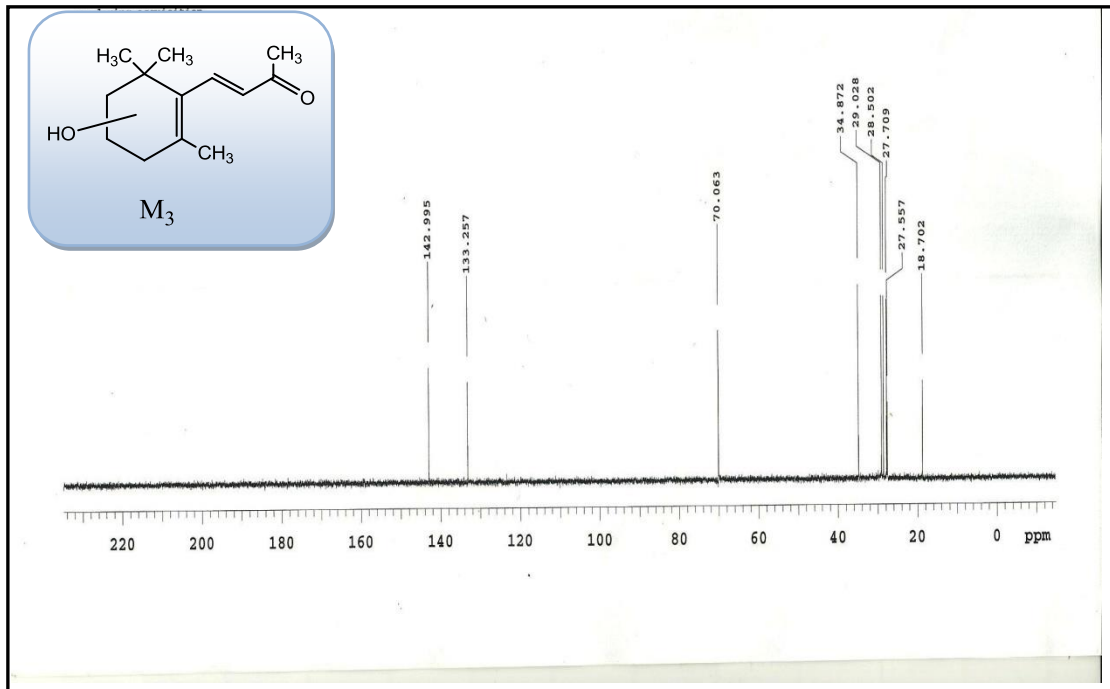
Şekil 4.9a. M_3 metabolitinin kromatogram ve kütle spektrumları



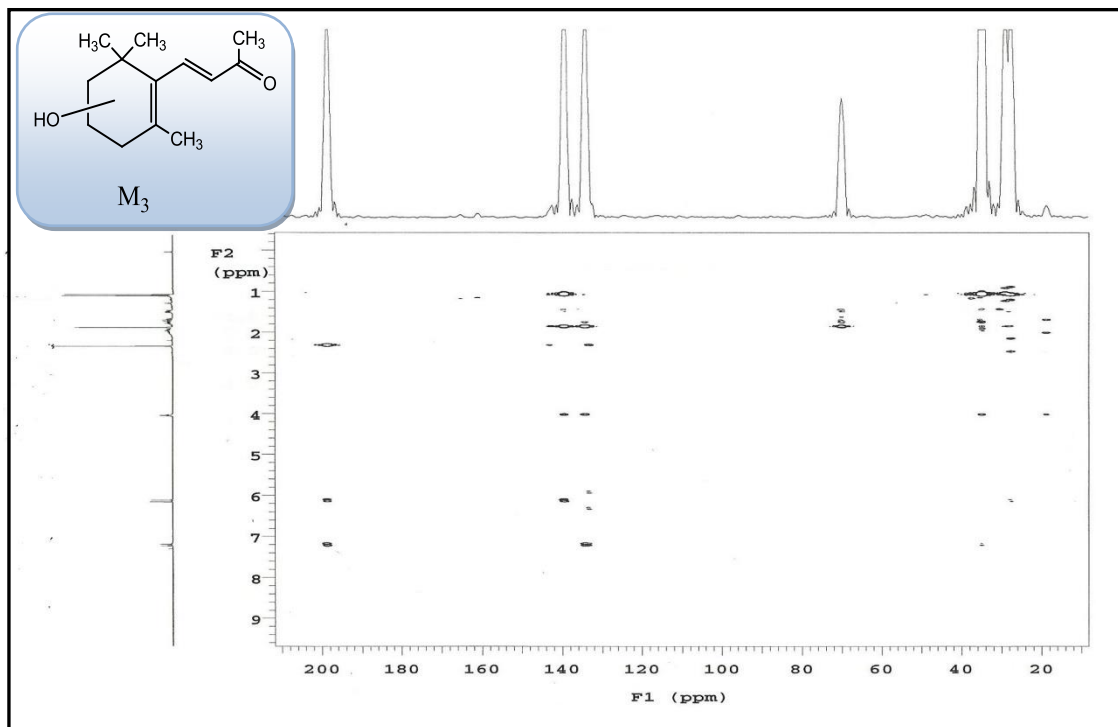
Şekil 4.9b. M_3 metabolitinin ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.9c. M_3 metabolitinin ^{13}C NMR spektrumu



