

***Aspergillus tamarii* MRC 72400 VE *Aspergillus terreus* MRC 200365 İLE β -İYONON BİLEŞİĞİNİN BİYOTRANSFORMASYONLARI**

Semra YILMAZER KESKİN ve Kudret YILDIRIM

SAU, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
E-mail: syilmazer@sakarya.edu.tr

ÖZET

β -iyonon'un *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ve *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. β -iyonon'un *A. tamarii* ve *A. terreus* ile 7 gün süren biyotransformasyonlarından (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon bileşiği elde edildi. (\pm)-4-Hidroksi- β -iyonon bileşiği β -iyonon'un *A. tamarii* ile biyotransformasyonundan daha yüksek verimle sonuçlandı.

Anahtar Kelimeler: *Biyotransformasyon, Monoterpenoidler, β -iyonon, *Aspergillus tamarii, Aspergillus terreus**

BIOTRANSFORMATIONS OF β -IONONE BY *Aspergillus tamarii* MRC 72400 AND *Aspergillus terreus* MRC 200365

ABSTRACT

The biotransformations of β -ionone by *Aspergillus tamarii* MRC 72400 and *Aspergillus terreus* MRC 200365 were described. The biotransformation of β -ionone with *A. tamarii* and *A. terreus* for seven days gave (\pm)-4-hydroxy- β -ionone. The biotransformation of β -ionone by *A. tamarii* resulted in a higher yield.

Keywords: *Biotransformation, Monoterpenoids, β -Ionone, *Aspergillus tamarii, Aspergillus terreus**

I. GİRİŞ

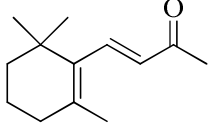
Terpenler ve terpenoidler pahalı olmayan, kolayca temin edilebilen ve yenilenebilir doğal maddelerdir. Özellikle monoterpenler ve monoterpenoidler doğal aroma kimyasallarının üretiminde kullanılacak çok geniş bir ürün yelpazesine sahiptir [1]. Monoterpenoidlerin biyotransformasyonu, enantiyomerce saf, hoş tat ve kokulara sahip bileşiklerin ılıman koşullar altında elde edilmesine olanak sağladığı için ilgi çeken bir konudur. Biyotransformasyonlar ile elde edilen ürünler doğal ürün olarak düşünülebilmektedir. Son zamanlarda doğal aroma kimyasallarının biyoteknolojik üretimi tüketicilerin bu ürünleri doğal ve sağlıklı olarak kabul 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 tatlandırıcılarının %70'e yakını doğal olarak kullanılmıştır [2]. Bunun yanı sıra monoterpenoidler 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 [3]. Ayrıca monoterpenler endüstride ozon tabakasına zararlı kloroflorokarbon gazları yerine kullanılabilirler gibi elektronik cihazlar ve kabloların temizliği, metallerin yağlardan arıtılması ve uçak malzemelerinin temizlenmesi gibi klorlanmış solventlerin kullanıldığı alanlarda bu temizleyicilerin yerine kullanılabilirler [4].

Şekil 1'de açık yapısı gösterilen β -iyonon bileşiği makyaj malzemeleri, parfümler, şampuanlar ve banyo sabunları gibi şahsi bakım malzemeleri ve ev temizlik ürünlerinde kullanılan bir bileşiktir. β -iyonon parfüm endüstrisinde

sıklıkla kullanılan gül yağının ana aroma bileşiklerindedir [5].



Şekil 1. β -iyonon'un açık yapısı

β -iyonon bileşiğinin literatüre geçen birçok fungal inkübasyonu bildirilmiştir. Mikami ve arkadaşları β -iyononun *A. niger* JTS 191 ile biyotransformasyonundan (S)-2-hidroksi- β -iyonon ve (R)-4-hidroksi- β -iyonon olmak üzere iki ana ürün elde etmişlerdir [6]. Bir diğer çalışmada Mikami ve arkadaşları çok sayıda küf ve mayanın β -iyononu diğer aroma bileşiklerine dönüştürme yeteneklerini, biyotransformasyonlar yolu ile test etmişlerdir. β -iyonon özellikle *Aspergillus*, *Phialophora*, *Rhizopus* türleri ile başarılı bir şekilde diğer aroma bileşiklerine dönüştürülmüştür. Bunların içinden β -iyonondan yeni aromatik metabolitler üretimine en uygun suş *A. niger* JTS 191 olarak belirlenmiştir [7].

