

**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI MONOTERPENOİDLERİN FUNGAL  
BİYOTRANSFORMASYONUNUN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Semra YILMAZER KESKİN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**  
**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**  
**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM**

**Mart 2010**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

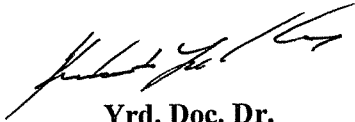
BAZI MONOTERPENOİDLERİN FUNGAL  
BİYOTRANSFORMASYONUNUN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Semra YILMAZER KESKİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

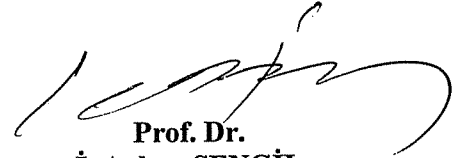
Bu tez 03/03/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



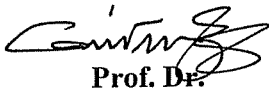
Yrd. Doç. Dr.  
Kudret YILDIRIM  
Jüri Başkanı



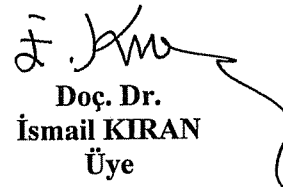
Prof. Dr.  
Ali Osman AYDIN  
Üye



Prof. Dr.  
İ. Ayhan ŞENGİL  
Üye



Prof. Dr.  
Cavit UYANIK  
Üye



Doç. Dr.  
İsmail KIRAN  
Üye

## TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarına yakın ilgi ve alaka gösteren, değerli fikirleriyle beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Osman AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince gösterdikleri büyük yardımları için Sayın Prof. Dr. Cavit UYANIK'a, Sayın Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL'e, Sayın Doç. Dr. İsmail KIRAN'a, Sayın Doç. Dr. Mahmut ÖZACAR'a, Sayın Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR'e,

Spektroskopik analizlerde yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşım Arş. Gör. Fatih SÖNMEZ'e, deneysel çalışmalarımnda yardımcı olan mesai arkadaşım Arş. Gör. Emrah BULUT'a,

Son olarak akademik hayatımın başlangıcından bu yana maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sonsuz hoşgörü ve özverileriyle beni destekleyen Arş. Gör. Can Serkan KESKİN'e ve değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2007-50-02-019).

Semra YILMAZER KESKİN

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xv

## BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
------------	---

## BÖLÜM 2.

GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyotransformasyon.....	3
2.1.1. Biyotransformasyonların kısa tarihi.....	3
2.1.2. Enzimler ve biyotransformasyonlar .....	6
2.1.3. Mikrobiyal biyotransformasyonlar .....	10
2.1.4. Biyotransformasyon teknikleri.....	15
2.1.4.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon.....	15
2.1.4.2. Stasyoner hücreler ile biyotransformasyon.....	15
2.1.4.3. Mikroorganizma sporları ile biyotransformasyon.....	16
2.1.4.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon.....	16
2.1.4.5. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon.....	16
2.1.5. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen faktörler.....	17
2.2. Terpenler.....	17
2.2.1. Terpenlerin sınıflandırılması.....	18

2.2.2. Terpenlerin biyosentezi.....	22
2.2.3. Terpenlerin biyotransformasyonu.....	28
2.2.4. Bazı önemli monoterpenoidler.....	29
2.2.4.1. (-)-Mirtenol.....	30
2.2.4.2. (-)-Nopol.....	31
2.2.4.3. (-)-Verbenon.....	32
2.2.4.4. $\alpha$ -İyonon.....	32
2.2.4.5. $\beta$ -İyonon.....	34
2.3. Çalışmanın Amacı.....	35

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT.....	36
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	36
3.2. Deneysel Çalışmalar.....	37
3.2.1. Taze yatık agar kültürlerinin hazırlanması.....	37
3.2.2. Biyotransformasyon çalışmalarına hazırlık.....	37
3.2.3. Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek substratın ilave edilmesi.....	38
3.2.4. Bileşiklerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	38
3.2.5. Bileşiklerin tanımlanması.....	38
3.2.6. Biyotransformasyon çalışmalarının kontrolü.....	38
3.3. <i>Aspergillus tamarii</i> Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları.....	39
3.3.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	39
3.3.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	40
3.3.3. (-)-Verbenon'un (3) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	40
3.3.4. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	41
3.3.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	41
3.4. <i>Aspergillus terreus</i> Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları.....	42
3.4.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	42

3.4.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu....	42
3.4.3. (-)-Verbenon'nun (3) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	43
3.4.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	43
3.4.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	43
3.5. <i>Aspergillus fumigatus</i> Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları.....	43
3.5.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus fumigatus</i> ile biyotransformasyonu.....	44
3.5.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus fumigatus</i> ile biyotransformasyonu.	44
3.5.3. (-)-Verbenon'nun (3) <i>Aspergillus fumigatus</i> ile biyotransformasyonu.....	44
3.5.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus fumigatus</i> ile biyotransformasyonu.....	44
3.5.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus fumigatus</i> ile biyotransformasyonu.	44

#### BÖLÜM 4.

DENEYSEL BULGULAR.....	46
4.1. <i>Aspergillus tamarii</i> Küfü ile Biyotransformasyonlar.....	46
4.1.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus tamarii</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	46
4.1.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus tamarii</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	47
4.1.3. (-)-Verbenon'un (3) <i>Aspergillus tamarii</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	48
4.1.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	49
4.1.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu....	50
4.2. <i>Aspergillus terreus</i> Küfü ile Biyotransformasyonlar.....	50
4.2.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus terreus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	50
4.2.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus terreus</i> küfü ile	

biyotransformasyonu.....	51
4.2.3. (-)-Verbenon'un (3) <i>Aspergillus terreus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	51
4.2.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	52
4.2.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	53
4.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> Küfü ile Biyotransformasyonlar.....	53
4.3.1. (-)-Mirtenol'ün (1) <i>Aspergillus fumigatus</i> küfü ile biyotransformasyonlar.....	53
4.3.2. (-)-Nopol'ün (2) <i>Aspergillus fumigatus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	54
4.3.3. (-)-Verbenon'un (3) <i>Aspergillus fumigatus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	54
4.3.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>Aspergillus fumigatus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	54
4.3.5. $\beta$ -İyonon'un (5) <i>Aspergillus fumigatus</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	55
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	56
KAYNAKLAR.....	63
EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	113

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
$[\alpha]_D^{20}$	: 20 °C'deki sodyumun D çizgisindeki spesifik rotasyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
bs	: Küt singlet
°C	: Santigrat derece
$CDCl_3$	: Dötorokloroform
$^{13}C$ -NMR	: Karbon-13 nükleer manyetik rezonans
D	: Sodyumun D çizgisi (289,3 nm)
$\Delta$	: Kimyasal kayma
$\delta_C$	: $^{13}C$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
dd	: Dubletin dubleti
$\delta_H$	: $^1H$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DEPT	: NMR tekniği (-CH, -CH <sub>2</sub> , -CH <sub>3</sub> tespitinde kullanılır)
$FeSO_4$	: Demir sülfat
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	: Demir sülfat hepta hidrat
g	: Gram
GAMA	: $\gamma$ -aminobutirik asit
$^1H$ -NMR	: Proton-nükleer manyetik rezonans
Hz	: Hertz
FTIR	: Fourier transform infrared
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
KCl	: Potasyum klorür
$KH_2PO_4$	: Potasyum dihidrojen fosfat
KoA	: Koenzim A
L	: Litre
Lit.	: Literatür



m	: Multiplet
mg	: Miligram
MgSO <sub>4</sub>	: Magnezyum sülfat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaNO <sub>3</sub>	: Sodyum nitrat
PDA	: Potato dextrose agar
pH	:Tayin edilebilen hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Parts per million
rpm	: Revolutions per minute
s	: Singlet
t	: Triplet
(-)	: Polarize ışığı sola çeviren
(+)	: Polarize ışığı sağa çeviren
(±)	: Rasemik karışım

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu.....	5
Şekil 2.2.	Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması.....	14
Şekil 2.3.	Oksen mekanizması.....	14
Şekil 2.4.	Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma.....	15
Şekil 2.5	Prenol ve izovalerik asitin açık yapıları.....	19
Şekil 2.6	Juinonon ve 3-metil-2-(3-metil-2-bütenil)furan'ın açık yapıları...	19
Şekil 2.7.	Farnesan ve dendrolasinin açık yapıları.....	20
Şekil 2.8.	Kauran ve pitanın açık yapısı.....	20
Şekil 2.9.	(-)-Cerifol ve skalarenin açık yapısı.....	20
Şekil 2.10.	Prostostan ve lupanın açık yapıları.....	21
Şekil 2.11.	Likopen'in açık yapısı.....	21
Şekil 2.12.	Plastokinon ve vitamin K <sub>1</sub> 'in açık yapıları.....	21
Şekil 2.13.	Terpenlerin bitki hücresi içerisindeki sentezleri.....	22
Şekil 2.14.	Mevalonat yolu.....	23
Şekil 2.15.	Rohmer yolu.....	25
Şekil 2.16.	GPP'den $\alpha$ - ve $\beta$ -pinen oluşumu.....	26
Şekil 2.17.	$\alpha$ - ve $\beta$ -Pinen'lerden sırasıyla verbenol ve pinokarveol biyosentezi.....	26
Şekil 2.18.	$\alpha$ -Terpinil katyonundan türetilen bazı monoterpen ve monoterpenoidler.....	27
Şekil 2.19.	FPP ve GGPP bileşiklerinin açık yapıları.....	28
Şekil 2.20.	Mirtenol'ün biyosentezi.....	30
Şekil 2.21.	Nopol'ün sentezi.....	31
Şekil 2.22.	Verbenon'un biyosentezi.....	32
Şekil 2.23.	$\alpha$ - ve $\beta$ -İyonon bileşiklerinin biyosentezi.....	33
Şekil 3.1.	(-)-Mirtenol'ün (1) açık yapısı.....	39

Şekil 3.2.	(-)-Nopol'un (2) açık yapısı.....	40
Şekil 3.3.	(-)-Verbenon'un (3) açık yapısı.....	40
Şekil 3.4.	(±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) açık yapısı.....	41
Şekil 3.5.	$\beta$ -İyonon'un (5) açık yapısı.....	41
Şekil 4.1.	Pinan, mentan ve iyonon halkalarının karbon iskeletlerinin numaralandırılması.....	46
Şekil 4.2.	(-)-Mirtenol'un (1) <i>A. tamarii</i> küfü ile inkübasyonu.....	47
Şekil 4.3.	(-)-Nopol'un (2) <i>A. tamarii</i> küfü ile inkübasyonu.....	48
Şekil 4.4.	(-)-Verbenon'un (3) <i>A. tamarii</i> küfü ile inkübasyonu.....	49
Şekil 4.5.	(±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>A. tamarii</i> küfü ile inkübasyonu.....	49
Şekil 4.6.	$\beta$ -İyonon'un (5) <i>A. tamarii</i> küfü ile inkübasyonu.....	50
Şekil 4.7.	(±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>A. terreus</i> küfü ile inkübasyonu.....	53
Şekil 4.8.	(-)-Mirtenol'un (1) <i>A. fumigatus</i> küfü ile inkübasyonu.....	53
Şekil 4.9.	(-)-Nopol'un (2) <i>A. fumigatus</i> küfü ile inkübasyonu.....	54
Şekil 4.10.	(-)-Verbenon'un (3) <i>A. fumigatus</i> küfü ile inkübasyonu.....	54
Şekil 4.11.	(±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) <i>A. fumigatus</i> küfü ile inkübasyonu.....	55
Şekil 4.12.	$\beta$ -İyonon'un (5) <i>A. fumigatus</i> küfü ile inkübasyonu.....	55
Şekil A1.	(-)-Mirtenol (1)'in <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	70
Şekil A2.	(-)-1- <i>p</i> -Menten-7,8-diol (6) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	71
Şekil A3.	(-)-Mirtenol (1)'in <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	72
Şekil A4.	(-)-1- <i>p</i> -Menten-7,8-diol (6) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	73
Şekil A5.	(-)-1- <i>p</i> -Menten-7,8-diol (6) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu...	74
Şekil A6.	(-)-Mirtenol (1)'in FTIR spektrumu.....	75
Şekil A7.	(-)-1- <i>p</i> -Menten-7,8-diol (6) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	76
Şekil A8.	(-)-Nopol (2)'nin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	77
Şekil A9.	(-)-7-Hidroksimetil-1- <i>p</i> -menten-8-ol (7) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	78
Şekil A10.	(-)-Nopol (2)'nin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	79
Şekil A11.	(-)-7-Hidroksimetil-1- <i>p</i> -menten-8-ol (7) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	80
Şekil A12.	(-)-7-Hidroksimetil-1- <i>p</i> -menten-8-ol (7) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu.....	81
Şekil A13.	(-)-Nopol (2)'nin FTIR spektrumu.....	82

Şekil A14.	(-)-7-Hidroksimetil-1- <i>p</i> -menten-8-ol ( <b>7</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	83
Şekil A15.	(-)-Verbenon ( <b>3</b> )'ün <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	84
Şekil A16.	(-)-10-Hidroksiverbenon ( <b>8</b> ) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	85
Şekil A17.	(-)-Verbenon ( <b>3</b> )'ün <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	86
Şekil A18.	(-)-10-Hidroksiverbenon ( <b>8</b> ) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	87
Şekil A19.	(-)-10-Hidroksiverbenon ( <b>8</b> ) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu..	88
Şekil A20.	(-)-Verbenon ( <b>3</b> )'ün FTIR spektrumu.....	89
Şekil A21.	(-)-10-Hidroksiverbenon ( <b>8</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	90
Şekil A22.	(±)- $\alpha$ -İyonon ( <b>4</b> )'ün <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	91
Şekil A23.	(±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon ( <b>9</b> ) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	92
Şekil A24.	(±)- $\alpha$ -İyonon ( <b>4</b> )'ün <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	93
Şekil A25.	(±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon ( <b>9</b> ) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	94
Şekil A26.	(±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon ( <b>9</b> ) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu.....	95
Şekil A27.	(±)- $\alpha$ -İyonon ( <b>4</b> )'ün FTIR spektrumu.....	96
Şekil A28.	(±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon ( <b>9</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	97
Şekil A29.	$\beta$ -İyonon ( <b>5</b> )'in <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	98
Şekil A30.	(±)-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon ( <b>10</b> ) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	99
Şekil A31.	$\beta$ -İyonon ( <b>5</b> )'in <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	100
Şekil A32.	(±)-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon ( <b>10</b> ) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu....	101
Şekil A33.	(±)-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon ( <b>10</b> ) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu	102
Şekil A34.	$\beta$ -İyonon ( <b>5</b> )'in FTIR spektrumu.....	103
Şekil A35.	(±)-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon ( <b>10</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	104
Şekil A36.	<i>trans</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>11+12</b> ) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	105
Şekil A37.	<i>trans</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>11+12</b> ) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	106
Şekil A38.	<i>trans</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>11+12</b> ) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu.....	107
Şekil A39.	<i>trans</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>11+12</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	108
Şekil A40.	<i>cis</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>13+14</b> ) bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu	109
Şekil A41.	<i>cis</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>13+14</b> ) bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR	

	spektrumu.....	110
Şekil A42.	<i>cis</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>13+14</b> ) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu.....	111
Şekil A43.	<i>cis</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon ( <b>13+14</b> ) bileşiğinin FTIR spektrumu.....	112

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Bütün hücre sistemleri ve izole enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	10
Tablo 2.2.	(-)-Mirtenol'ün literatürdeki fungal biyotransformasyonları.....	31
Tablo 2.3.	(-)-Nopol'ün literatürdeki fungal biyotransformasyonları.....	32
Tablo 2.4.	$\alpha$ -İyonon'un literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları.....	34
Tablo 2.5.	$\beta$ -İyonon'un literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları.....	35
Tablo 3.1.	<i>Aspergillus tamaris</i> küfüne ait besiyeri çözeltilisinin bileşenleri....	39
Tablo 3.2.	<i>Aspergillus terreus</i> küfüne ait besiyeri çözeltilisinin bileşenleri....	42
Tablo 3.3.	<i>Aspergillus fumigatus</i> küfüne ait besiyeri çözeltilisinin bileşenleri.	43

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Monoterpenoidler, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus fumigatus*.

Monoterpenoidlerin biyotransformasyonları özellikle gıda sanayi, parfümeri ve eczacılıkta kullanılan çok önemli bileşiklerin hazırlanması amacıyla dünya çapında yaygın olarak uygulanmaktadır. Birçok monoterpenoid yıllardır bu amaçla mikrobiyal biyotransformasyonlara maruz bırakılmaktadır. Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliğinin artırılması ve faydalı olabilecek yeni mikroorganizmalar ile reaksiyonların bulunmasına yönelik yoğun çalışmalar sürmektedir.

Bu çalışmada (-)-mirtenol, (-)-nopol, (-)-verbenon, ( $\pm$ )- $\alpha$ -iyonon ve  $\beta$ -iyonon monoterpenoidlerinin *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus terreus* ile inkübasyonlar bazı hidroksillenmiş metabolitler verirken *Aspergillus fumigatus* ile inkübasyonlar sadece değişmeyen başlangıç maddelerini verdi.

Metabolitlerin yapısı optik rotasyonlarının ölçülmesi,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR ile FTIR spektrumlarının alınması ve bunların başlangıç maddelerinkilerle karşılaştırılması ile belirlendi.

# THE INVESTIGATION OF FUNGAL BIOTRANSFORMATION OF SOME MONOTERPENOIDS

## SUMMARY

Keywords : Biotransformation, Monoterpenoids, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus fumigatus*.

Microbial biotransformations of monoterpenoids have found worldwide application for the production of more valuable and functionalized compounds used especially in foods, perfumes and medicines. A number of researches on microbial biotransformations of a wide range of monoterpenoids have been reported for years. There are still enormous efforts to increase the efficiency of microbial biotransformations and find new useful microorganisms and reactions.

In this work, the incubations of (-)-myrtenol, (-)-nopol, (-)-verbenone, ( $\pm$ )- $\alpha$ -ionone and  $\beta$ -ionone were performed with *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus*. Incubations with *Aspergillus tamaraii* and *Aspergillus terreus* afforded some hydroxylated metabolites whereas incubations with *Aspergillus fumigatus* afforded unchanged starting materials only.

The structures of metabolites were determined by measuring their optical rotations, taking their  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR and FTIR spectra and comparing them with those of starting materials.



## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlılarda doğal olarak gözlenen organik bileşikler üç ayrı temel gruba ayrılabilir. Birinci gruba, bütün hücrelerde ortak olan, hücrelerin büyüme ve üremelerinde merkezi rol oynayan primer metabolitler adı verilen bileşikler girer [1]. İkinci gruba selüloz, ligninler ve proteinler gibi hücresel yapıları oluşturan yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler girer. Üçüncü gruba ise canlıların büyüme ve üremesi için elzem olmayan sekonder metabolizmanın bileşenleri olan, doğal ürünler veya sekonder metabolitler olarak da adlandırılan ve sadece bir veya belirli birkaç tür için karakteristik olan bileşikler girer [1-3].

Doğal ürünler her ne kadar hayat için elzem olmasalar da genellikle canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olurlar [2, 3] ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkileri sebebi ile dikkat çekerler [1]. Bu ürünler hemen her grup canlıda bulunmalarına rağmen özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böcekler de daha yaygın olarak gözlenirler [3]. Doğal ürünlerin en bol bulunduğu canlılar bitkiler ve mikroorganizmalardır. Çoğu doğal ürün olan tıbbi, ticari ve zehirli bitkilerin biyolojik açıdan aktif bileşenleri organik kimyanın gelişimi süresince çalışılmıştır. Günümüzdeki ilaçların %40'ından fazlasının doğal ürünlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Doğal ürünler özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde ekolojik role sahip olan bileşiklerdir. Bunlar genellikle stres şartlarında devreye giren savunma maddeleri, hoş olmayan tatları ile otçullar tarafından tüketilmeyi önleyen bileşikler, diğer canlıları buldukları canlılara çeken renkli ve kokulu bileşikler ve özellikle böcekler gibi bazı hayvanlar arasında iletişimi sağlayan feromonlar olarak görev yaparlar.

Doğal ürünler ilk bakışta çok sayıda ve birbirinden yapıca farklı bileşikler olmasına rağmen bu bileşiklerin çoğu genellikle doğadaki biyosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal karakterlerinden dolayı poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş amino asitler ve peptidler gibi sınıflardan birine dahil edilirler [1].

## **BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Biyotransformasyon**

Enzimler veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı olan maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişiklere biyotransformasyonlar adı verilir [4]. Her geçen gün daha çok ilgi çeken biyotransformasyonlar; mikrobiyal liçing, ilaç aktif maddeleri, esans maddeleri, gıda katkı maddeleri, enerji üretimi, antibiyotik üretimi ve amino asit elde edilmesinde kullanıldığı gibi toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre ile ilgili konularda da kullanılmaktadır [5, 6].

#### **2.1.1. Biyotransformasyonların kısa tarihçesi**

M.Ö 3000 yıllarında mayalanma ve ekmek yapımı, meyve sularının fermentasyonu ile içki ve benzeri ürünlerin yapımı ilk gerçekleştirilen biyotransformasyonlar olarak kabul edilebilir. Sonraki dönemlerdeki meydana gelen önemli gelişmeler ise M.Ö 300 yılında bira üretimi, 1150 yılında etanol üretimi, 14. yy'da sirke imalatı endüstrisinin kurulması ve 1818 yılında mayaların fermentasyon özelliğinin keşfedilmesi şekilde özetlenebilir [6, 7].

Biyotransformasyon alanındaki ilk çalışma, Pasteur tarafından 1858 yılında *Penicillium glaucum* küfü ile DL-amonyum tartarattan L-amonyumun, D-enantiyomerinin seçimli yıkımı ile elde edilmesi olmuştur. 1864 yılında ise biyotransformasyon alanında literatürde yayınlanan ilk çalışma olan, etanolün *Acetobacter aceti* ile asetik aside dönüşümü yine Pasteur tarafından gerçekleştirilmiştir. 1886 yılında Brown etanol oksidasyonunu da gerçekleştirebilen *Bacterium aceti* ile propanolun propiyonik aside yükseltgendiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada ayrıca, Berthelot'un *B. aceti* ile mannitolün fruktoza ve glukozun glukonik

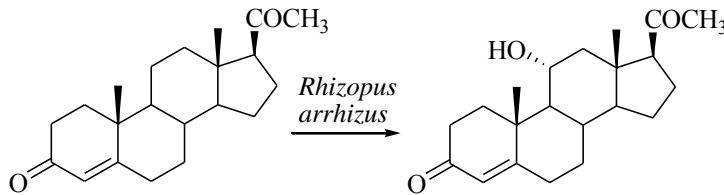
aside dönüşümlerine yönelik ilk çalışmalarının devamını bildirilmiştir. Bu şekildeki çoğu ilk çalışmalar genellikle saf kültürlerin eksikliği sebebi ile sekteye uğramıştır. 1874'de Dumas bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) kükürdü hidrojen sülfüre indirgediğini bildirmiştir. Windisch ise 1898'de furfuralın, furfiril alkole indirgenebileceğini bildirmiştir.

Bugün hala faydalanılan biyotransformasyonların bazılarının temeli 1920'ler ile 1940'lı yıllar arasında atıldı. Bu dönem boyunca çok sayıda biyosentetik ve genel metabolik yollar, bu yollardaki muhtemel ara bileşikler ve onlarla ilgili bileşiklerin biyotransformasyonlarının incelenmesi ile belirlendi. Bazı basit karboksilik asitler ve amino asitlerin glikolitik yollar ile ilişkileri izotoplarla etiketleme metodunun keşfine kadar bahsedilen çalışmalar ile gerçekleştirildi. Aromatik bileşiklerin degradasyonunun aydınlatılması ve bazı enzim sistemlerinin izolasyonu bu dönemde gerçekleştirildi. 1920'li yıllarda özellikle Liebig ve Neuberg tarafından *S. cerevisiae* kullanımına dayanan pek çok biyotransformasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu biyotransformasyonların bazıları I. Dünya savaşı süresince mikroorganizmalar kullanılarak aseton, gliserol ve bütanol üretimine yönelik çalışmalardan kaynaklanmaktadır. 1921'de Neuberg *S. cerevisiae* fermentasyonda oluşan asetaldehit ile besiyerine eklenen benzaldehitin kondensasyonu neticesinde daha sonra efedrin alkaloidinin ticari sentezine ilham veren bir ketol oluşturmuştur.

Arsenik içeren pigmentlerden uçucu toksik organoarsenik bileşiklerin oluşumu problemi araştırılırken, 1933 yılında arsenik, selenyum ve tellür oksanyonlarının çeşitli *Penicillium* türleri ile indirgen alkilasyonları tanımlandı. 1930'lardaki bir diğer faydalı endüstriyel uygulama C vitamini sentezinde *Acetobacter xylinum* küfünün D-sorbitol'ün L-sorboz'a dönüşümünde başarıyla kullanılmasıdır. Bir diğer alternatif proses ise D-glukoz'un önce *Acetobacter fragrum* ile mikrobiyal oksidasyonu ve sonrasında *Corynebacterium* türleri tarafından seçici olarak indirgenmesi ile gerçekleştirilmiştir. 1937 yılında *S. cerevisiae* ile yapılan bir çalışma dehidroizoandesteron üzerinden testesteron sentezi ile sonuçlanmıştır.

1948'de *Proactinomyces roseus* bakterisinin kolesterolün C-7'de oksidasyonunu içeren sterollerin degradasyon ve oksidasyonlarını gerçekleştirdiği bildirildi. 1952

yılındaki benzer amaçlı bir çalışmada *Rhizopus arrhizus* ile progesteronu biyolojik açıdan önemli olan Şekil 2.1’de gösterildiği gibi C-11 pozisyonunda hidroksilleyebildiği gözlemlendi. Kortikosteroidlerin sentezi için bileşikler sağlamak üzere steroidlerin etkin mikrobiyal hidroksilasyonun geliştirilmesi bütün dikkatleri biyotransformasyonlar üzerine çekti ve biyotransformasyonların diğer çeşitli amaçlar için daha yaygın olarak kullanılmasını tetikledi. Bahsedilen çalışmada progesteron bitkisel bir steroid olan diosgeninden yan zincirin kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılmasıyla elde edilmiştir. Diosgenin kısıtlılığı sebebi ile başlangıç maddesi olarak sitosterol ve stigmasterol kullanılmıştır. Günümüzde sitosterol ve stigmasterol daha sonra çeşitli steroid hormonlara çevrilecek olan androstendion bileşiğine bakteriler kullanılarak dönüştürülmektedir.



Şekil 2.1. Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu

*Penicillium chrysogenum*’dan elde edilen doğal penisilinlerin amidazlar ile semisentetik penisilinlerin başlangıç maddesi olan 6-aminopenisilinik aside parçalanması oldukça fayda sağlamıştır. Bir diğer önemli uygulama akrilonitrilin özellikle polimer endüstrisinde yaygın olarak kullanılan akrilamide, *Rhodococcus rhodochrous* bakterisi ile hidrolizlenmesi olmuştur. Bahsedilen işlem kimyasal hidrolize göre çok daha ılımlı şartlarda gerçekleştirilmiştir [4].

1960’ların ilk yıllarındaki her iki enantiyomeri de içeren “Thalidomide” adlı ilacın sebep olduğu teratojenik problemler, özellikle farmasötikal endüstride etkin tek enantiyomerlerin üretiminin önemini ortaya koymuştur. Bu durum *Pseudomonas putida* gibi mikroorganizmalar, çeşitli esterazlar ve lipazlarla biyotransformasyonların kiral sentezlerde kullanılmasını tetiklemiştir. Geçmişte spesifik enzimlerin kullanımı yetersiz üretimleri nedeniyle kısıtlı iken, günümüzde özellikle gen mühendisliği sayesinde bu enzimlerin eldesi ve haliyle kullanımı çok daha yaygınlaşmıştır [8]. Buna ilaveten, günümüzde modifiye ve semisentetik

enzimler ile katalitik antikorlarda (abzimler) biyotransformasyonlar için kullanılmaktadır. Enzimlerle yapılan biyotransformasyon çalışmalarındaki en önemli problemlerden biri metabolitlerin izolasyonu esnasında kullanılan ayırma metotlarının enzimi denatüre etmesi ve tekrar kullanılmasını sınırlamasıdır. Bu sorun enzimlerin immobilizasyonu ile çözülmüştür [9]. Günümüzde mikroorganizmalar bile aynı amaçla immobilize edilebilmektedir. Bu sayede birçok enzim ve mikroorganizma immobilizasyon sonrasında sürekli kullanılabilir. Enzimlerle yapılan biyotransformasyon çalışmalarındaki bir diğer sorun ise çoğu organik substratın sudaki düşük çözünürlüğüdür. 1985'de özellikle lipazlar gibi bazı enzimlerin organik solventler içerisinde kullanılabilmesi gösterilmiştir ve bu şekildeki biyotransformasyonlar giderek yaygınlaşmaktadır. Günümüzde bitki doku kültürleri hem doğal ürünlerin üretimi hem de sentetik bileşiklerin biyotransformasyonları için önemli araçlardır [4].

### **2.1.2. Enzimler ve biyotransformasyonlar**

Daha öncede belirtildiği gibi biyotransformasyonlar enzimler ile gerçekleştirilir. Bu amaçla kullanılan enzimler serbest, immobilize veya çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde bulunabilir. Günümüzde birçok enzim izole edilerek veya bazıları ticari olarak sağlandıktan sonra biyotransformasyonlar için kullanılmaktadır. Enzimler Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ayrı sınıfa ayrılmıştır. Her bir sınıf ise kendi içerisinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılmaktadır.

Oksidoredüktazlar 2 ayrı substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen dehidrojenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar gibi enzimleri içerirler. Transferazlar 2 ayrı substrat arasındaki belirli atom ve grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Bunlardan hidrolazlar, ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağları gibi bazı bağların su katılımıyla parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar substratlardan belirli grupların ayrılması ile çift bağ oluşumunu ve ayrıca çift bağlara çeşitli grupları ilave edilmesini katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar çeşitli izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen

mutaz, rasemaz, epimeraz gibi isimlerle anılan enzimleri içerir. Ligazlar iki substratın birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir [10].

Enzimler hakkında oldukça duyarlı, pahalı, sadece kendi doğal substratları üzerinde ve kendi doğal çevreleri üzerinde etkili oldukları yönünde bir takım genel önyargılar söz konusudur. Çoğu enzim için bu bahsedilen olumsuzluklar geçerli değildir [9].

Enzimler kullanıcılarına birçok avantajlar sağlayan biyokatalizörlerdir. Örneğin enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir ve enzimatik bir reaksiyon enzimsiz gerçekleşen bir reaksiyona göre  $10^8$ - $10^{10}$  kat daha hızlıdır. Ayrıca enzimatik reaksiyonlarda katalizör oranı %  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol arasında olması istenirken kimyasal katalizörlü bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilir.

Katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine doğada tamamen parçalanabilir oldukları için enzimler çevreye uyumlu biyomoleküllerdir.

Enzimler sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine ılıman şartlarda etkili biyomoleküllerdir. Enzimler genellikle pH 5-8 aralığında ve sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında çalışırlar. Bu sayede sentetik metodlarla sıklıkla karşılaşılan bozunma, izomerleşme, rasemizasyon ve çevrilme gibi yan reaksiyonlar azaltılabilmektedir.

Enzimler genellikle aynı ve benzer şartlar altında etkili oldukları için bir reaksiyon ağındaki birkaç seri reaksiyon aynı ortamda gerçekleşebilir. Metabolik yollardaki multienzim sistemleri bu şekilde çalışmaktadır.

Enzimler çoğu zaman kendi doğal rollerine uymayabilirler. Örneğin, çoğu enzim geniş bir substrat spektrumuna sahip olmaları sebebi ile birçok doğal veya sentetik bileşik üzerinde etkili olabilir. Ayrıca gerektiğinde bazı enzimler organik solventlerde bile kullanılabilirler.

Enzimler geniş bir reaksiyon çeşitliğine sahiptirler. Hemen her sentetik reaksiyona eş değer bir enzimatik reaksiyon söz konusudur. Enzimler ile ester, amid, lakton, laktam, eter, asit anhidrit, epoksit ve nitrillerin hidrolizi veya sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürlerin ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, su, amonyak ve hidrojen siyanür ilavesi veya eliminasyonu, halojenasyon ve dehalojenasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, karboksilasyon, dekarboksilasyon, izomerizasyon, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael adisyonu ve Diels-Alder reaksiyonları bunlara örnektir [9].

Enzimler kemoselektif biyomoleküllerdir. Belirli bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurlar ve diğer duyarlı fonksiyonel grupları etkilemedikleri için genellikle yan ürünlerin oluşumlarını engellerler.

Regioselektif ve diastereoselektif biyomoleküller olan enzimler, kompleks üç boyutlu yapıları sebebi ile aynı substrat molekülünün üzerindeki farklı bölgelerde fonksiyonel grupları bile ayırt edebilirler.

Enzimler enantiyoselektif biyomoleküllerdir. L-amino asitlerden oluştuklarından kiral biyokatalizörlerdir. Substrat bünyesindeki herhangi bir kiralite enzim-substrat kompleksi oluşumu esnasında tanımlanır. Prokiral bir substrat sadece bir enantiyomere dönüşürken genellikle rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birinin etkilenmesi ile enantiyomerlerin ayrılmaları da mümkündür.

Enzimlerin yukarıda sayılan avantajları sayesinde organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor olan ya da imkansız reaksiyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedirler [4, 9].

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasında bazı dezavantajlar da söz konusudur. Örneğin enzimler doğada sadece bir enantiyomerik forma sahip olmaları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olması sebebi ile sadece belirli bir enantiyomer ile reaksiyona girebilirler. Bu durumda diğer enantiyomerik ürünün eldesi için zıt bir stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzim kullanılmalıdır. Bu bazen mümkün olabilmektedir.



Enzimler sınırlı operasyon parametreleri gerektirir. Yavaş gerçekleşen bir enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için pH ve sıcaklık gibi parametreler, enzimlerin protein tabiatı sebebi ile genellikle fazla değiştirilemez.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamının su olmasına rağmen çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine organik bir solvante alınması çoğu zaman enzimlerin denatürasyon ile aktivite kaybına sebep olmaktadır.

Enzimler kendi doğal kofaktörlerine bağımlıdır. Enzimatik reaksiyonlarda NAD(P)H gibi kofaktörler rol oynuyorsa bu kofaktörlerin bizzat kendilerinin reaksiyon ortamında olmaları ve yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin genelde kararsız moleküller olması, oldukça pahalı olmaları ve sentetik eşdeğerleri ile yer değiştirmelerinin mümkün olmaması enzimatik reaksiyonların önemli handikaplarından.

Enzimler inhibisyona duyarlı biyomoleküllerdir. Çoğu enzimatik reaksiyon çok yüksek substrat ve yüksek ürün konsantrasyonlarında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonu, düşük seviyede substrat miktarları ile başlayarak ortama sürekli substrat ilavesi ile kolaylıkla geçiştirilebilir. Reaksiyon ortamından artan ürünün kademeli bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılması genellikle ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması açısından oldukça zordur.

Enzimler alerjik reaksiyonlara sebep olabilirler. Bu biyomoleküller eğer kimyasal maddeler olarak değerlendirilir ve dikkatli kullanılırsa, bu özellikleri minimize edilebilir.

Biyotransformasyonlar temelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleri ile olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri tabiri genel olarak mikroorganizmalar ile bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürlerini içerir. Bütün hücre sistemleri ile izole enzimlerin birbirlerine göre sahip oldukları avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1'de özetlenmiştir [9].

Tablo 2.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzimlerin avantaj ve dezavantajları

Biyokatalizör	Form	Avantaj	Dezavantaj
İzole enzimler	Genel	Basit düzenekler, Basit işlemler, Yüksek derişim toleransı nedeniyle iyi verim	Kofaktöre ihtiyaç duyulması
	Sulu ortamda	Yüksek enzim aktivitesi	Yan reaksiyon ihtimali, Lipofilik substratların düşük çözünürlüğü, Ekstraksiyon gerekliliği
	Organik çözücüde	Çalışma kolaylığı, Lipofilik substrat çözünürlüğü Enzimin geri kazanım kolaylığı	Düşük aktivite
	İmmobilize	Tekrar kullanılabilme	İmmobilizasyon ile aktivite kaybı
Bütün hücreler	Genel	Kofaktöre ihtiyaç duyulmaz	Pahalı donanım, Büyük hacimlerle çalışma zorluğu, Düşük derişim toleransı sebebi ile düşük verim, Organik çözücülerle düşük tolerans, Yüksek yan ürün verme ihtimali
	Büyüyen kültür	Yüksek aktivite	Çok miktarda biyokütle gelişmesi, Yan ürün fazlalığı, Proses kontrol güçlüğü
	Durağan kültür	Çalışma kolaylığı, Daha az yan ürün	Düşük aktivite
	İmmobilize hücreler	Tekrar kullanılabilirlik	Düşük aktivite

Biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir. Bu tercihin sebepleri arasında çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmesi, hücre içi enzimlerin homojenasyon sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmesi, hücre içi enzimlerin kofaktör ihtiyaçlarının temini ve sürekli yenilenmesi, hücre içi enzimlerin izolasyonunun zorluğu ve yüksek maliyeti sayılabilir [5].

### 2.1.3. Mikrobiyal biyotransformasyonlar

Biyotransformasyon reaksiyonları için kullanılan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilenler mikrobiyal hücrelerdir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha yüksektir. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonların hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha farklı tipte substratları metabolize edebilir. Mikrobiyal hücreler küçük boyutları ve etkili hücre duvarı yapısı sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak

daha kararlı olmaları sayesinde değişik kültür tekniklerinde bu tip hücrelerin ortama uyumu açısından bir avantaj sağlar [5, 8].

Mikrobiyal biyotransformasyonların günümüzde biyoteknolojinin temel elemanları haline gelmesi diğer kimyasal sentez metotlarına karşı olan avantajları sayesinde [4, 9].

Mikroorganizmalar yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik çok sayıdaki farklı substratlar üzerinde bir çok farklı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilirler [4].

Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebilir. Mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen genetik manplasyonlar ve diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle elde edilen önemli ürünler daha yüksek verimler ile elde edilebilirler. Hatta genetik manplasyonlar ile ürünler üzerinde istenilen değişiklikler bile mümkün olabilmektedir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal metodlara göre çok daha ılıman şartlarda gerçekleşirler. Çoğu mikrobiyal biyotransformasyonlar oda sıcaklığında ve 1 atmosfer basınç altında gerçekleşmektedir [4, 8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar evre dostudurlar. Klasik kimyasal sentez metodlarında kullanılan çoğu reaktif çevreye çok büyük zararlar vermektedir [4].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal metodlara göre daha ucuza ve daha kısa sürede gerçekleştirilirler. Kimyasal reaktiflere göre çok ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak hedef bileşikler daha kısa sreler içerisinde ve genellikle daha yüksek verimler ile hazırlanmaktadır.

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enantiospesiftir. Klasik kimyasal sentez metodları ile genelde hedef moleküller, ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar olarak elde edilmektedir. Özellikle ilaç etkin maddelerinin sentezinde tek enantiyomer üretmek oldukça önemlidir. *Pseudomonas* ve *Rhodococcus* gibi

mikroorganizmalar kullanılarak tek enantiyomerin seçimli üretimi çalışmaları günümüzde gittikçe yaygınlaşmıştır.

Klasik kimyasal sentez metodlarının aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmez. Bu avantaj enzimlerin regiospesifiklikleri sebebi ile ortaya çıkar.

Mikrobiyal biyotransformasyonlar genellikle fonksiyonel grupların varlığına gerek duymazlar. Örneğin mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel grupların uzağında gerçekleşirler [4].

Mikroorganizmalar değişik ortamlara kolayca adapte olabilen canlılardır. Bu özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar, erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok ortama kolayca adapte edilerek kullanılabilirler.

Mikrobiyal biyotransformasyonlar için çeşitli mikroorganizmalar serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. En yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grupları mantarlar aleminin üyesi ve ökaryotik canlılar olan küfler ve mayalar ile protista aleminin üyesi ve prokaryotik canlılar olan bakterilerdir [8].

Mikroorganizmalar ile birçok sentetik reaksiyona eş değer reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Buna ilaveten mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar sentetik reaksiyonlar ile tek basamakta gerçekleştirilemezler. Özellikle fonksiyonel grupların uzağında gerçekleşen mikrobiyal hidroksilasyonlar en önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından biridir. Mikrobiyal biyotransformasyonların günümüze kadar süren popülerliği mikrobiyal hidroksilasyonların daha önce belirtilen kortikosteroidlerin sentezinde sağladıkları büyük kolaylık ile başlamıştır [4, 6].