Şekil 4.9d. M_3 metabolitinin DEPT spektrumu



Şekil 4.9e. M_3 metabolitinin HMBC spektrumu

4.4. Sonuçların Değerlendirmesi ve Öneriler

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1) β -iyonol asetat substratının çalışma kapsamında denenen mikroorganizmaların çoğu tarafından metabolize olduğu gözlenmiştir.
- 2) Bir ile yedi arasında metabolit içeren karışımlar elde edilmiş, bu durum verimin düşmesine ve saflaştırmalarda zorluklar yaşanmasına neden olmuştur.
- 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 β -iyonol asetat molekülü ile gerçekleştirilen herhangi bir biyotransformasyon deneyine rastlanmamış olması, elde edilen verilerin ilk olduğunu ortaya koymaktadır.

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.
- 3) *Fusarium solani* ATCC 1284 mikroorganizmasından koku ve tat maddesi üretiminde olumlu sonuç alınmasından dolayı farklı koku ve tat maddelerinin üretiminde de kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguedo, M., Ly, M. H., Belo, I., Teixeira, J. A., Belin, J. M. and Wache, Y., 2004, The use of enzymes and microorganiss for the production of aroma compounds from lipids, *Food Technology and Biotechnology*, 42, 327-336.
- Akar, T., 2005, Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s.
- Aran, N., 2010, Gıda biyoteknolojisi, Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Ankara, 1,493 s.
- Arfmann, H.A., Abraham, W.R. and Kieslich, K., 1988, Microbial ϵ -hydroxylation of trans-nerolidol and structurally related sesquiterpenoids, *Biocatalysis*, 2, 59-67.
- Armstrong, D.W. and Brown, L.A., 1994, Aliphatic, aromatic and lactone compounds, *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*, Gabelman A (Eds.) Wiley, New York, 41–89.
- Armstrong, D.W. and Yamazak, H., 1986, A biotechnological approach, *Natural Flavours Production*, *Trends in Biotechnological*, 4, 264-268.
- Assaf, S., Hadar, Y. and Dosoretz, C.G., 1995, Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenata of *Pleurotus pulmonarius*, *J Agric Food Chem*, 43, 2173-2178.
- Berger, R.G., 2007, Flavours and fragrances chemistry, *Bioprocessing and sustainability*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 648 p.
- Berger , R. G., 1995, *Aroma Biotechnology*, Springer Verlang , Berlin, 240 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bosser, A. and Belin, J.M., 1994, Synthesis of β -ionone in an aldehyde/Xanthine oxidase/ β -carotene system involving free radical formation, *Biotechnology Progress*, 10, 129-133.
- Breitmaier, E., 2006, *Terpenes*, Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 223 p.
- Broadbent, D., Hemming, H.G. and Turner, W.B., 1968, Preparation of jasmonic acid, Brazil, 1286266.
- Couto, S.R., and Sanromán, M. A, 2006, Application of solid-state fermentation to food industry, *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302.
- Crueger, W. and Crueger, A., 1990, *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*, Sinauer Associates, Inc., USA, 2, 357 p.
- Çarıkçı, S., 2005, *Sideritis Condensata Boiss. & Heldr* bitkisinin fitokimyasal analizi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 75 s.
- Demirci , F., 2000, Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal transformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137 s.
- Dordick, S.J., Khmelnitsky, Y.L. and Sergeeva, M.V., 1998, The evolution of biotransformation technologies, *Current Opinion in Microbiology*, 1, 311-318.
- Dwight, O.C. and Paul B.R., 2002, Biotransformation of cadina-4,10-dien-3-one and 3 α -hydroxycadina-4,10-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017, *Phytochemistry*, 59, 489–492.
- Ernst, D., 1989, *Biotechnology in agriculture and forestry, Medical and aromatic plants II*, Bajaj YPS (Eds.), Springer, New York, 7, 381 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fabre, C.E., Blanc P.J. and Goma, G., 1996, Production of benzaldehyde by several strains of *ischnoderma benzoinum*, Sciences des Aliments, 16, 61-68.
- Faber, K., 2004, Biotransformations in organic chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 5, 454 p.