Krasnobajew ve Helmlinger β -iyononun *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570 ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bazı metabolitler elde etmişlerdir ve bu metabolitler daha sonra aromalı sigara üretiminde kullanılmıştır [8]. Larroche ve arkadaşları β -iyononun *A. niger* IFO 8541 ile biyotransformasyonu sonucunda ana ürün olarak 4-hidroksi- β -iyonon verirken yan ürünler olarak da 2-hidroksi- β -iyonon, 4-hidroksi- β -iyonon ve 2-okzo- β -iyonon bileşiklerini vermiştir [9].

Hartman ve arkadaşları *A. niger* ATCC 16888 ve *Cunninghamella blakesleeana* küfleri ile β -iyononu inkübe etmişlerdir. *A. niger* ile 4-hidroksi- β -iyonon ve 4-okzo- β -iyonon bileşikleri elde edilmiştir. *C. blakesleeana* ile 4-okzo- β -iyonol ile 4-okzo-7,8-dihidro- β -iyonon bileşikleri elde edilmiştir [10]. Pinheiro ve arkadaşları *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 ile β -iyonon'dan 4-okzo-7,8-dihidro- β -iyonon elde etmişlerdir [11].

Bu çalışmanın amacı *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus terreus* küfleri ile β -iyonon monoterpeneoidinin biyotransformasyonlarının incelenmesidir.

II. MATERYAL VE METOT

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

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.

2.3 Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek substratın ilave edilmesi

Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek olan madde (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.

2.4 Bileşiklerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

İnkübasyon tamamlandıktan sonra besiyeri filtrasyon işlemine tabi tutularak küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Erlendeki 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. Kolon kromatografisi 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.

2.5 Bileşiklerin tanımlanması

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

2.6 *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus terreus* ile β -iyonon'un Biyotransformasyonu

A. tamarii küfünün besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 1'de verilmiştir [12].

Tablo 1. *Aspergillus tamarii* küfünün besiyeri bileşenleri

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

A. terreus besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 2'de verilmiştir [13].

Tablo 2. *Aspergillus terreus* küfünün besiyeri bileşenleri

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

β -iyonon (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.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 *Aspergillus tamarii* ile β -iyonon'un Biyotransformasyonu

Şekil 2'de gösterilen β -iyonon bileşiğinin *A. tamarii* küfütü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (235 mg) ve (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon (60 mg, %11,1) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının, β -iyonon bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

(\pm)-4-Hidroksi- β -iyonon;

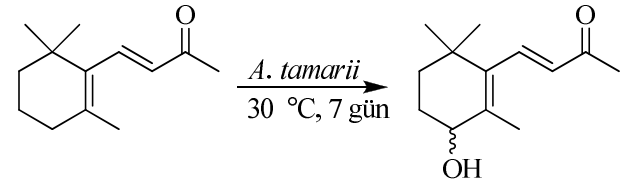
Yağımsı madde

$[\alpha]_D^{20}$: 0°, *c* 0.1, CHCl₃ (Lit. [6] $[\alpha]_D^{23}$: -0,61°, *c* 7,86, CH₃OH)

IR: 3430, 1667 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 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).

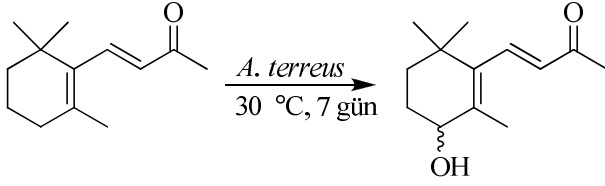
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 198,65; 142,80; 139,22; 133,96; 132,98; 69,76; 34,55; 34,50; 28,75; 28,16; 27,40; 27,30; 18,48.



Şekil 2. β -iyonon'un *A. tamarii* ile inkübasyonu

3.2 *Aspergillus terreus* ile β -iyonon'un Biyotransformasyonu

Şekil 3'de gösterilen β -iyonon bileşiğinin *A. terreus* küfütü ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (293 mg) ve (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon (52 mg, %9,6) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının β -iyonon bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Elde edilen metabolitin yapısı ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının β -iyonon bileşiğinin *A. tamarii* ile inkübasyonundan elde edilen ürünün ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. Metabolit herhangi bir optik rotasyon göstermedi.