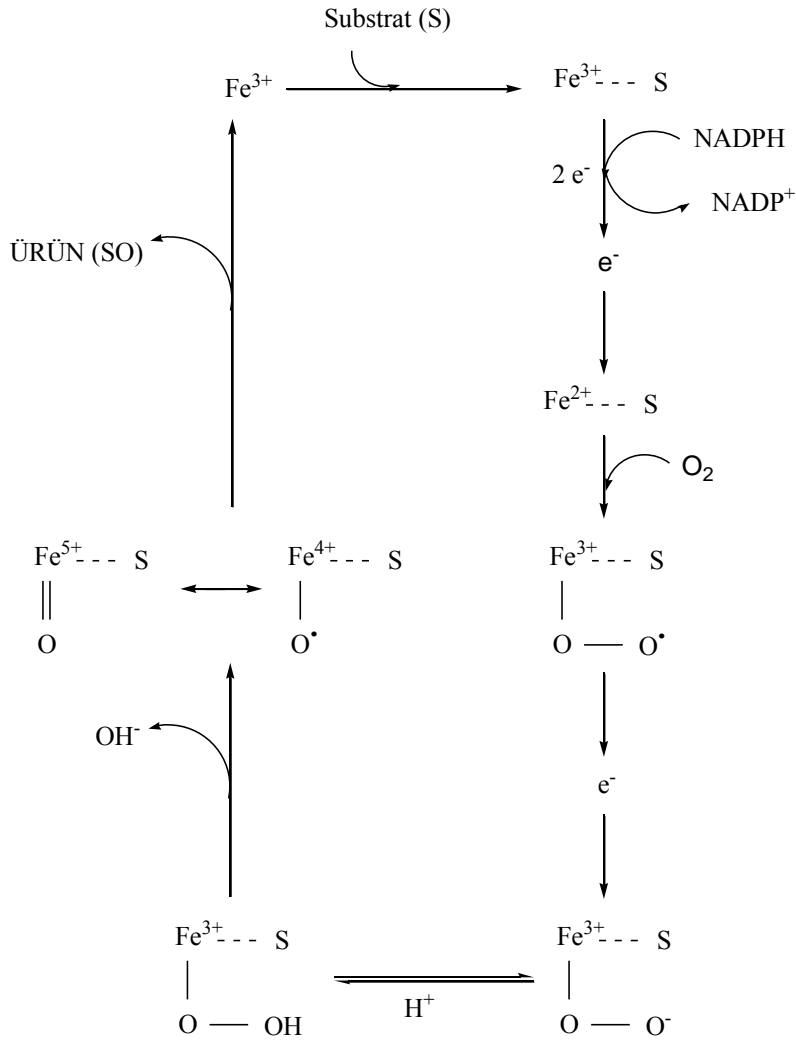
Mikrobiyal hidroksilasyonlar, çoğu canlılarda bulunan sitokrom P-450 enzimlerince katalizlenmektedir [4]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar için ayrıca moleküler oksijen, NADPH veya NADH gibi bir hidrojen kaynağı ve 1 molekül su gerektirmektedir [11].

Mikrobiyal hidroksilasyonun mekanizması özellikle *Pseudomonas putida* bakterisinin kamfor bileşiğinin hidroksilasyonunu katalizleyen kamfor hidroksilaz enzimine ait sitokrom P-450 üzerinde çalışılarak ortaya çıkarılmıştır [4]. Sitokrom P-450'nin yapısı X ışınları kristallografi tekniği ile anlaşılmıştır [11]. Kristal yapı çalışmaları kamfor bileşiğinin enzimin aktif merkezine iki etkileşim ile sıkıca bağlı olduğunu göstermiştir. Birinci etkileşim kamforun karbonil grubu ile aktif merkezindeki bir tirozinin hidroksil grubu arasındaki hidrojen bağı iken ikinci etkileşim ise kamfor molekülü ile çevresindeki alifatik ve aromatik amino asitler arasındaki hidrofobik etkileşimlerdir.

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi mikrobiyal hidroksilasyon sırasında diatomik moleküler oksijenin bir atomu, organik substrata bağlanmaktadır [4, 11, 12]. İndirgeyici 2 elektron genellikle NADPH bazen ise NADH'dan sağlanmaktadır. İlk adımda substrat bağlanması gerçekleşir ve bu bağlanma diatomik oksijenin atomlarından birisinin demire bağlanabilmesi için elzemdir.

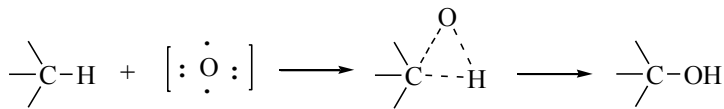
Substrat bağlandıktan sonra bir elektronun nakli ile  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmektedir. Elektronların teker teker ilavesi mikrobu türüne göre NADPH veya NADH'dan bir flavin nükleotid, Fe-S proteinleri ve/veya sitokrom  $b_5$  vasıtası ile gerçekleşmektedir. Moleküler oksijen ilk elektron naklinden sonra bağlanır.

Moleküler oksijenin bağlanmasını, ikinci elektronun O-O bağına aktarılması izler. Bu aktarım sonrasında O-O bağı kopar ve bir oksijen atomu su molekülü olarak ayrılırken  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{4+}$ 'e oksitlenmektedir. Bu oksidasyon ile oluşan son oksidant artık substratla reaksiyona girebilir.



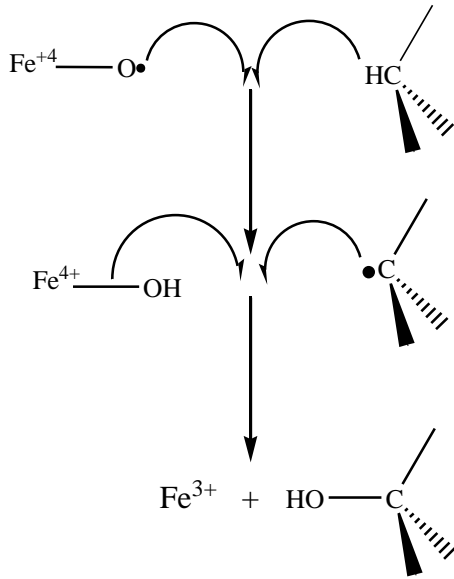
Şekil 2.2. Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması

Oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun mekanizması için ilk olarak Şekil 2.3’de verilen oksen mekanizması önerilmiş ve bu mekanizma yıllarca kabul görmüştür.



Şekil 2.3. Oksen mekanizması

Günümüzde ise oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun Şekil 2.4’deki gibi muhtemelen radikalleri içeren bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir [11].



Şekil 2.4. Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma

#### 2.1.4. Biyotransformasyon teknikleri

Biyotransformasyonlar birçok farklı şekillerde gerçekleştirilebilirler. Bu biyotransformasyon teknikleri hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir [6].

##### 2.1.4.1. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyon çalışmalarında genellikle büyüyen hücreler kullanılır. Mikroorganizmalar veya hücreler kendilerine özel besiyerlerinde üretildikten sonra biyotransformasyona uğrıtılacak substrat ilave edilir ve biyotransformasyonlar gerçekleştirilir.

##### 2.1.4.2. Stasyonier hücreler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyon çalışmalarında stasyonier (durağan) hücreler de kullanılabilir. Hücreler veya mikroorganizmalar üretildikleri ve kendilerine has besiyerlerinden filtrasyon veya santrifüjleme gibi teknikler ile ayrılıp biyotransformasyon çalışmasının yapılacağı asıl ortama dağıtılır. Bu yeni ortama daha sonra substrat ilavesi yapılır ve biyotransformasyonlar gerçekleştirilir. Hücreler veya mikroorganizmaların canlı kalması için yeni ortama az miktarda glukoz ilave edilir.

Bu uygulamada, büyüme ve biyotransformasyonun farklı ortamlarda gerçekleştiği için biyotransformasyon süresince ortamdaki mikroorganizma veya hücre sayısı önemli bir değişim göstermez. Ayrıca bu teknik substratın büyümeyi inhibe etme ihtimalini ortadan kaldırır ve ürün ya da ürünlerin ortamdan izolasyonu daha kolay gerçekleştirilebilir.

#### **2.1.4.3. Mikroorganizma sporları ile biyotransformasyon**

Biyotransformasyon çalışmaları mikroorganizma sporları kullanılarak da gerçekleştirilebilir. Önce mikroorganizmalar spor oluşumu için uygun koşullarda üretilir. Daha sonra oluşan sporlar misellerden ayrılıp soğuk bir ortamda saklanır. Biyotransformasyon yapılacağı zaman bu spordan faydalanılır.

#### **2.1.4.4. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon**

Biyotransformasyon çalışmalarında immobilize hücreler veya mikroorganizmalar da kullanılabilir. Hücreler veya mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren poliakrilamid, alginat veya nişasta gibi çeşitli polimer matrisler üzerine sabitlendikten sonra biyotransformasyon çalışmalarında kullanılabilirler. Sabitlenmiş mikroorganizmalar veya hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırabilir ve yeniden kullanılabilirler.

#### **2.1.4.5. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon**

Biyotransformasyon çalışmalarında serbest veya sabitlenmiş enzimler de kullanılabilir. Biyotransformasyonlarda mikroorganizmalar veya hücreler yerine sadece serbest ya da sabitlenmiş enzimlerin kullanılması istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına engel olmaktadır. Enzimler oldukça pahalı maddeler olduğundan serbest enzim yerine çeşitli yöntemler ile hazırlanan sabitlenmiş enzimlerin kullanılması ekonomik açıdan daha karlı olmaktadır [6].



### 2.1.5. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen faktörler

Canlı sistemler veya enzimler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları için gereken şartlar kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği şartlara göre daha çeşitli ve hassastır. Örneğin mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen önemli faktörler besiyerinin bileşimi, substratın toksisitesi ve derişimi (tolerans aralığı % 0,1-10>), bazı ürünlerin ve toksik atıkların reaksiyon ortamındaki birikimi, inkübasyon sıcaklığı (değişim limiti  $\pm 2$  °C), çalkalama hızı (rpm), inkübasyon süresi (saat-ay), oksijen miktarı, pH (genellikle nötr) ve mikroorganizmanın suşu sayılabilir [5, 13].

### 2.2. Terpenler

Terpen adı terebentin yağından gelir. Terebentin yağı özellikle bazı çamgillerin kendiliğinden saldığı, kabukları veya filizlerinin kesilmesi ya da soyulması ile de açığa çıkabilen hoş kokulu ve vizkoz bir maddedir. Terebentin yağı reçine asitleri ve daha çok terpenler olarak bilinen hidrokarbonları içerir [14].

Çam ağaçları, trunçgiller, kişniş, okaliptüs, lavanta, limon otu, zambak, karanfil, kimyon, nane türleri, güller, biberiye, adaçayı, kekik, menekşe ve daha birçok bitki veya bu bitkilerin kök, gövde, yumru, yaprak, meyve, tohum ve çiçek gibi kısımları hoş kokuları, baharatlı tatları veya kendilerine özgü farmakolojik aktiviteleri ile bilinirler. Bahsedilen bitkilerin bu özellikleri içerdikleri terpenlerden kaynaklanır. Terpenler genellikle bu bitkilerin tamamının veya bazı kısımlarının ekstraksiyon veya buhar destilasyonlarına maruz bırakılmaları ile elde edilirler. Uçucu yağlar olarak da bilinen bu ekstraktlar ve buhar destilatları ıtırılı parfümlerin hazırlanması, yiyecek ve içeceklerle hoş bir tat ve aroma kazandırılması ve bitki orjinli bazı ilaçların hazırlanması için kullanılır.

Terpenlerin biyolojik ve ekokimyasal rolleri şimdiye kadar tam olarak araştırılmamıştır. Çoğu bitki, böcekler vasıtası ile polinasyonu sağlamak için uçucu terpenler veya otçul hayvanlardan korunmak için na hoş tatlı veya toksik daha az

uçucu terpenler üretirler. Ayrıca bazı terpenler sinyal bileşikleri ve bitki büyüme düzenleyicileri olarak önemli roller oynarlar.

Çoğu böcek, beslendikleri bitkilerden aldıkları terpenleri kendi büyüme hormonları ve feromonlarına çevirirler. Feromonlar özellikle böcekler gibi hayvanların birbirleri ile iletişimlerini sağlayan kimyasallardır. Feromonlar diğer bireyleri uyarmak (alarm feromonları), besin kaynaklarını ve yerlerini işaretlemek (takip feromonları), belirli bir yerde toplanmak (kümelenme feromonları) ve karşı cins bireyleri üreme döneminde etkilemek (eşey feromonları) gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Doğaya zararlı olmayan bazı feromonların zararlı böcekler ile mücadelede insektisidler yerine kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır [14].

Memelilerde terpenler, hücre membranlarının stabilizasyonunda ve enzimatik reaksiyonlarda düzenleyici olarak bulunmaktadır. Terpenler, kanseri de içeren birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisindeki rolleri, doğal insektisid olarak kullanılabilirliği, antimikrobiyal özellikleri, şahsi bakım ve ev temizlik maddelerinde kullanılmaları, yiyecek ve içeceklere tat ve aroma katmaları, bazı tarım ürünlerinin depolanmasında ve birçok önemli bileşiğin sentezinde kullanılmaları nedeniyle ticari olarak büyük dikkat çekmektedirler [15].

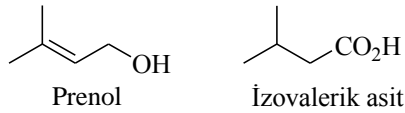
Terpenler halkalı, düz zincirli veya kısmen halkalı ve kısmen düz zincirli bileşikler olabilirler. Yeryüzündeki en yaygın doğal ürün grubu olan terpenlerin tanımlanan sayısı günümüzde 30.000'i geçmiştir. Terpenler ve diğer önemli bir doğal ürün grubu olan steroidlerin ana iskeleti beş karbonlu izopren (2-metil-1,3-butadien) birimleri (izopren kuralı) içerdiği için izoprenoidler olarak da bilinirler. Terpenler doğada genellikle hidrokarbonlar, alkoller ve glikozidleri, eterler, aldehytler, ketonlar karboksilik asitler ve esterleri olarak gözlenirler [14].

### **2.2.1. Terpenlerin sınıflandırılması**

Terpenler yaygın olarak içerdikleri izopren birimlerinin sayısına göre hemiterpenler, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler olmak üzere sekiz sınıf olarak incelenirler. Oksijenlenmiş terpenler

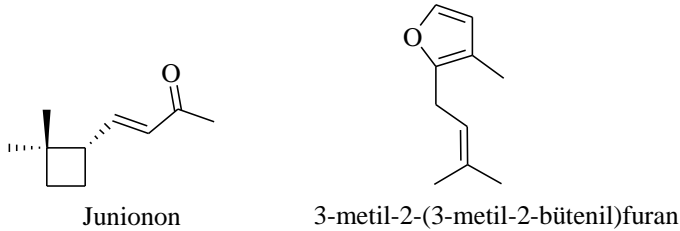
adlandırılırken sonlarına -oid eki alırlar. Örneğin oksijen içeren terpenler terpenoidler genel adı ile adlandırılırken benzer şekilde oksijenli hemiterpenler hemiterpenoidler, monoterpenler ise monoterpenoidler olarak adlandırılırlar. Diğer oksijen içeren terpen sınıfları da benzer şekilde diterpenoidler, sesterterpenoidler vb. gibi adlandırılırlar.

Hemiterpenler tek bir izopren birimden oluşur ve izoprenin kendisi tek hemiterpen olarak sayılır. Bilinen 50 çeşit hemiterpen mevcuttur. Şekil 2.5’de gösterilen prenol ve izovalerik asit gibi bileşikler hemiterpenlere örnek olarak verilebilir [14].



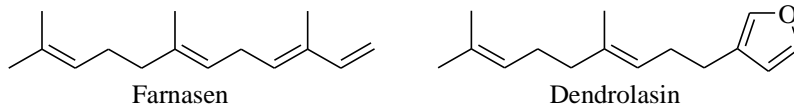
Şekil 2.5. Prenol ve izovalerik asitin açık yapıları

Monoterpenler iki izopren birimden oluşurlar ve  $C_{10}H_{16}$  moleküler formülüne sahiptirler. Yaklaşık olarak 1500 monoterpen belgelenmiştir. Şekil 2.6’de gösterilen 3-metil-2-(3-metil-2-bütenil)furan ve junonon monoterpenlere örnektir.



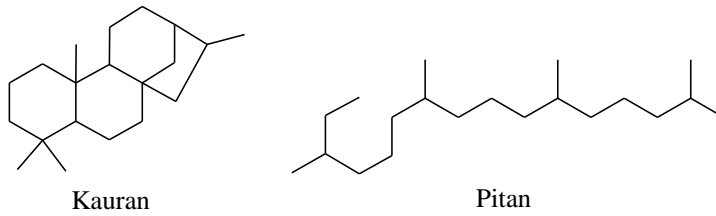
Şekil 2.6. Junonon ve 3-metil-2-(3-metil-2-bütenil)furan’ın açık yapıları

Seskiterpenler üç izopren birimden oluşurlar ve  $C_{15}H_{24}$  moleküler formülüne sahiptirler. Yaklaşık 10000 adet seskiterpen çeşidi bilinmektedir ve asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik seskiterpenler olarak alt gruplara ayrılırlar. Şekil 2.7’de açık yapıları gösterilen fernenen ve dendrolasin seskiterpenlere örnektir [14, 16].



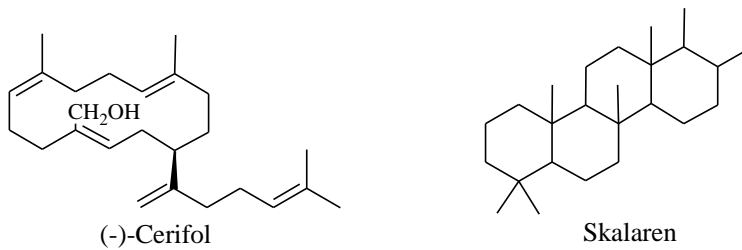
Şekil 2.7. Farnesan ve dendrolasinin açık yapıları

Diterpenler dört izopren birimden oluşurlar ve  $C_{20}H_{32}$  moleküler formülüne sahiptirler. Çeşitli farmakolojik etkilere sahiptirler ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Yaklaşık olarak 5000 adet doğal asiklik ve siklik diterpenler bilinmektedir. Şekil 2.8'de açık yapıları gösterilen kauran ve pitan diterpenlere örnektir [14, 17].



Şekil 2.8. Kauran ve pitanın açık yapısı

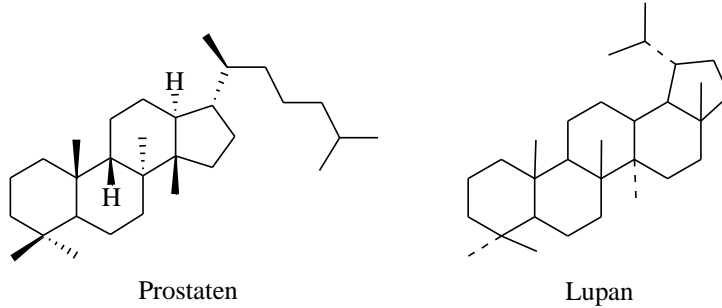
Sesterterpenler, beş izopren birimli, 25 karbonlu terpenlerdir, diğer terpenlere kıyasla enderdirler. Sester ön eki iki buçuk anlamına gelmektedir. 150 den fazla sesterterpen bilinmektedir. Asiklik sesterterpenlerin tipik örnekleri 3, 7, 11, 15, 19-pentametilikosan'dan türemişlerdir. Şekil 2.9'da gösterilen cerifol ve skalaren sesterterpenlere birer örnektir [14].



Şekil 2.9. (-)-Cerifol ve skalarenin açık yapısı

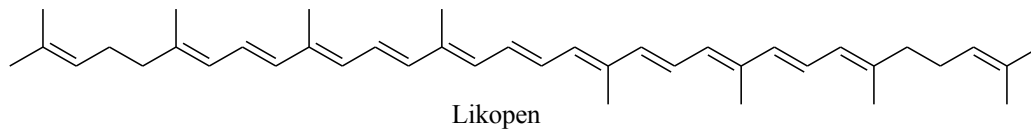
Triterpenler altı izopren birimden oluşurlar ve  $C_{30}H_{48}$  moleküler formülüne sahiptirler. Yaklaşık 5000 kadar doğal triterpen literatürde belirtilmiştir. Bunların çoğu skualen'den türemiştir. Bitkilerde serbest olarak bulunabildikleri gibi

triterpenik saponinler olarak adlandırılan glikozitleri halinde de bulunabilirler. Prostostan ve lupanın Şekil 2.10’da triterpenlere birer örnek olarak verilebilir [14, 17].



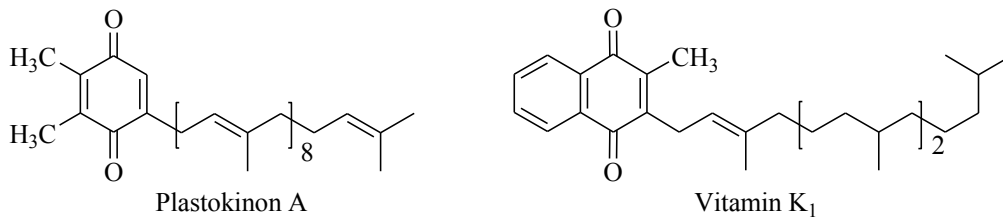
Şekil 2.10. Prostostan ve lupanın açık yapıları

Tetraterpenler, sekiz izopren birimden oluşurlar ve  $C_{40}H_{56}$  moleküler formülüne sahiptirler. Yaklaşık 200 adet doğal tetraterpen bilinmektedir ve karotenoidler olarak adlandırılmaktadırlar. Çünkü bilinen tüm tipik örnekleri  $\beta$ -karotenin başka bir biçimi veya parçalanma ürünüdür. Şekil 2.11’de açık yapısı gösterilen likopenin yanısıra krastaksantin, astaksantin tetraterpenlere örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.11. Likopen’in açık yapısı

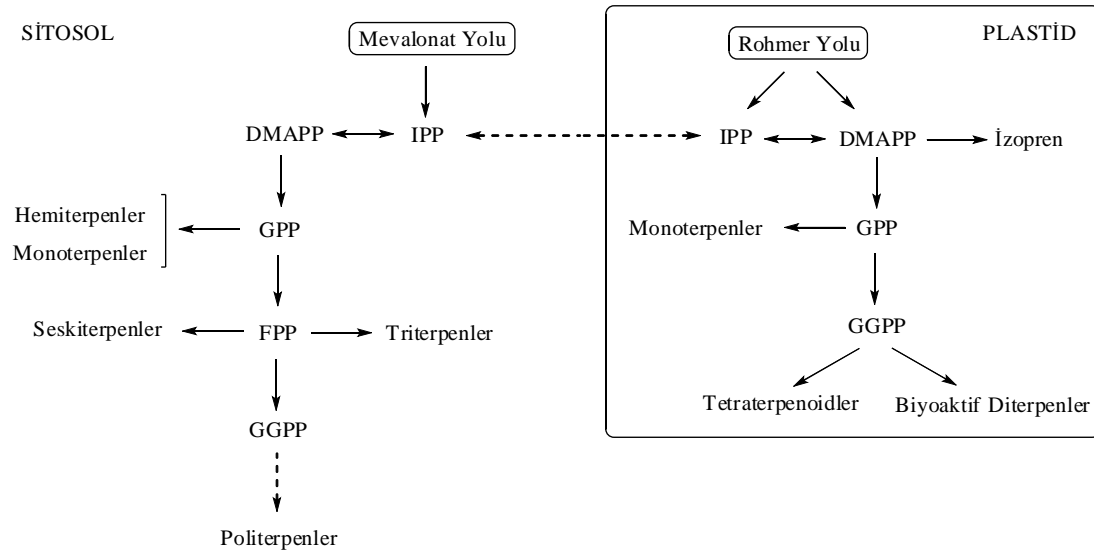
Politerpenler, pekçok izopren birimden oluşan uzun zincirlerdir. Doğal kauçuk, çift bağların *cis* konumlu olduğu bir poliizoprendir. Şekil 2.12’deki plastokinon A, vitamin  $K_1$  politerpenlere verilebilecek birer örnektir [14].



Şekil 2.12. Plastokinon ve vitamin  $K_1$ ’in açık yapısı

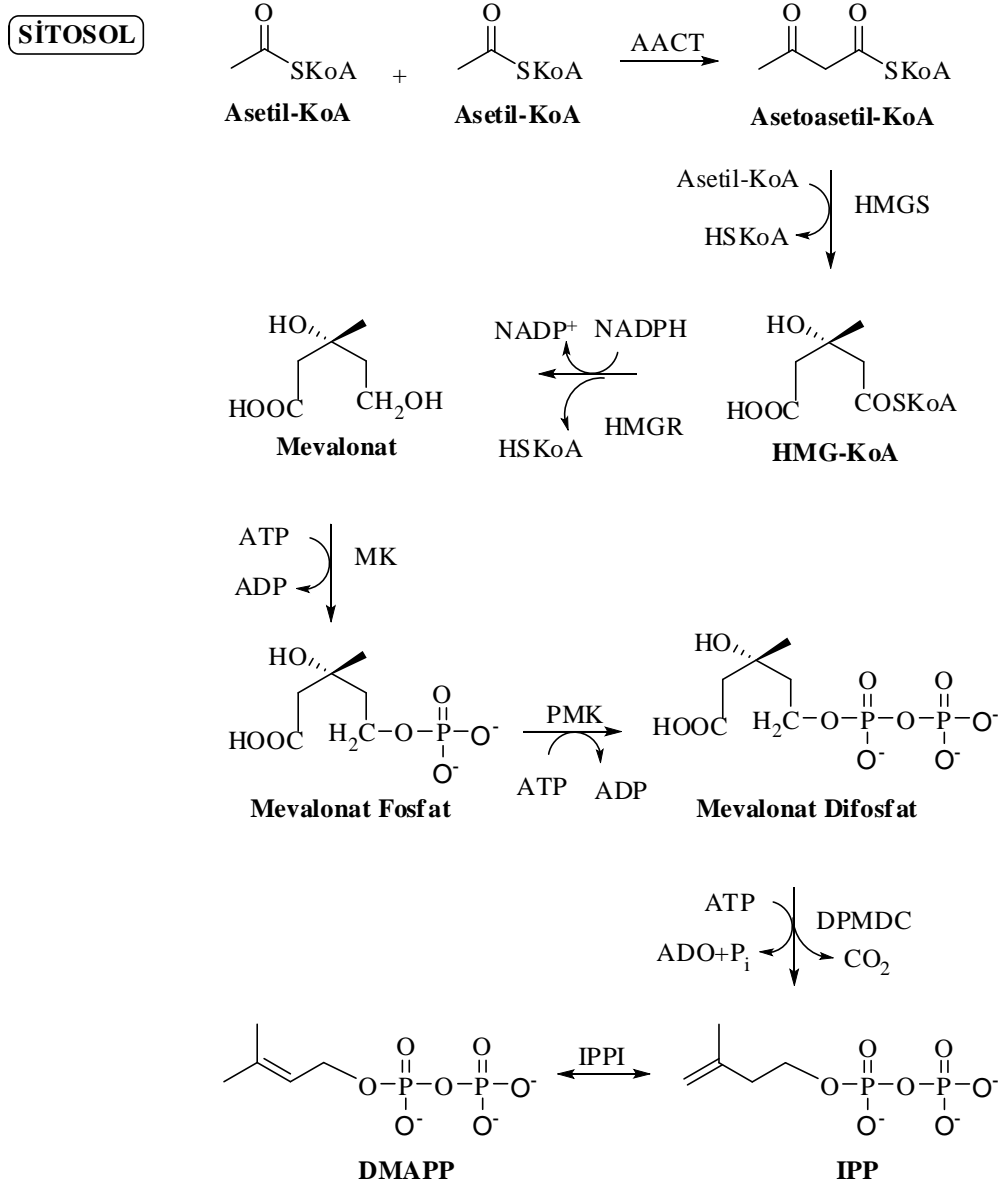
### 2.2.2. Terpenlerin biyosentezi

Terpenoidlerin biyosentezi birçok araştırmanın konusu olmuştur. Terpenoid biyosentezinin hücrenin hangi bölgesinde gerçekleştiği net olarak bilinmemekle birlikte bazı monoterpenoidler, diterpenoidler ve tetraterpenoidler hücrenin plastidlerinde ve seskiterpenoidler ile bazı monoterpenoidlerin ise hücrenin sitosol kısmında sentezlendikleri düşünülmektedir. Özellikle bitkilere has doğal ürünler olan terpenlerin bir bitki hücresi içerisindeki sentezleri Şekil 2.13’de verilmiştir. Bu bölümde daha çok monoterpenlerin biyosentezi üzerinde durulacaktır.



Şekil 2.13. Terpenlerin bitki hücresi içerisindeki sentezleri

Terpenler ve steroidleri oluşturan izopren birimlerinin çıkış maddesi aktive edilmiş asetik asit olarak da bilinen asetil koenzim A bileşiğidir (asetil KoA). İzoprenin bu bileşiklerin yapısına dahil olan aktif formu izopentenil pirofosfattır (IPP). IPP sitozolde gerçekleşen ve Şekil 2.14’deki mevalonat yolu ile plastidlerde gerçekleşen ve Şekil 2.15’de gösterilen Rohmer yolu olmak üzere iki ayrı şekilde sentezlenir.



Şekil 2.14. Mevalonat yolu

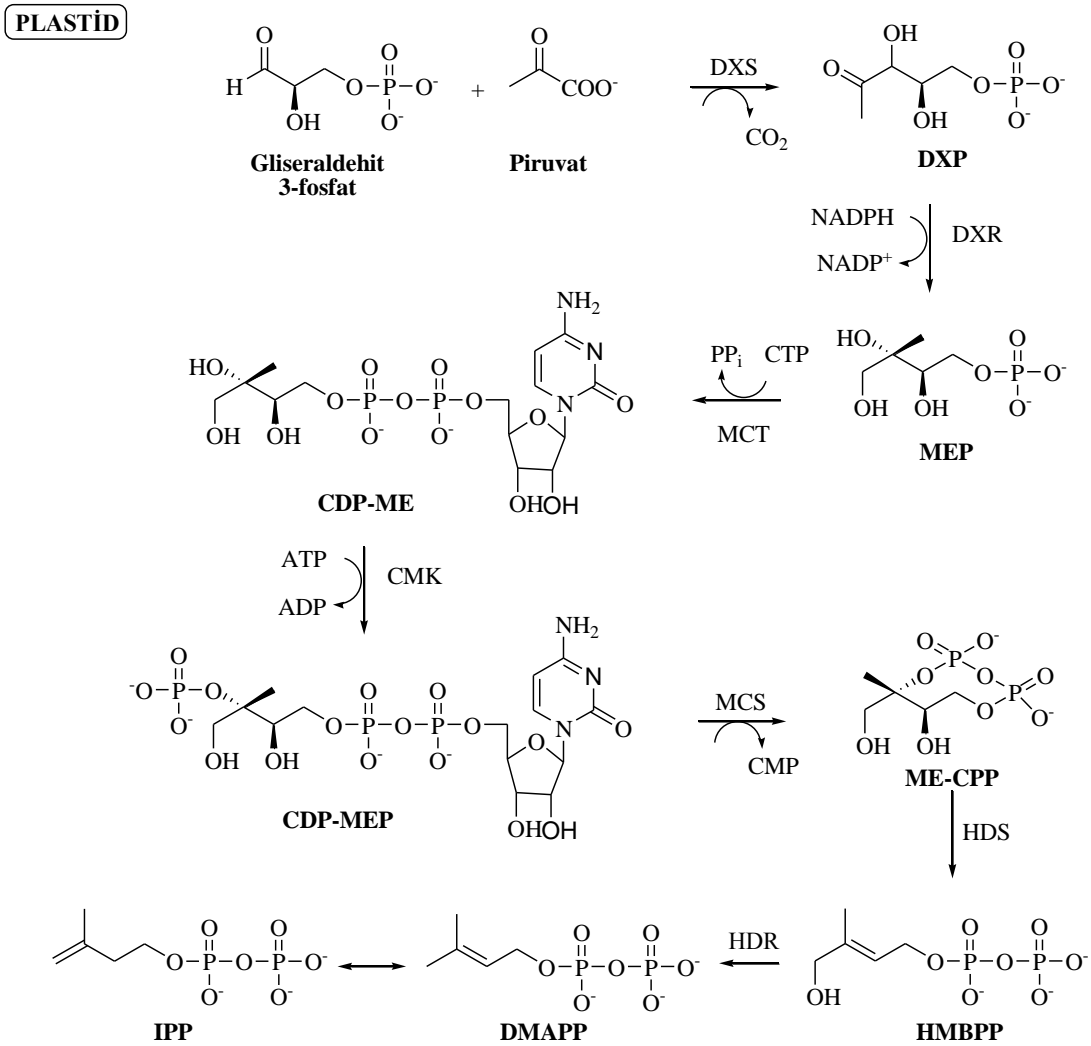
Mevalonat yolunda önce iki asetil KoA molekülü Claisen kondenzasyonuna benzer bir şekilde asetoasetil KoA bileşiğini oluşturmak üzere asetoasetil KoA tiyolaz (AACT) enzimi varlığında reaksiyona girerler. Oluşan asetoasetil KoA bileşiği bir başka asetil KoA ile hidrosimetilglutaril KoA sentaz (HMGs) varlığında reaksiyona girdiğinde altı karbonlu hidrosimetilglutaril KoA (HMG KoA) bileşiği sentezlenir. HMG KoA daha sonra koenzim olarak NADPH kullanan 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA redüktaz (HMGR) ile mevalonata çevrilir. Mevalonata sırasıyla mevalonat kinaz (MK) ve 5-fosfomevalonat kinaz (PMK) enzimleri katalizörlüğünde iki ATP molekülünden iki fosfat grubunun ardı ardına eklenmesi ile oluşan mevalonat

difosfatın, 5-difosfomevalonat dekarboksilaz (DPMDC) varlığında dekarboksilasyonu ve dehidrasyonu neticesinde ise IPP oluşur. IPP bileşiği ise IPP izomeraz (IPPI) enzimi ile dimetilallil pirofosfata (DMAPP) dönüştürülür.

Rohmer yolu plastidlerde gliseraldehit 3-fosfat ile piruvatın 1-deoksi-D-ksiluloz-5-fosfat sentaz (DXS) varlığında kondensasyonu neticesinde 1-deoksi-D-ksiluloz-5-fosfat (DXP) oluşumu ile başlar. DXP bileşiği daha sonra 1-deoksi-D-ksiluloz-5-fosfat redüktoizomeraz (DXR) ile 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) bileşiğine dönüştürülür. Bu bileşik önce 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat sitidil transferaz (MCT) enzimi etkisi ile 4-(sitidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) bileşiğine çevrildikten sonra 4-(sitidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinaz (CMK) ile fosforillenerek 2-fosfo-4-(sitidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritole (CDP-MEP) çevrilir. Oluşan bileşik önce 2-C-metil-D-eritritol-2,4-siklodifosfat sentaz (MCS) ile 2-C-metil-D-eritritol-2,4-siklodifosfata (ME-CPP) daha sonra ise 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-bütenil-4-difosfata sentaz (HDS) ile de 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-bütenil-4-difosfata (HMBPP) çevrilir. HMBPP bileşiği ise 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-bütenil-4-difosfat redüktaz (HDR) ile birbirlerine dönüşebilen IPP ve DMAPP bileşiklerine çevrilir [18].

DMAPP bünyesindeki elektrofilik allilik metilen grubu ve IPP bünyesindeki nükleofilik metilen grubu birleşerek bir monoterpen olan ve diğer monoterpenlerinde başlangıç maddesi olan geranilpirofosfatı (GPP) oluşturur.

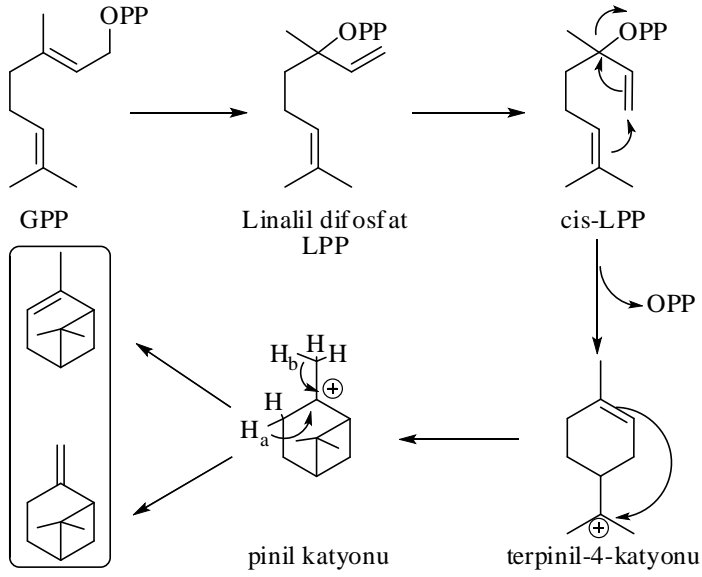




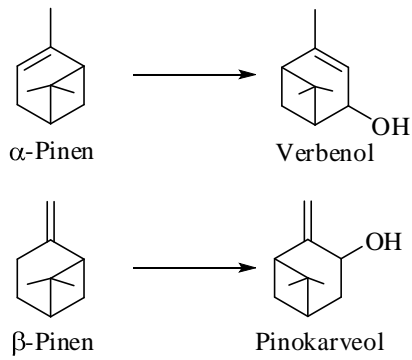
Şekil 2.15. Rohmer yolu

GPP bileşiğinin çeşitli monoterpenlere dönüştürülmesi bazı özgün monoterpen sentaz enzimlerince katalizlenir. Yapılan çalışmalar her bir enantiyomerin oluşumu esnasında en az iki enzimatik yolun söz konusu olduğunu göstermiştir. Örneğin pinan monoterpenoidlerinin biyosentezi GPP'nin  $\alpha$ -terpinil kationuna linalil difosfat (LPP) üzerinden isomerizasyonu ve halkalaşması ile başlar. LPP'nin sentezlenmesini gözlemek için pek çok uğraş verilse de varlığı kabul edilen bu ara ürün henüz tespit edilememiştir.  $\alpha$ -Terpinil kationunun sikloheksenil çift bağına bir Markovnikov katılması ile pinil kationu oluşur. Daha sonra Şekil 2.16'da gösterildiği gibi pinil kationu komşu metilenden veya metil grubundan proton kaybederek sırasıyla  $\alpha$ -pinen veya  $\beta$ -pinen bileşiklerini oluşturur.  $\alpha$ -Pinenin her iki enantiyomeri de doğal olarak oluşurken,  $\beta$ -pinen neredeyse her zaman enantiomerce saf ve (-)-enantiomeri

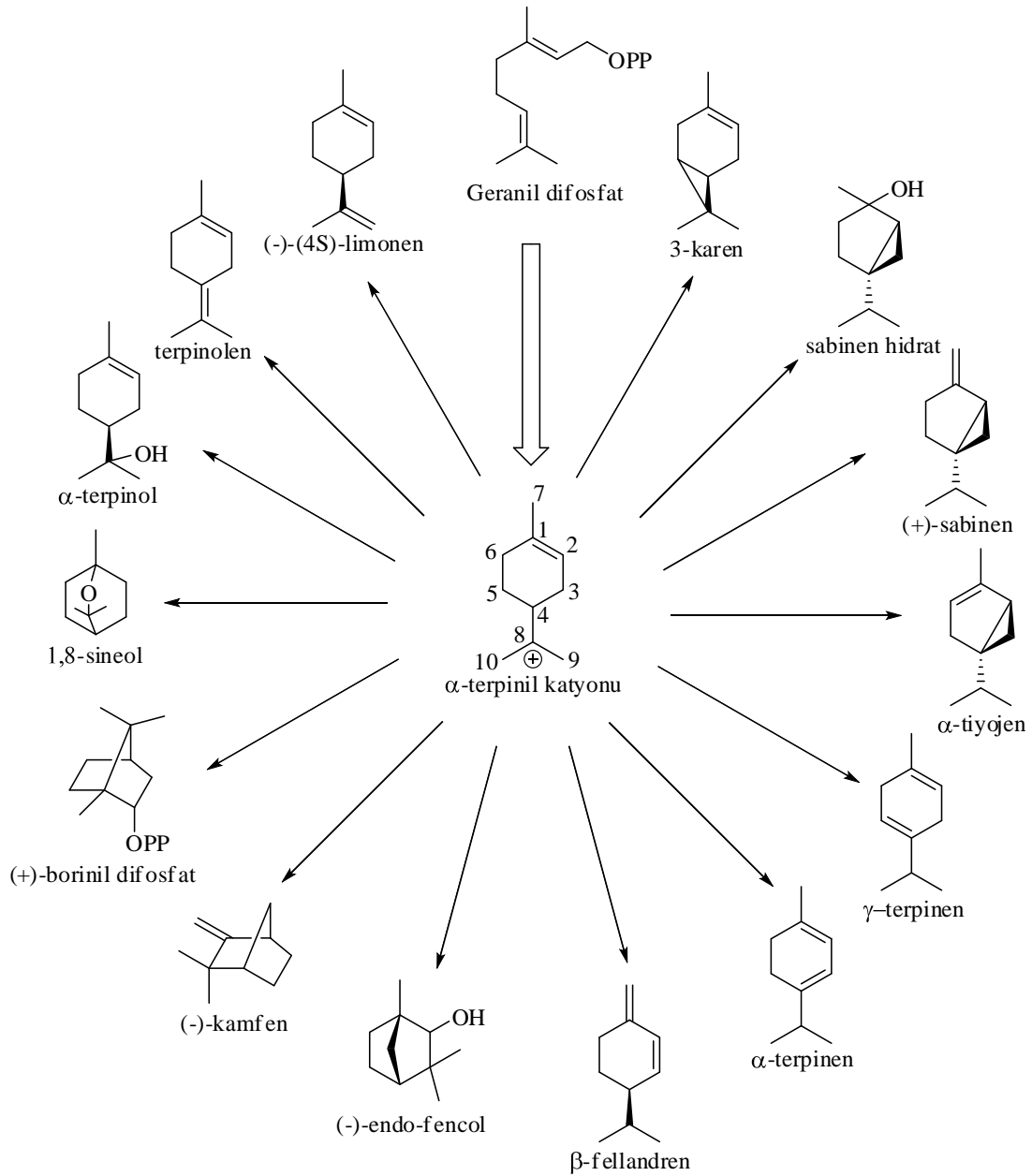
halinde oluşur. Bu oluşan ilk ürünler daha sonra bazı enzimatik reaksiyonlar ile oksijenlenmiş yeni ürünlere (monoterpenoidlere) dönüşürler. Örneğin verbenol ve pinocarveol gibi pınan monoterpeneoidleri Şekil 2.17’de gösterildiği gibi sırasıyla  $\alpha$ -pinen veya  $\beta$ -pinen bileşiklerinden oluşurlar.  $\alpha$ -Terpinil kationundan oluşan diğer monoterpene ve monoterpeneoidler Şekil 2.18’de verilmiştir [19].