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lasage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G. and Asther, M., 1994, Vanillin as product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *pycnoporus cinnabarinus*, Identification of metabolic pathways, J Biotechnol, 37, 123-132.
- Farbood, M.I., Morris, J.A. and Downey, A.E., 1990, Process for producing diol and lactone and microorganisms capable of same, U.S., Patent, 4, 970, 163
- Feron, G., Bonnarne, 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.
- Furusawa, M., Hashimoto, T., Noma, Y. and Asakawa, Y., 2005, Biotransformation of citrus aromatics nootkatone and valencene by microorganisms, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 53, 1423-1429.
- Gatfield, I.L., 1988, Production of flavour and aroma compounds by biotechnology, Food Technol, 10, 110-122.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hayashi, H., Fukui, H. and Tabata, M., 1988, Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*, Plant Cell Rep, Springer-Verlag, 7, 508-511.
- Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J. and Demuynck, C., 1996, Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*, J Agric Food Chem, 44, 1357-1360.
- Hrdlicka, P.J., Sorensen, A.B., Poulsen, B.R., Ruijter, G.J.R., Visser, J. and Iversen, J.J.L., 2004, Characterization of nerolidol biotransformation based on indirect on-line estimation of biomass concentration and physiological state in batch cultures of *Aspergillus niger*, Biotechnology Progress, 20, 368-376.
- Hunter, W.N., 2007, The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis, The Journal of Biological Chemistry, 30, 21573–21577.
- Janssens, L., 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., 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 process for hexadecanolide, Dev Food Sci, 18, 743 p.
- Karabacak, Ç., 2007, Bazı *Scutellaria Orientalis* türlerinin içerisindeki ekstraktif bileşiklerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 95 s.
- Kaspera, R., Krings, U., Nanzad, T. and Berger, R. G., 2005, Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, Appl Microbiol Biotechnol, 67, 477 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Kieslich, K., 1976, Microbial biotransformations of non steroid cyclic compounds, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 56-84.
- Knorr, D., Caster, C., Dornburg, H., Graf, S., Havin-Frenkel, D., Podstolski, A. and Werrman, U., 1993, Food Technology , New York, 47, 57 p.
- Knuth, M.E. and Sahai, O.P., 1991, US Patent, WO8900820.
- Krings, U., Abraham, B. and Berger, R. G., 1995, Plant impact volatiles from higer 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 microoganisms, Sci Aliment, 5, 1-26.
- Liese, A., and Filho, M.V., 1999, Production of fine chemicals using biocatalysis, Curr. Opin. Biotechnol., 10, 595-603.
- 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 (-)-alpha-bisabolol as exogenous substrates, Appl. Microbiol. Biotechnol., 61, 552-555.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Longo, M. A., and Sanromán, M. A., 2006, Production of food aroma compounds, Food technology and biotechnology, 44, 335-353.
- Maarse, H., 1991, Volatile compounds in foods and beverages, Marcel Dekker Inc., New York, 784 p.
- Madhavi, D. L., Prabha, T. N., Singh, N. S. and Patwardhan, M. V., 1991, Biochemical studies with garlic (*Allium sativum*) cell cultures showing different flavour levels, J Sci Food Agric, 56, 15-24.
- Manley, C. H., 1994, The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology, Wiley, New York, 19-39.
- Mitsuo, M., Yoshihiro H. and Hiromu K., 1996, Biotransformation of the sesquiterpenoid *p*-selinene using the plant pathogenic fungus *Glomerella czongulata* as a biocatalyst, Phytochemistry, 44, 433-436.
- Miersch, O., Guenther, T., Fritsche, W. and Sembdner, G., 1993, Jasmonates from different fungal species, Nat Prod Lett, 2, 293-299.
- Neto, R.S., Pastore, G.M. and Macedo, G.A., 2004, Biocatalysis and biotransformation producing γ -dekalaktone, Journal of Food Science, 69, 677-680.