Şekil 3. β -iyonon'un *A.terreus* ile ikübasyonu

IV. TARTIŞMA

β -iyonon bileşiğinin *A. tamarii* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,98 ppm ve ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 69,76 ppm'de bir hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi. Metabolitin ^{13}C DEPT spektrumu δ_{C} 69,76 ppm'deki yeni metin C atomu rezonansı α -iyonon metabolitlerindeki gibi hidroksilasyonun başlangıç maddesindeki halkada bulunan metilen karbonlarından birinde gerçekleştiğini düşündürdü. Başlangıç maddesi ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 39,46 ppm'de gözlenen C-2 rezonansı δ_{C} 34,55 ppm'e (Δ 4,91) yukarı bölgeye doğru bir kayma gösterirken başlangıç maddesi ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 18,64 ppm ve δ_{C} 33,33 ppm'de gözlenen C-3 ve C-4 rezonansları ise aşağı bölgeye doğru sırası ile δ_{C} 28,75 ppm (Δ 10,11) ve δ_{C} 69,76 ppm'e (Δ 36,43) kayma gösterdi. Bu sonuçlar hidroksilasyonun C-4'de gerçekleştiğini kanıtlar nitelikteydi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,98 ppm'deki triplet şeklinde yarılmaya gösteren rezonansı (1H, t, J= 4,9 Hz) hidroksilasyonun C-4'de olduğunu daha da destekledi. Metabolit herhangi bir optik rotasyon göstermedi. Metabolitin spesifik optik rotasyon göstermemesi ve ^1H NMR ile ^{13}C NMR spektrumlarının var olan literatürle karşılaştırılması sonucunda elde edilen bileşiğin (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon bileşiği olduğu anlaşıldı [14, 15].

β -iyonon bileşiği *A. terreus* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Elde edilen metabolitin (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon olduğu ^1H NMR ve ^{13}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.

Literatürde *A. tamarii* ve *A. terreus* ile β -iyonon inkübasyonlarındaki gibi (\pm)-4-hidroksi- β -iyonon elde edilmese de *A. awamori* [6] gibi bazı küfler ile söz konusu bileşiğin rasemiğe yakın karışımları elde edilmiştir.

V. KAYNAKLAR

[1] 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.

- [2] Krings U., Berger, R. G., Biotechnological Production of Flavours and Fragrances, Applied Microbiology and Biotechnology, 49, 1-8, 1998.
- [3] De-Oliveria A. C.A.X., Riberio-Pinto L.F., Paumgarten F.J.R., In Vitro Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by β -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds, Toxicology Letters, 92, 39-46, 1997.
- [4] Carvalho M.C.C.C.R., Da Fonseca D.M.R., Biotransformation of Terpenes, Biotechnology Advances, 24, 134-142, 2006.
- [5] Lalko, J., Lapczynski, A., McGinty, D., Bhatia, S., Letizia, C.S., Api, A.M., Fragrance Material Review on *trans*- β -Ionone, Food and Chemical Toxicology, 45, 248-250, 2007.
- [6] Mikami, Y., Watanabe, E., Fukunaga, Y., Kisaki, T., Formation of 2S-Hydroxy- β -ionone and 4 ξ -Hydroxy- β -ionone by Microbial Hydroxylation of β -Ionone, Agricultural and Biological Chemistry, 42, 1075-1077, 1978.
- [7] Mikami, Y., Fukunaga, Y., Arita, M., Kisaki, T., Microbial Transformation of β -Ionone and β -Methylionone, Applied and Environmental Microbiology, 41, 610-617, 1981.
- [8] Krasnobajew, V., Helmlinger, D., 156. Fermentation of Fragrances: Biotransformation of β -Ionone by *Lasiodiplodia theobromae*, Helvetica Chimica Acta, 65, 1590-1601, 1982.
- [9] Larroche, C., Creuly, C., Gros, J.B., Fed-batch Biotransformation of β -Ionone by *Aspergillus niger*, Applied Microbiology and Biotechnology, 43, 222-227, 1995.
- [10] Hartman, D. A., Pontones, M. E., Kloss, V. F., Curley, R. W., Robertson, L. W., Models of Retinoid Metabolism: Microbial Biotransformation of α -Ionone and β -Ionone, Journal of Natural Products, 51, 947-953, 1988.
- [11] Pinheiro, L., Marsaioli, A. J., Microbial Monooxygenases Applied to Fragrance Compounds, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 44, 78-86, 2007.
- [12] Gould, B.S., CVII. The Metabolism of *Aspergillus tamarii* Kita. Kojic Acid Production, Biochemical Journal, 32, 797- 802, 1938.
- [13] 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.

- [14] Kakeya, H., Sugai, T., Ohta, H., Biochemical
Preparation of Optically Active 4-Hydroxy- β -
ionone and Its Transformation to (S)-6-Hydroxy-
 α -Ionone, Agricultural and Biological Chemistry,
55, 1873-1876, 1991.
- [15] Ferreira, M. J. P., Emerenciano, V. P., Linia, G. A.
R., Romoff, P., Macari, P. A. T., Rodrigues, G. V.,
¹³C NMR Spectroscopy of Monoterpenoids,
Progress in Nuclear Magnetic Resonance
Spectroscopy, 33, 153-206, 1998.