

## ***Aspergillus terreus* MRC 200365 VE *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 İLE (-)- NOPOL BİLEŞİĞİNİN BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**Semra YILMAZER KESKİN ve Kudret YILDIRIM**

SAU, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü  
E-mail: [syilmazer@sakarya.edu.tr](mailto:syilmazer@sakarya.edu.tr)

### **ÖZET**

(-)-Nopol'ün *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *A. terreus* ile (-)-nopol'ün 7 gün süren inkübasyonu neticesinde (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol bileşiği elde edildi. (-)-Nopol'ün *A. fumigatus* ile 7 gün süren inkübasyonu ise başlangıç maddesi ile sonuçlandı.

**Anahtar Kelimeler:** *Biyotransformasyon, Monoterpenoidler, (-)-Nopol, Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus*

## **BIOTRANSFORMATIONS OF (-)-NOPOL BY *Aspergillus terreus* MRC 200365 AND *Aspergillus fumigatus* MRC 200358**

### **ABSTRACT**

The biotransformation of (-)-nopol by *Aspergillus terreus* MRC 200365 and *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 was described. The biotransformation of (-)-nopol by *A. terreus* for 7 days afforded (-)-7-hydroxymethyl-1-*p*-menthen-8-ol. The biotransformation of (-)-nopol by *A. fumigatus* for 7 days afforded only starting material.

**Keywords:** *Biotransformation, Monoterpenoids, (-)-Nopol, Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus*

### **I. GİRİŞ**

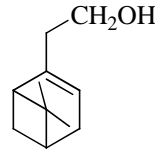
Her geçen gün daha fazla ilgi çeken biyotransformasyonlar; mikrobiyal liçing, ilaç aktif maddeleri, esans maddeleri, gıda katkı maddeleri, enerji üretimi, antibiyotik üretimi ve amino asit elde edilmesinde kullanıldığı gibi toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre ile ilgili konularda da kullanılmaktadır [1, 2].

Monoterpenoidlerin neredeyse tamamı bitkiler tarafından oluşturulur. Monoterpenoidlerin sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Bu bileşikler çoğu hücreler için toksiktir ve otoburlara karşı savunma için kullanıldıklarına inanılmaktadır [3].

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 [4]. Ayrıca monoterpenlerin endüstride ozon tabakasına zararlı kloroflorokarbon gazları yerine

kullanılabilmektedir. Elektronik cihazlar ve kabloların temizliği, metallerin yağlardan arıtılması ve uçak malzemelerinin temizlenmesi gibi klorlanmış solventlerin kullanıldığı alanlarda bu temizleyicilerin yerine monoterpenoidler kullanılabilir [5].

Şekil 1'de açık yapısı gösterilen (-)-nopol çeşitli pestisidlerin sentezinde çıkış maddesi olarak, şahsi bakım malzemeleri ve genel temizlik maddelerinde ise esans maddesi olarak kullanılan sentetik bir bisiklik primer alkoldür [6].



Şekil 1. (-)-Nopol'ün açık yapısı

(-)-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 [7].

Hanson ve Farooq tarafından *Cephalosporium aphidicola* kullanılarak yapılan biyotransformasyon çalışmasında (-)-nopol'ün inkübasyonu sonucunda (-)-4 $\beta$ -metoksinopol ve (-)-4 $\beta$ -hidroksinopol ürünlerini elde etmişlerdir [8]. Noma ve Asakawa ise *Aspergillus niger* ile (-)-nopol biyotransformasyonundan tek ürün olarak (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol elde etmişlerdir [9].

Bu çalışmanın amacı *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri ile (-)-nopol monoterpenoidinin 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 erlenlerinden 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. 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. 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 stereokimyasallarının tayini için bir polarimetre ile optik rotasyon ölçümleri gerçekleştirildi.

### 2.6 *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus fumigatus* ile (-)-Nopol'ün Biyotransformasyonu

*A. terreus* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 1'de verilmiştir [10].

Tablo 1. *Aspergillus terreus* küfünün besiyeri 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

*A. fumigatus* besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 2’de verilmiştir [11].

Tablo 2. *Aspergillus fumigatus* küfünün besiyeri 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

(-)-Nopol (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 7 gün süresince inkübasyona bırakıldı.

### III. SONUÇLAR

#### 3.1 *Aspergillus terreus* ile (-)-Nopol’ün Biyotransformasyonu

Şekil 2’de gösterilen (-)-nopol bileşiğinin *A. terreus* küfü ile 30 °C ’de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (100 mg) ve (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol (52 mg, %9,4) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının, (-)-nopol bileşiğinin <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

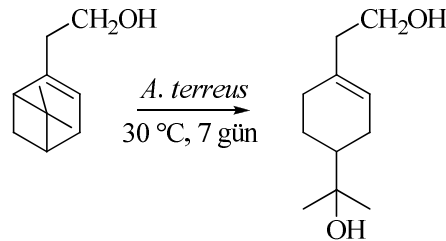
(-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol;  
Yağimsı madde

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -26,0°, 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).