Şekil 2.16. GPP’den  $\alpha$  ve  $\beta$ -pinen oluşumu



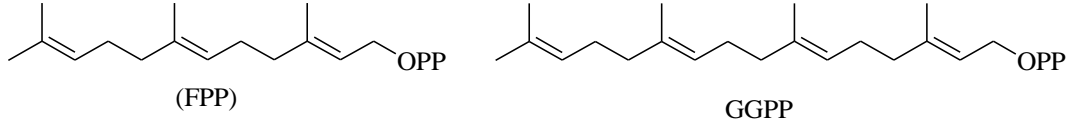
Şekil 2.17.  $\alpha$  ve  $\beta$ -Pinen’lerden sırasıyla verbenol ve pinocarveol biyosentezi



Şekil 2.18.  $\alpha$ -Terpinil kationundan türevlenen bazı monoterpen ve monoterpeneoidler

Şekil 2.16'da yapısı gösterilen GPP diğer bir IPP ile birleşerek bir seskiterpen ve diğer seskiterpenlerin başlangıç maddesi olan farnesilpirofosfatı (FPP) oluşturur. FPP bileşiğinin elektrofilik kuyruk kısmı ile IPP bileşiğinin nükleofilik baş kısmı kondanse olarak bir diterpen ve diğer diterpenlerin başlangıç maddesi olan geranylgeranilpirofosfat (GGPP) bileşiğini oluşturur. Sesterterpenlerin biyosentezi bir adet IPP bileşiğinin GGPP ile başa kuyruk ilavesi şeklinde birleşmesi ile gerçekleşir. İki adet FPP bileşiğinin kuyruk kuyruğa birleşmesi ile ise bir triterpen olup ve diğer triterpenler ile steroidlerin çıkış maddesi olan skualen oluşur. Benzer bir şekilde iki

adet GGPP bileşiğinin kuyruk kuyruğa birleşmesi ile ise tetraterpenler sentezlenir. Politerpenler ise ikiden fazla GGPP biriminin kuyruk kuyruğa birleşmesi ile sentezlenir. Yukarıda bahsedilen FPP ve GGPP bileşiklerinin yapısı Şekil 2.19'da gösterilmiştir [14, 18].



Şekil 2.19. FPP ve GGPP bileşiklerinin açık yapıları

### 2.2.3. Terpenlerin biyotransformasyonu

Terpenler ve terpenoidler pahalı olmayan, kolayca temin edilebilen ve yenilenebilir doğal maddelerdir. Özellikle monoterpenler ve monoterpenoidler doğal aroma kimyasallarının üretiminde kullanılacak çok geniş bir ürün yelpazesine sahiptir [20]. Buna rağmen söz konusu bileşiklerin uçuculuğu, sudaki düşük çözünürlüğü, kendiliğinden yükseltgenebilmeleri ve hücreler için genellikle toksik olmaları sebebi ile monoterpenlerin etkin bir şekilde kullanımını sınırlamaktadır [21].

Monoterpenlerin biyotransformasyonu, enantiyomerce saf hoş tat ve kokulara sahip bileşiklerin ılıman koşullar altında elde edilmesine olanak sağladığı için ilgi çeken bir konudur. Biyotransformasyon prosesi ile elde edilen ürünler doğal ürün olarak düşünülebilmektedir. Son zamanlarda doğal aroma kimyasallarının biyoteknolojik üretimi tüketicilerin doğal ve sağlıklı ürünleri talep etmeleri nedeniyle rağbet görmeye başlamıştır. Sentetik tatlandırıcılar yerine doğal tatlandırıcılara gösterilen ilgi araştırmaların biyotatlandırıcılar olarak adlandırılan ürünlerin mikrobiyal üretimine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu proseslerden sadece bazıları ticari olarak kullanılmaktadır. Dünya üzerinde kullanılan tatlandırıcı ve esansların neredeyse %80'i halen kimyasal olarak üretilmektedir. Buna rağmen Almanya'da 1990'lı yıllarda tüm yiyecek tatlandırıcılarının %70'e yakını doğal olarak kullanılmıştır [22].

Literatür çalışmaları terpenlerin biyotransformasyonlarının enzimler, hücre ekstraktları, canlı bakteriler, mavi-yeşil su yosunları, mayalar, mikroalgler, küfler kullanılarak yapıldığını göstermektedir. Serbest ve immobilize edilen enzimlerin her ikisi de terpenlerin biyotransformasyonlarında kullanılmaktadır. Amaca uygun enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması hem pahalı hem de zor olabilmektedir. Canlı hücreler ile biyokataliz izole enzimlere göre hem daha ucuz hem de daha basit olabilir, fakat reaksiyon ortamına yan ürünler bırakabilmektedir. Canlı hücrelerde hücre zarları ve duvarları enzimleri olumsuz faktörlere karşı korurlar ve hücre içinde kofaktörlerin belirli koşullar altında yenilenebilmektedir. Canlı hücreler ile bir seri reaksiyon gerçekleştirilebilir. Buna rağmen canlı hücreler ile biyotransformasyonun kontrolü ve tekrarlanabilirliği, enzimatik prosese göre daha zordur ve yan reaksiyonlar meydana gelebilir. Hücreler serbest veya sabitlenmiş halde kullanılabilir. Son zamanlarda yapılmış olan terpenlerin üretimi ve biyotransformasyonlarına yönelik çalışmaların neredeyse üçte ikisinde bakteriler ve mantarlar kullanılmıştır. Söz konusu çalışmaların sadece %7'si immobilize enzimler ile gerçekleştirilmiştir [15, 23].

#### **2.2.4. Bazı önemli monoterpenoidler**

Monoterpenler özellikle bitkiler tarafından oluşturulurlar. Bir yılda ağaçlardan salınan terpen emisyonu  $4,8 \times 10^4$  g olarak tahmin edilmektedir. Yapraklar kuru kütlelerinin %9'undan fazlasında monoterpen içerirler ve kuruyup dökülmeleri ile de sediment ve topraklar için organik madde kaynağı olurlar. Yaşlı sediment katmanlarında monoterpenlerin olmamasının nedeni, atmosfere difüzyon olmalarıdır. Monoterpen hidrokarbonlarının sudaki çözünürlüğü 20-50  $\mu\text{M}$ 'dir. Monoterpenler hücreler için toksiktir ve otoburlara karşı savunma için kullanıldıklarına inanılmaktadır [24].

Monoterpenler özellikle şahsi bakım ürünlerinde ve evlerde kullanılan genel temizlik malzemelerinde esans maddesi olarak, zararlı böceklerle doğal mücadelede, absisik asit ve A vitamini gibi bazı önemli kimyasalların sentezinde çıkış maddesi olarak, çeşitli gıdalarda ve alkollü-alkolsüz içeceklerin üretiminde katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır [25]. Ayrıca monoterpenler endüstride ozon tabakasına zararlı

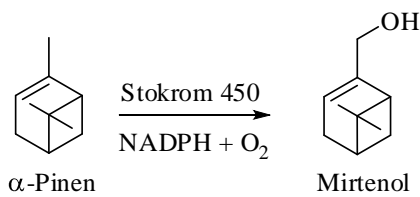
kloroflorokarbon gazları yerine kullanılmaktadır. Elektronik cihazlar ve kabloların temizliği, metallerin yağlardan arıtılması ve uçak malzemelerinin temizlenmesi gibi klorlanmış solventlerin kullanıldığı alanlarda bu temizleyicilerin yerine monoterpenler kullanılabilir [15].

Tezin bu kısmında bazı *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirilecek olan (-)-mirtenol, (-)-nopol, (-)-verbenon,  $\alpha$ -iyonon ve  $\beta$ -iyonon monoterpenoidleri hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.2.4.1. (-)-Mirtenol

(-)-Mirtenol günlük temizlik maddelerinde, deterjanlarda, çeşitli esans maddelerinde şampuanlar ve sabunlar gibi şahsi bakım ürünlerinde kullanılan doğal bir üründür. Dünya üzerinde kullanımı 0,1 tona yaklaşmaktadır [26].

Bitkilerde siklik veya asiklik oksijenlenmiş monoterpenlerin biyosentez yolu stokrom P450 hidroksilaz ve epoksidaz enzimi ile başlatılır [27]. Çileklerin yaydığı kokular üzerine yapılan son araştırmalara göre Şekil 2.20’de gösterilen stokrom P450 enzimi  $\alpha$ -pineni C-10 pozisyonundan mirtenol oluşturacak şekilde allilik hidroksilasyona uğratar [28].



Şekil 2.20. Mirtenol’ün biyosentezi

(-)-Mirtenol bazı fungal biyotransformasyonlara maruz bırakılmıştır. Hanson ve Farooq tarafından *Cephalosporium aphidicola* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmasında (-)-mirtenol’ün mikrobiyal hidroksilasyonu sonucu (-)-4 $\beta$ -10-dihidroksipin-2-en bileşiğini elde etmişlerdir [29]. Noma ve Asakawa ise *Aspergillus niger* kullanarak yaptıkları (-)-mirtenol

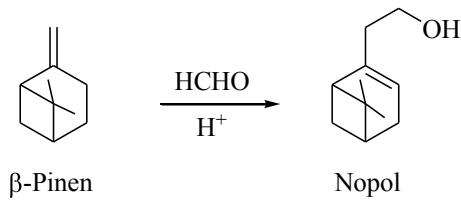
biyotransformasyonunda tek ürün olarak (-)-1-*p*-menten-7,8-diol elde etmişlerdir [30]. Bu çalışmalar Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. (-)-Mirtenol’ün literatürdeki fungal biyotransformasyonları

Başlangıç Maddesi	Mikroorganizma	Ürünler	Referans
(-)-Mirtenol	<i>C. aphidicola</i>	(-)-4 $\beta$ -10-Dihidroksipin-2-en	[29]
(-)-Mirtenol	<i>A. niger</i>	(-)-1- <i>p</i> -Menten-7,8-diol	[30]

#### 2.2.4.2. (-)-Nopol

(-)-Nopol çeşitli pestisidlerin sentezinde çıkış maddesi olarak, şahsi bakım malzemeleri ve genel temizlik maddelerinde ise esans maddesi olarak kullanılan sentetik bir bisiklik primer alkoldür [31]. (-)-Nopol Şekil 2.21’de gösterildiği gibi genelde  $\beta$ -pinen ve *p*-formaldehitin bir katalizör varlığında 150-230 °C arası sıcaklıklarda ısıtılması ile elde edilir [32].



Şekil 2.21. Nopol’ün sentezi

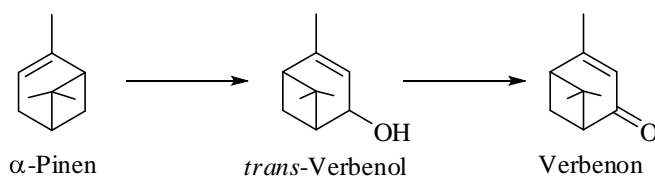
(-)-Nopol üzerinde bazı fungal biyotransformasyonlar gerçekleştirilmiştir. Miyazawa ve arkadaşları (-)-nopol’ün *Glomerella cingulata* ile yaptıkları biyotransformasyon çalışmasında (-)-4-hidroksinopol, 4-okzonopol ve 5-hidroksinopol olmak üzere üç ürün elde etmişlerdir [33]. Hanson ve Farooq tarafından *C. aphidicola* kullanılarak yapılan biyotransformasyon çalışmasında (-)-nopol’ün inkübasyonu sonucunda (-)-4 $\beta$ -metoksinopol ve (-)-4 $\beta$ -hidroksinopol ürünlerini elde etmişlerdir [29]. Noma ve Asakawa ise *A. niger* ile (-)-nopol biyotransformasyonundan tek ürün olarak (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol elde etmişlerdir [30]. (-)-Nopol ile gerçekleştirilen literatürdeki fungal biyotransformasyonlar Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. (-)-Nopol'un literatürdeki fungal biyotransformasyonları

Başlangıç Maddesi	Mikroorganizma	Ürünler	Referans
(-)-Nopol	<i>G. cingulata</i>	(-)-4-Hidroksinopol 4-Okzonopol 5-Hidroksinopol	[33]
(-)-Nopol	<i>C. aphidicola</i>	4 $\beta$ -Metoksinopol (-)-4 $\beta$ -Hidroksinopol	[29]
(-)-Nopol	<i>A. niger</i>	(-)-7-Hidroksimetil-1- <i>p</i> -menten-8-ol	[30]

### 2.2.4.3. (-)-Verbenon

Doğal bir monoterpenoid bisiklik keton olan verbenon *Rosmarinus officinalis*, *Verbena triphylla* ve *Eucalyptus globulus* bitkilerine ait uçucu yağların önemli bir bileşenidir [34]. (-)-Verbenon bitki çayı, baharat ve parfüm olarak kullanılan bir doğal üründür [35, 36]. (-)-Verbenon cam ağaçlarına önemli zararlar veren bir haşereye karşı doğal mücadele için de kullanılmaktadır [37, 38]. (-)-Verbenon ayrıca siklobutil GABA analoglarının, siklobutan karboksilik nükleosit ve oligopeptidlerin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır [39, 40]. Verbenon *Scolytis* türleri tarafından üretilen,  $\alpha$ -pinen'in oluşumu ve takiben verbenolün oksidasyonu ile türediği düşünülen multifonksiyonel bir feremondur.  $\alpha$ -pinen Şekil 2.22'deki gibi allilik pozisyonundan *cis* ve *trans* verbenol oluşturacak şekilde okside edilir. Verbenol'ün oksidasyonu ile de verbenon oluşur [41]. Literatürde (-)-verbenon için herhangi bir fungal biyotransformasyon bildirilmemiştir.



Şekil 2.22. Verbenon'un biyosentezi

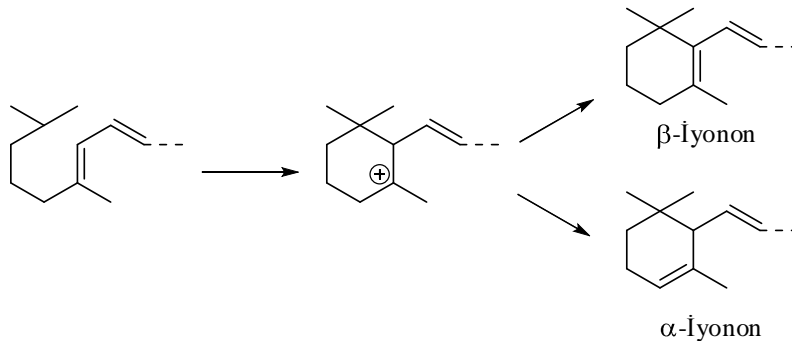
### 2.2.4.4. $\alpha$ -İyonon

İyononlar ve türevleri doğadaki önemli yaygın bileşiklerdendir. Bu bileşikler birçok uçucu yağın temel bileşenleridir ve muhtemelen çeşitli karotenoidlerin kompleks enzimatik proseslerinden oluştukları düşünülmektedir [42, 43]. Birçok bitkinin çiçek, kök, gövde ve meyveleri çeşitli iyononlar ve dihidroiyononlar içerirler. En önemli



iyononlar  $\alpha$ - ve  $\beta$ - iyononlardır [44]. Bu gibi trimetilsiklohegzan halkalı bileşikler, birçok bitkisel kökenli yağın temel aroma maddeleri olmaları sebebi ile gıda ve parfümeri endüstrilerinin dikkatini çekmektedir [45]. Ayrıca  $\alpha$ - ve  $\beta$ -iyononlar biyolojik açıdan önemli birçok bileşiğin çıkış maddeleridir [46].

$\alpha$ -İyonon ve bir diğer önemli iyonon bileşiği olan  $\beta$ -iyonon halkaları, ilk halkalaşma tepkimesinde sonra oluşan karbonyum iyonunu kararlı kılacak şekilde farklı protonların kaybedilmesiyle oluşur. Asiklik öncüde bulunan C-2'ye proton atağı ile halkalaşma başlar ve oluşan karbonyum ara ürünü proton kaybederek nötralize olur. Karbonyumdan Şekil 2.23'de gösterildiği gibi C-4'ten hidrojen ayrılması ile  $\alpha$ -iyonon oluşurken C-6'dan hidrojen ayrılması ile  $\beta$ -iyonon oluşur [47].



Şekil 2.23.  $\alpha$ - ve  $\beta$ -İyonon bileşiklerinin biyosentezi

$\alpha$ -İyonon üzerinde birçok fungal inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Krasnobajew bir çalışmada  $\alpha$ -iyononun *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469 ile biyotransformasyonu sonucunda hanımeli çiçeği aroması veren birtakım bileşiklerin karışımını elde etmiştir [48]. Krasnobajew ve Rytcoonen'in bir diğer çalışmada *Lasiodiplodia theobromae* IFO 6499 ise  $\alpha$ -iyononu da etkin bir şekilde ana ürünler olarak 3-hidroksi ve 3-okzo- $\alpha$ -iyonon gibi bileşiklerine dönüştürmüştür [49].

Yamazaki ve arkadaşları *A. niger* JTS 191 ile  $\alpha$ -iyonon ve diğer bazı bileşiklerin biyotransformasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmadan ana ürün olarak *cis*- ve *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyononlar ile 3-okzo- $\alpha$ -iyononlar elde edilmiştir [42]. Noma ve arkadaşları, birisi *A. niger* JTS 191 olmak üzere 10 farklı *Aspergillus* türü ile  $\alpha$ -iyononun biyotransformasyonlarını çalışmışlardır. *A. niger* JTS 191 ile elde edilen

sonuçlar hemen hemen Yamazaki ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir [48]. Hartman ve arkadaşları *A. niger* ATCC 16888 ve *Cunninghamella blakesleeana* küfleri ile  $\alpha$ -iyononu inkübe etmişlerdir. *A. niger* ile  $\alpha$ -iyononun biyotransformasyonundan 3-okzo- $\alpha$ -iyonon elde edilirken *C. blakesleeana* ile ise 3-okzo- $\alpha$ -iyonol, 3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon ve 3-hidroksi- $\alpha$ -iyonol bileşikleri elde edilmiştir [50]. Pinheiro ve arkadaşları ise *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 ile  $\alpha$ -iyonondan  $\alpha$ -homo-siklogeraniol elde etmişlerdir [51].  $\alpha$ -İyonon'un literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları Tablo 2.4'de özetlenmiştir.

Tablo 2.4.  $\alpha$ -İyonon'un literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları

Başlangıç Maddesi	Mikroorganizma	Ürünler	Referans
$\alpha$ -İyonon	<i>L. theobromae</i>	3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon 3-Okzo- $\alpha$ -iyonon	[49]
$\alpha$ -İyonon	<i>A. niger</i>	<i>cis</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon <i>trans</i> -3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon 3-Okzo- $\alpha$ -iyonon	[42]
$\alpha$ -İyonon	<i>A. niger</i>	3-Okzo- $\alpha$ -iyonon	[50]
$\alpha$ -İyonon	<i>C. blakesleeana</i>	3-Okzo- $\alpha$ -iyonol 3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon 3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonol	[50]
$\alpha$ -İyonon	<i>T. cutaneum</i>	$\alpha$ -Homo-siklogeraniol	[51]

#### 2.2.4.5. $\beta$ -İyonon

$\beta$ -İyonon bileşiği makyaj malzemeleri, parfümler, şampuanlar ve banyo sabunları gibi şahsi bakım malzemeleri ve ev temizlik ürünlerinde kullanılan bir bileşiktir.  $\beta$ -İyonon parfüm endüstrisinde sıklıkla kullanılan gül yağının ana aroma bileşiklerindedir [52].

$\beta$ -İyonon bileşiğinin literatüre geçen birçok fungal inkübasyonu bildirilmiştir. Mikami ve arkadaşları  $\beta$ -iyononun *A. niger* JTS 191 ile biyotransformasyonundan (S)-2-hidroksi- $\beta$ -iyonon ve (R)-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon olmak üzere iki ana ürün elde etmişlerdir [53]. Bir diğer çalışmada Mikami ve arkadaşları çok sayıda küf ve mayanın  $\beta$ -iyononu diğer aroma bileşiklerine dönüştürme yeteneklerini, biyotransformasyonlar yolu ile test etmişlerdir.  $\beta$ -iyonon özellikle *Aspergillus*, *Phialophora*, *Rhizopus* türleri ile başarılı bir şekilde diğer aroma bileşiklerine

dönüştürülmüştür. Bunların içinden  $\beta$ -iyonondan yeni aromatik metabolitler üretimine en uygun suş *A. niger* JTS 191 olarak belirlenmiştir [54].

Krasnobajew ve Helmlinger  $\beta$ -iyononun *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570 ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bazı metabolitler elde etmişlerdir ve bu metabolitler daha sonra aromalı sigara üretiminde kullanılmıştır [49]. Larroche ve arkadaşları  $\beta$ -iyononun *A. niger* IFO 8541 ile biyotransformasyonu sonucunda ana ürün olarak 4-hidroksi- $\beta$ -iyonon verirken yan ürünler olarak da 2-hidroksi- $\beta$ -iyonon, 4-hidroksi- $\beta$ -iyonon ve 2-okzo- $\beta$ -iyonon bileşiklerini vermiştir [55].

Hartman ve arkadaşları *A. niger* ATCC 16888 ve *Cunninghamella blakesleeana* küfleri ile  $\beta$ -iyononu inkübe etmişlerdir. *A. niger* ile 4-hidroksi- $\beta$ -iyonon ve 4-okzo- $\beta$ -iyonon bileşikleri elde edilmiştir. *C. blakesleeana* ise 4-okzo- $\beta$ -iyonol ile 4-okzo-7,8-dihidro- $\beta$ -iyonon bileşikleri elde edilmiştir [50]. Pinheiro ve arkadaşları *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 ile  $\beta$ -iyonon'dan 4-okzo-7,8-dihidro- $\beta$ -iyonon elde etmişlerdir [51]. Tablo 2.5'de  $\beta$ -iyonon'a ait literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları gösterilmiştir.

Tablo 2.5.  $\beta$ -İyonon'un literatürdeki bazı fungal biyotransformasyonları

Başlangıç Maddesi	Mikroorganizma	Ürünler	Referans
$\beta$ -İyonon	<i>A. niger</i>	(S)-2-Hidroksi- $\beta$ -iyonon (R)-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon	[53]
$\beta$ -İyonon	<i>A. niger</i>	4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon 2-Hidroksi- $\beta$ -iyonon 4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon 2-Okzo- $\beta$ -iyonon	[55]
$\beta$ -İyonon	<i>A. niger</i>	4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon 4-Okzo- $\beta$ -iyonon	[50]
$\beta$ -İyonon	<i>C. blakesleeana</i>	4-Okzo- $\beta$ -iyonol 4-Okzo-7,8-dihidro- $\beta$ -iyonon	[50]
$\beta$ -İyonon	<i>T. cutaneum</i>	4-Okzo-7,8-dihidro- $\beta$ -iyonon	[51]

### 2.3. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarisii* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri ile (-)-mirtenol, (-)-nopol, (-)-verbenon, ( $\pm$ )- $\alpha$ -iyonon ve  $\beta$ -iyonon monoterpoidlerinin biyotransformasyonlarının incelenmesidir.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Nüve OT 020 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, Shimadzu IR Prestige-21 spektrometre cihazı ile alındı. Optik rotasyon ölçümleri WXG-4 polarimetre cihazı ile alındı. <sup>1</sup>H-NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. <sup>13</sup>C-NMR ve <sup>13</sup>C DEPT NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Kolon kromatografisi için Merck kalite (107734) silika jel 60 (230-400 mesh) kullanıldı. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografisi çalışmaları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi kullanılarak yapıldı. Bileşikler *p*-anisaldehit-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaktifine daldırıldıktan sonra 120 °C'de üç dakika ısıtılarak görünür hale getirildi.

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan *Aspergillus tamarii* MRC 72400, *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 kültürleri TUBİTAK MAM Kurumu'ndan yatık agar kültürü şeklinde birer adet stok kültür olarak temin edildi.

Çalışmada biyotransformasyonları gerçekleştirilen (-)-nopol, (-)-mirtenol, (-)-verbenon, (±)α-iyonon ve β-iyonon bileşikleri Sigma-Aldrich Şirketi ve Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden tedarik edildi.

## **3.2. Deneysel Çalışmalar**

### **3.2.1. Taze yatık agar kültürlerin hazırlanması**

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

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

### **3.2.2. Biyotransformasyon çalışmalarına hazırlık**

Hazırlanmış olan 1 L besiyeri çözeltisi 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Küf içeren erlenin muhtevassından diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL nakledildikten sonra bu erlenler de yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün süresince 30 °C'de inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.3. Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek substratın ilave edilmesi**

Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek her bir monoterpenoid (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözülerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra, 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.4. Bileşiklerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması**

İnkübasyon tamamlandıktan sonra besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutularak küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Erlenindeki süzüntü ile her seferinde etil asetat (1 L) kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat ilave edilerek ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde elde edildi. Her bir biyotransformasyon çalışması için başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması gerçekleştirildi. Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda kromatografi çalışmalarında çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Başlangıç maddeleri %30'luk çözgen sistemi ile metabolitler ise %50'lik çözgen sistemi kullanılarak kolondan ayrıldı.

### **3.2.5. Bileşiklerin tanımlanması**

Bileşiklerin tanımlanmaları başlangıç maddeleri ile elde edilen her bir maddenin NMR ve FTIR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Metabolitlerin tam stereokimyelerinin tayini için bir polarimetre ile optik rotasyon ölçümleri gerçekleştirildi.

### **3.2.6. Biyotransformasyon çalışmalarının kontrolü**

Herbir biyotransformasyon deneyi üç ayrı kontrol erleni ile takip edildi. İlk kontrol erleninde sadece besiyeri ikinci kontrol erleninde besiyeri ve substratlardan birisi

üçüncü kontrol erleninde ise besiyeri ve mikroorganizma kullanıldı. Her bir kontrol erleni için asıl biyotransformasyon çalışmalarındaki bütün işlemler aynen uygulandı. Bu erlenlerden elde edilen kalıntılardan İTK alınarak asıl deneylerden elde edilen metabolitlerin gerçek biyotransformasyon ürünleri olup olmadığı belirlendi. Ayrıca tüm erlenlerde inkübasyon süresince renk ve koku değişimi olup olmadığı kontrol edildi. Kontrol erlenlerinde asıl biyotransformasyon deneylerinden farklı hiçbir sonuç veya değişim gözlenmedi.

### 3.3. *Aspergillus tamarii* Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları

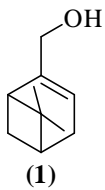
*Aspergillus tamarii* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir [56].

Tablo 3.1. *Aspergillus tamarii* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Glukoz	50,0 g
NaNO <sub>3</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g

#### 3.3.1. (-)-Mirtenol’ün (1) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 3.1’de açık yapısı gösterilen (-)-mirtenol (1) (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 30 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

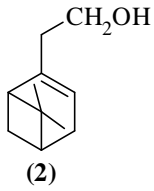


Şekil 3.1. (-)-Mirtenol’ün (1) açık yapısı

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde birisi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip diğeri ise daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Gözlenen bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.3.2. (-)-Nopol'un (2) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 3.2'de açık yapısı gösterilen (-)-nopol (2) (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

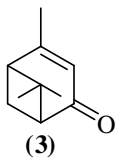


Şekil 3.2. (-)-Nopol'un (2) açık yapısı

Biyotransformasyon sonrasında başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde birisi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip diğeri ise daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.3.3. (-)-Verbenon'un (3) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 3.3'de açık yapısı gösterilen (-)-verbenon (3) (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra, 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.



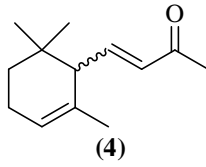
Şekil 3.3. (-)-Verbenon'un (3) açık yapısı



Biyotransformasyon sonrasında başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, birisi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip diğeri ise daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.3.4. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon'un (4) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 3.4'de açık yapısı gösterilen ( $\pm$ )- $\alpha$ -iyonon (4) (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde steril koşullar altında ilave edildikten sonra, 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

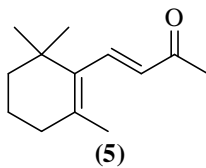


Şekil 3.4. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon'un (4) açık yapısı

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, birisi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip diğeri ise daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.3.5. $\beta$ -İyonon'un (5) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 3.5'de açık yapısı gösterilen  $\beta$ -iyonon (5) (500 mg) etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde steril koşullar altında ilave edildikten sonra, 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.



Şekil 3.5.  $\beta$ -İyonon'un (5) açık yapısı

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, birisi başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip diğeri ise daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.4. *Aspergillus terreus* Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları

*Aspergillus terreus* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir [57].

Tablo 3.2. *Aspergillus terreus* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Glukoz	30,0 g
NaNO <sub>3</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g

#### 3.4.1. (-)-Mirtenol’ün (1) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması gerçekleştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı ve ondan daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

#### 3.4.2. (-)-Nopol’ün (2) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildi ve başlangıç maddesi ile aynı ve ondan daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.4.3. (-)-Verbenon'un (3) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildikten sonra, başlangıç maddesi ile aynı ve ondan daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.4.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik ile ondan daha polar ama birbirleri ile aynı polariteye sahip iki ayrı bileşik olmak üzere üç bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### 3.4.5. $\beta$ -iyonon'un (5) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması gerçekleştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı ve ondan daha polar olmak üzere iki bileşik gözlemlendi. Söz konusu bileşikler kolon kromatografisi ile ayrıldı.

## 3.5. *Aspergillus fumigatus* Küfü ile Monoterpenoidlerin Biyotransformasyonları

*Aspergillus fumigatus* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.3'de verilmiştir [58].

Tablo 3.3. *Aspergillus fumigatus* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Sukroz	30,0 g
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g

### **3.5.1. (-)-Mirtenol'ün (1) *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu**

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik gözlemlendi. Gözlenen bileşik kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### **3.5.2. (-)-Nopol'ün (2) *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu**

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir spot gözlemlendi. Söz konusu bileşik kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### **3.5.3. (-)-Verbenon'nun (3) *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu**

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde, başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik gözlemlendi. Bileşik kolon kromatografisi ile ayrıldı.

### **3.5.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu**

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir spot gözlemlendi. Söz konusu bileşik kolon kromatografisi ile ayrıldı.

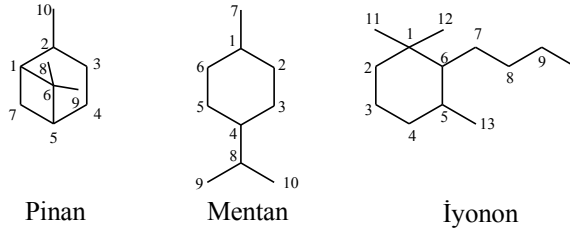
### **3.5.5. $\beta$ -İyonon'un (5) *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu**

Biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde

başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik gözlendi. Gözlenen bileşik kolon kromatografisi ile ayrıldı.

## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Biyotransformasyonlardan elde edilen metabolitlerin yapı tayinleri Bölüm 3’de anlatıldığı gibi bu bileşiklerin optik rotasyonlarının ölçülmesi,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR ve FTIR spektrumlarının alınması ve bu spektrumların başlangıç maddelerine ait  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve FTIR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde gerçekleştirildi. Başlangıç maddeleri ve elde edilen bileşiklerdeki pinan, mentan ve iyonon halkalarının karbon iskeletlerinin numaralandırılması Şekil 4.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Pinan, mentan ve iyonon halkalarının karbon iskeletlerinin numaralandırılması

### 4.1. *Aspergillus tamarii* Küfü ile Biyotransformasyonlar

#### 4.1.1. (-)-Mirtenol’ün (1) *Aspergillus tamarii* küfü ile biyotransformasyonu

Şekil 4.2’de gösterilen (-)-mirtenol (1) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 30 °C ’de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (280 mg) ve (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (6) (56 mg, %10) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-mirtenol (1) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. (-)-Mirtenol (1) ve (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (6) bileşiklerine ait NMR ve FTIR spektrumları ise Şekil A1-A7’de gösterilmiştir.

(-)-1-*p*-menten-7,8-diol (**6**);

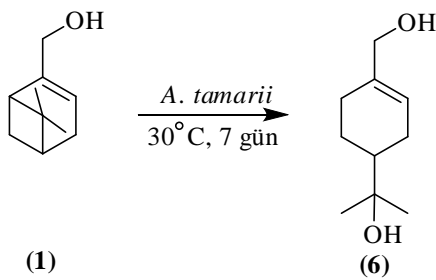
Yağimsı madde

$[\alpha]_D^{20}$  : -30,0°, *c* 0,1, CHCl<sub>3</sub>, (Lit. [59],  $[\alpha]_D^{17}$  : -22,4°, *c* 0,2, CHCl<sub>3</sub>)

IR: 3240, 1665 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,17 (3H, s, H-9); 1,18 (3H, s, H-10); 1,54 (1H, m, H-4); 4,00 (2H, bs, H-7); 5,67 (1H, bs, H-2).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 137,20; 122,63; 73,07; 67,06; 44,94; 27,23; 26,50; 26,50; 26,19; 23,52.



Şekil 4.2. (-)-Mircenol'ün (1) *A. tamarii* küfü ile inkübasyonu

#### 4.1.2. (-)-Nopol'ün (2) *Aspergillus tamarii* küfü ile biyotransformasyonu

Şekil 4.3'de gösterilen (-)-nopol (2) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (50 mg) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (7) (82 mg, % 14,8) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının, (-)-nopol (2) bileşiğinin <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. (-)- Nopol (2) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (7) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A8-A14'de gösterilmiştir.

(-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (7);

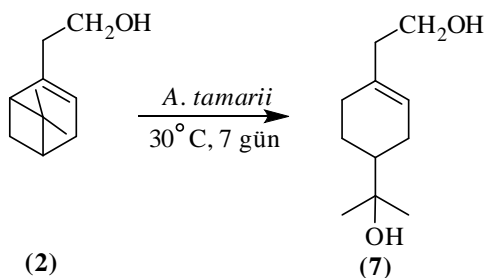
Yağimsı madde

$[\alpha]_D^{20}$  : -28,0°, *c* 0,1, CHCl<sub>3</sub>

IR: 3386, 1670 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,18 (3H, s, H-10); 1,19 (3H, s, H-11); 1,54 (1H, m, H-4); 3,65 (2H, t, *J* = 6.5 Hz CH<sub>2</sub>OH); 5,52 (1H, bs, H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  133,95; 123,68; 72,85; 60,13; 44,88; 40,42; 28,88; 27,35; 26,84; 26,21; 23,80.



Şekil 4.3. (-)-Nopol'ün (2) *A. tamarii* küfü ile inkübasyonu

#### 4.1.3. (-)-Verbenon'un (3) *Aspergillus tamarii* küfü ile biyotransformasyonu

Şekil 4.4'de (-)-verbenon (3) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (90 mg) ve (-)-10-hidroksiverbenon (8) (56 mg, %10,1) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının, (-)-verbenon (3) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. (-)-Verbenon (3) ve (-)-10-hidroksiverbenon (8) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A15-A21'de gösterilmiştir.

(-)-10- Hidroksiverbenon (8);

Yağımsı madde

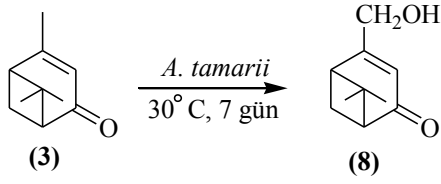
$[\alpha]_D^{20}$  -248,0,  $c$  0,1,  $\text{CHCl}_3$  (Lit. [60],  $[\alpha]_D^{20}$  : -269°,  $c$  0,7,  $\text{CHCl}_3$ )

IR: 3430, 1671  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,00 s, 3H (H-8); 1,50 s, 3H (H-9); 2,10 bs, 1 H (6 $\alpha$ -H); 2,40 t, 1 H,  $J$  (1,6) = 5,3 (H-1); 2,67 m, 1 H (H-5); 2,82 m, 1 H (6 $\beta$ -H); 4,22 m, 2 H ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 5,97 bs, 1 H (H-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,90; 171,56; 117,87; 64,04; 58,28; 54,30; 45,15; 41,00; 26,45; 22,10.





Şekil 4.4. (-)-Verbenon'un (3) *A. tamarii* küfü ile inkübasyonu

#### 4.1.4. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 4.5'de gösterildiği gibi (±)- $\alpha$ -iyonon (4) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 30 °C'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde başlangıç maddesi (200 mg) ve (±)-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (9) (75 mg, %14) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının, (±)- $\alpha$ -iyonon (4) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. (±)- $\alpha$ -İyonon (4) ve (±)-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (9) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A22-A28'de gösterilmiştir.

(±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon (9);

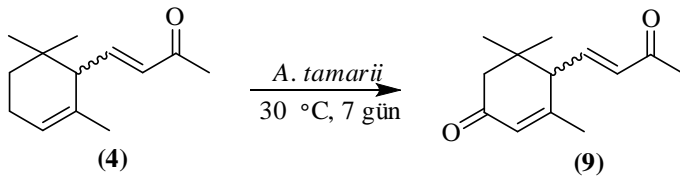
Yağımsı madde

$[\alpha]_D^{20}$ : 0°, *c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$  (Lit. [50]  $[\alpha]_D^{22}$ : 6,5°, *c* 0.6, THF)

IR: 1667  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,0 (3H, s, H-12); 1,06 (3H, s, H-11); 1,89 (3H, bs, H-13); 2,11 (1H, bs, H-2); 2,29 (3H, s, H-10); 2,33 (1H, d,  $J = 16,7$ , H-2); 2,70 (1H, d,  $J = 9,4$ , H-6); 5,96 (1H, bs, H-4); 6,16 (1H, d,  $J = 15,8$ , H-8); 6,63 (1H, dd,  $J = 15,8$ ; 9,7, H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198,39; 197,67; 159,23; 143,63; 133,67; 126,85; 55,33; 47,21; 36,66; 27,85; 27,58; 27,36; 23,52.



Şekil 4.5. (±)- $\alpha$ -İyonon'un (4) *A. tamarii* küfü ile inkübasyonu

#### 4.1.5. $\beta$ -İyonon'un (5) *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu

Şekil 4.6'da gösterilen  $\beta$ -iyonon (5) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde başlangıç maddesi (235 mg) ve ( $\pm$ )-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon (10) (60 mg, %11,1) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının,  $\beta$ -iyonon (5) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.  $\beta$ -iyonon (5) ve ( $\pm$ )-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon (10) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A29-A35'de gösterilmiştir.

( $\pm$ )-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon (10);

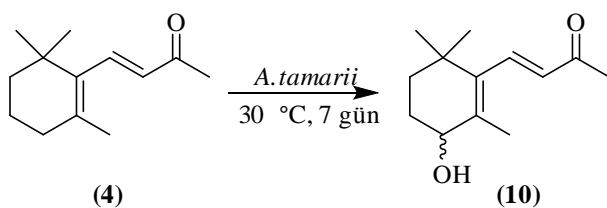
Yağimsı madde

$[\alpha]_D^{20}$  : 0°, *c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$  (Lit. [53]  $[\alpha]_D^{23}$  : -0,61°, *c* 7,86,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

IR: 3430, 1667  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,03 (3H, s, H-11); 1,06 (3H, s, H-12); 1,83 (3H, s, H-13); 2,30 (3H, s, H-10); 3,98 (1H, t, *J* = 4,8, H-4); 6,08 (1H, d, *J* = 16,4, H-8); 7,15 (1H, d, *J* = 16,4, H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198,65; 142,80; 139,22; 133,96; 132,98; 69,76; 34,55; 34,50; 28,75; 28,16; 27,40; 27,30; 18,48.



Şekil 4.6.  $\beta$ -İyonon'un (5) *A. tamarii* küfü ile inkübasyonu

## 4.2. *Aspergillus terreus* Küfü ile Biyotransformasyonlar

### 4.2.1. (-)-Mirtenol'ün (1) *Aspergillus terreus* küfü ile biyotransformasyonu

(-)-Mirtenol (1) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (300 mg) ve (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (6) (38 mg, %6,8) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR

spektrumlarının, (-)-mirtenol (**1**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılarak belirlendi. Elde edilen diolün yapısı ise  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-mirtenol'ün *A. tamarii* ile inkübasyonundan elde edilen metabolitin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Diolün spesifik rotasyonu  $-28^\circ$  olarak belirlendi. (-)-Mirtenol (**1**) ve (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (**6**) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A1-A7'de gösterilmiştir.

#### 4.2.2. (-)-Nopol'ün (**2**) *Aspergillus terreus* küfü ile biyotransformasyonu

(-)-Nopol (**2**) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile  $30^\circ\text{C}$  'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (100 mg) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) (52 mg, %9,4) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-nopol (**2**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla belirlendi. Elde edilen metabolitin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-nopol (**2**) bileşiğinin *A. tamarii* ile inkübasyonundan elde edilen metabolitin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Diolün spesifik rotasyonu  $-26^\circ$  olarak belirlendi. (-)- Nopol (**2**) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A8-A14'de gösterilmiştir.

#### 4.2.3. (-)-Verbenon'un (**3**) *Aspergillus terreus* küfü ile biyotransformasyonu

(-)-Verbenon (**3**) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile  $30^\circ\text{C}$  'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (116 mg) ve (-)-10-hidroksiverbenon (**8**) (44 mg, %8) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-verbenon (**3**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Elde edilen metabolitin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının (-)-verbenon (**3**) bileşiğinin *A. tamarii* ile inkübasyonundan elde edilen ürünün  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Metabolitin spesifik rotasyonu  $-246^\circ$  olarak belirlendi. (-)-Verbenon (**3**) ve (-)-10-hidroksiverbenon (**8**) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A15-21'de gösterilmiştir.

#### 4.2.4. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon'un (4) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

Şekil 4.7'de gösterilen ( $\pm$ )- $\alpha$ -iyonon (4) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde başlangıç maddesi (220 mg) ile aynı polariteye sahip olan *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12) (54 mg, %10) ve *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14) (20 mg, %3,7) bileşikleri elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon (4) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon (4), *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12) ve *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A36-A43'de gösterilmiştir.

*trans*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12);

Yağimsı madde

$[\alpha]_D^{20}$  :  $-2^\circ$ ,  $c$  0.1,  $\text{CHCl}_3$

IR: 3433, 1667  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,88 (3H, s, H-12); 1,02 (3H, s, H-11); 1,36 (1H, dd,  $J = 13,5; 6,4$ , H-2); 1,61 (3H, bs, H-13); 1,80 (1H, dd,  $J = 13,3; 6,0$ , H-2); 2,26 (3H, s, H-10); 2,47 (1H, d,  $J = 10,3$ , H-6); 4,23 (1H, m, H-3); 5,61 (1H, m, H-4); 6,07 (1H, d,  $J = 15,8$ , H-8); 6,49 (1H, dd,  $J = 15,8; 10$ , H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198,12; 147,22; 135,40; 133,59; 125,76; 65,43; 54,20; 43,79; 33,84; 29,26; 27,19; 24,60; 22,67.

*cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14);

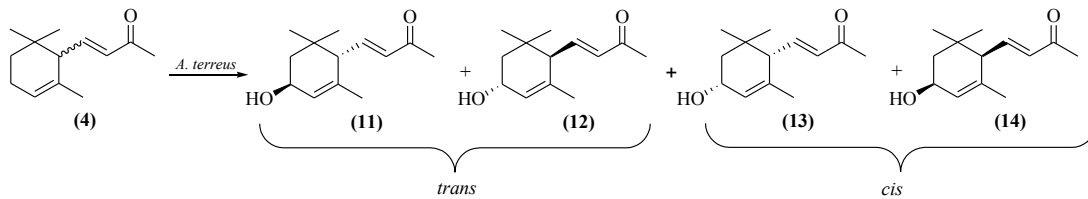
Yağimsı madde

$[\alpha]_D^{20}$  :  $-5^\circ$ ,  $c$  0,1,  $\text{CHCl}_3$

IR: 3433, 1667  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,87 (3H, s, H-12); 0,98 (3H, s, H-11); 1,40 (1H, dd,  $J = 12,9; 9,7$ , H-2); 1,62 (3H, bs, H-13); 1,66 (1H, dd,  $J = 12,9; 6,5$ , H-2); 2,27 (3H, s, H-10); 2,28 (1H, bs, H-6); 4,24 (1H, m, H-3); 6,05 (1H, s, H-4); 6,10 (1H, d,  $J = 15,2$ , H-8); 6,59 (1H, dd,  $J = 15,9; 9,6$ , H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198,55; 147,83; 135,39; 132,67; 126,32; 66,40; 54,22; 40,59; 34,92; 29,09; 27,04; 26,92; 22,41.



Şekil 4.7. (±)-α-İyonon'un (4) *A. terreus* küfü ile inkübasyonu

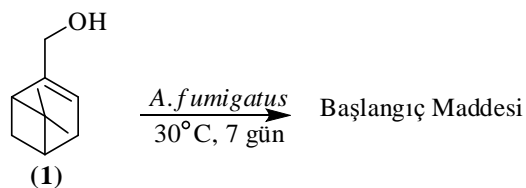
#### 4.2.5. β-İyonon'un (5) *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu

β-iyonon (5) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (293 mg) ve (±)-4-hidroksi-β-iyonon (10) (52 mg, %9,6) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının β-iyonon (5) bileşiğinin <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Elde edilen metabolitin yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının β-iyonon (5) bileşiğinin *A. tamarii* ile inkübasyonundan elde edilen ürünün <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Metabolit herhangi bir spesifik rotasyon göstermedi. β-İyonon (5) ve (±)-4-hidroksi-β-iyonon (10) bileşiklerine ait NMR spektrumları ise Şekil A29-A35'de gösterilmiştir.

### 4.3. *Aspergillus fumigatus* Küfü ile Biyotransformasyonlar

#### 4.3.1. (-)-Mirtenol'ün (1) *Aspergillus fumigatus* küfü ile biyotransformasyonu

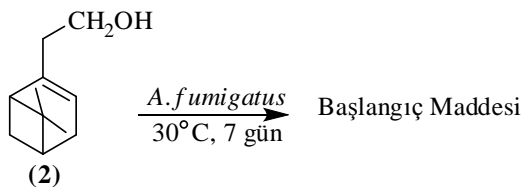
Şekil 4.8'de gösterilen (-)-mirtenol (1) bileşiğinin *A. fumigatus* küfü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (375 mg) ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile (-)-mirtenol'ün <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin başlangıç maddesi olduğu belirlendi



Şekil 4.8. (-)-Mirtenol'ün (1) *A. fumigatus* küfü ile inkübasyonu

### 4.3.2. (-)-Nopol'ün (2) *Aspergillus fumigatus* küfö ile biyotransformasyonu

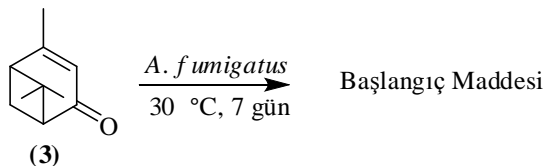
(-)-Nopol (2) bileşiminin Şekil 4.9'da gösterildiği *A. fumigatus* küfö ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (387 mg) ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile (-)-nopol'ün (2) <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları karşılaştırıldığında inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşimin başlangıç maddesi olduğu tespit edildi.



Şekil 4.9. (-)-Nopol'ün (2) *A. fumigatus* küfö ile inkübasyonu

### 4.3.3. (-)-Verbenon'un (3) *Aspergillus fumigatus* küfö ile biyotransformasyonu

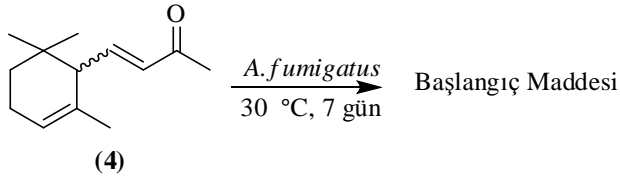
Şekil 4.10'da gösterilen (-)-verbenon (3) bileşiminin *A. fumigatus* küfö ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (398 mg) ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile (-)-verbenon'un (3) <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşimin başlangıç maddesi olduğu anlaşıldı.



Şekil 4.10. (-)-Verbenon'un (3) *A. fumigatus* küfö ile inkübasyonu

### 4.3.4. (±)-α-İyonon'un (4) *Aspergillus fumigatus* küfö ile biyotransformasyonu

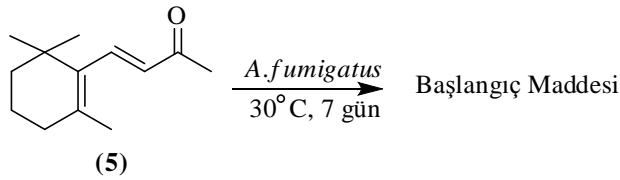
(±)-α-İyonon (4) bileşiminin Şekil 4.11'de gösterildiği gibi *A. fumigatus* küfö ile 30 °C'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (377 mg) ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile (±)-α-iyonon'un (4) <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşimin başlangıç maddesi olduğu tespit edildi.



şekil 4.11. ( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon'un (4) *A. fumigatus* k\u00fcf\u00fc ile ink\u00fcasyonu

#### 4.3.5. $\beta$ -İyonon'un (5) *Aspergillus fumigatus* k\u00fcf\u00fc ile biyotransformasyonu

şekil 4.12'de g\u00f6sterilen  $\beta$ -iyonon (5) bileşiğinin *A. fumigatus* k\u00fcf\u00fc ile 30  $^{\circ}\text{C}$  'de 7 g\u00fcn s\u00fcren ink\u00fcasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (387 mg) ait  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile  $\beta$ -iyonon'un  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi.



şekil 4.12.  $\beta$ -İyonon'un (5) *A. fumigatus* k\u00fcf\u00fc ile ink\u00fcasyonu

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

(-)-Mirtenol (**1**), (-)-nopol (**2**), (-)-verbenon (**3**), ( $\pm$ )- $\alpha$ -iyonon (**4**) ve  $\beta$ -iyonon (**5**) monoterpoidlerinin *A. tamarii*, *A. terreus* ve *A. fumigatus* küfleri ile 7 gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

(-)-Mirtenol'un (**1**) *A. tamarii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumundaki  $\delta_{\text{H}}$  1,17 ve 1,18 ppm'de iki metil grubu rezonansı gözlemlendi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda bileşikteki siklobütül halkası açıldığını ve yeni bir tersiyer hidroksil grubu içerdiğini gösteren  $\delta_{\text{C}}$  27,23 ve 26,19 ppm'de iki metil grubu ve  $\delta_{\text{C}}$  73,07'de yeni bir kuartern C rezonansı gözlemlendi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda 10 C atomu rezonansı gözlenirken  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumunda 2 metil, 4 metilen ve 2 metin C atomu rezonansı gözlemlendi. Metabolit  $-30.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) değerinde bir spesifik rotasyon gösterdi. Bütün bu sonuçlardan metabolitin (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (**6**) olduğu anlaşıldı. Metabolitin spektrumları ve optik rotasyonunun literatür değerleri ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlemlendi [59].

(-)-Mirtenol'un (**1**) *A. terreus* ile biyotransformasyonu da (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (**6**) bileşimini verdi. Bileşimin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının daha önceki biyotransformasyon çalışmasından elde edilen orijinal bileşimin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi. Söz konusu bileşimin spesifik rotasyonu  $-28.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak gözlemlendi.

(-)-Mirtenol'un (**1**) *A. fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşimin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.



(-)-Nopol (**2**)'ün *A. tamarii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumundaki  $\delta_{\text{H}}$  1,18 ve 1,19 ppm'de iki metil grubu rezonansı gözlemlendi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki  $\delta_{\text{C}}$  27,35 and 26,21 ppm'de ise iki metil grubu ve  $\delta_{\text{C}}$  72,85'de yeni bir kuarterner C rezonansı gözlemlendi.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki bu rezonanslardan bileşikteki siklobütül halkasının açıldığı ve metabolitin yeni bir tersiyer hidroksil grubu içerdiği anlaşıldı. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda 11 C atomu rezonansa gelmişken  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumunda ise 2 metil, 5 metilen ve 2 metin C atomunun rezonansa geldiği gözlemlendi. Metabolitin spesifik rotasyonu  $-28.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak belirlendi. Bütün bu sonuçlar metabolitin (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) olduğunu gösterdi. (-)-7-Hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) bileşiğine ait spektrumların literatür değerleri [60] ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlenirken söz konusu bileşik için literatürde verilen herhangi bir spesifik rotasyon değeri tespit edilemedi.

(-)-Nopol (**2**) bileşiğinin *A. terreus* ile biyotransformasyonu da (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) bileşiğini verdi. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının daha önceki biyotransformasyon çalışmasından elde edilen orijinal bileşiğin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi. Söz konusu bileşiğin spesifik rotasyonu  $-26.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak ölçüldü.

(-)-Nopol (**2**) bileşiğinin *A. fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının orijinal başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.

(-)-Verbenon (**3**) bileşiği *A. tamarii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin IR spektrumu  $3430\text{ cm}^{-1}$ 'de yapısında bir hidroksil grubu olduğunu gösteren bir soğurum gösterdi. Başlangıç maddesinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  2,02 ppm'de gözlenen 10-metil rezonansı (s, 3H, H-10)  $\delta_{\text{H}}$  4,22 ppm'deki yeni bir metilen rezonansı ile yer değiştirdi. Başlangıç maddesinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  23,30 ppm'deki metil grubu rezonansının yerine  $\delta_{\text{C}}$  73,07'deki yeni bir sekonder C rezonansı gözlemlendi. Bütün bu sonuçlardan yeni bir primer hidroksil grubunun varlığı anlaşıldı. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda 10 C atomu

rezonansa gelmişken  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumunda ise 2 metil, 2 metilen ve 3 metin C atomunun rezonansa geldiği gözlemlendi. Metabolitin spesifik rotasyonu  $-248.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak ölçüldü. Bütün bu sonuçlar metabolitin (-)-10-hidroksiverbenon (**8**) bileşiği olduğunu kanıtladı. Metabolitin spektrumları ve spesifik rotasyonunun literatür değerleri ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlemlendi [60].

(-)-Verbenon (**3**) *A. terreus* ile biyotransformasyonu da (-)-10-hidroksiverbenon (**8**) bileşiği bileşiğini verdi. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının daha önceki biyotransformasyon çalışmasından elde edilen orijinal bileşiğin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi. Bileşiğin spesifik rotasyonu ise  $-246.0^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak gözlemlendi.

(-)-Verbenon (**3**) bileşiği *A. fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının orijinal başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.

( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon (**4**) bileşiğinin *A. tamaritii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  5,44 ppm'deki 4-H rezonansı metabolitte aşağı bölgeye doğru bir kayma ( $\Delta$  0,52) gösterdi. Benzer şekilde başlangıç maddesinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  122,5 ppm'deki C-4 rezonansı da metabolitte aşağı bölgeye doğru bir kayma ( $\Delta$  4,35) gösterdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  197,67 ppm'de yeni bir kuaterner C atomu rezonansı gözlemlendi. Bütün bu sonuçlardan C-3'de yeni bir karbonil grubunun varlığı tespit edildi. Metabolitin herhangi bir spesifik rotasyon (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) göstermemesi nedeniyle elde edilen bileşiğin ( $\pm$ )-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (**9**) olduğunu anlaşıldı. Metabolitin spektrumlarının literatür değerleri ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlemlendi [42].

( $\pm$ )- $\alpha$ -İyonon (**4**) bileşiğinin *A. terreus* ile biyotransformasyonu sonucunda ise aynı polariteye sahip iki ayrı metabolit elde edildi. İlk metabolit  $\delta_{\text{H}}$  4,23 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  65,40 ppm'de bir hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  65,40 ppm'deki yeni metin C atomu rezonansı, hidroksilasyonun halkada gerçekleştiğini gösterdi. Halkada bu şekilde

hidroksillenebilecek C-2 ve C-3 olmak üzere iki karbon atomu bulunduğu için dikkatler söz konusu karbon atomlarına çevrildi. Normalde C-2'deki bir hidroksilasyonun C-1 geminal metil gruplarından birinin  $\gamma$ -*cis* etkisi ile 4 ile 6 ppm arasında yukarı bölgeye kaymasına sebep olması gerekirken, metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki söz konusu geminal metil rezonanslarından birisi aşağı diğeri ise yukarı bölgeye olmak üzere yaklaşık olarak 2,5 ppm'lik iki ayrı kayma gözlemlendi. Bu sonuçlar hidroksilasyonun C-3'de gerçekleştiğini gösterdi. Metabolitin spesifik rotasyonu  $-2^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) olarak ölçüldü. Bu değer  $0^\circ$ 'ye yakın olması metabolitin bir karışım halinde olabileceğini düşündürdü. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının literatürdeki bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırıldığında elde edilen bileşiğin *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11+12**) olduğu anlaşıldı. Literatürde *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11+12**) için verilen net bir spesifik rotasyon değeri olmamasına rağmen, Yamazaki ve arkadaşlarının söz konusu bileşiğin polarize ışığı sola çevirdiğini belirtmesi bileşiğin yapı tayininin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir [42].

İkinci metabolit de benzer şekilde  $\delta_{\text{H}}$  4,24 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  66,40 ppm'de bir hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  66,40 ppm'deki yeni metin C atomu rezonansının varlığı ilk metabolitteki gibi hidroksilasyonun halkadaki C-2 ve C-3 pozisyonlarından birinde gerçekleştiğini gösterdi. C-2'deki bir hidroksilasyonun C-1 geminal metil gruplarından birinin  $\gamma$ -*cis* etkisi ile 4 ile 6 ppm arasında yukarı bölgeye kaymasına sebep olması gerekirken, metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki söz konusu geminal metil rezonanslarının birisi 2,3 ppm diğeri ise 0,32 ppm olmak üzere aşağı bölgeye doğru iki ayrı kayma gözlemlendi. Bu sonuçlar hidroksilasyonun C-3'de gerçekleştiğini düşündürdü. İkinci metabolitin de  $0^\circ$ 'ye yakın bir spesifik rotasyon ( $-5^\circ$ , c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) vermesi bir karışım halinde olabileceğini düşündürdü. Söz konusu metabolitin  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları literatür değerleri ile karşılaştırıldığında elde edilen bileşiğin *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) olduğu anlaşıldı. Diğer metabolitteki gibi *cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) için de literatürde verilen net bir spesifik rotasyon değeri olmamasına rağmen, Yamazaki ve arkadaşlarının bileşiğin polarize ışığı sola çevirdiğini belirtmesi bileşiğin yapı tayininin doğrular niteliktedir [42].

(±)- $\alpha$ -İyonon'un (**4**) *A. fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.

$\beta$ -İyonon (**5**) bileşiğinin *A. tamarii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  3,98 ppm ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  69,76 ppm'de bir hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  DEPT spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  69,76 ppm'deki yeni metin C atomu rezonansı  $\alpha$ -iyonon metabolitlerindeki gibi hidroksilasyonun başlangıç maddesindeki halkada bulunan metilen karbonlarından birinde gerçekleştiğini düşündürdü. Başlangıç maddesi  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  39,46 ppm'de gözlenen C-2 rezonansı  $\delta_{\text{C}}$  34,55 ppm'e ( $\Delta$  4,91) yukarı bölgeye doğru bir kayma gösterirken başlangıç maddesi  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  18,64 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  33,33 ppm'de gözlenen C-3 ve C-4 rezonansları ise aşağı bölgeye doğru sırası ile  $\delta_{\text{C}}$  28,75 ppm ( $\Delta$  10,11) ve  $\delta_{\text{C}}$  69,76 ppm'e ( $\Delta$  36,43) kayma gösterdi. Bu sonuçlar hidroksilasyonun C-4'de gerçekleştiğini kanıtlar nitelikteydi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  3,98 ppm'deki triplet şeklinde yarıma gösteren rezonansı (1H, t, J= 4,9 Hz) hidroksilasyonun C-4'de olduğunu daha da destekledi. Metabolit herhangi bir spesifik rotasyon göstermedi. Metabolitin spesifik rotasyon göstermemesi ve  $^1\text{H}$  NMR ile  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının var olan literatürle karşılaştırılması sonucunda elde edilen bileşiğin (±)-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon (**10**) bileşiği olduğu anlaşıldı [62, 63].

$\beta$ -İyonon (**5**) bileşiği *A. terreus* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Elde edilen metabolitin (±)-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon (**10**) olduğu  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının daha önceki biyotransformasyon çalışmasından elde edilen orijinal bileşiğin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi. Söz konusu bileşik için de herhangi bir rotasyon gözlenmedi.

$\beta$ -İyonon'un (**4**) *A. fumigatus* ile biyotransformasyonu ise başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının orijinal başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi.

(-)-Mirtenol (**1**) ve (-)-nopol (**2**) bileşiklerinin *A. tamarii* ve *A. terreus* ile inkübasyonları bir diğer *Aspergillus* türü olan *A. niger* ile biyotransformasyonlarına benzer şekilde siklobutil halkası açılmış ve yeni bir tersiyer hidroksil grubu taşıyan sırası ile (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (**6**) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (**7**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [30]. Literatürde (-)-mirtenol (**1**) ve (-)-nopol (**2**) ile aynı sonuçları veren diğer herhangi bir inkübasyon bildirilmemiştir.

*A. tamarii* ve *A. terreus* küfleri (-)-verbenon (**3**) bileşiğinin ilk mikrobiyal hidroksilasyonunu gerçekleştiren küflerdir. (-)-Verbenon'un (**3**) bahsedilen küfler ile inkübasyonları sonucunda elde edilen (-)-10-hidroksiverbenon (**8**) bileşiği çoğu çam ağaçlarında gözlenen doğal fitoaleksinlerden (bitki antibiyotikleri) biridir [64]. (-)-Verbenon (**3**) bileşiğinin insan [34] ve fare [65] karaciğer mikrozomları ile bazı karaciğer mikrozomal sitokrom P450 enzimleriyle [66] gerçekleştirilen inkübasyonları da 10-hidroksiverbenon (**8**) bileşiğini vermiştir.

(±)- $\alpha$ -İyonon (**4**) bileşiğinin *A. terreus* ile inkübasyonu *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11+12**) ve *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) ile sonuçlanırken, aynı bileşiğin *A. tamarii* ile inkübasyonundan sadece (±)-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (**9**) elde edilmesi *A. tamarii* ile inkübasyon esnasında önce *A. terreus* küfündeki gibi hidroksilasyon gerçekleşmiş ve sonrasında ise oluşan bileşikler oksidasyona uğrayarak (±)-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (**9**) bileşiğini verdiği şeklinde yorumlanabilir. *A. terreus* ile (±)- $\alpha$ -iyonon'un (**4**) biyotransformasyonunda elde edilen (±)-3-okzo- $\alpha$ -iyonon (**9**) veya *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11+12**) ile *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) bileşikleri literatürdeki fungal inkübasyonlarda bu bileşiklerin yanında başka bileşiklerle birlikte elde edilmiştir. *A. terreus* ile (±)- $\alpha$ -iyonon (**4**) bileşiğinin biyotransformasyonu neticesinde oluşan *trans*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11+12**), literatürde olduğu gibi *cis*-3-hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) bileşiğinden daha yüksek verimle elde edilmiştir [42].

Literatürde *A. tamarii* ve *A. terreus* ile  $\beta$ -iyonon (**5**) inkübasyonlarındaki gibi (±)-4-hidroksi- $\beta$ -iyonon (**10**) elde edilmese de *A. awamori* [53] gibi bazı küfler ile söz konusu bileşiğin rasemiğe yakın karışımları elde edilmiştir.

*A. tamarii* ve *A. terreus* küflerinin aksine söz konusu monoterpenoidlerin *A. fumigatus* ile inkübasyonlarının hiçbirisinin herhangi bir değişim ile sonuçlanmaması, *A. fumigatus* küfünün bu monoterpenoidleri metabolize edemediğini düşündürdü. Çalışmalar esnasında biyotransformasyon deneyleri ve kontrol erlenlerinde herhangi bir renk ve koku değişimi gözlenmemesi bu sonucu desteklemektedir. Diğer iki küf ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verimler ise *A. tamarii* küfünün bu çalışma için en etkin mikroorganizma olduğunu gösterdi. Buna rağmen her iki küf ile elde edilen verimler literatürdeki çalışmalardaki gibi düşük olduğu gözlemlendi. *A. tamarii* ve *A. terreus* ile elde edilen verimlerin literatürdeki verimler gibi düşük olmasının sebepleri arasında monoterpenoidlerin uçucu olmaları, sudaki düşük çözünürlükleri, kendiliğinden yükseltgenmelerini ve sitotoksik olabilmeleri sayılabilir [21].

Çalışmada kullanılan monoterpenoidlerin aynı küfler ile inkübasyonlarından daha yüksek verimler elde etmek için inkübasyon sıcaklığı, besiyeri bileşenleri, inkübasyon süresi gibi parametrelerin değiştirilmesi, etanol yerine monoterpenoidlerin sudaki çözünürlüğünün artırabilecek diğer yardımcı solventlerin kullanılması ve inkübasyon ortamına sitokrom P450 enzimlerini teşvik edici bazı kimyasalların eklenmesine yönelik çabalar gelecek çalışmalarımız kapsamındadır. Ayrıca çalışmada kullanılan monoterpenoidler ve diğer bazı monoterpenoidlerin benzer çalışmalar için kullanılmamış diğer bazı küfler ile daha önemli sonuçlar ve daha yüksek verimli inkübasyonlarını gerçekleştirmeye yönelik araştırmalarımız sürecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] HANSON, J. R., Natural Products: the Secondary Metabolites, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-2, 2003.
- [2] MANN, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First Edition, Oxford University Press, New York, 2-4, 1994.
- [3] CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P., Organic Chemistry, First Edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [4] HANSON, J. R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 1-62, 1995.
- [5] AKAR, T., Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 10-25, 2005.
- [6] TELEFONCU, A., Bioteknoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1-347, 1995.
- [7] ALGUR, Ö. F., Temel Bioteknoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, 3-6, 1992.
- [8] ARNOLD, L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [9] FABER, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [10] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, 4. Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 92-95, 2005.
- [11] YILDIRIM, K., The Biotransformation and Synthesis of Some Steroids, D. Phil. Thesis, Sussex University, England, 8-81, 2001.
- [12] HOLLAND, H. L., The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids, Chemical Society Reviews, 11, 371-395, 1982.

- [13] SMITH, J. E., *Biotechnology*, Third Edition, Cambridge, Cambridge University Pres., 47-67, 1996.
- [14] BREITMAIER, E., *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Wiley-VCH, 1-118, 2006.
- [15] CARLA, C. C. R., CARVALHO, M., DE MANUELA, R. DA FONSECA, *Biotransformation of Terpenes*, *Biotechnology Advances*, 24, 134–142 2006.
- [16] UMay, A., *Lavandula Stoechas, Melissa Officinalis ve Tribulus terrestris Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 4-11, 2007.
- [17] SÖNMEZ, U., *Salvia Nemerosa L.'nin Terpenoit ve Flavonoit Bileşikleri ile Kimyasal Araştırmalar*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 5-18, 1993.
- [18] BOUVIER, F., RAHIER, A., CAMARA, B., *Biogenesis, Molecular Regulation and Function of Plant Isoprenoids*, *Progress in Lipid Research*, 44, 357–429, 2005.
- [19] DAVIS, E. M., CROTEAU, R., *Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes*, *Topics in Current Chemistry*, 209, 53-95, 2000.
- [20] DEMYTTENAERE, J., DE KIMPE, N., *Biotransformation of Terpenes by Fungi Study of the Pathways Involved*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 265-270, 2001.
- [21] HENRIKSON, M. L., *Biotransformations of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification*, Ph. D. Thesis, 31-32, 2003.
- [22] KRINGS, U., BERGER, R. G., *Biotechnological Production of Flavours and Fragrances*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 1-8, 1998.
- [23] BICAS, J. L., DIONISIO, A. P., PASTORE, G. M., *Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry*, *Chemical Reviews*, 109, 4518-4531, 2009.
- [24] HYLEMON, P. B., HARDER, J., *Biotransformation of Monoterpenes, Bile Acids, and Other Isoprenoids in Anaerobic Ecosystems*, *FEMS Microbiology Reviews*, 22, 475-488, 1999.
- [25] DE-OLIVERIA, A. C.A.X., RIBERIO-PINTO, L. F., PAUMGARTTEN, F. J. R., *In Vitro Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by  $\beta$ -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds*, *Toxicology Letters*, 92, 39-46, 1997.



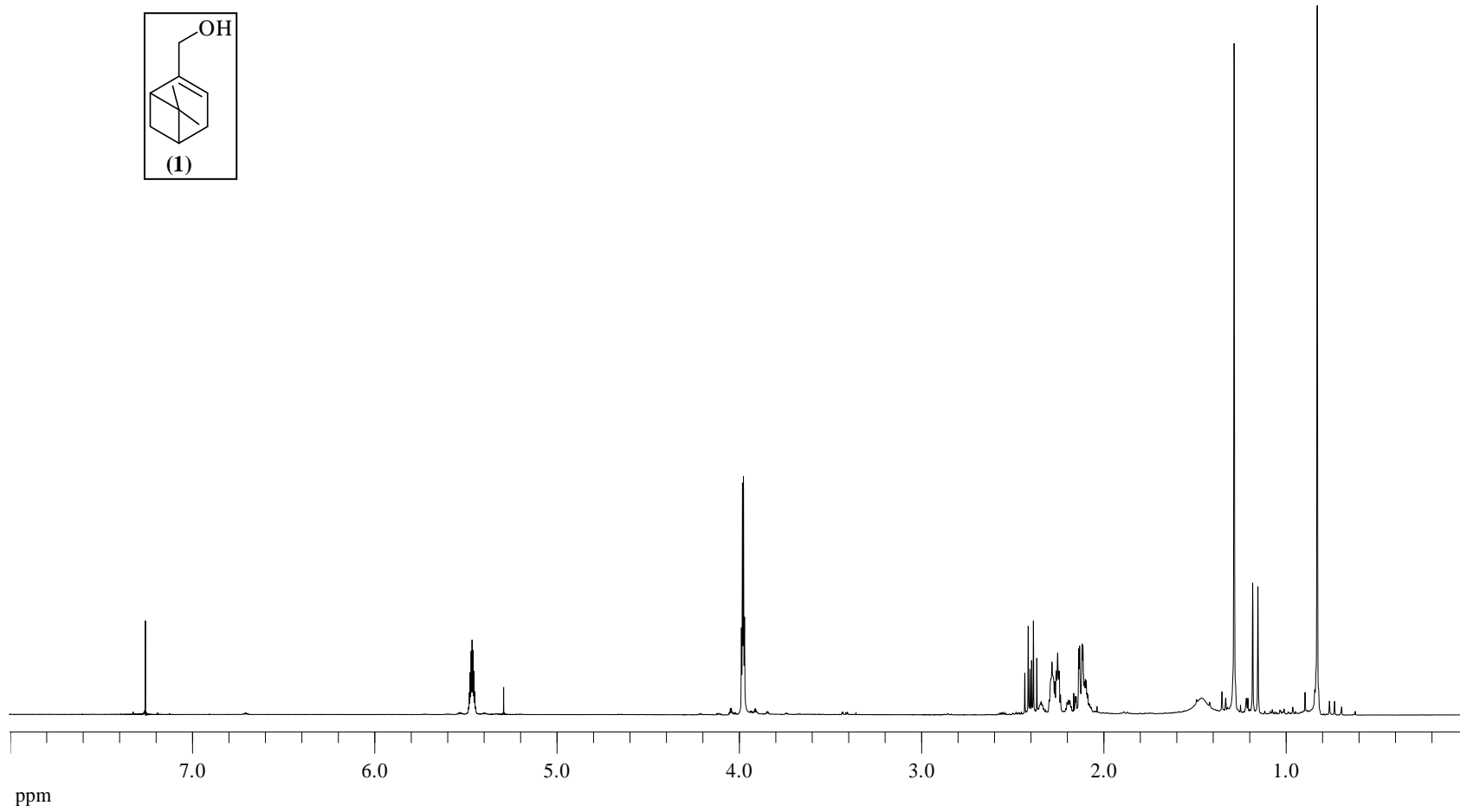
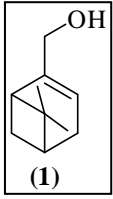
- [26] BHATIA, S. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., API, A. M., *Fragrance Material Review on Myrtenol, Food and Chemical Toxicology*, 46, 237-240, 2008.
- [27] AHARONI, A., ASHOK, P. G., FRANCELE, W. A.V., CINZIA, M., *Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species, The Plant Cell*, 16, 3110–3131, 2004.
- [28] CHRISTOPHER, J. D., CROTEAU, M. R., *Cytochrome P450 Oxygenases of Monoterpene Metabolism, Phytochemistry Reviews*, 5, 373–383, 2006.
- [29] FAROOQ, A., HANSON, J. R., *The Microbial Hydroxylation of Some Pinane Monoterpenoids by Cephalosporium aphidicola, Phytochemistry*, 40, 815-817, 1995.
- [30] NOMA, Y., ASAKAWA, Y., *Microbial Transformation of (-)-Myrtenol and (-)-Nopol, Koryo, Terupen Oyobi Seiyu Kagaku Ni Kansuru Toronkai Koen Yoshishu*, 49, 78-80, 2005.
- [31] SELVARAJ, M., KAWI, S., *Highly Selective Synthesis of Nopol Over Mesoporous and Microporous Solid Acid Catalysts, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 246, 218–222, 2006.
- [32] BAIN, J. P., *Nopol I. the Reaction of  $\beta$ -Pinen with Formaldehyde, Journal of the American Chemical Society*, 68, 638–641, 1946.
- [33] MIYAZAWA, M., SUZUKI, Y., KAMEOKA, H., *Biotransformation (-)-Nopol by Glomerella cingulata, Phytochemistry*, 39, 337-340, 1995.
- [34] MIYAZAWA, M., SUGIE, A., SHINDO, M., *Biotransformation of (-)-Verbenone by Human Liver Microsomes, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 2458-2460, 2002.
- [35] RAVID, U., PUTIEVSKY, E., KATZIR, I., LEWINSOHN, E., DUDAI, N., *Identification of (1R)(+)-Verbenone in Essential Oils of Rosmarinus Officinalis L. on a Chiral-Cyclodextrin Capillary Column, Flavour and Fragrance Journal*, 12, 109-112, 1997.
- [36] GIORGIO, P., MARIANNA, U., PASCALE, B., CLAUDIA, J., FELIX, T., MARIO, C., RICCARDO, C., JOSEPH, C., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Rosemarinus Officinalis L. Oil from Sardinia and Corsica, Folia Pharmacologica Japonica*, 17, 15-19, 2002.
- [37] LINDGREN, B. S., BORDEN, J. H., *Displacement and Aggregation of Mountain Pine Beetles, Dendroctonus Ponderosae (Coleoptera: Scolytidae), in Response to Their Antiaggregation and Aggregation Pheromones, Canadian Journal of Forest Research*, 23, 286-290, 1993.

- [38] COOK, S. M., KHAN, Z. R., PICKETT, J. A., The Use of 'Push-Pull' Strategies in Integrated Pest Management, *Annual Review of Entomology*, 52, 375-400, 2007.
- [39] MOGLIONI, A. G., BROUSSE, B. N., ALVAREZ-LARENA, A., MOLTRASIO, G. Y., ORTUNO, R. M., Stereoselective Synthesis of Cyclobutyl GABA Analogues and Related Compounds from (-)-(*S*)-Verbenone, *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 451-454, 2002.
- [40] ROUGE, P. D., MOGLIONI, A. G., MOLTRASIO, G. Y., ORTUNO, R. M., Stereoselective Synthesis of Chiral Precursors to Cyclobutane Carbocyclic Nucleosides and Oligopeptides, *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 193-195, 2003.
- [41] VANDERWEL, D., Pheromone Biosynthesis by Selected Species of Grain and Bark Beetles, Ph. D. Thesis, University of Victoria, 14-25, 1981.
- [42] YAMAZAKI, Y., HAYASHI, Y., ARITA, M., HIEDA, T., MIKAMI, Y., Microbial Conversion of  $\alpha$ -Ionone,  $\alpha$ -Methylionone, and  $\alpha$ -Isomethylionone, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2354-2360, 1988.
- [43] AGUEDO, M., LY, M. H., BELO, I., TEIXEIRA, J. A., BELIN, J. M., WACHE, Y., The Use of Enzymes and Microorganisms for the Production of Aroma Compounds from Lipids, *Food Technology and Biotechnology*, 42, 327-336, 2004.
- [44] INA, K., ETO, H., Photo-oxygenation of  $\alpha$ -Ionone, *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 1091-1094, 1972.
- [45] LUTZ-WAHL, S., FISCHER, P., SCHMIDT-DANNERT, C., WOHLLEBEN, W., HAUER, B., SCHMID, R. D., Stereo- and Regioselective Hydroxylation of  $\alpha$ -Ionone by *Streptomyces* Strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3878-3881, 1998.
- [46] YANG, M., PENG, Q. R., LAN, J. B., SONG, G. F., XIE, R. G.,  $\text{CaCl}_2$ - or  $\text{MgCl}_2$ -Catalyzed Allylic Oxidations of Ionones-like Dienes, *Synlett*, 16, 2617-2620, 2006.
- [47] WILLIAMS, R. J. H., BRITTON, G. C., GOODWVIN, T. W., The Biosynthesis of Cyclic Carotenes, *Biochemical Journal*, 105, 99-105, 1967.
- [48] DEMTTENAERE, J. C. R., Biotransformation of Terpenoids by Microorganisms, *Studies in Natural Products Chemistry*, 25, 125-178, 2001.
- [49] KRASNOBAJEV, V., HELMLINGER, D., 156. Fermentation of Fragrances: Biotransformation of  $\beta$ -Ionone by *Lasiodiplodia theobromae*, *Helvetica Chimica Acta*, 65, 1590-1601, 1982.

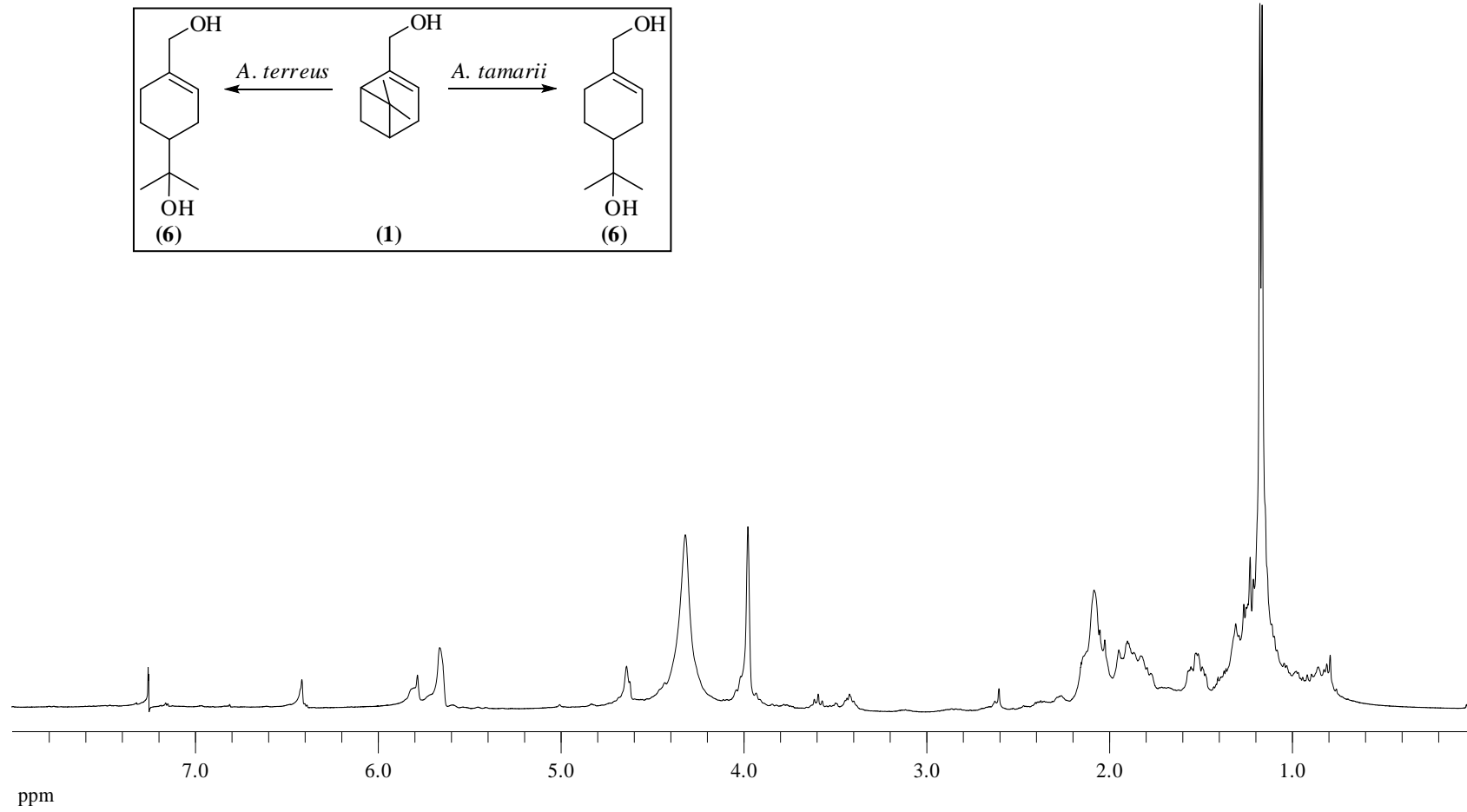
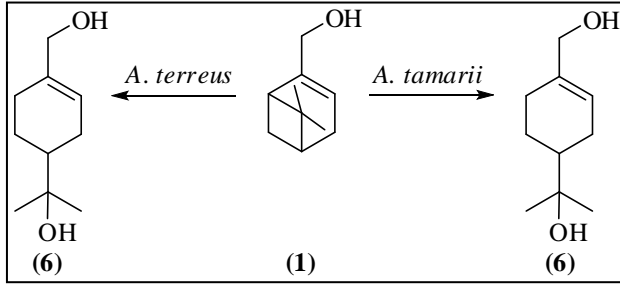
- [50] HARTMAN, D. A., PONTONES, M. E., KLOSS, V. F., CURLEY, R. W., ROBERTSON, L. W., Models of Retionid Metabolism: Microbial Biotransformation of  $\alpha$ -Ionone and  $\beta$ -Ionone, *Journal of Natural Products*, 51, 947-953, 1988.
- [51] PINHEIRO, L., MARSAIOLI, A. J., Microbial Monooxygenases Applied to Fragrance Compounds, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44, 78-86, 2007.
- [52] LALCO, J., LAPCZYNSKI, A., MCGINTY, D., BHATIA, S., LETIZIA, C. S., API, A. M., Fragrance Material Review on *trans*- $\beta$ -Ionone, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 248-250, 2007.
- [53] MIKAMI, Y., WATANABE, E., FUKUNAGA, Y., KISAKI, T., Formation of 2S-Hydroxy- $\beta$ -ionone and 4 $\xi$ -Hydroxy- $\beta$ -ionone by Microbial Hydroxylation of  $\beta$ -Ionone, *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 1075-1077, 1978.
- [54] MIKAMI, Y., FUKUNAGA, Y., ARITA, M., KISAKI, T., Microbial Transformation of  $\beta$ -Ionone and  $\beta$ -Methylionone, *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 610-617, 1981.
- [55] LARROCHE, C., CREULY, C., GROS, J. B., Fed-batch Biotransformation of  $\beta$ -Ionone by *Aspergillus niger*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 222-227, 1995.
- [56] GOULD, B. S., CVII. The Metabolism of *Aspergillus tamaris* Kita. Kojic Acid Production, *Biochemical Journal*, 32, 797- 802, 1938.
- [57] SUBRAHMANYAM, S., KODANDAPANI, N., SHANMUGAM, K., MOOVARKUMUTHALVAN, K., JEYAKUMAR, D., SUBRAMANIAN, T. V., Cyclic Voltametric Measurements of Groeth of *Aspergillus terreus*, *Analytical Sciences*, 17, 481-484, 2001.
- [58] KOSALEC, I., PEPELJNJAK, S., JANDRLIC, M., Influence of Media and Temperature on Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Strains, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 56, 269-273, 2005.
- [59] MIYAZAWA, M., OHSAWA, M., Biotransformation of  $\alpha$ -Terpineol by Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4916-4918, 2002.
- [60] KATO, M., KIDO, F., WATANABE, M., MASUDA, Y., AWEN, B. Z., Preparation of Key Intermediates for the Asymmetric Synthesis of Oxygenated Elemanoids, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 22, 2831-2836, 1993.