- Ohloff, G., 1994, Scent and fragrances, Springer, Berlin, New York, 238 p.
- Ohsumi, C., Hayashi, T., and Sano, K., 1993, Formation of alliin in the culture tissues of *Allium sativum*. Oxidation of S-allyl-L-cysteine, Phytochemicals, 33, 107-111.
- Okuda, M., Sonohara, H., Takigawa, H., Tajima, K. and Ito, S., 1994, Nootkatone manufacture with *Rhodococcus* from valencen, Patent, JP, 06303967A.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özşen, Ö. E., 2011, İzoforon analoglarının sentezi, biyotransformasyonu ve biyolojik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 62 s.
- Pekin, B., 1993, Biyokimya mühendisliği (biyoteknoloji), Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları, No: 3, Mas Ambalaj, 1-89.
- Pinches, M., 1994, Cheese-developing the flavour, Dairy Inc., 59-37.
- 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.
- Raprior, 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.
- 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 pharmaco biotechnology, Balado, D. (Eds.), Williams &Wilkins, USA, 81, 107 p.
- 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 S´anchez, S., 2007, Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage, Informa Healthcare, 33, 211-230.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Schalk, M. and Clark, A., 2004, WO Patent 2003, IB5072.
- 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, *Advances in Biotechnology*, Moo-Young, M. (Eds.), Pergamon, Toronto, 2, 71-77.
- Seitz, E.W., 1994, Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavours and fragrances, *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*, Gabelman A. (Eds.), Wiley, New York, 95-134.
- Sell, C.S., 2006, *The chemistry of fragrances: From perfumer to consumer*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 330p.
- Servi, S., Barbeni, M., and Caella, P., 1993, Strategies in the biogeneration of flavours, studies in natural products chemistry, fungati C., *New avenues in natural products*, Rahman, A., (Eds.), ElsevierSci. Publ., Amsterdam, 13, 295-345.
- Simmonds, J. and Robinson, G.K., 1997, Novel biotransformations to produce aromatic and heterocyclic aldehydes, *Enzyme and microbial Technology*, 21, 367-374.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J., 1995, *Principles of fermentation technology*, Pergamon, UK, 2, 357 p.
- Suhara, Y., Itoh, S., Ogawa, M., Yokose, K., Sawada, T., Sano, T., Ninomiya, R. and Maruyama, H.B., 1981, Regio-selective 10-hydroxylation of patchoulol, a sesquiterpene, by pithomyces species, *Appl Environ Microbiol*, 2, 187-191.
- Telefoncu, A. ve Pazarlıoğlu Kaşıkara, N., 2010, *Biyoteknoloji temel prensipler ve uygulamalar*, Birleşik Matbaacılık, 605 s.
- 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 vanilin, *Labensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31, 530-536.
- Türk gıda kodeksi aroma vericiler ve aroma verme özelliği taşıyan gıda bileşenleri yönetmeliği, 2011, Resmi Gazte, 29/12/2011, 28157.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1997, Dünya Yayıncılık, İstanbul
- Urbach, G., 1997, *The Flavour of milk and dairy products*, II. cheese: contribution of volatile compounds, *J. Dairy Technol Inc.*, 50, 79–89.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Walton, N.J., Mayer, M.J. and Narband, A., 2003, Vanillin, *Phytochemistry*, 63, 505-515.

Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.M. and Belin, J.M., 2003, Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*, *Appl Environ Microbiol*, 61, 393-404.

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.

Winterhalter, P. and Schreier, P., 1993, *Biotechnology, Challenge for the flavor industry* flavor science, American Chemical Society, 225-258.

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 9 th international scientific congress on the cultivation of edible fungi*, Tokyo, 371-383.

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

<http://news.nationalgeographic.com/news/2007/03/070329-oldest-perfumes.html>

<http://www.bedoukian.com/products/product.asp?id=266>