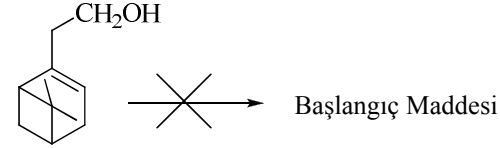
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 133,95; 123,68; 72,85; 60,13; 44,88; 40,42; 28,88; 27,35; 26,84; 26,21; 23,80.



Şekil 2. (-)-Nopol’ün *A. terreus* ile inkübasyonu

#### 3.2 *Aspergillus fumigatus* ile (-)-Nopol’ün Biyotransformasyonu

(-)-Nopol bileşiğinin Şekil 3’de gösterildiği *A. fumigatus* küfü 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 <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları karşılaştırıldığında inkübasyon neticesinde elde edilen bileşiğin başlangıç maddesi olduğu belirlendi.



Şekil 3. (-)-Nopol’ün *A. fumigatus* ile inkübasyonu

### IV. TARTIŞMA

(-)-Nopol’ün *A. terreus* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin <sup>1</sup>H NMR spektrumundaki δ<sub>H</sub> 1,18 ppm ve 1,19 ppm’de iki metil grubu rezonansı gözlemlendi. Metabolitin <sup>13</sup>C NMR spektrumundaki δ<sub>C</sub> 27,35 ppm ve 26,21 ppm’de ise iki metil grubu ve δ<sub>C</sub> 72,85 ppm’de yeni bir kuarterner C rezonansı gözlemlendi. <sup>13</sup>C NMR spektrumundaki bu rezonanslardan bileşikteki siklobütül halkasının açıldığı ve metabolitin yeni bir tersiyer hidroksil grubu içerdiği anlaşıldı. Metabolitin <sup>13</sup>C NMR spektrumunda 11 C atomu rezonansa gelmişken <sup>13</sup>C DEPT spektrumunda ise 2 metil, 5 metilen ve 2 metin C atomunun rezonansa geldiği gözlemlendi. Metabolitin optik rotasyonu -26,0° (c 0,1, CHCl<sub>3</sub>) olarak belirlendi. Bütün bu sonuçlar metabolitin (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol bileşiğine ait spektrumların literatür değerleri [12] ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlenirken söz konusu bileşik için literatürde verilen herhangi bir spesifik rotasyon değeri tespit edilemedi.

(-)-Nopol bileşiğinin *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının orijinal başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle belirlendi.

(-)-Nopol bileşiğinin *A. terreus* ile inkübasyonu bir diğer *Aspergillus* türü olan *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonuna benzer şekilde siklobütül halkası açılmış ve yeni bir tersiyer hidroksil grubu taşıyan (-)-7-hidroksimetil-1-*p*-menten-8-ol bileşiği ile sonuçlanmıştır [9]. Literatürde (-)-nopol ile aynı sonucu veren diğer herhangi bir inkübasyonu bildirilmemiştir.

## V. KAYNAKLAR

- [1] Akar T., Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 10-25, 2005.
- [2] Telefoncu A., Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1-347, 1995.
- [3] Hylemon P.B., Harder J., Biotransformation of Monoterpenes, Bile Acids, and Other Isoprenoids in Anaerobic Ecosystems, FEMS Microbiology Reviews, 22, 475-488, 1999.
- [4] De-Oliveria A. C.A.X., Riberio-Pinto L.F., Paumgarten F.J.R., In Vitro Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by  $\beta$ -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds, Toxicology Letters, 92, 39-46, 1997.
- [5] Carvalho M.C.C.C.R., Da Fonseca D.M.R., Biotransformation of Terpenes, Biotechnology Advances, 24, 134-142, 2006.
- [6] 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.
- [7] Miyazawa M., Suzuki, Y., Kameoka H., Biotransformation (-)-Nopol by *Glomerella cingulata*, Phytochemistry, 39, 337-340, 1995.
- [8] Farooq A., Hanson J.R., The Microbial Hydroxylation of Some Pinane Monoterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*, Phytochemistry, 40, 815-817, 1995.
- [9] Noma Y., Asakawa Y., Microbial Transformation of (-)-Myrtenol and (-)-Nopol, Koryo, Terupen Oyobi Seiyu Kagaku Ni Kansuru Toronkai Koen Yoshishu, 49, 78-80, 2005.
- [10] Subrahmanyam S., Kodandapani N., Shanmugam K., Moovarkumuthalvan K., Jeyakumar D., Subramanian T.V., Cyclic Voltametric Measurements of Growth of *Aspergillus terreus*, Analytical Sciences, The Japan Society for Analytical Chemistry, 17, 481-484, 2001.
- [11] Kosalec I., Pepeljnjak S., Jandric M., Influence of Media and Temperature on Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Strains, Arh Hig Rada Toksikol, 56, 269-273, 2005.
- [12] Kato M., Kido F., Watanabe M., Masuda Y., Awen B.Z., J. Preparation of Key Intermediates for the

Asymmetric Synthesis of Oxygenated Elemnoids. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 22, 2831-2836, 1993.