- [61] WANG, Z. D, XIAO, Z. Q., CHEN, J. Z., Studies on Synthesis and Oxidation of Nopyl Acetate, *Linchan Huaxue Yu Gongye*, 24, 12-16, 2004.
- [62] KAKEYA, H., SUGAI, T., OHTA, H., Biochemical Preparation of Optically Active 4-Hydroxy- $\beta$ -ionone and Its Transformation to (S)-6-Hydroxy- $\alpha$ -Ionone, *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1873-1876, 1991.
- [63] FERREIA, M. J. P., EMERENCIANO, V. P., LINIA, G. A. R., ROMOFF, P., MACARI, P. A. T., RODRIGUES, G. V.,  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Monoterpenoids, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 33, 153-206, 1998.
- [64] OKU, H., Role of Phytotoxins in Pine Wilt Disease, *Journal of Nematology*, 20, 245-251, 1988.
- [65] MIYAZAWA, M., SUGIE, A., SHIMADA, T., High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of (-)-Verbenone 10-Hydroxylation Catalyzed by Rat Liver Microsomes, *Journal of Chromatography B*, 793, 291-296, 2003.
- [66] MIYAZAWA, M., SUGIE, A., SHIMADA, T., Roles of Human CYP2A6 and 2B6 and Rat CYP2C11 and 2B1 in the 10-hydroxylation of (-)-Verbenone by Liver Microsomes, *Drug Metabolism and Disposition*, 31, 1049-1053, 2003.

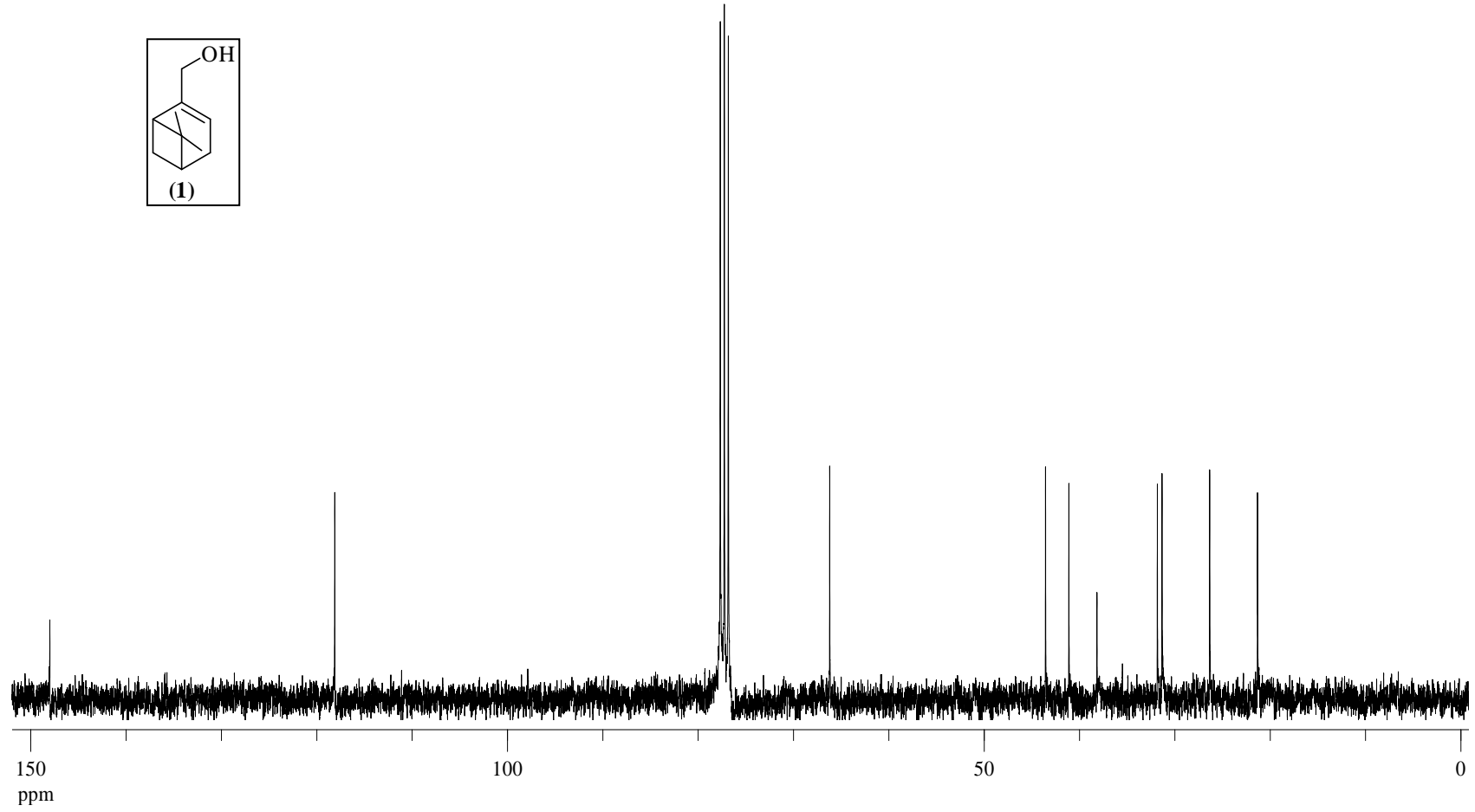
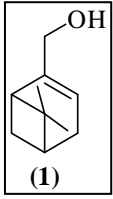
## **EKLER**



Şekil A1. (-)-Mircenol (1)'in <sup>1</sup>H NMR spektrumu

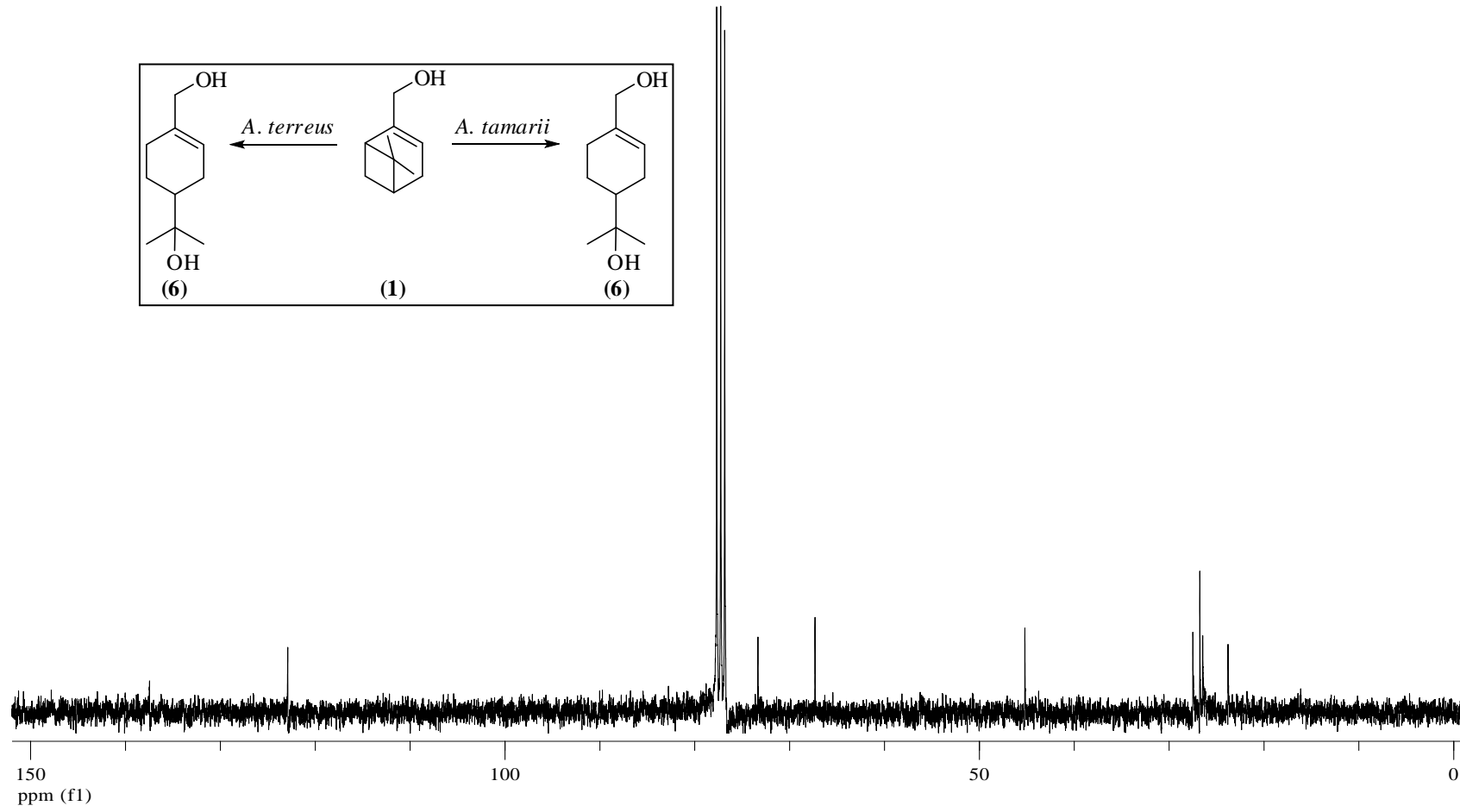


Şekil A2. (-)-1-*p*-Menten-7,8-diol (6) bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

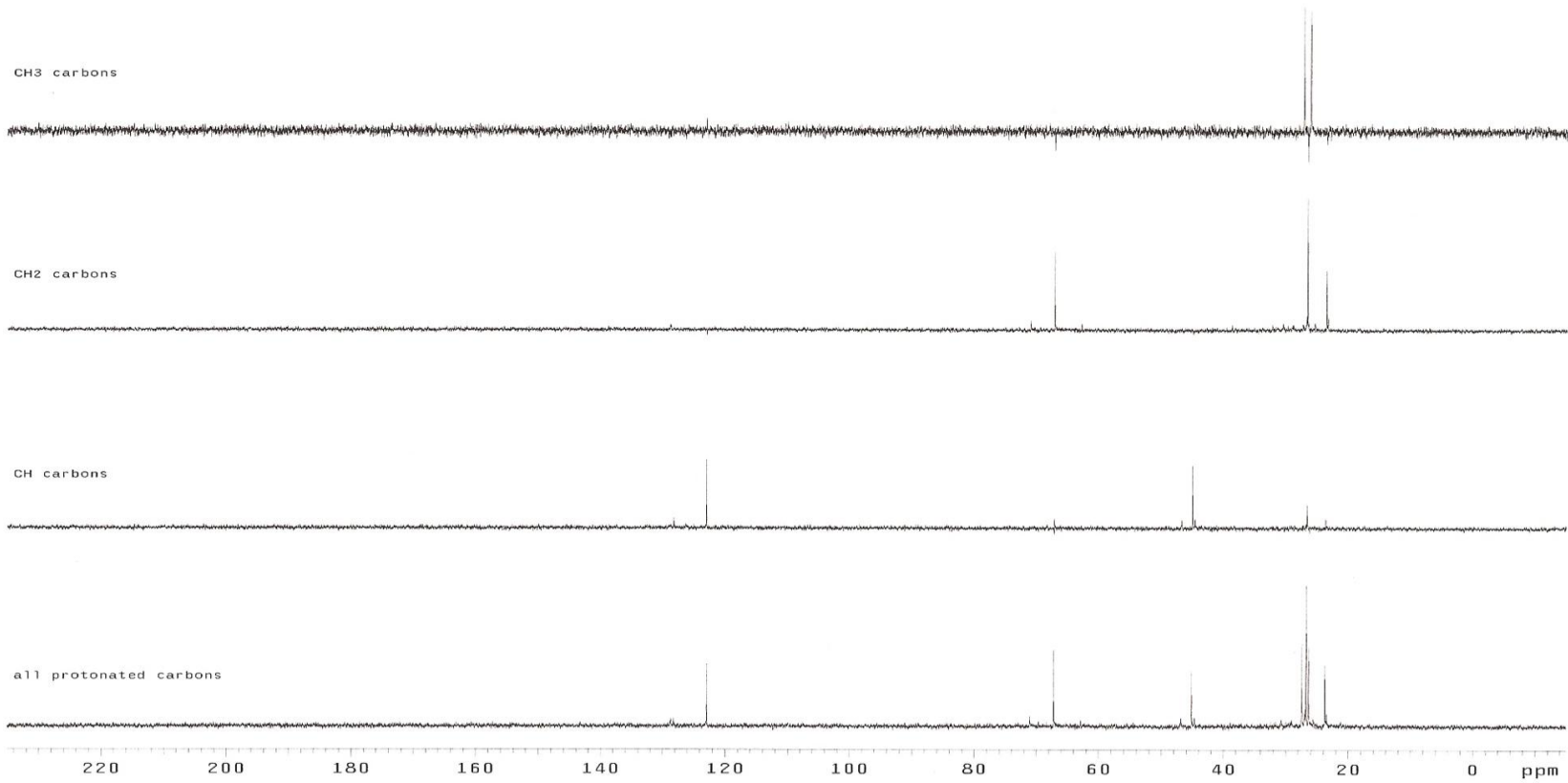


Şekil A3. (-)-Mirtenol (1)'in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

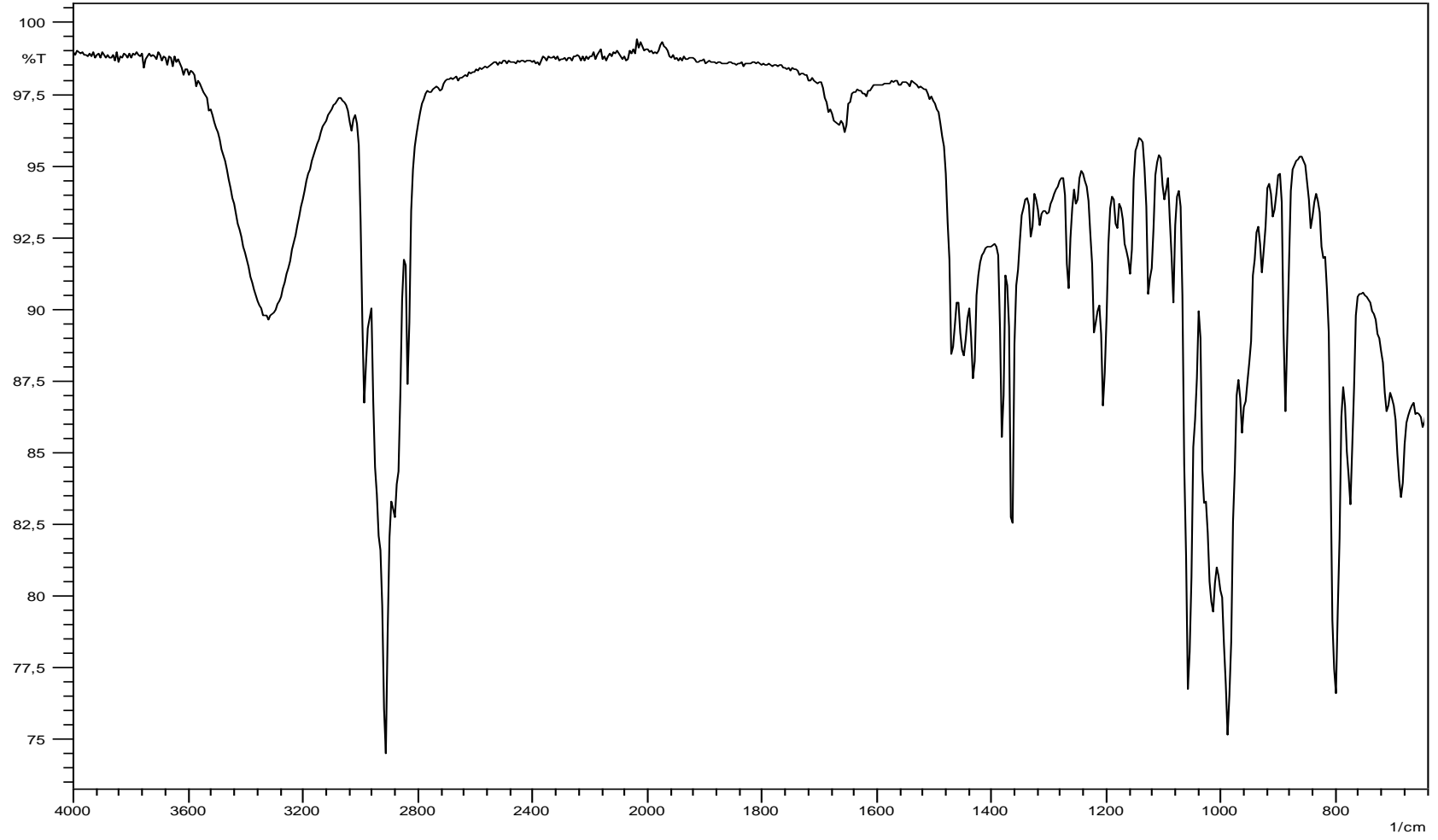




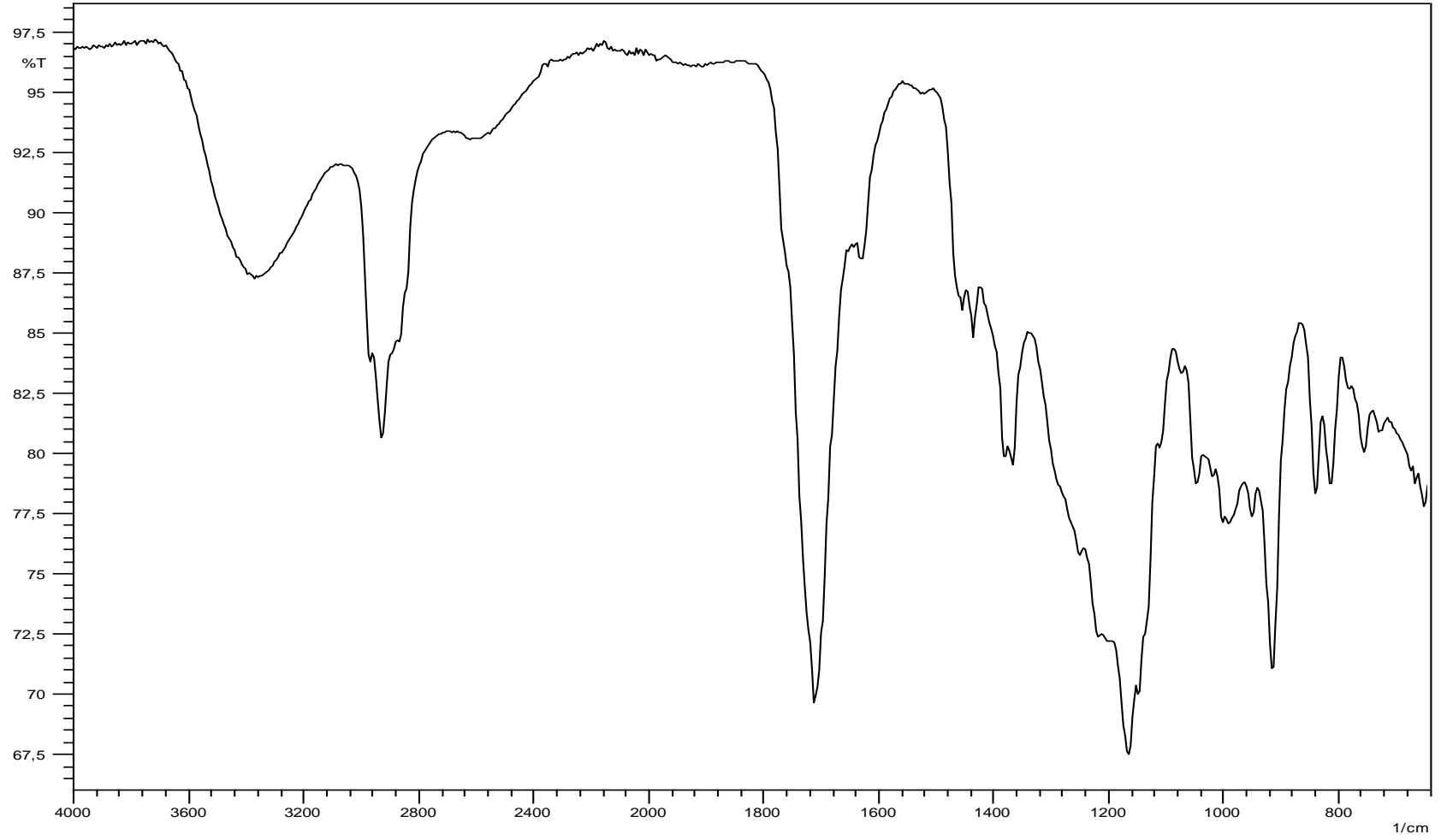
Şekil A4. (-)-1-*p*-Menten-7,8-diol (**6**) bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu



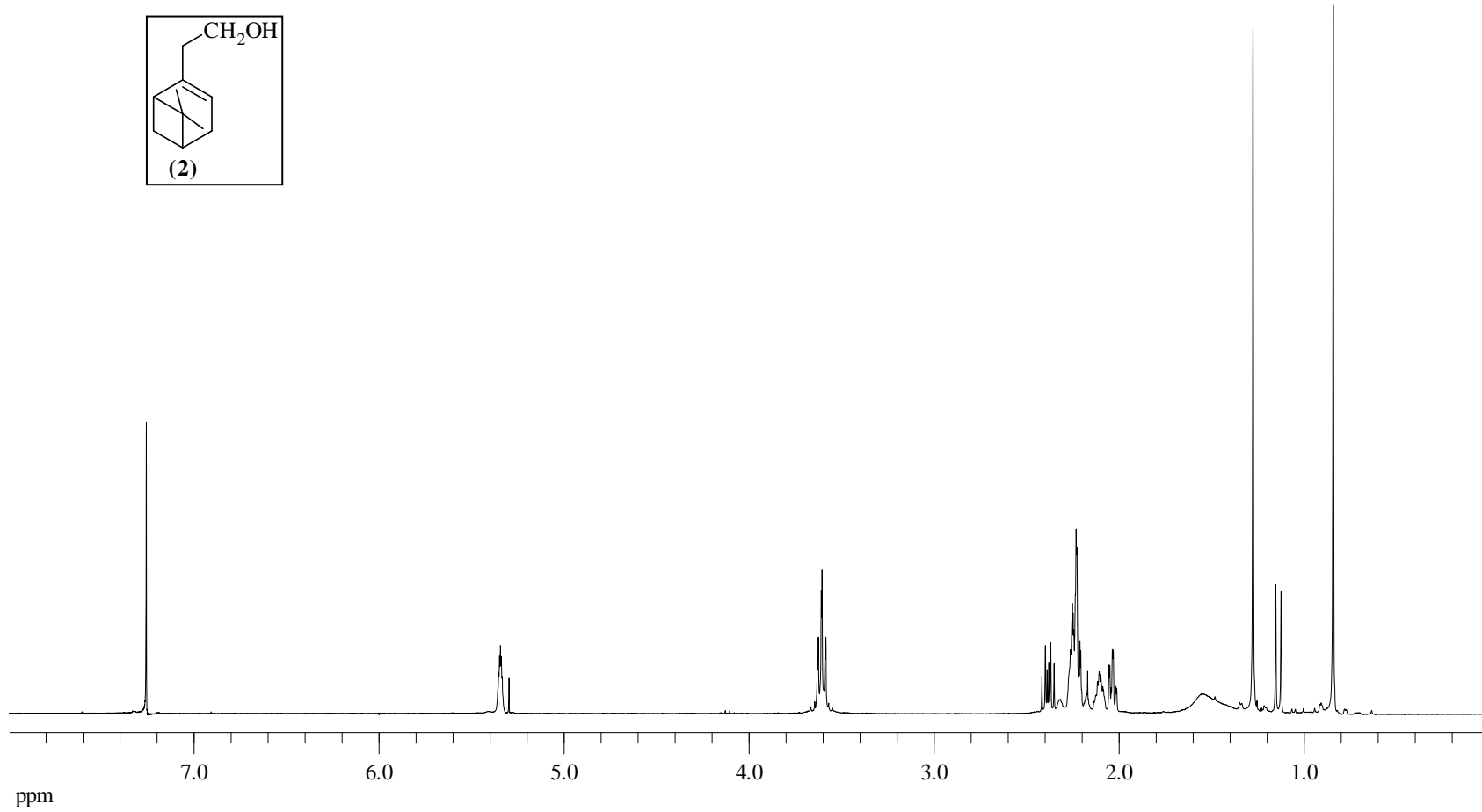
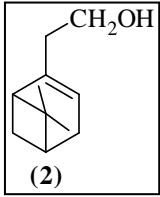
Şekil A5. (-)-1-p-Menten-7,8-diol (6) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu



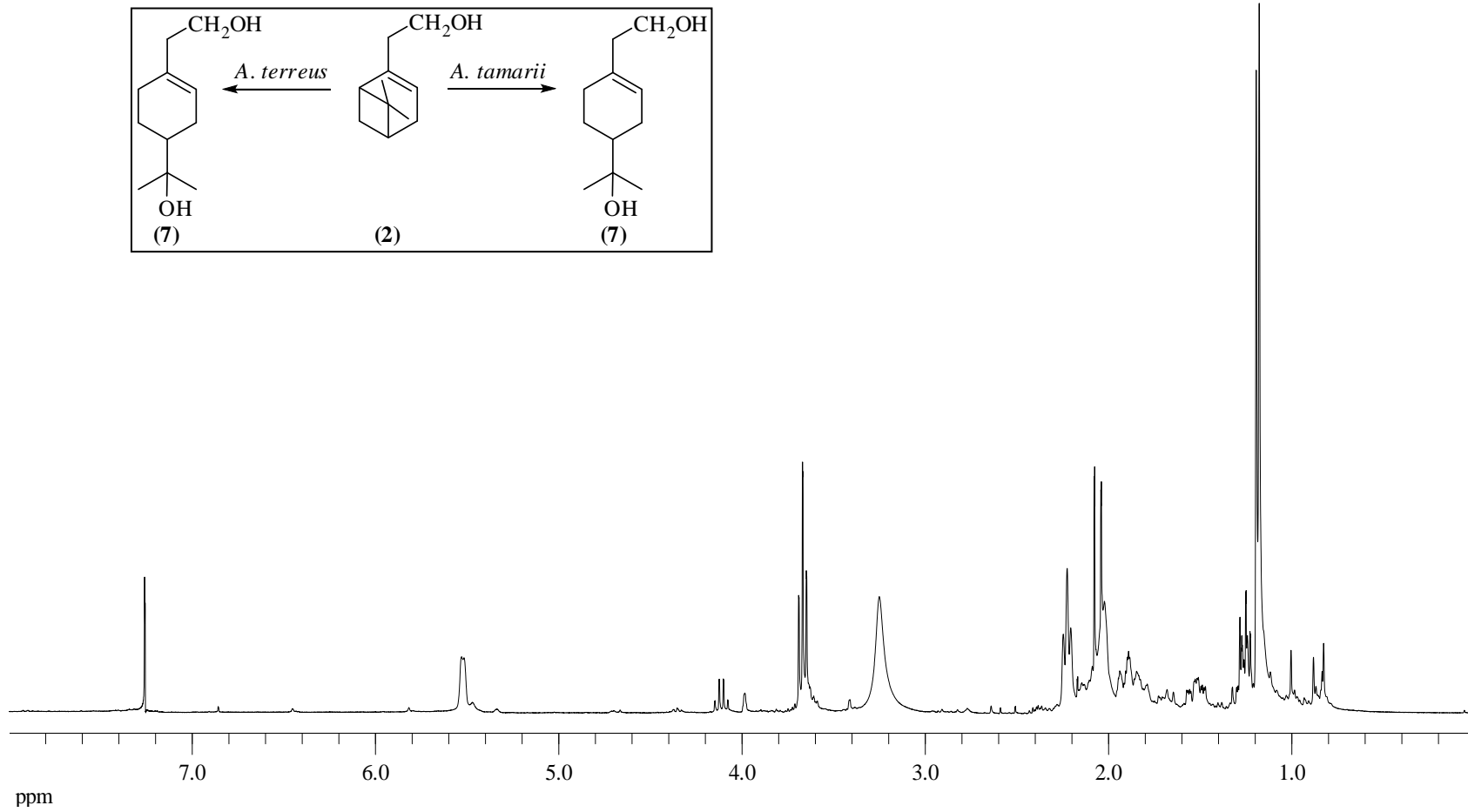
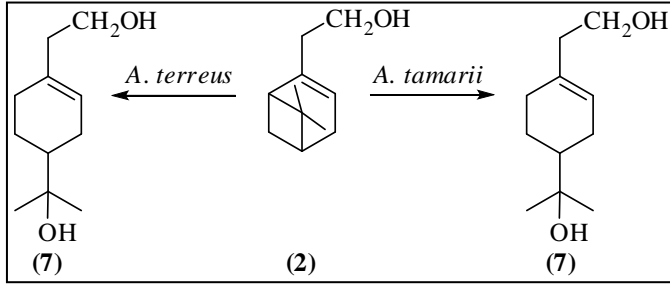
Şekil A6. (-)-Mircenol (1)'in FTIR spektrumu



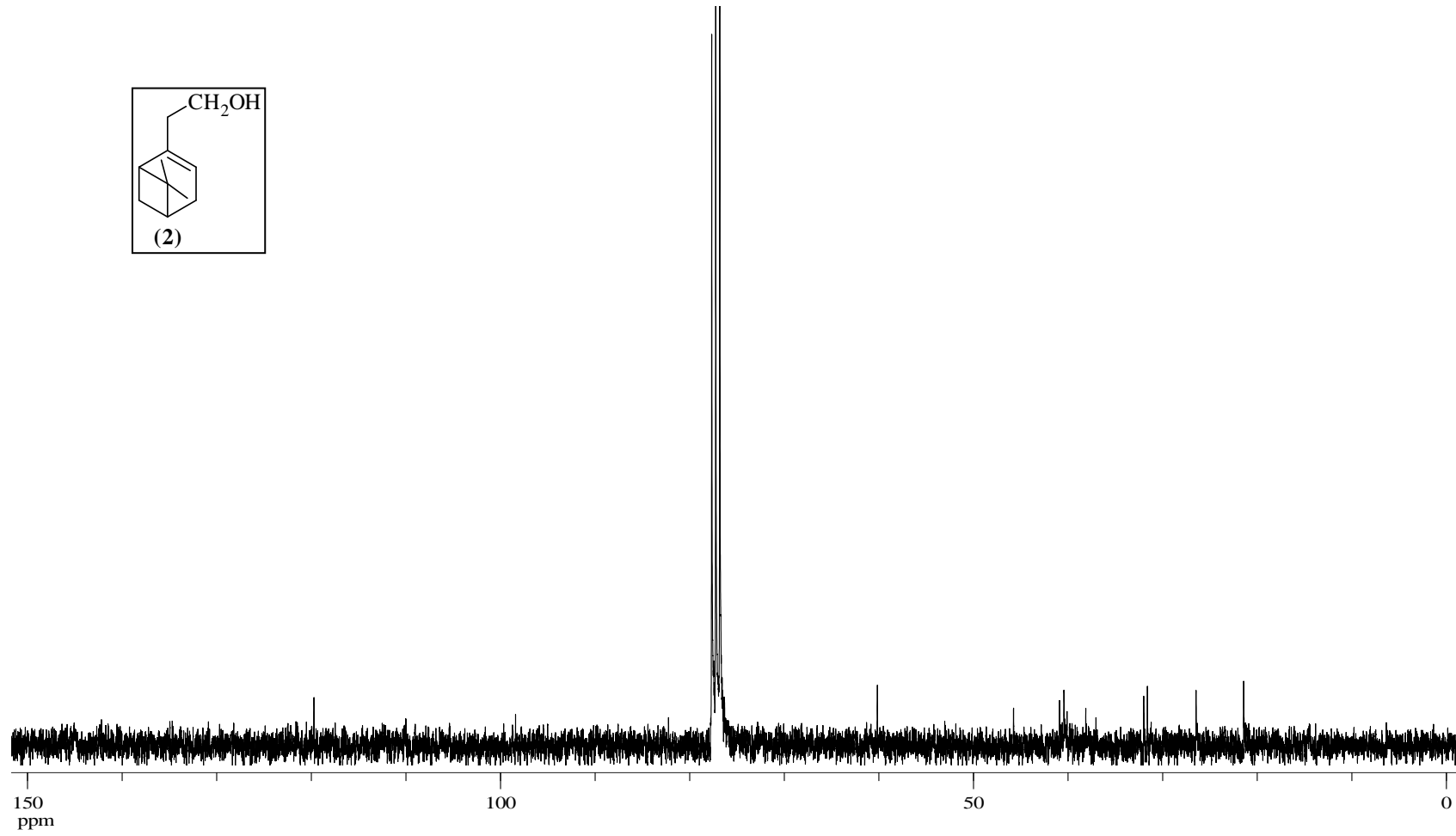
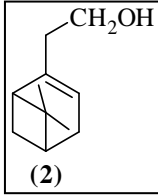
Şekil A7. (-)-1-*p*-Menten-7,8-diol (6) bileşiminin FTIR spektrumu



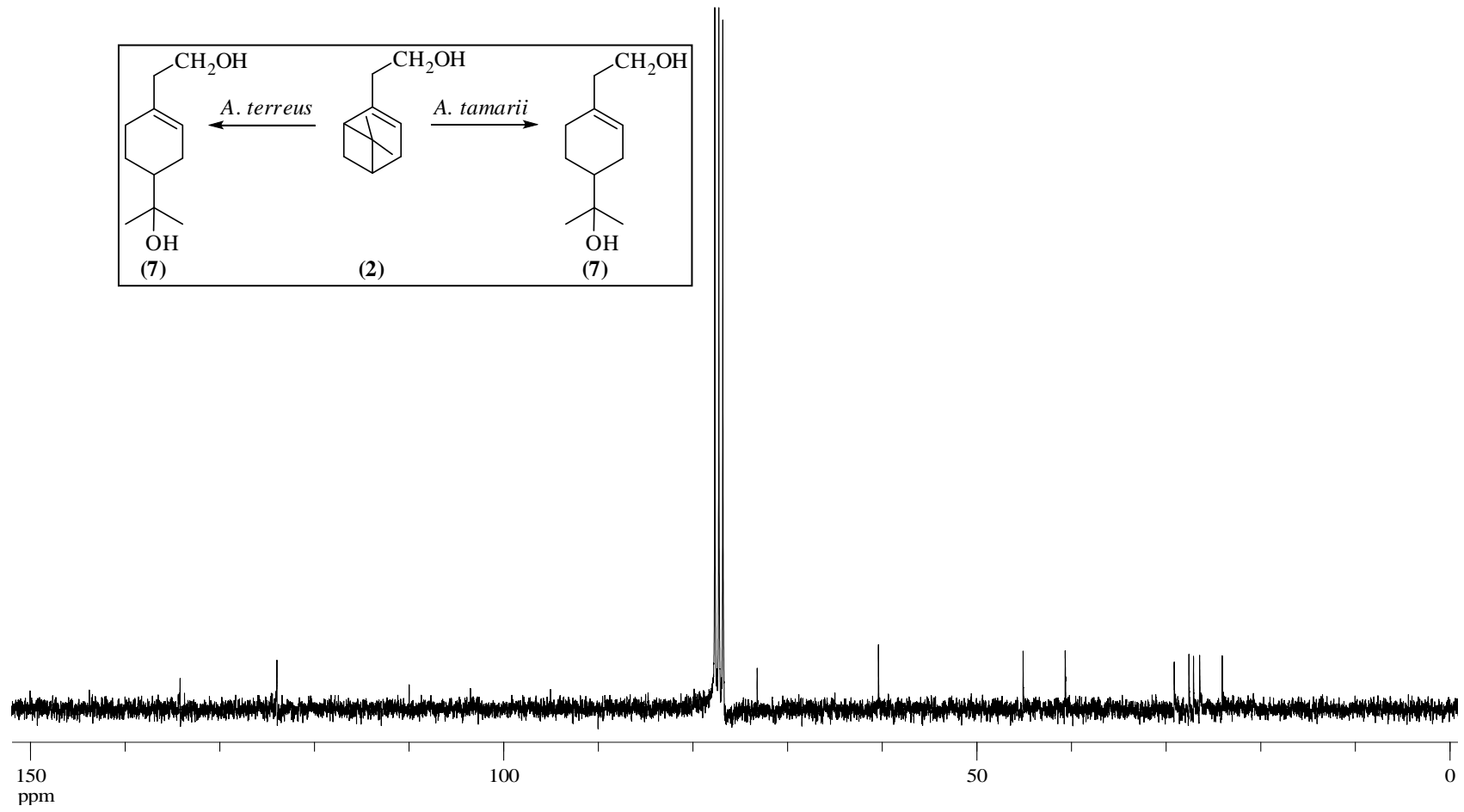
Şekil A8. (-)-Nopol (2)'nin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Şekil A9. (-)-7-Hidroksimetil-1-p-menten-8-ol (7) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

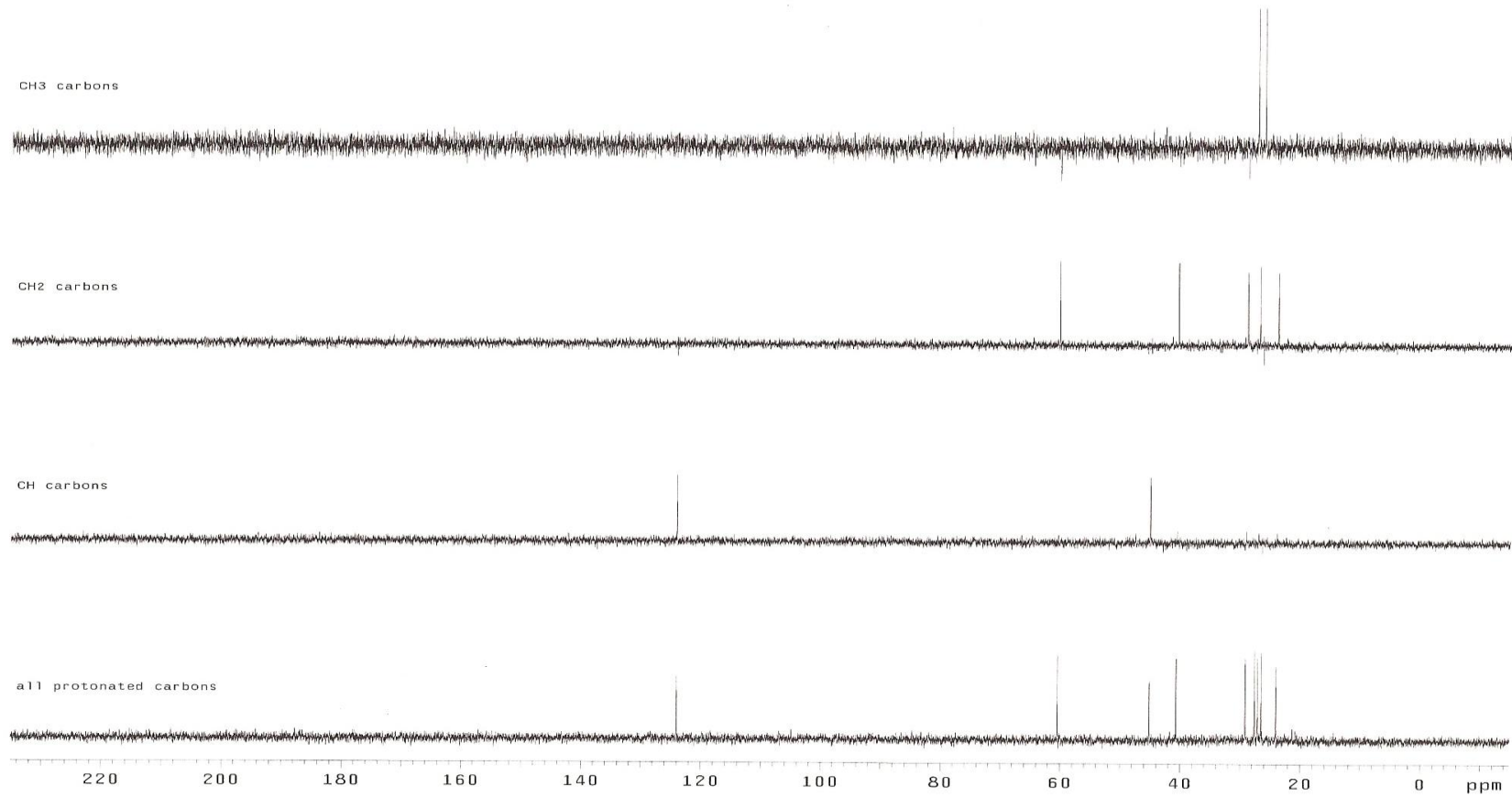


Şekil A10. (-)-Nopol (2)'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

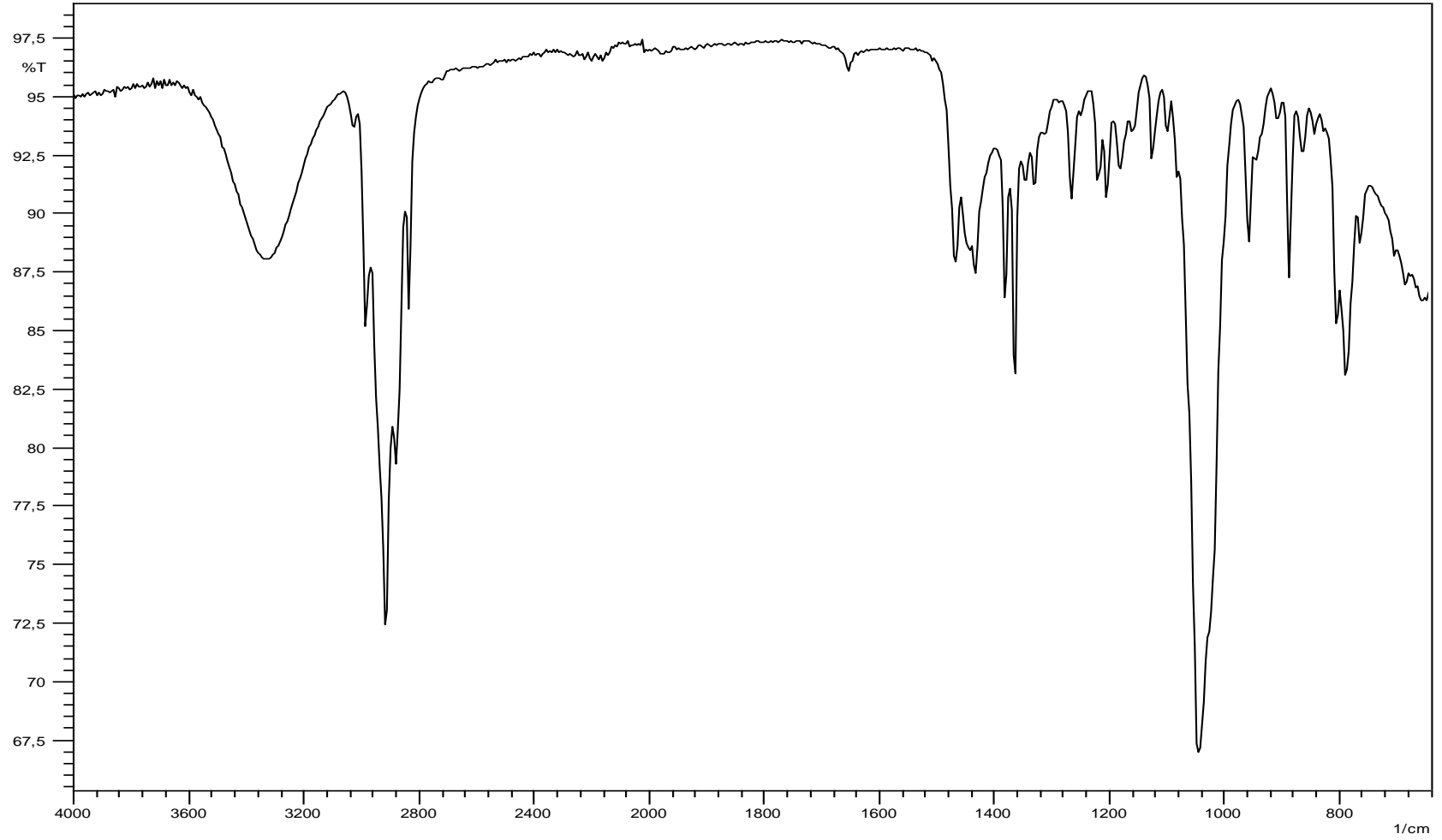


Şekil A11. (-)-7-Hidroksimetil-1-p-menten-8-ol (7) bileşğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu

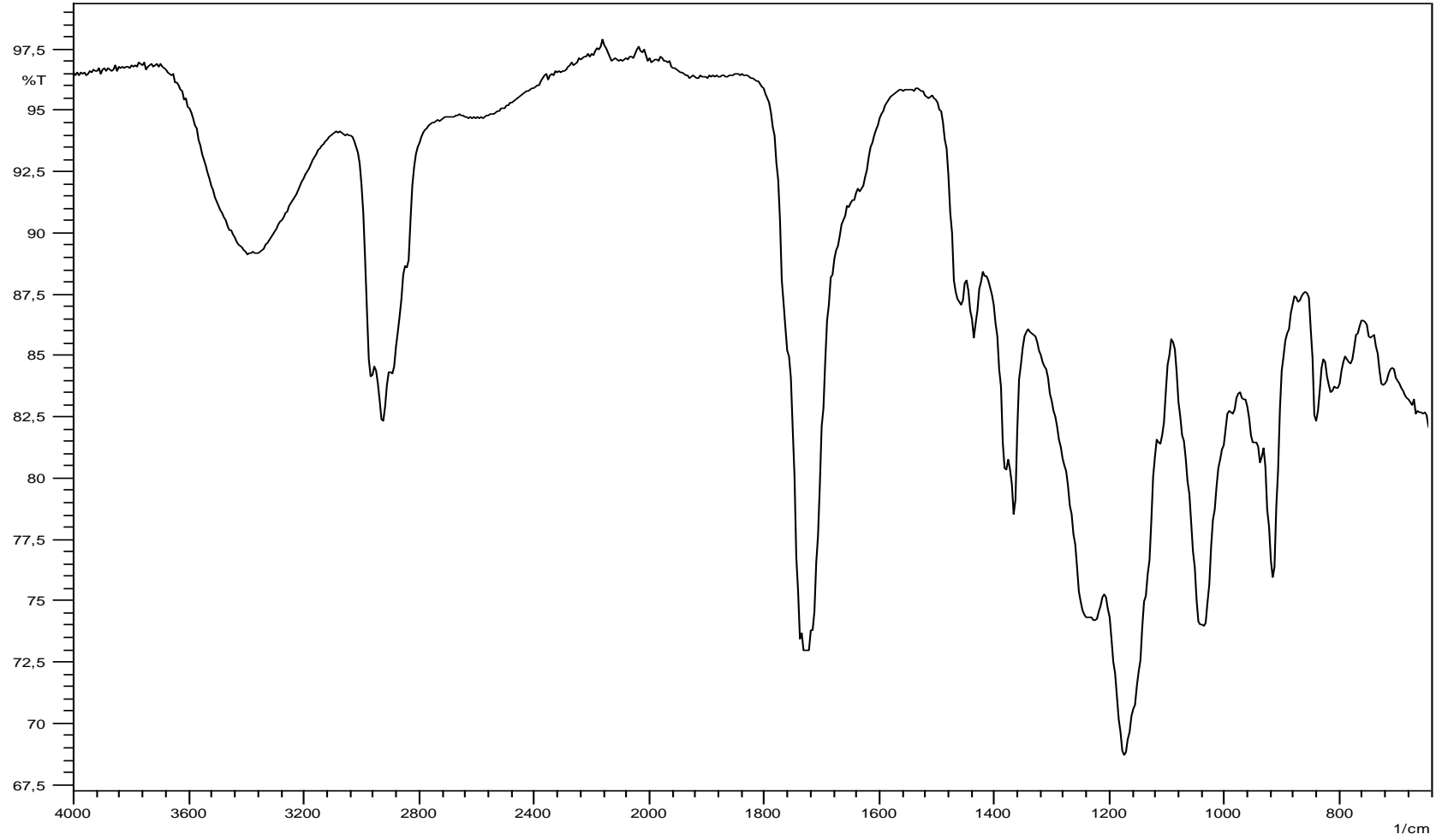




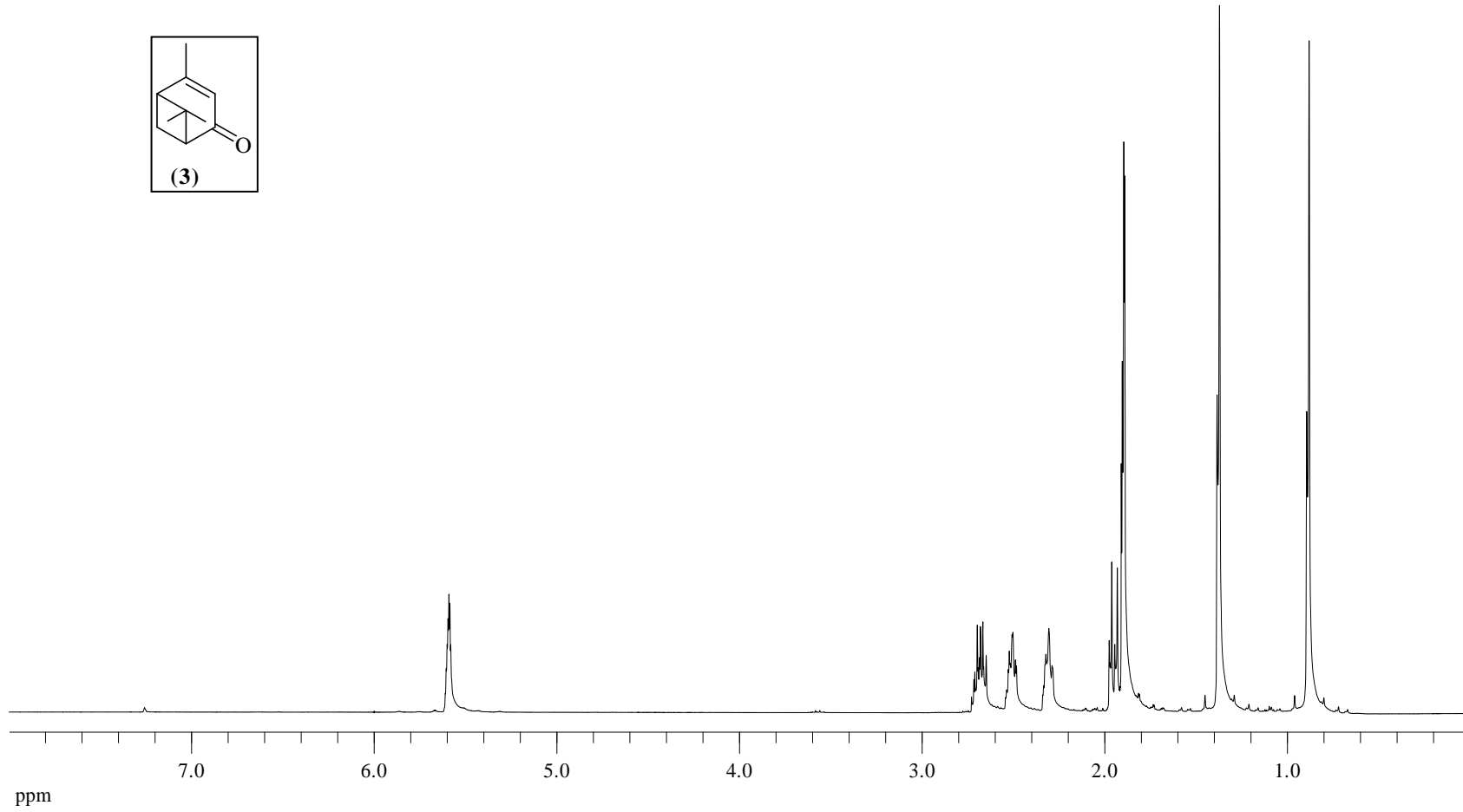
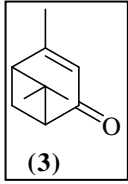
Şekil A12. (-)-7-Hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (7) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu



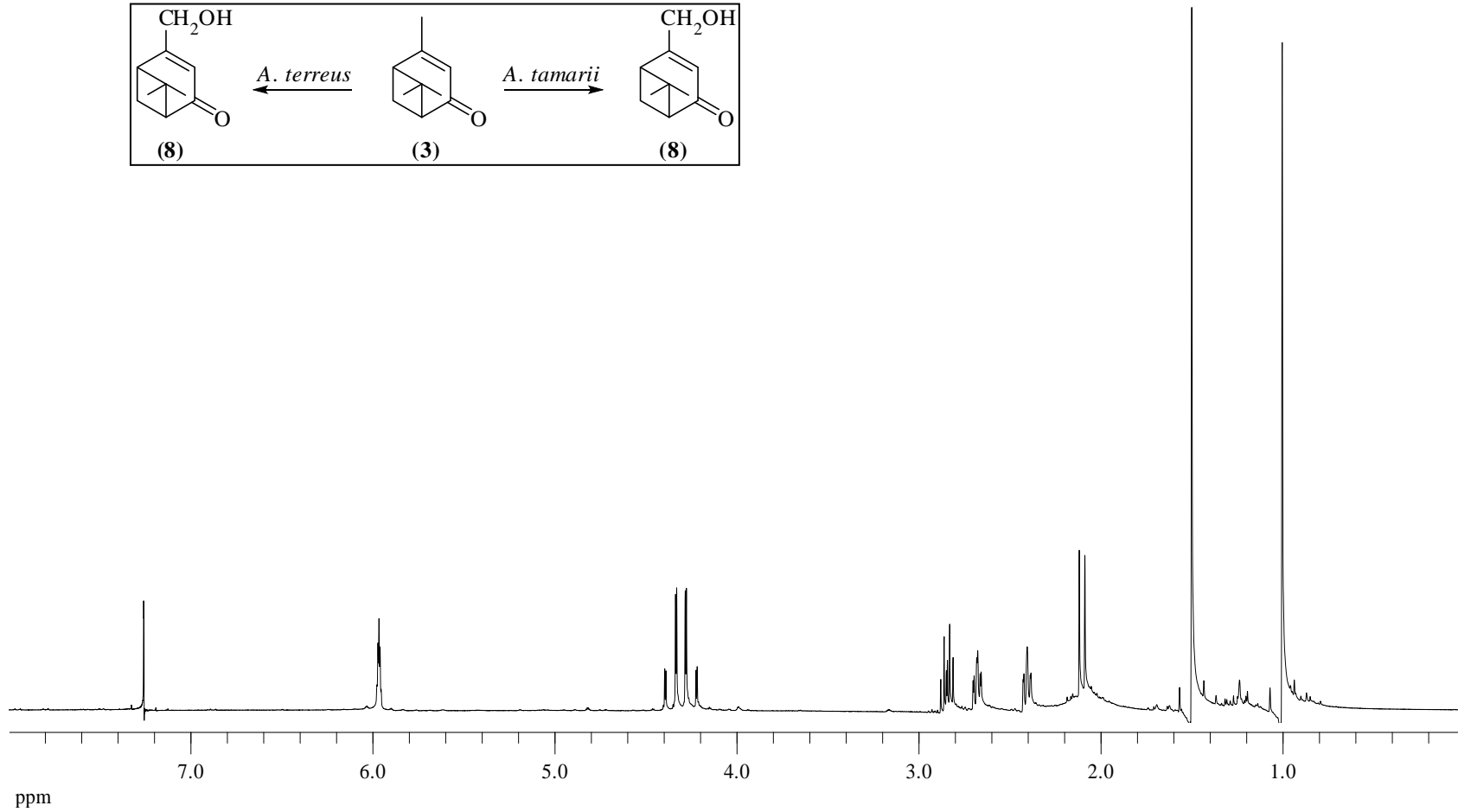
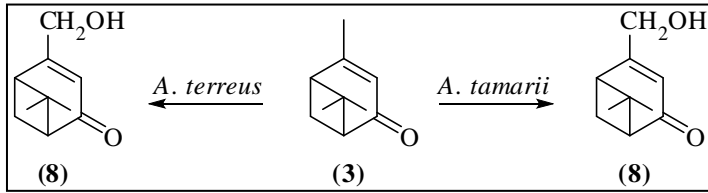
Şekil A13. (-)-Nopol (2)'nin FTIR spektrumu



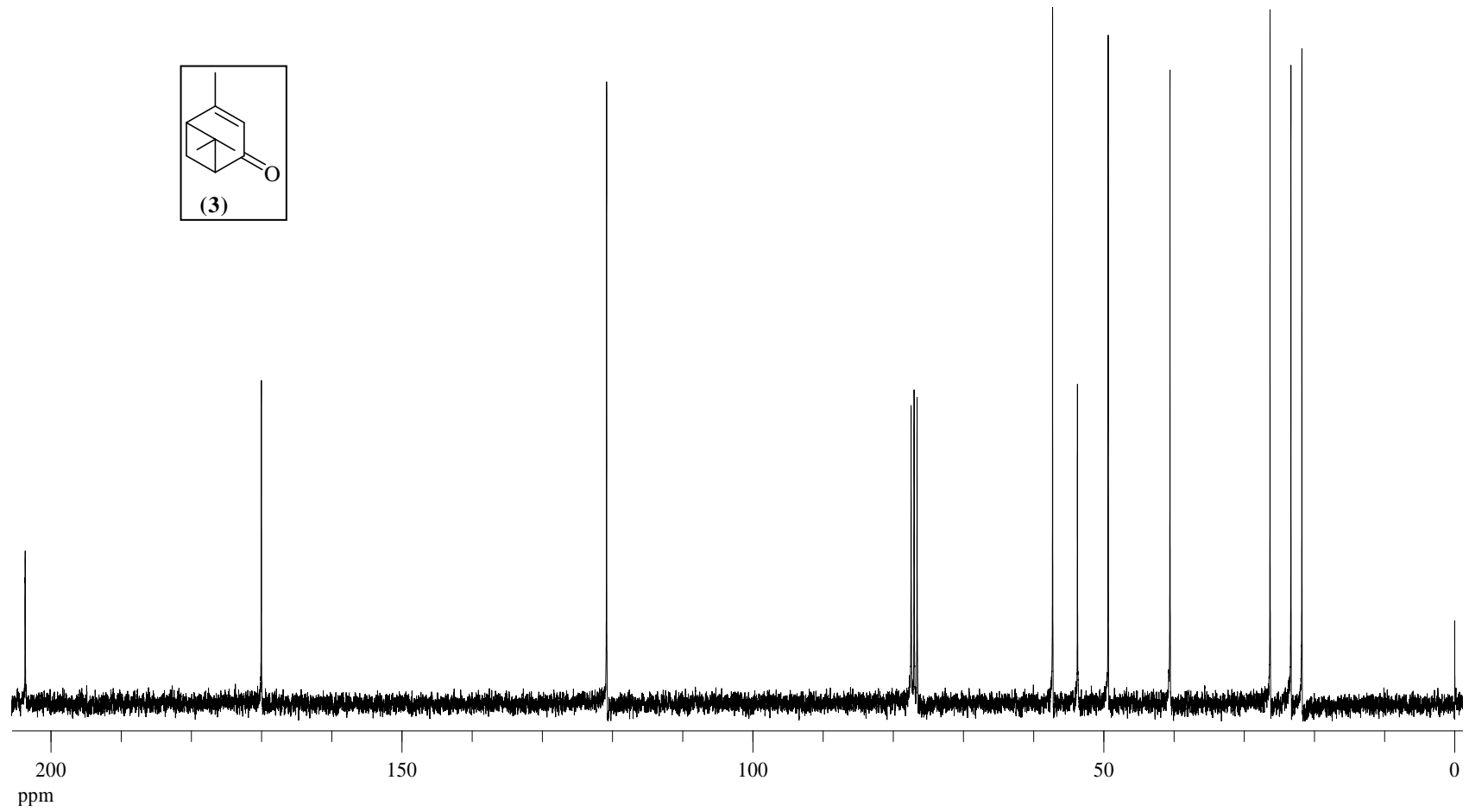
Şekil A14. (-)-7-Hidroksimetil-1-p-menten-8-ol (7) bileşğinin FTIR spektrumu



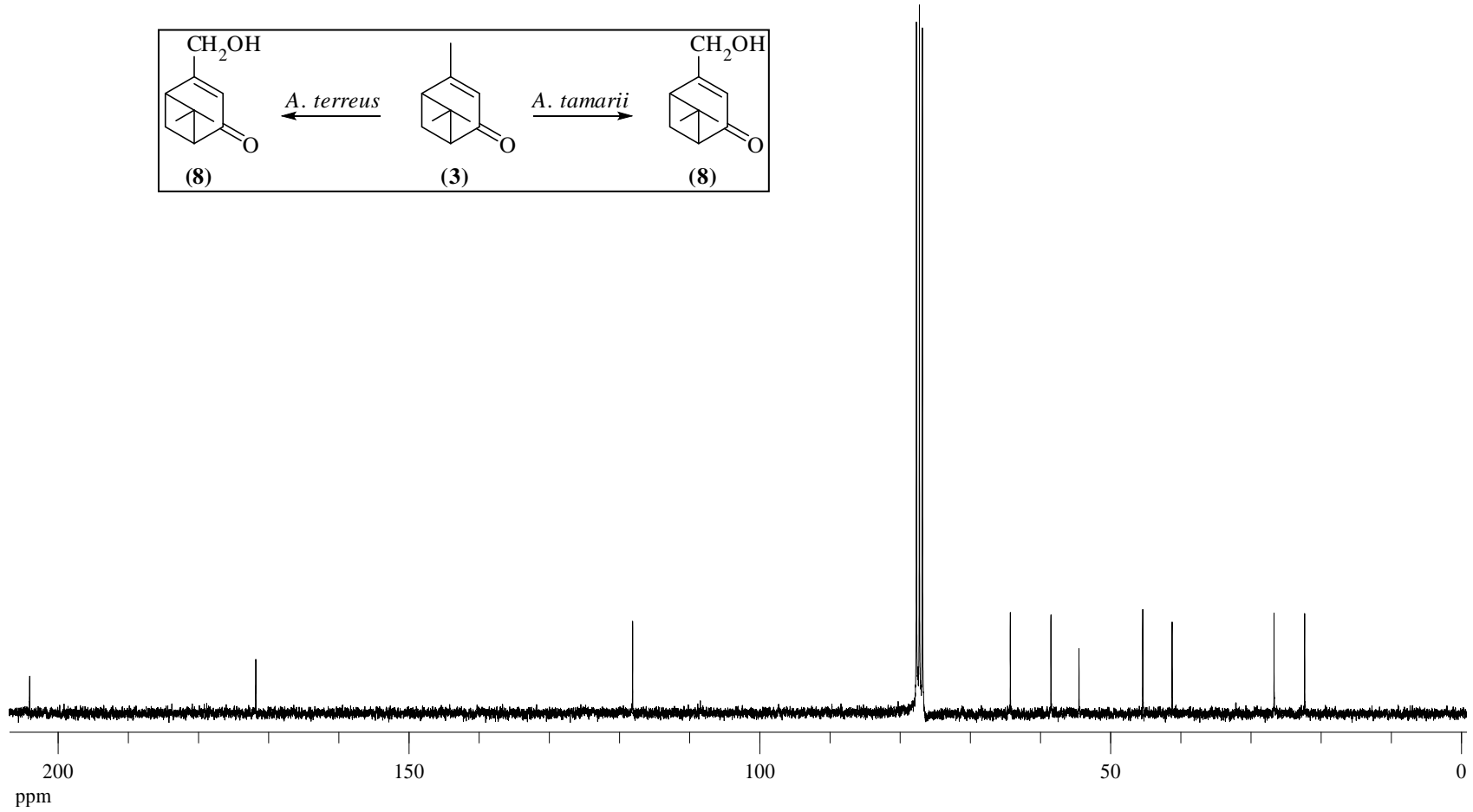
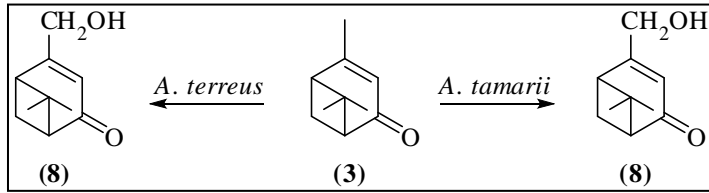
Şekil A15. (-)-Verbenon (3)'ün  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



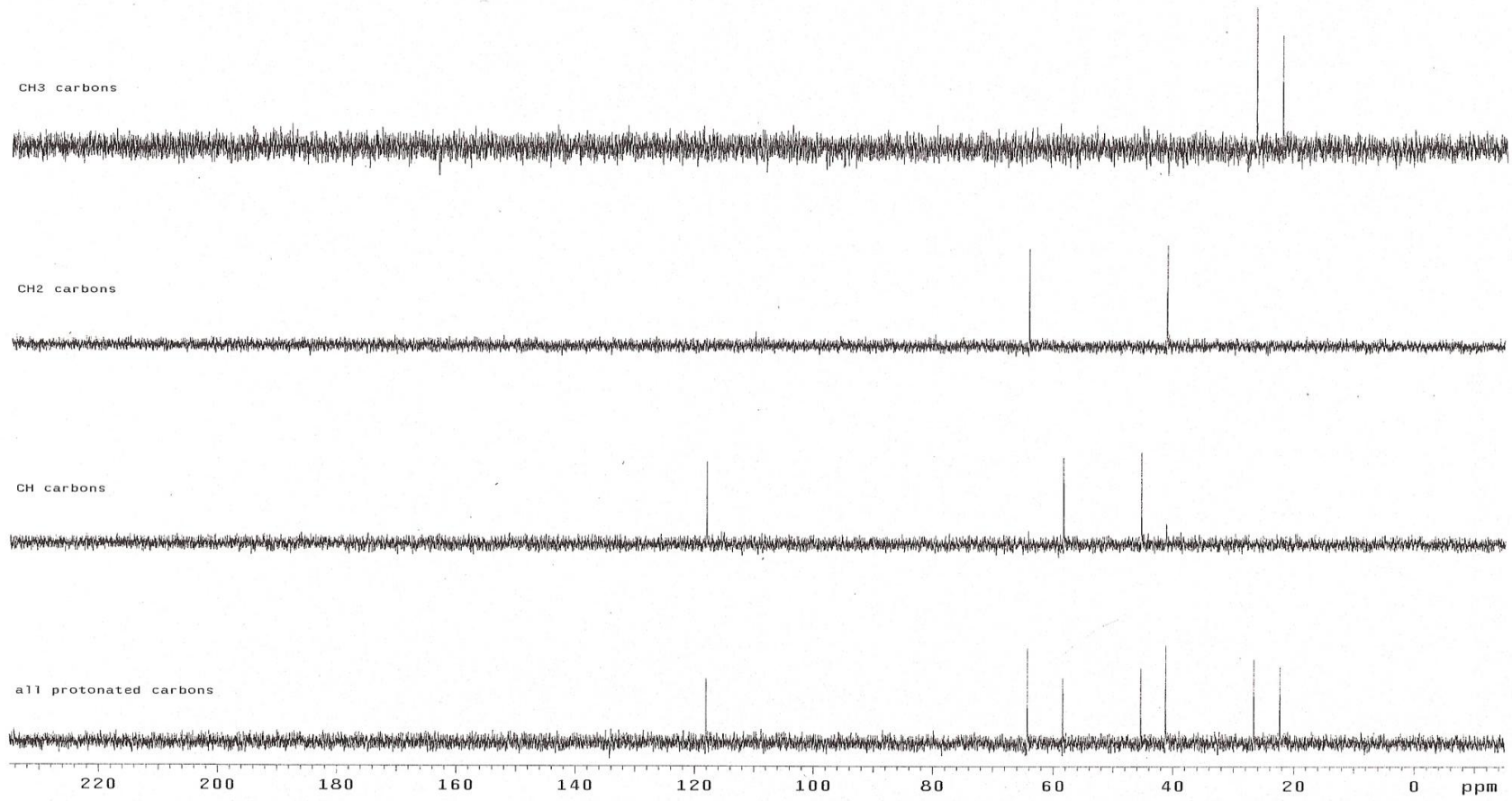
Şekil A16. (-)-10-Hidroksiverbenon (8) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Şekil A17. (-)-Verbenon (3)'ün  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

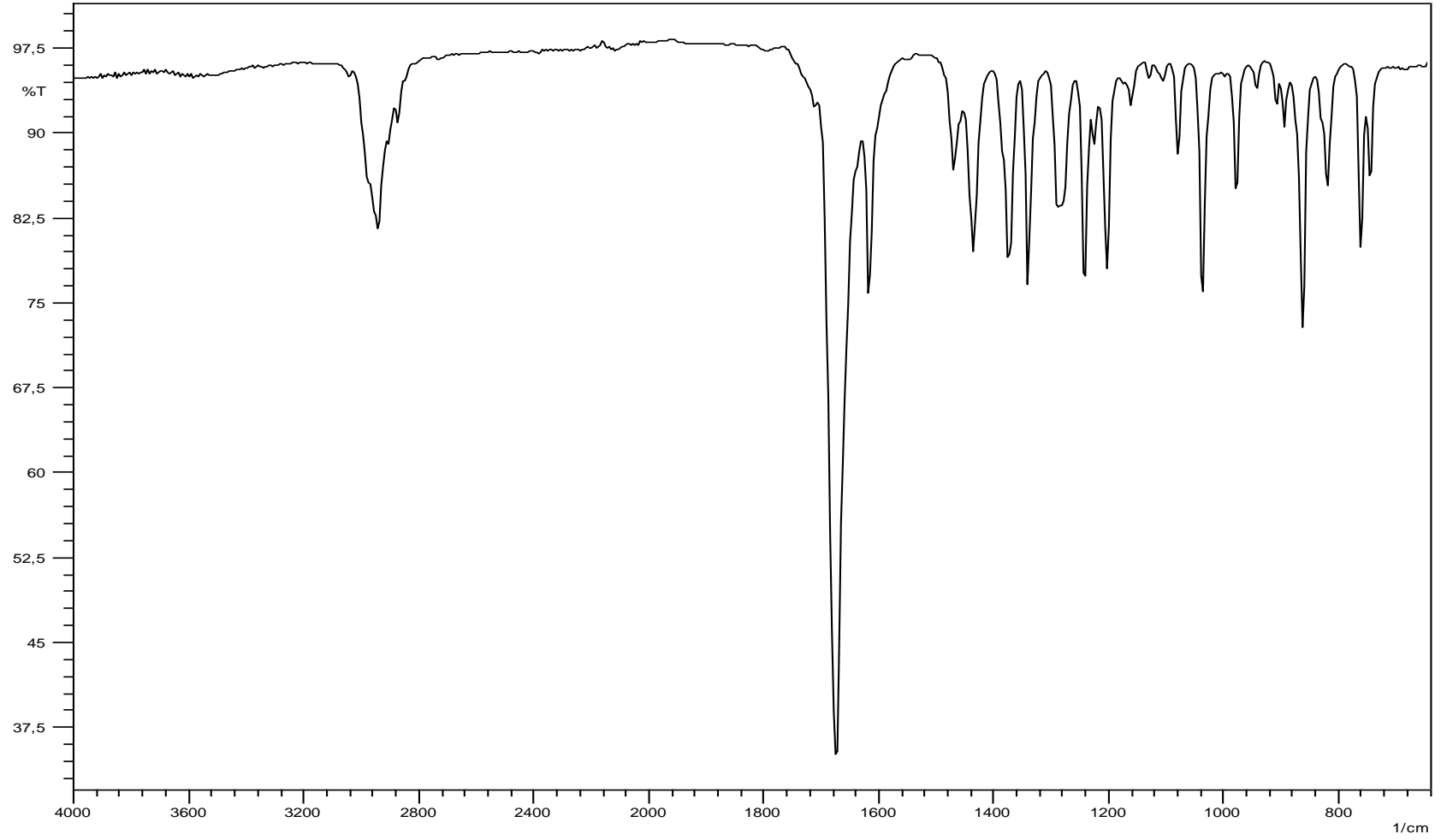


Şekil A18. (-)-10-Hidroksiverbenon (8) bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu

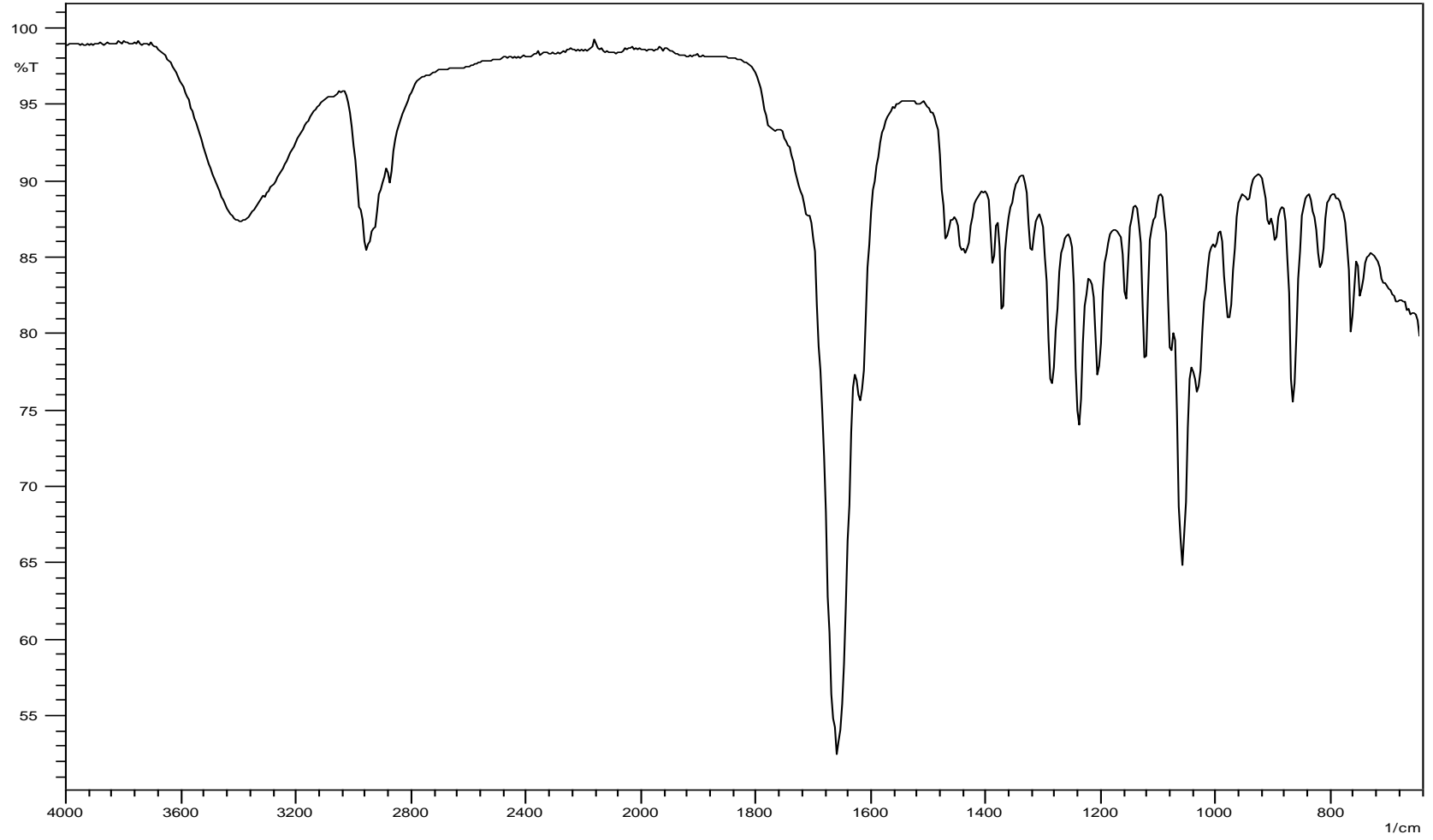


Şekil A19. (-)-10-Hidroksiverbenon (**8**) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu

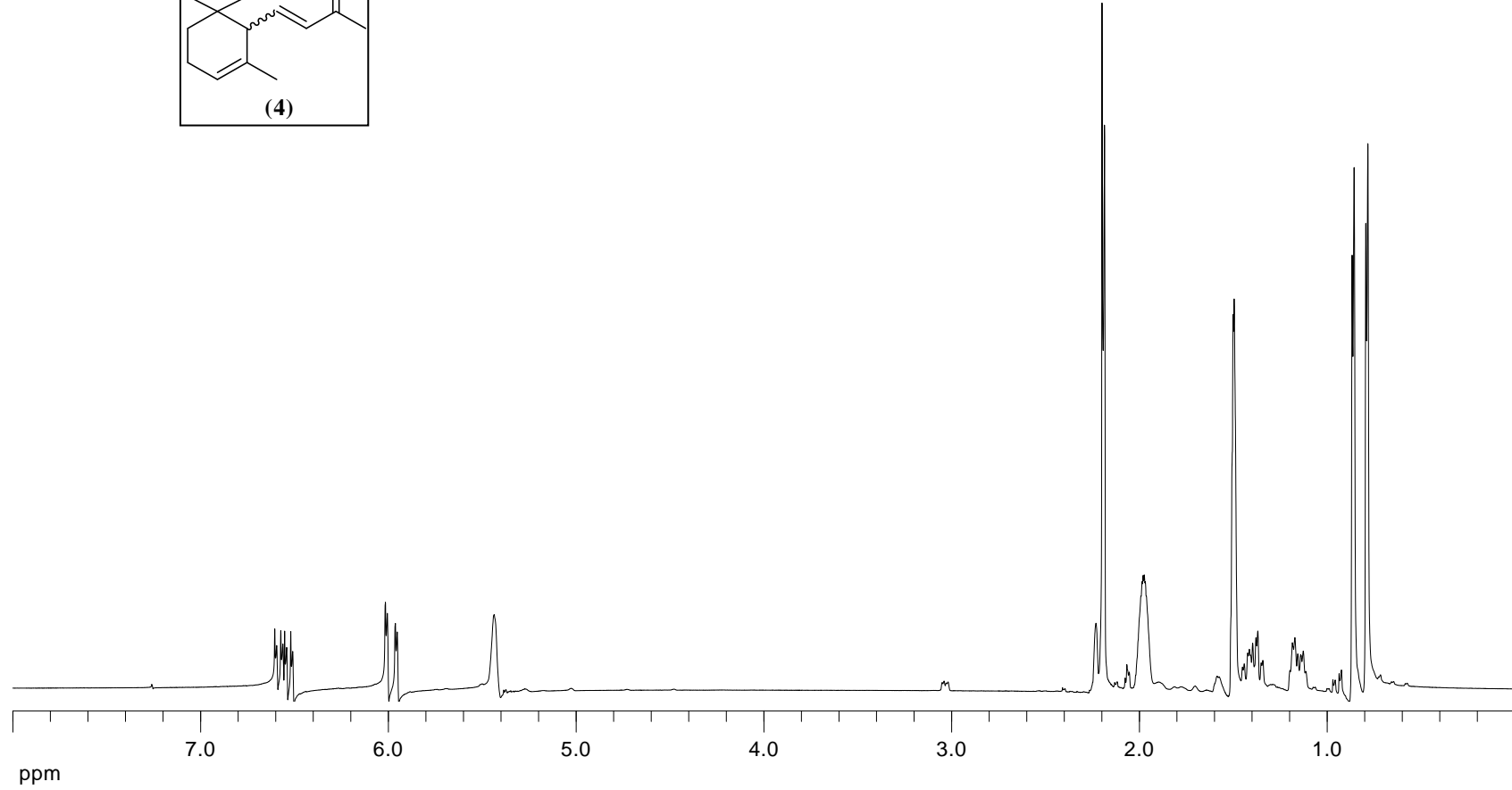
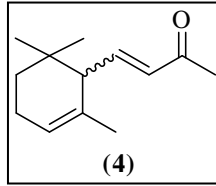




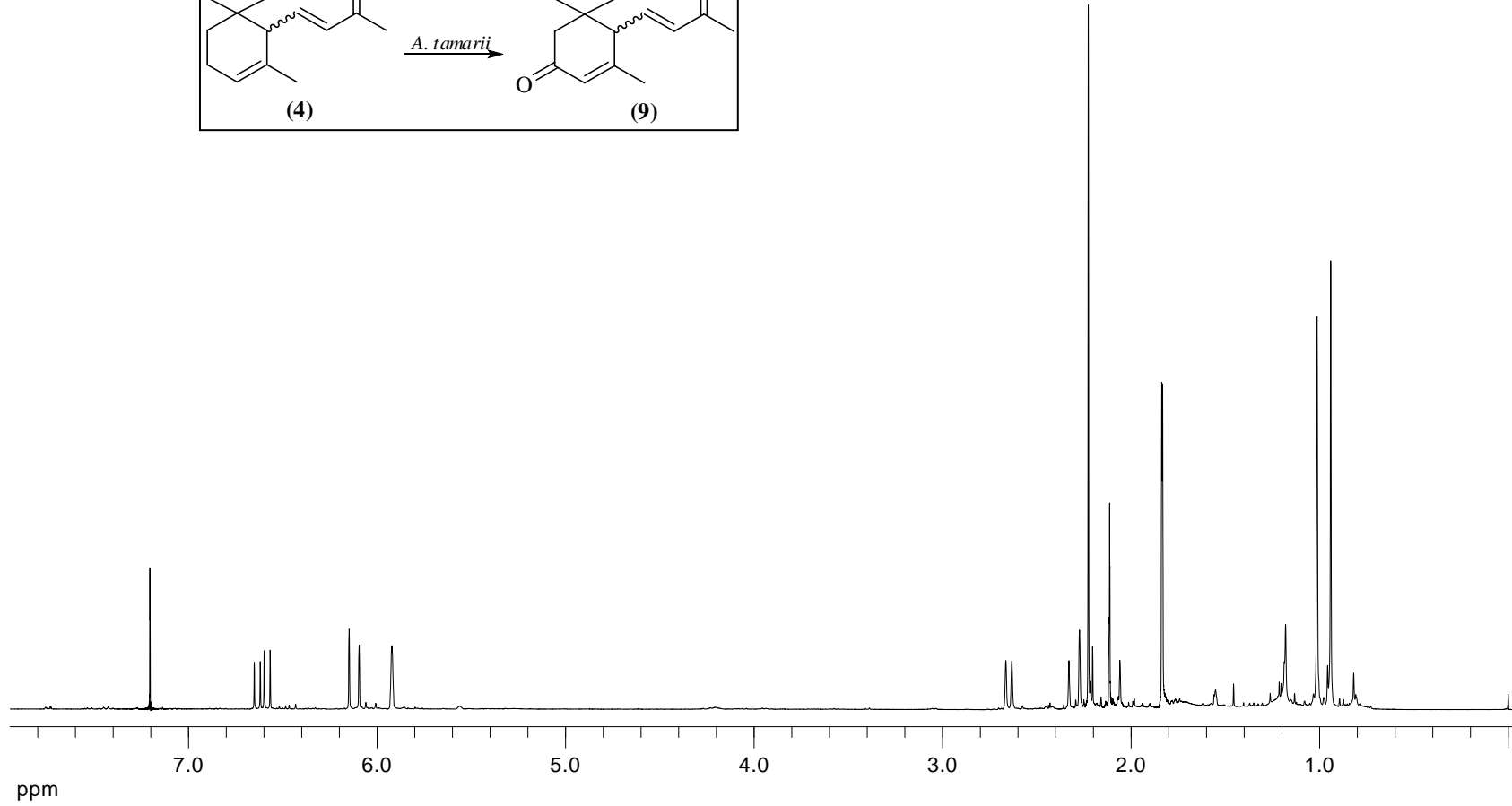
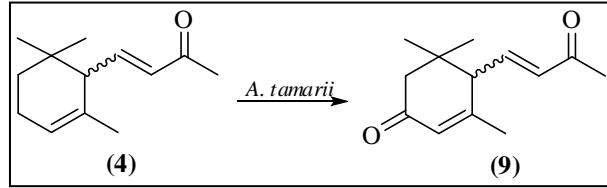
Şekil A20. (-)-Verbenon (3)'ün FTIR spektrumu



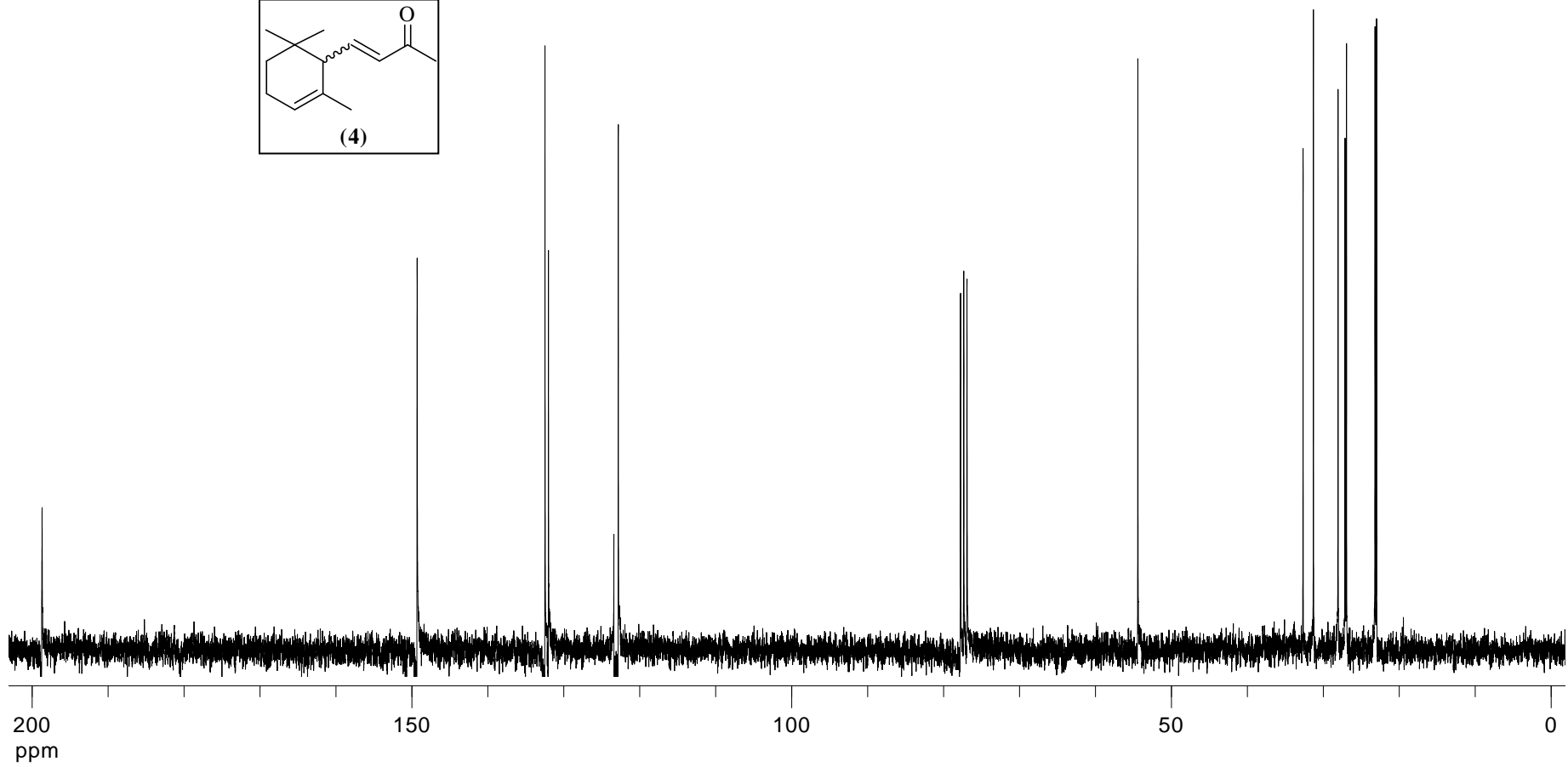
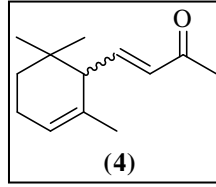
Şekil A21. (-)-10-Hidroksiverbenon (8) bileşiminin FTIR spektrumu



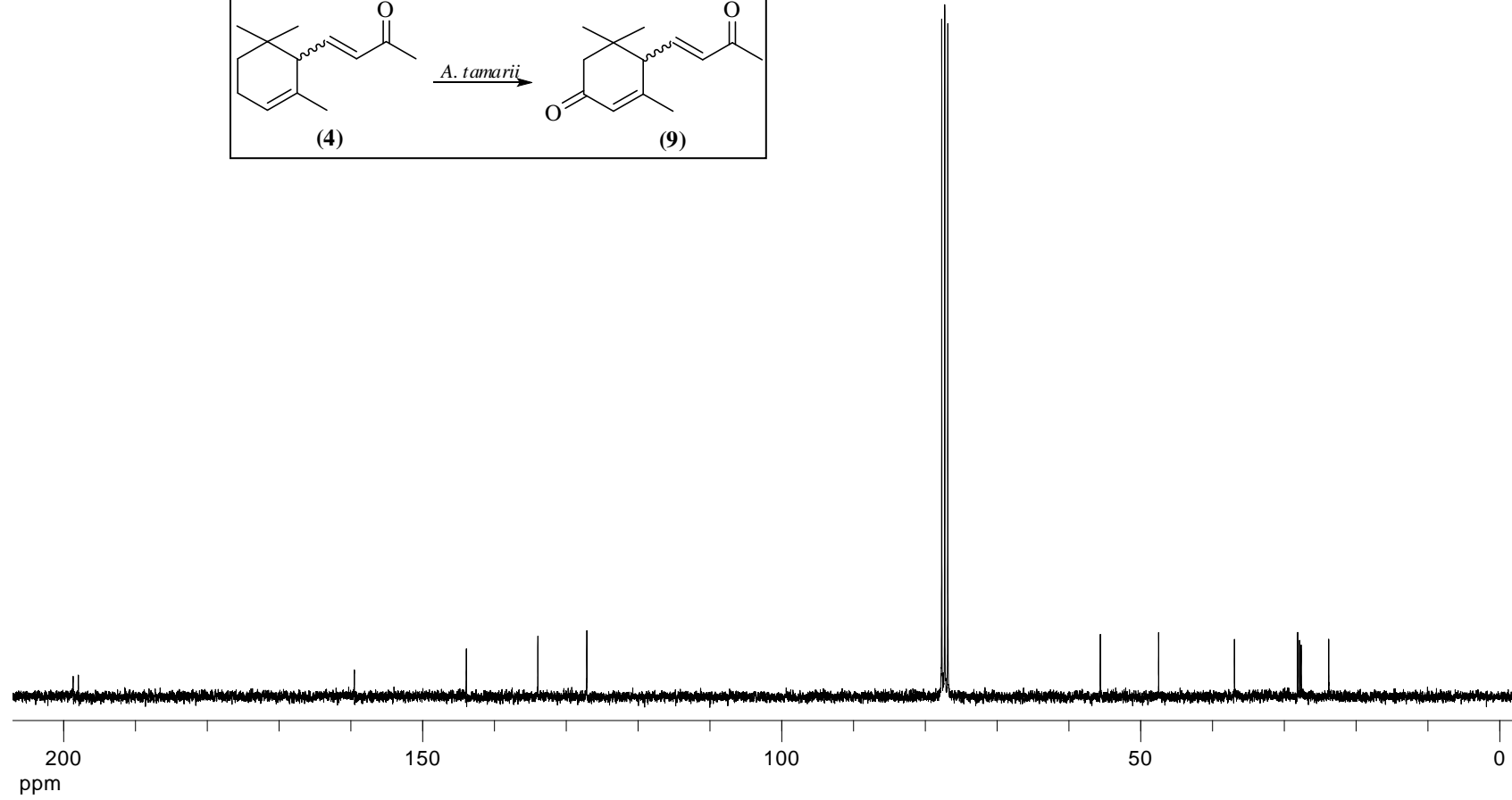
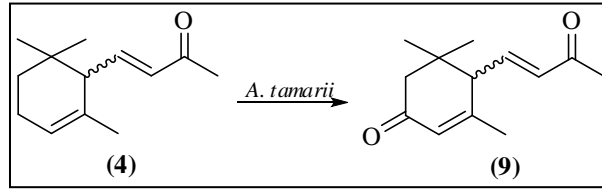
Şekil A22. (±)- $\alpha$ -İyonon (4)'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu



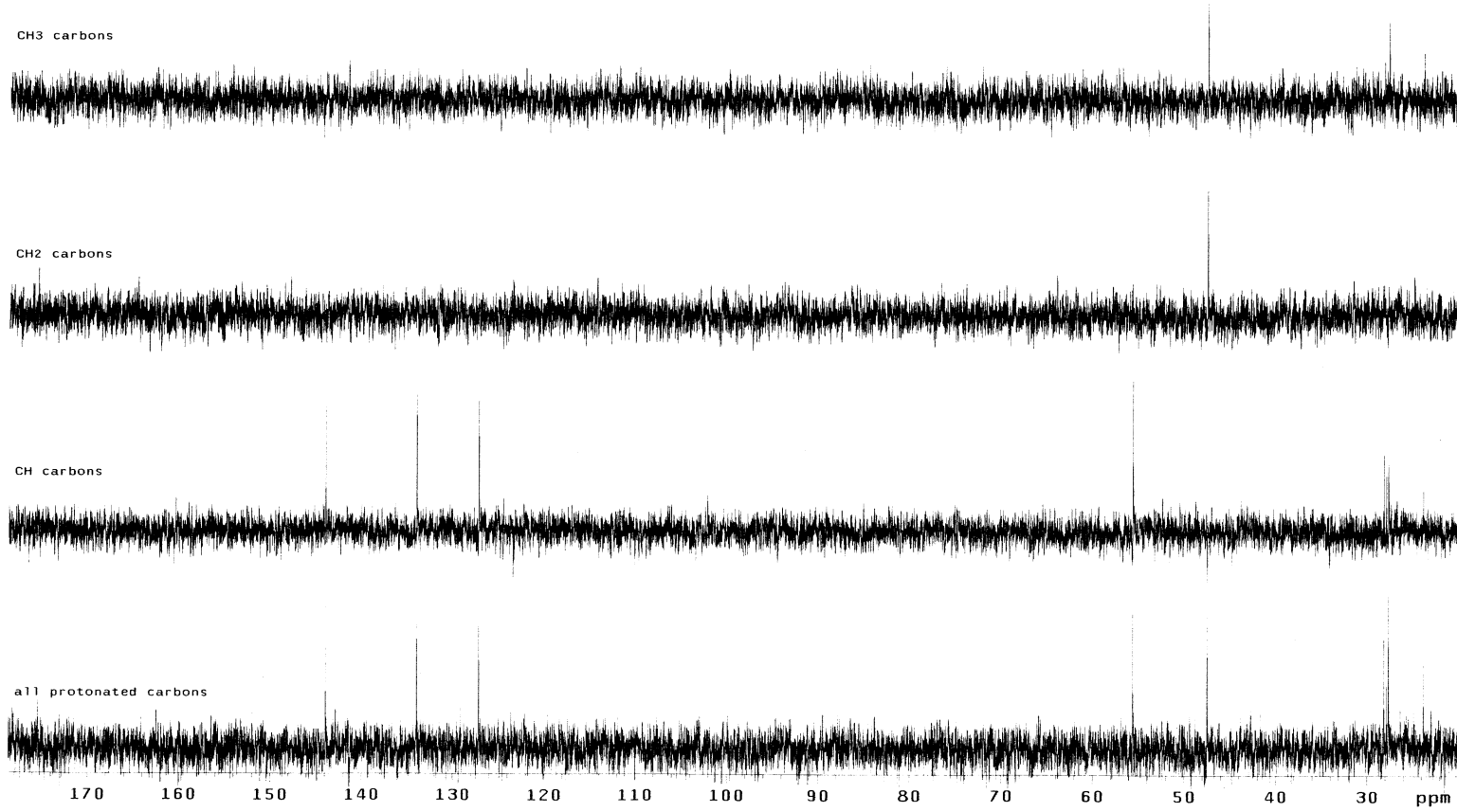
Şekil A23. (±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon (9) bileşğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



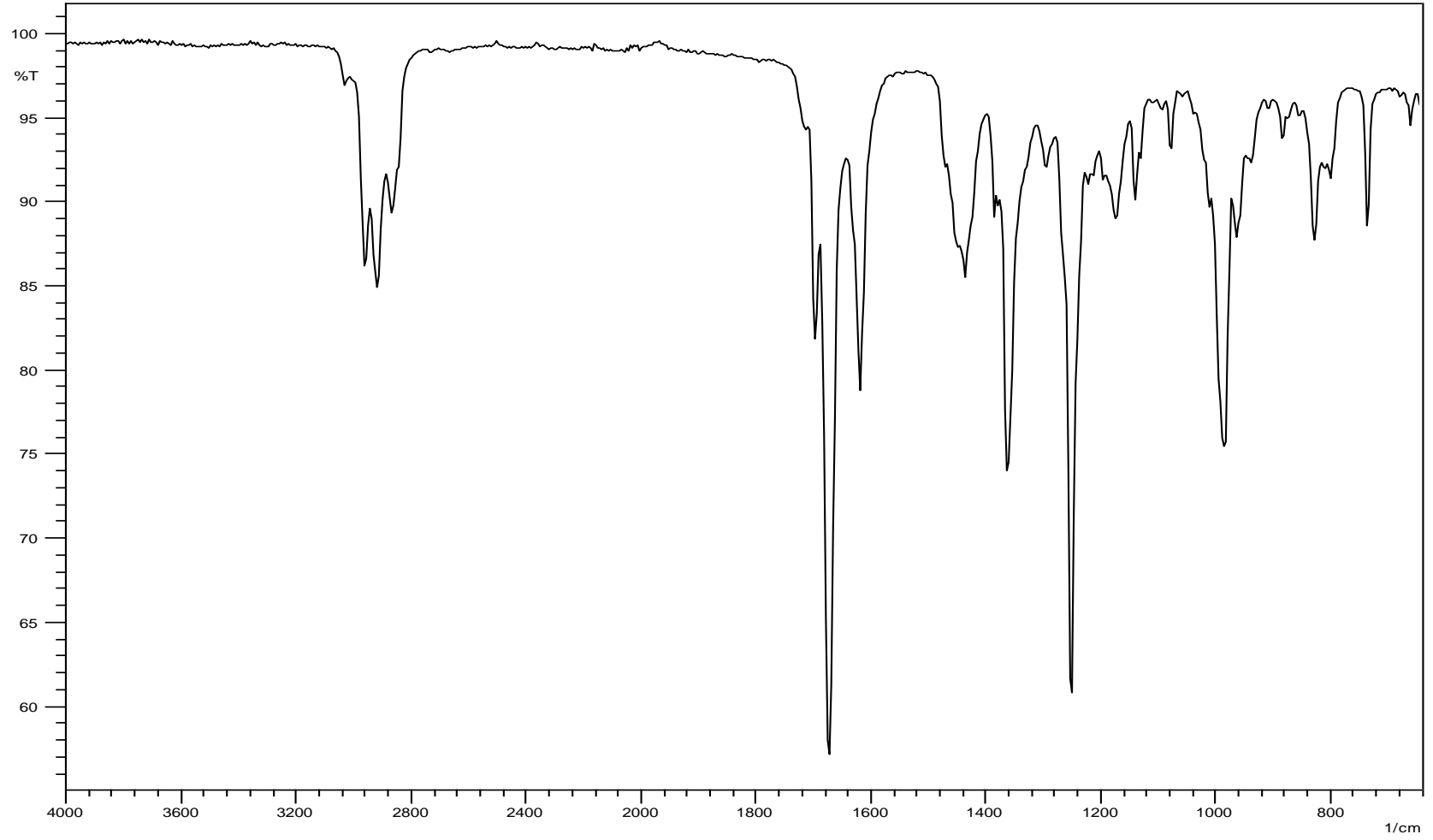
Şekil A24. (±)-α-İyonon (4)'ün <sup>13</sup>C NMR spektrumu



Şekil A25. (±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon (9) bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

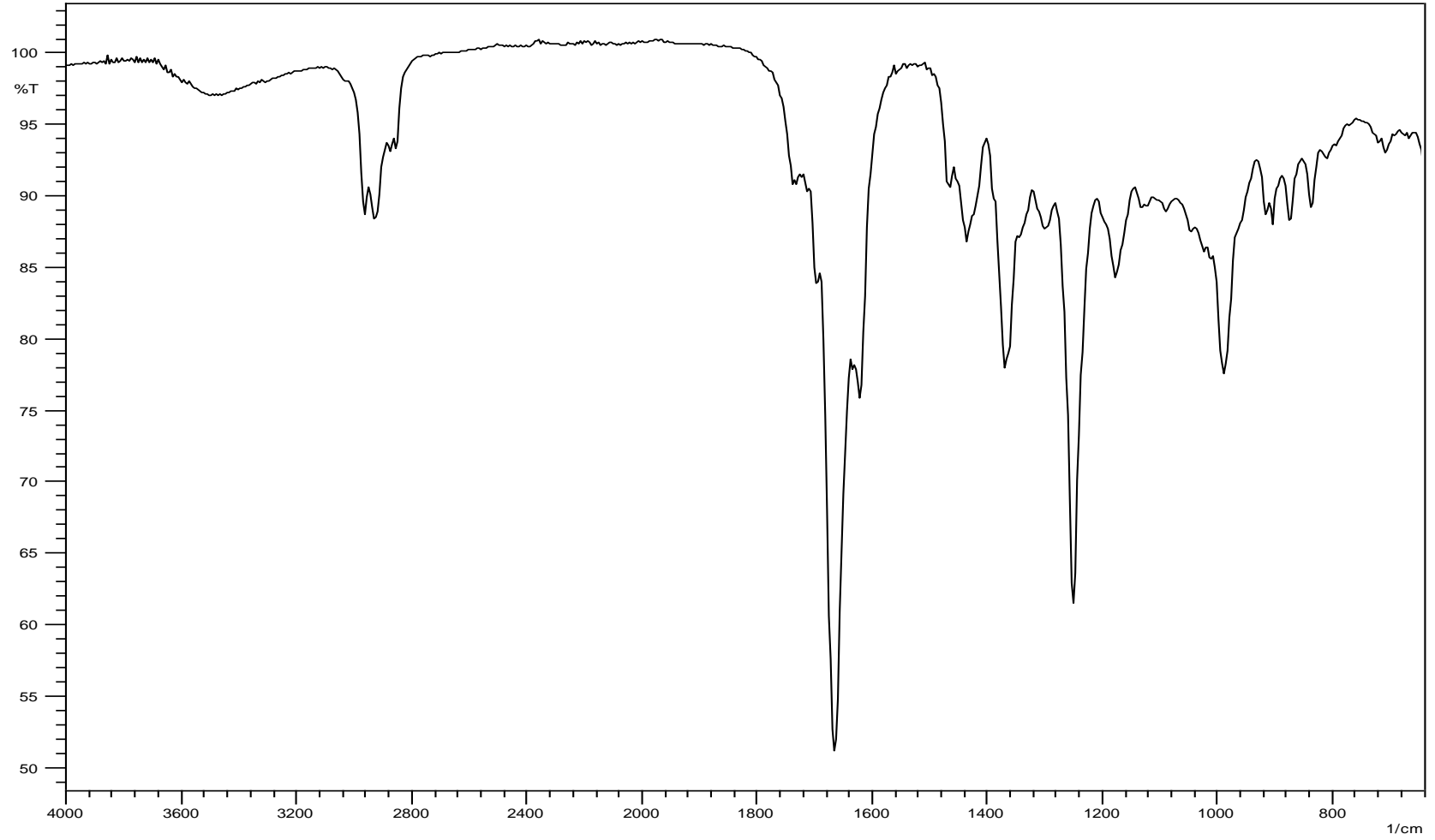


Şekil A26. (±)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon (**9**) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu

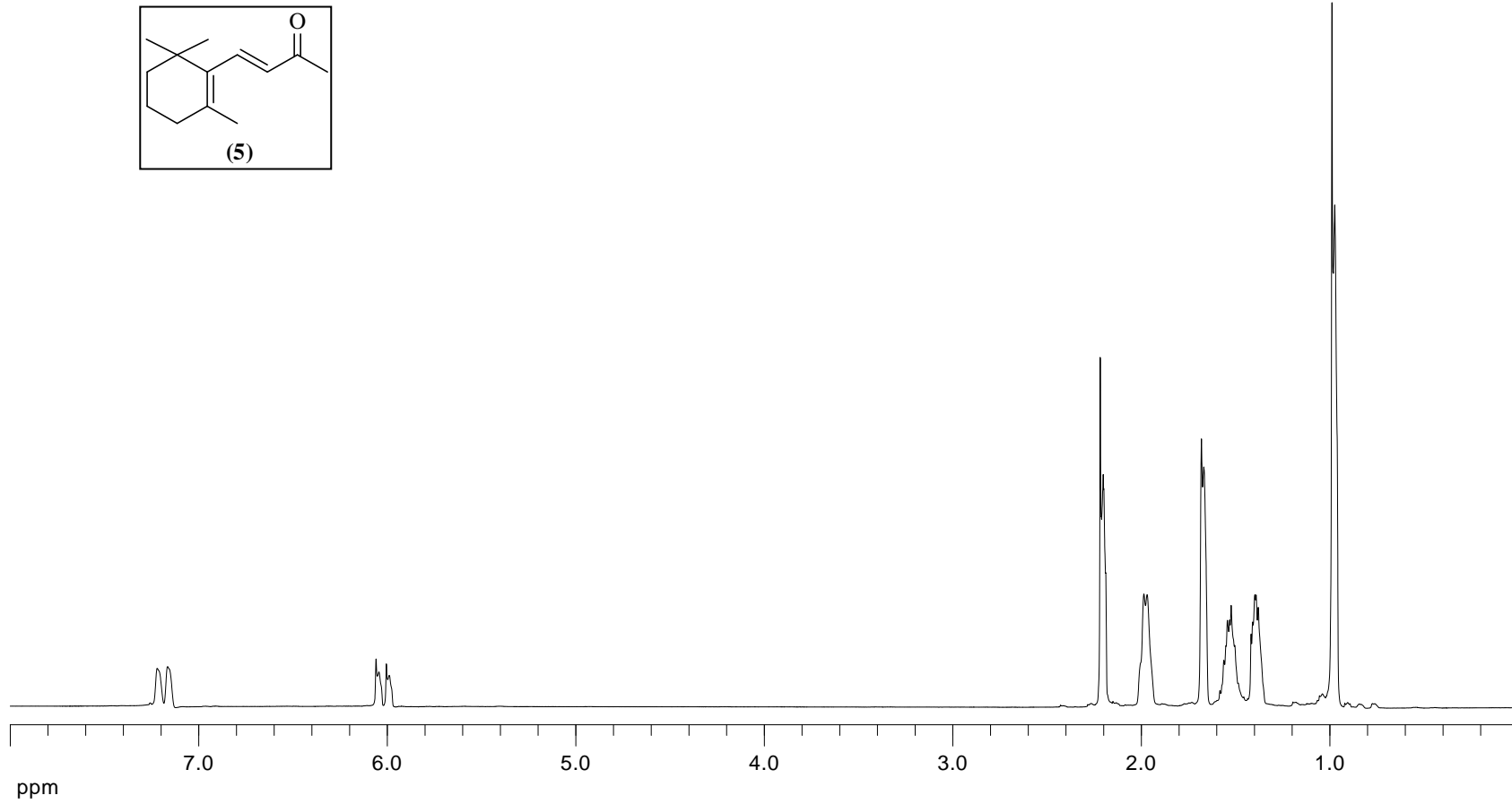
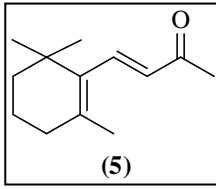


Şekil A27. (±)- $\alpha$ -İyonon (4)'ün FTIR spektrumu

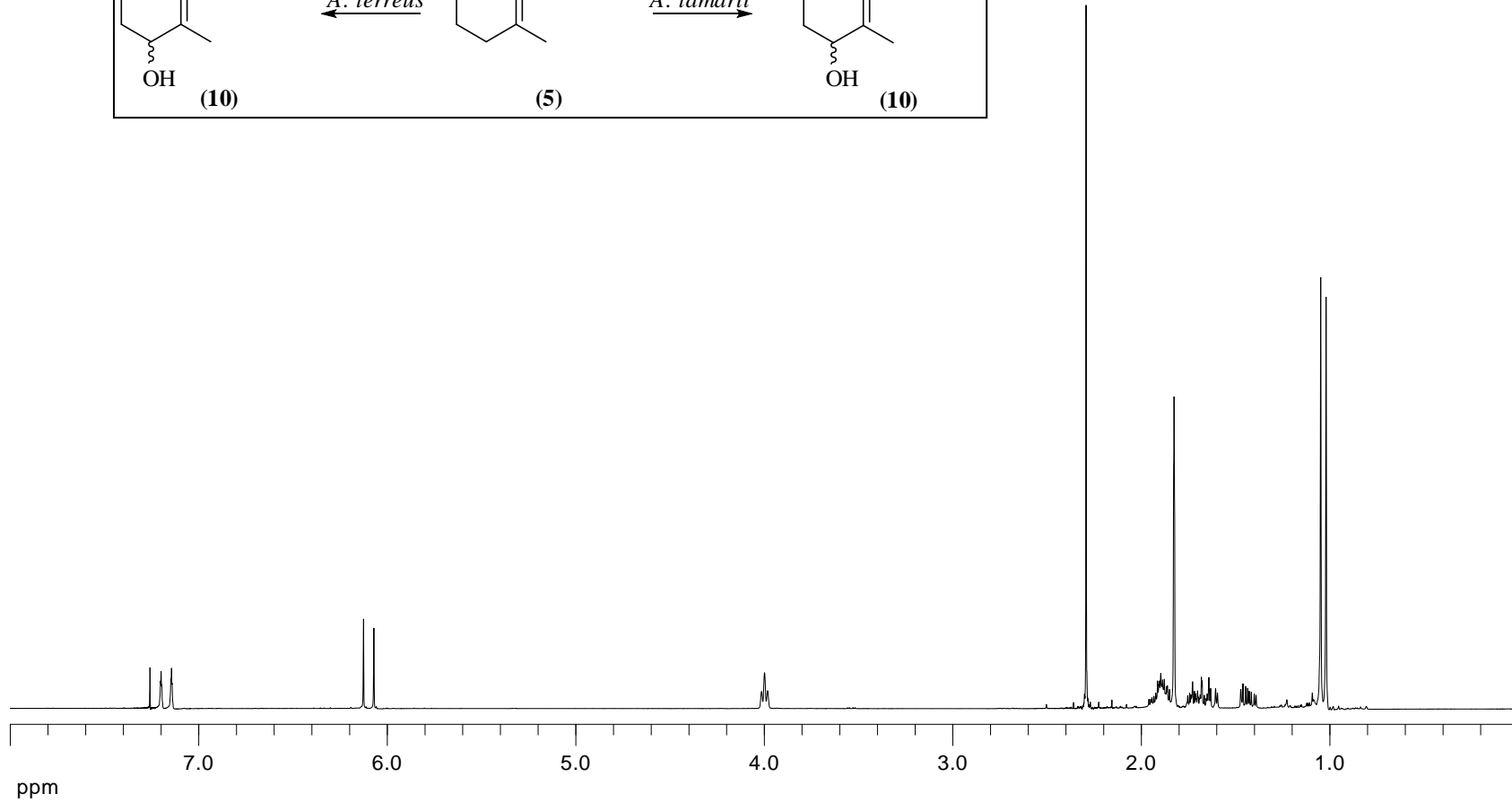
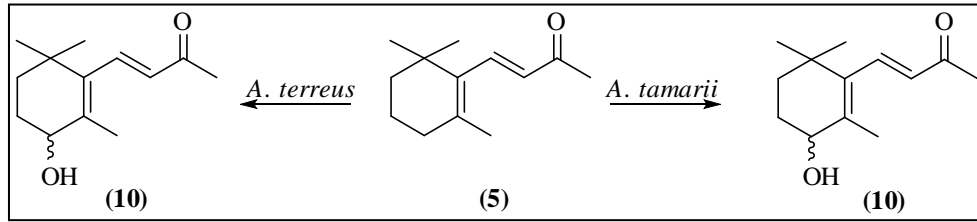




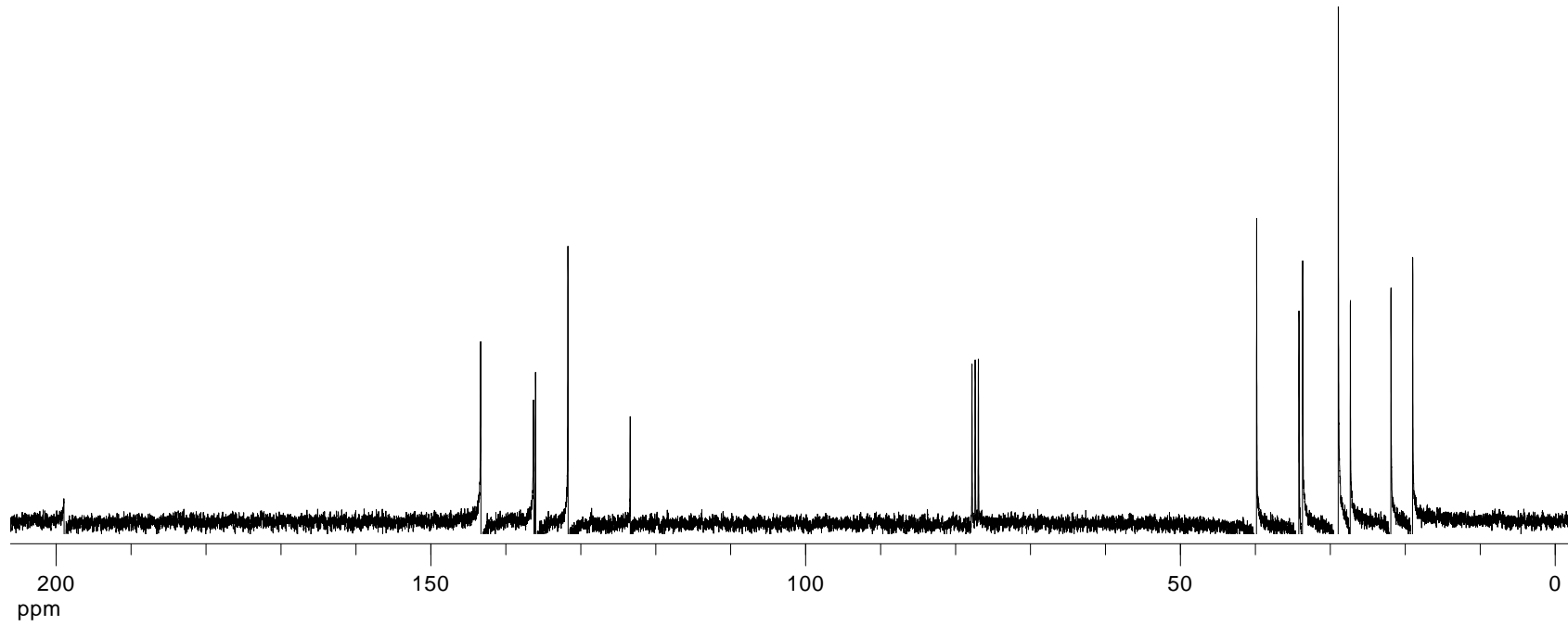
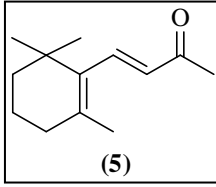
Şekil A28. (+)-3-Okzo- $\alpha$ -iyonon (9) bileşiminin FTIR spektrumu



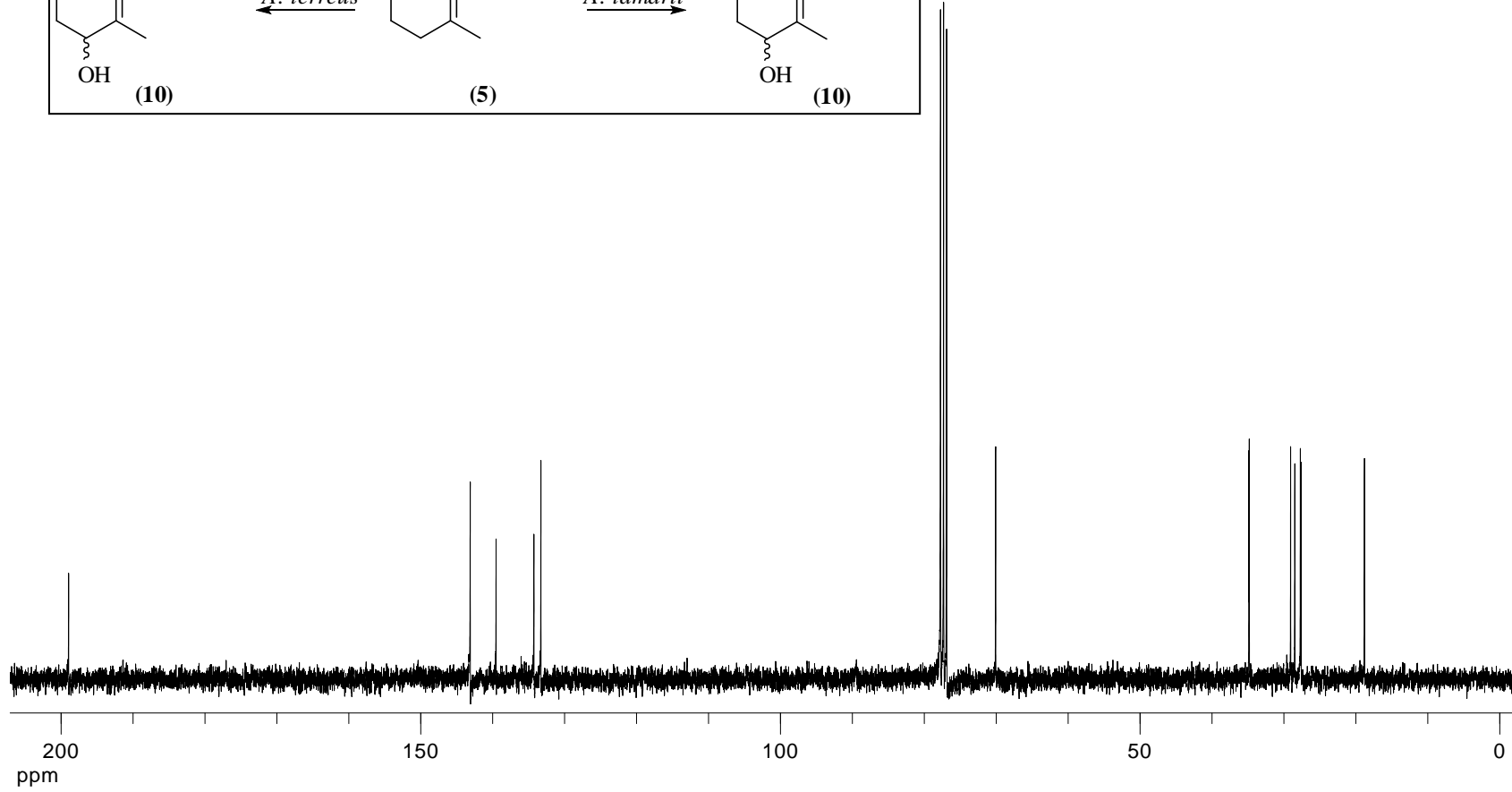
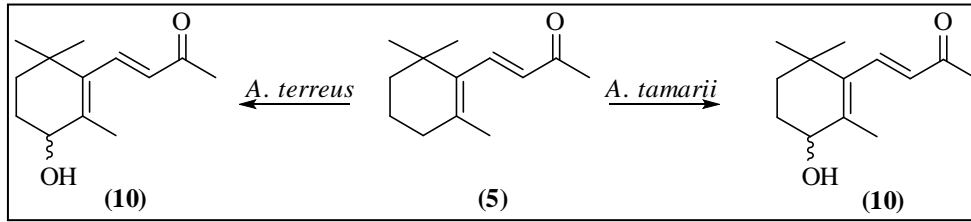
Şekil A29.  $\beta$ -İyonon (5)'in  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



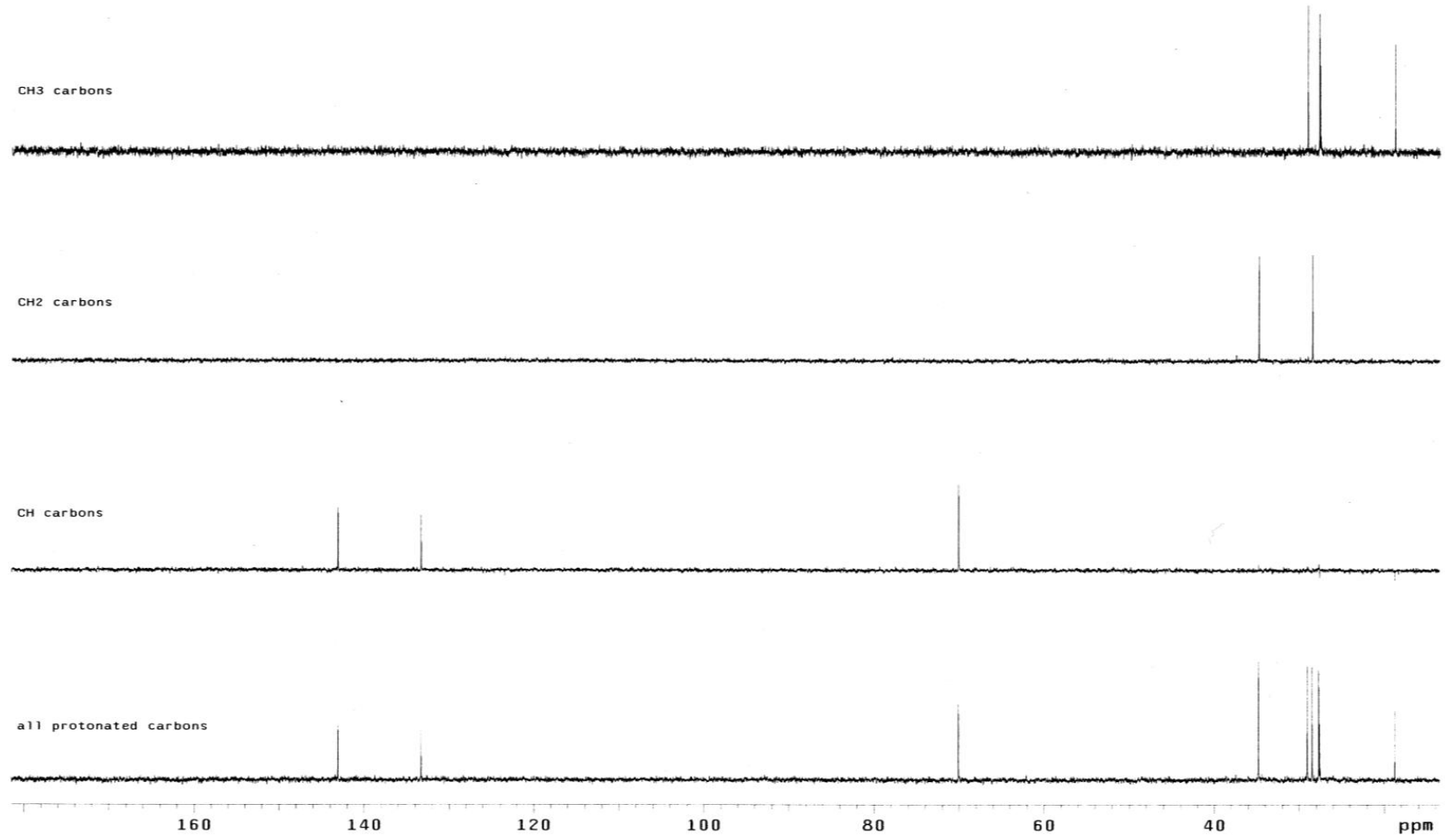
Şekil A30. ( $\pm$ )-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon (**10**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



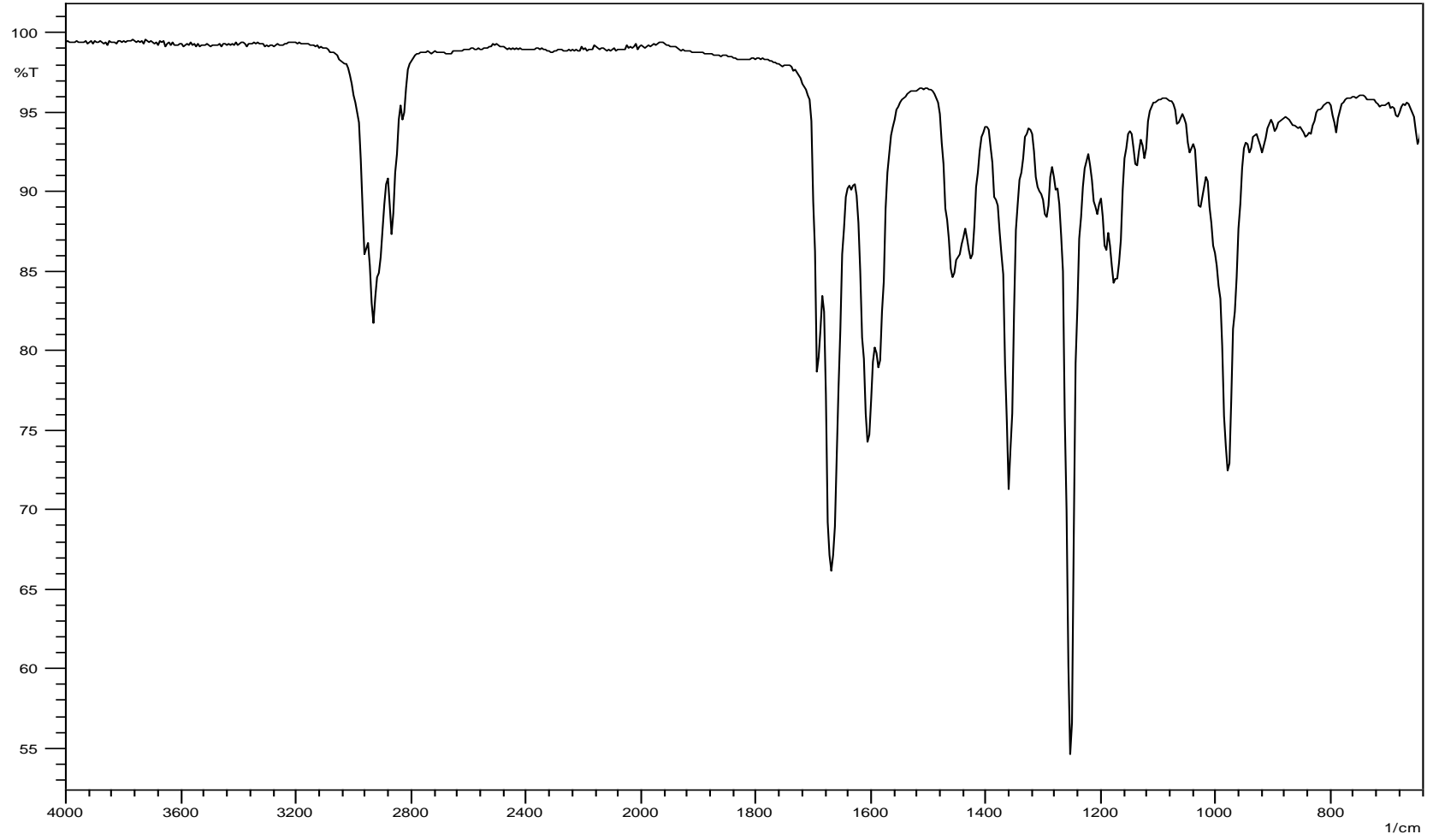
Şekil A31.  $\beta$ -İyonon (5)'in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



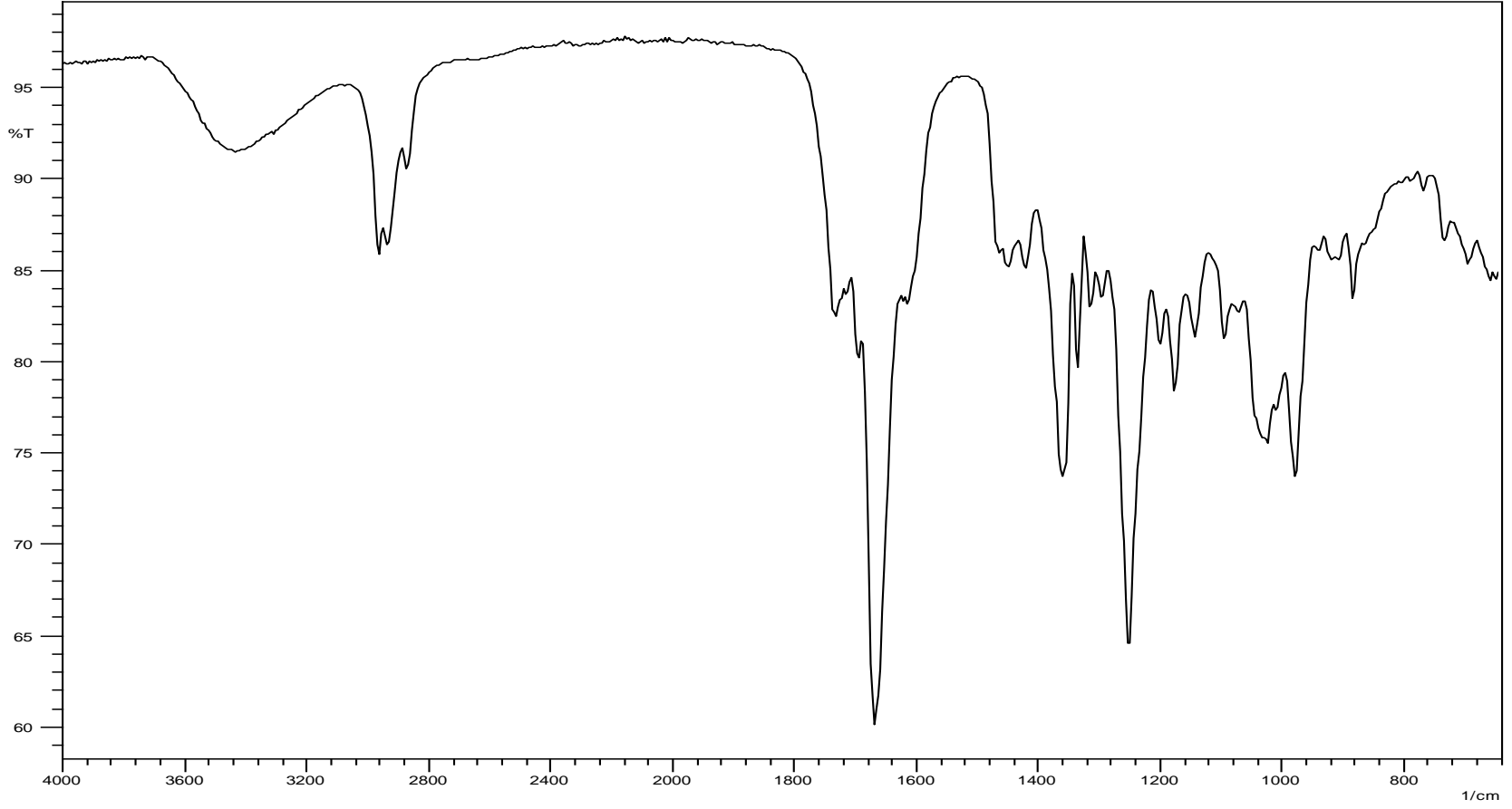
Şekil A32. (±)-4-Hidroksi-β-iyonon (**10**) bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu



Şekil A33. ( $\pm$ )-4-Hidroksi- $\beta$ -iyonon (**10**) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu

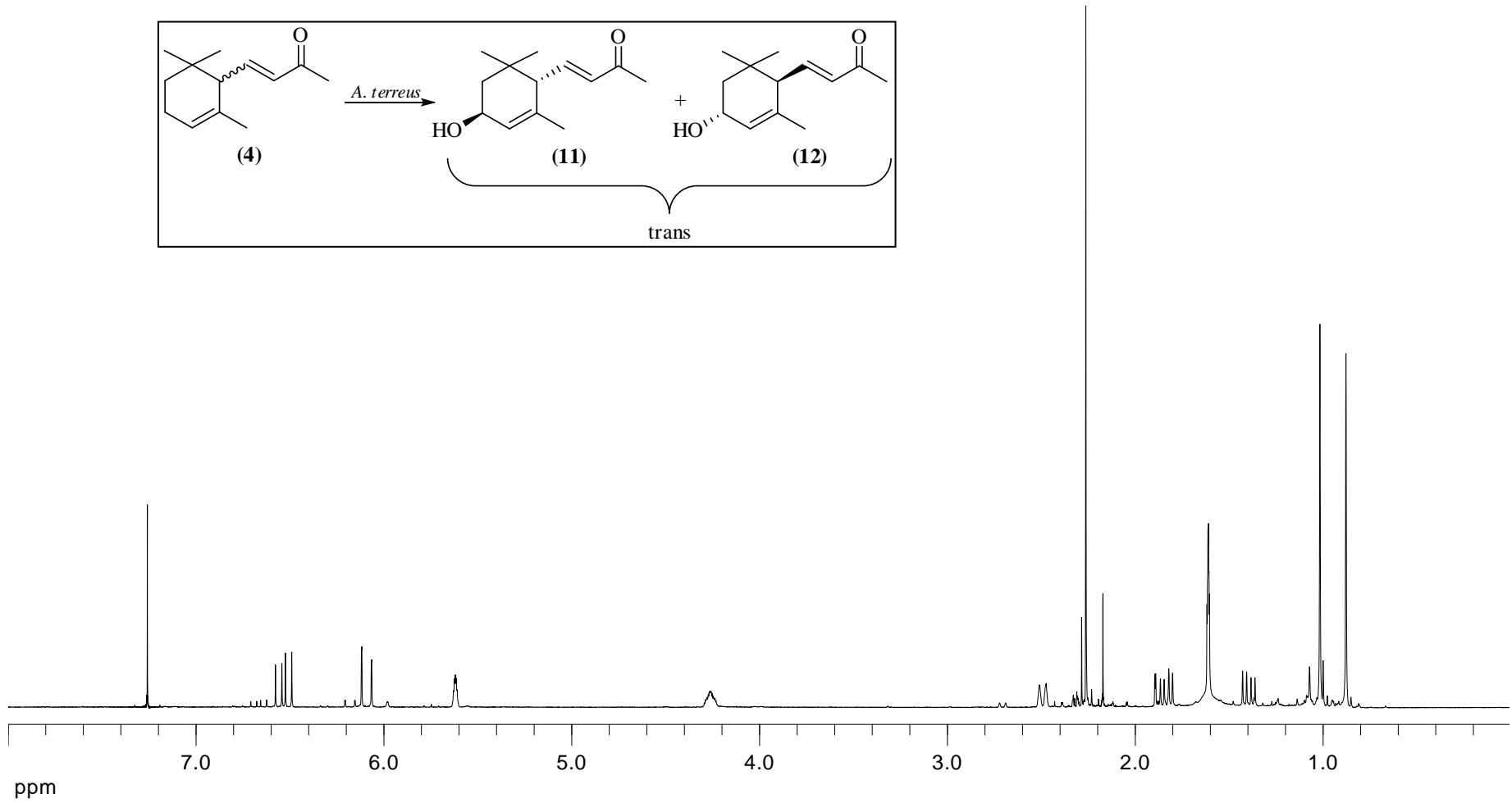
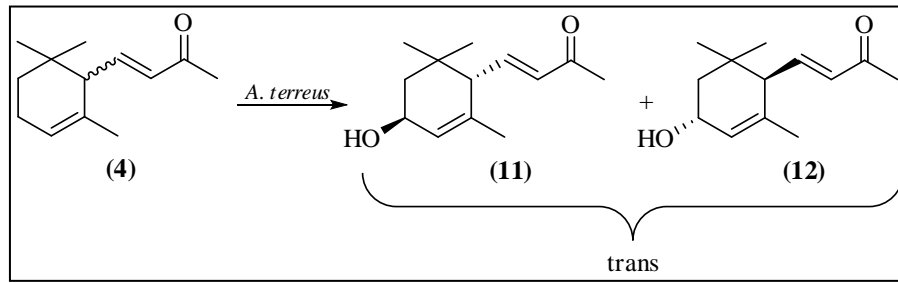


Şekil A34.  $\beta$ -İyonon (5)'in FTIR spektrumu

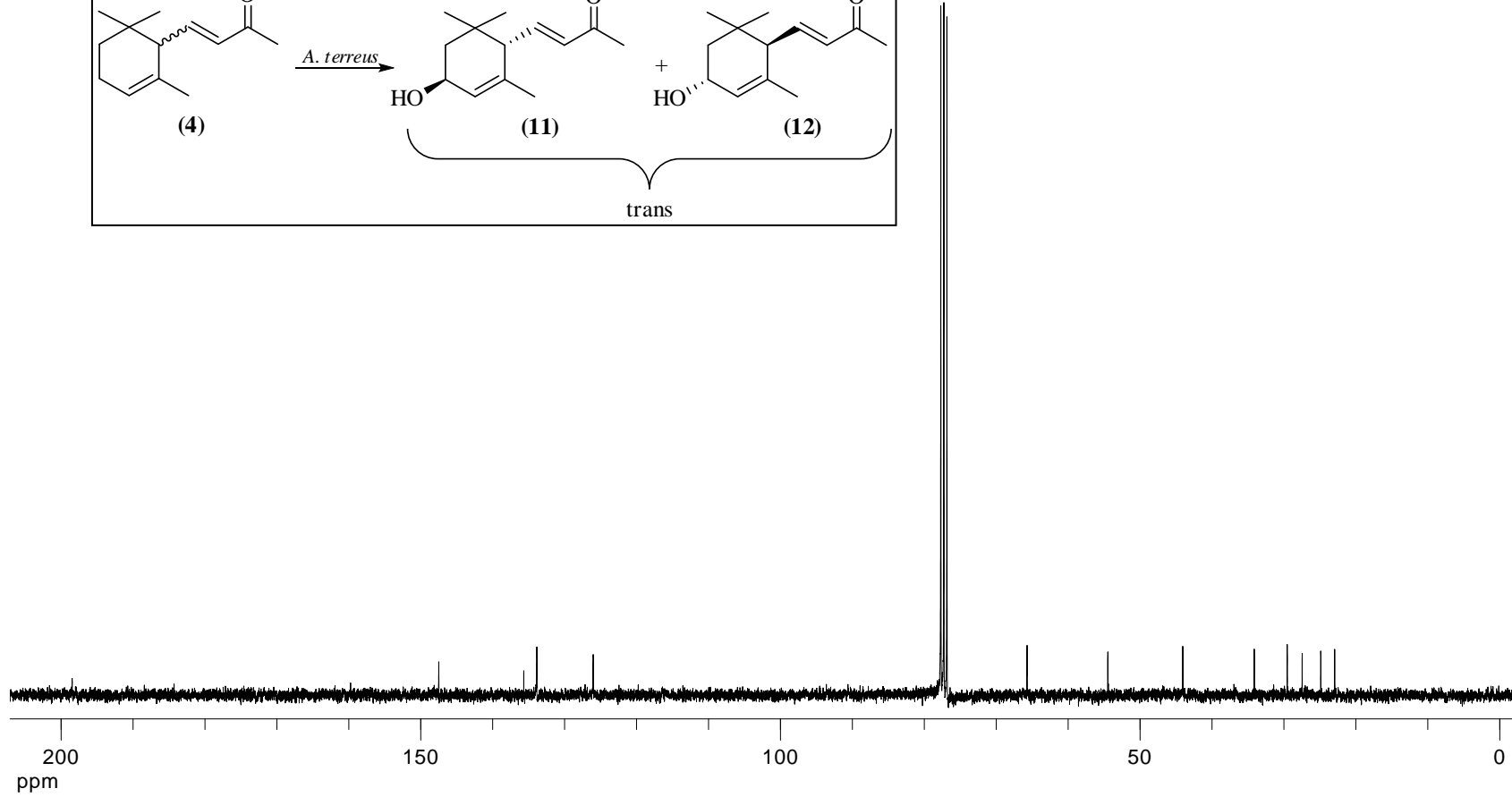
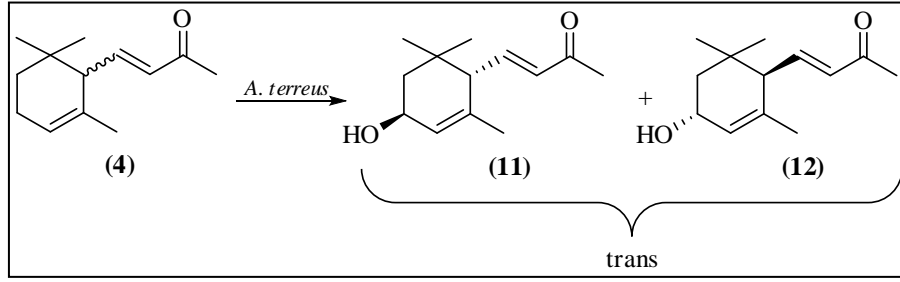


Şekil A35. (±)-4-Hidroksi-β-iyonon (**10**) bileşğinin FTIR spektrumu

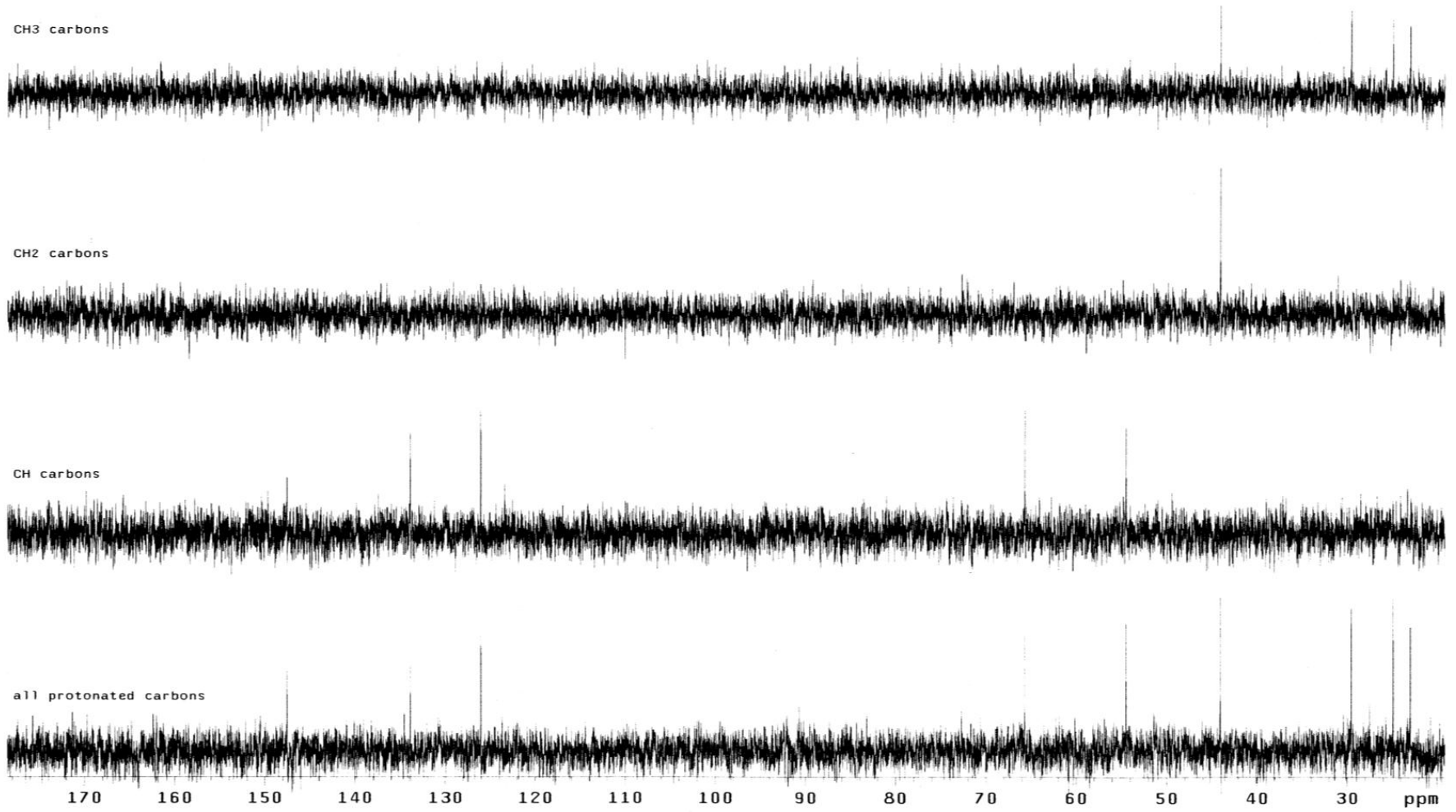




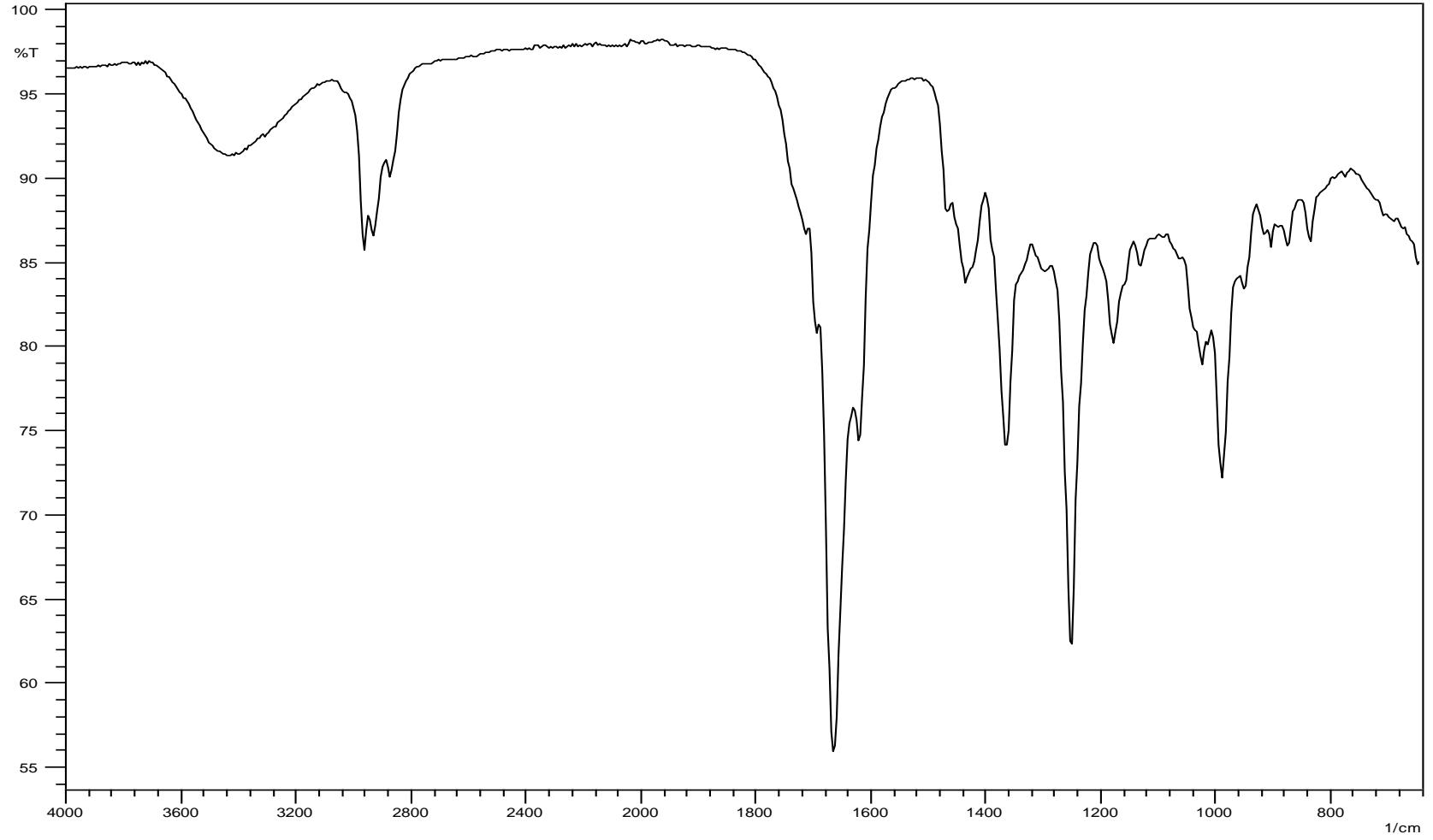
Şekil A36. *trans*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



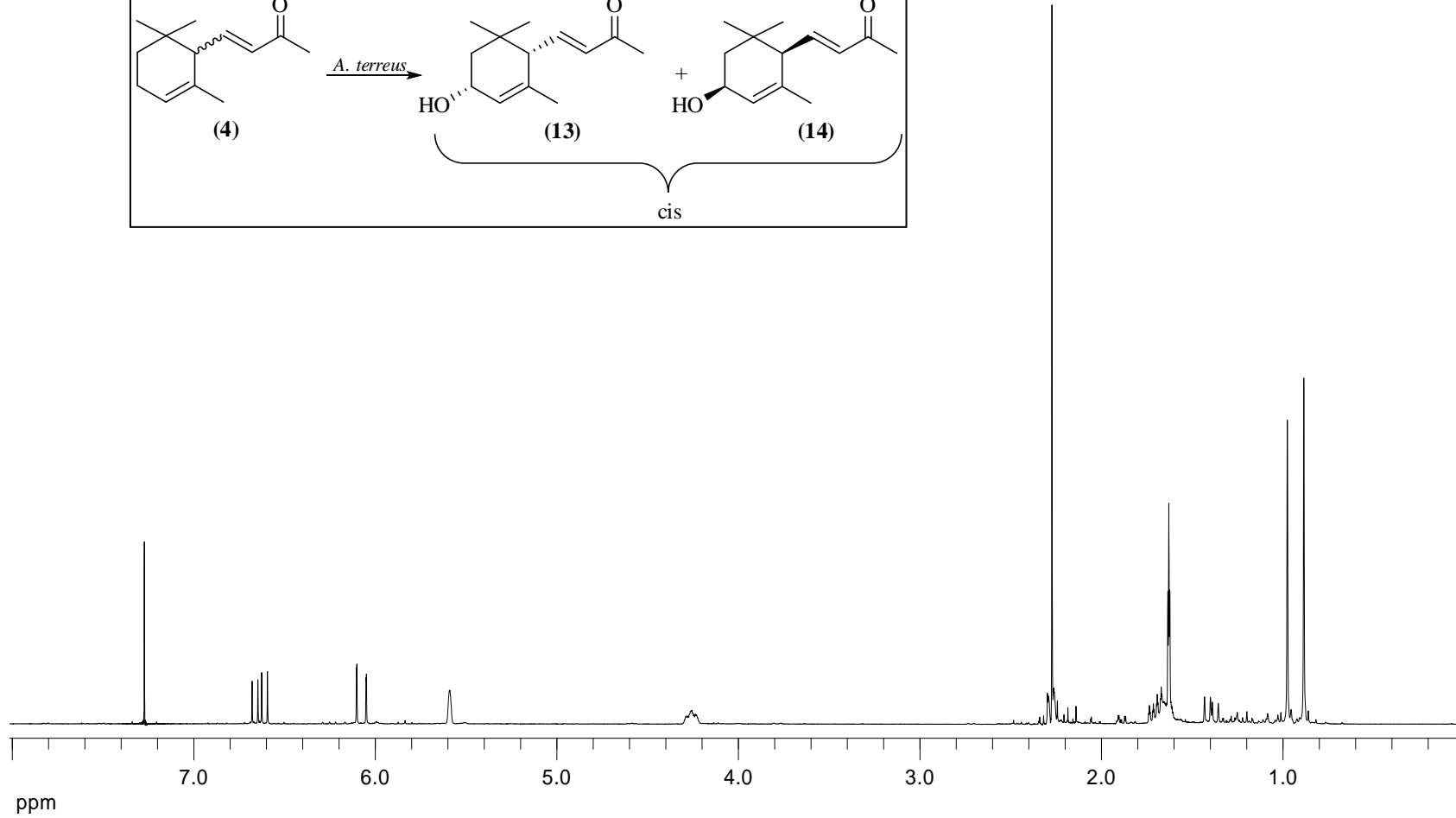
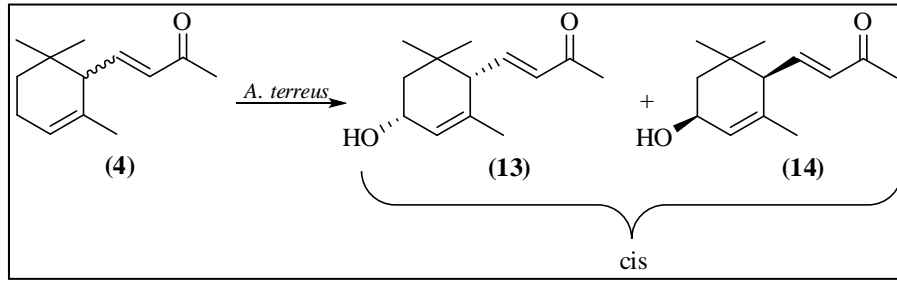
Şekil A37. *trans*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**11**+**12**) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum



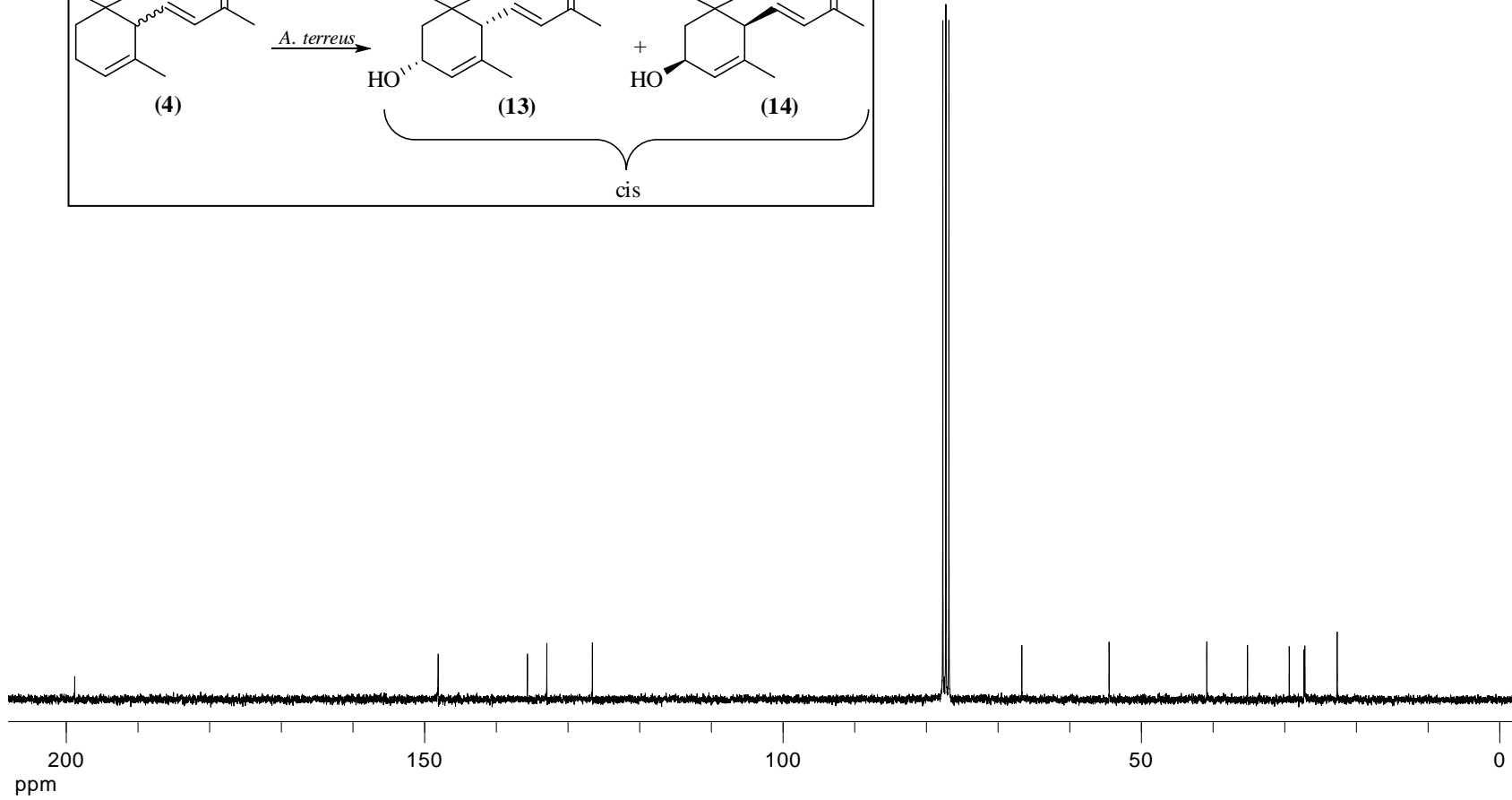
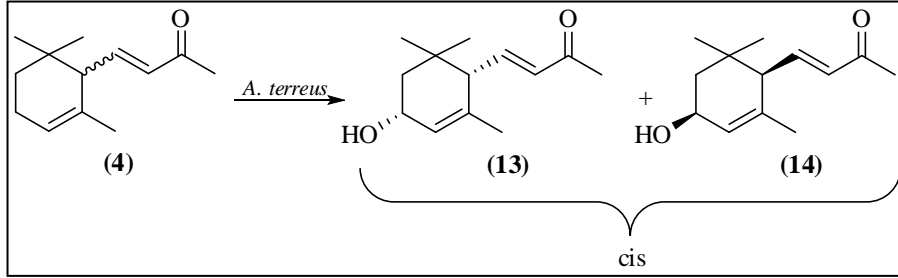
Şekil A38. *trans*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12) bileşiminin DEPT NMR spektrumu



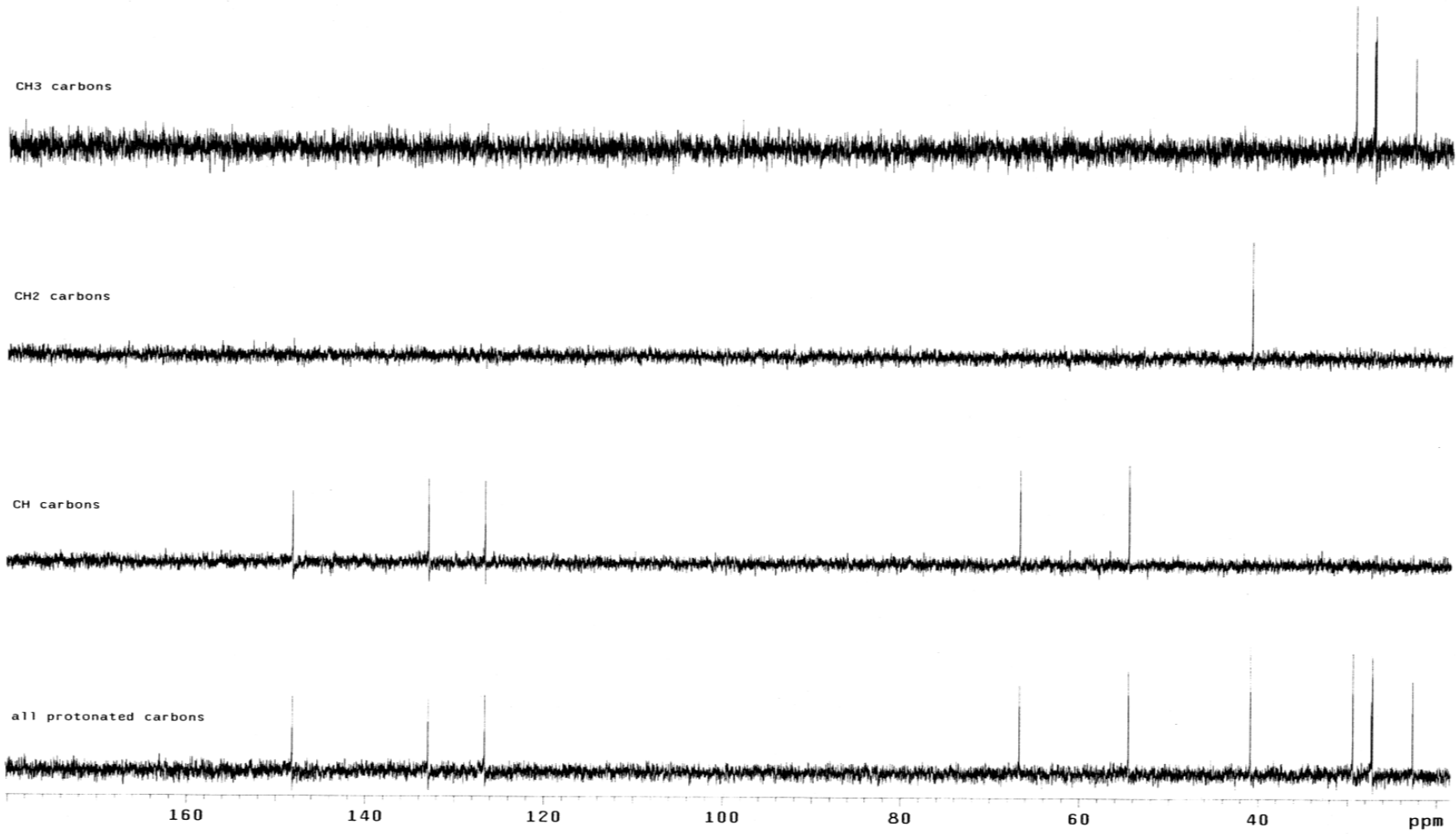
Şekil A39. *trans*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (11+12) bileşiğinin FTIR spektrumu



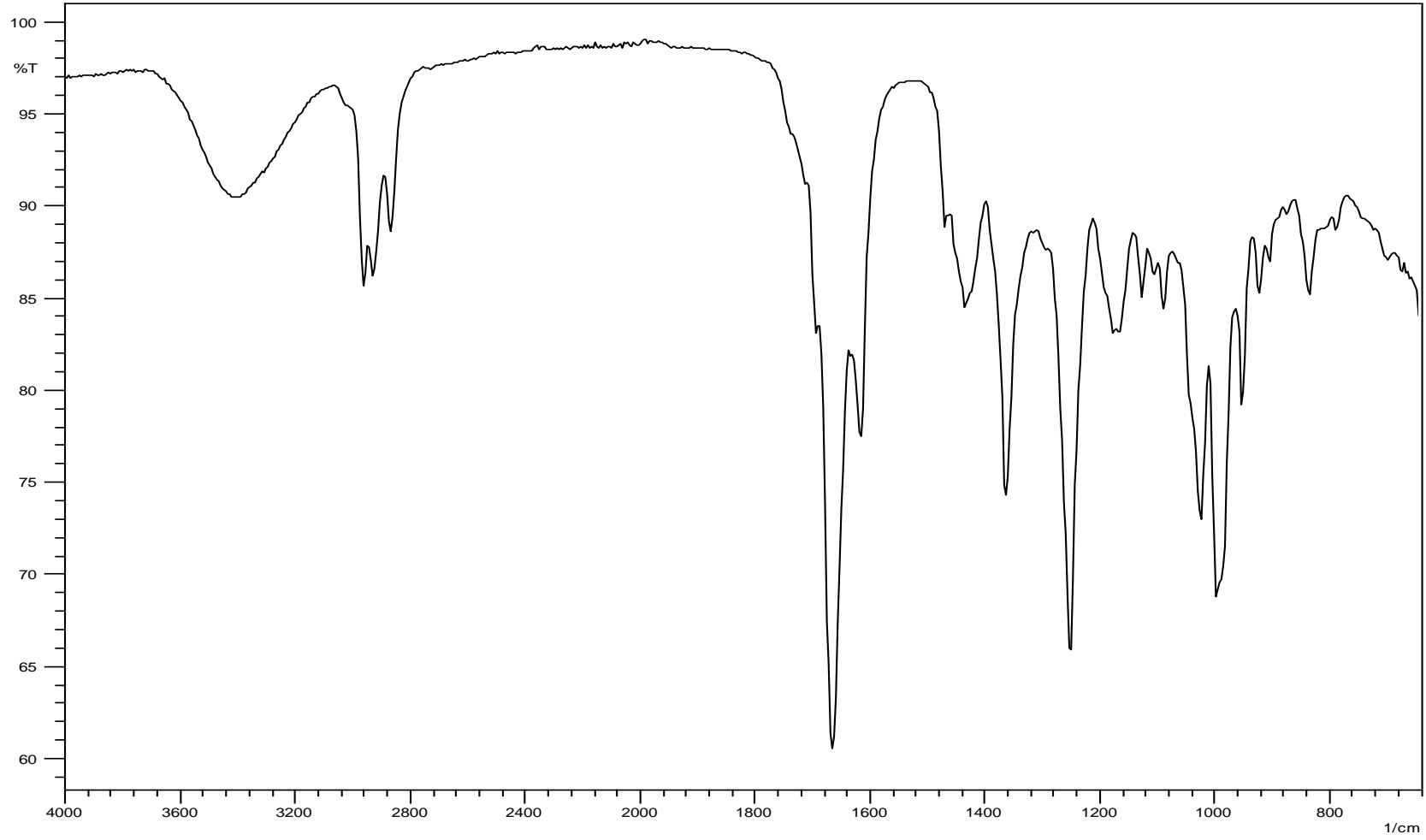
Şekil A40. *cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (**13+14**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Şekil A41. *cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14) bileşiminin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A42. *cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14) bileşiğinin DEPT NMR spektrumu



Şekil A43. *cis*-3-Hidroksi- $\alpha$ -iyonon (13+14) bileşiminin FTIR spektrumu



## ÖZGEÇMİŞ

Semra YILMAZER KESKİN, 1980'de Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2002 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2005 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl doktora öğrenimine başladı. Aralık 2003 yılından itibaren Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

# THE INVESTIGATION OF FUNGAL BIOTRANSFORMATION OF SOME MONOTERPENOIDS

Semra YILMAZER KESKİN

## SUMMARY

Keywords : Biotransformation, Monoterpenoids, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus fumigatus*.

Microbial biotransformations of monoterpenoids have found worldwide application for the production of more valuable and functionalized compounds used especially in foods, perfumes and medicines. A number of researches on microbial biotransformations of a wide range of monoterpenoids have been reported for years. There are still enormous efforts to increase the efficiency of microbial biotransformations and find new useful microorganisms and reactions.

In this work, the incubations of (-)-myrtenol, (-)-nopol, (-)-verbenone, (±)- $\alpha$ -ionone and  $\beta$ -ionone were performed with *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus*. Incubations with *Aspergillus tamaraii* and *Aspergillus terreus* afforded some hydroxylated metabolites whereas incubations with *Aspergillus fumigatus* afforded unchanged starting materials only.

The structures of metabolites were determined by measuring their optical rotations, taking their  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR and FTIR spectra and comparing them with those of starting materials.

# BAZI MONOTERPENOİDLERİN FUNGAL BİYOTRANSFORMASYONUNUN İNCELENMESİ

Semra YILMAZER KESKİN

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Monoterpenoidler, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus fumigatus*.

Monoterpenoidlerin biyotransformasyonları özellikle gıda sanayi, parfümeri ve eczacılıkta kullanılan çok önemli bileşiklerin hazırlanması amacıyla dünya çapında yaygın olarak uygulanmaktadır. Birçok monoterpenoid yıllardır bu amaçla mikrobiyal biyotransformasyonlara maruz bırakılmaktadır. Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliğinin artırılması ve faydalı olabilecek yeni mikroorganizmalar ile reaksiyonların bulunmasına yönelik yoğun çalışmalar sürmektedir.

Bu çalışmada (-)-mirtenol, (-)-nopol, (-)-verbenon, (±)- $\alpha$ -iyonon ve  $\beta$ -iyonon monoterpenoidlerinin *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *Aspergillus tamarisii* ve *Aspergillus terreus* ile inkübasyonlar bazı hidroksillenmiş metabolitler verirken *Aspergillus fumigatus* ile inkübasyonlar sadece değişmeyen başlangıç maddelerini verdi.

Metabolitlerin yapısı optik rotasyonlarının ölçülmesi,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR ile FTIR spektrumlarının alınması ve bunların başlangıç maddelerinkilerle karşılaştırılması ile belirlendi.