

***Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 Küfleri ile (-)-Mirtenol Bileşiğinin Biyotransformasyonları**

Semra YILMAZER KESKİN*, Kudret YILDIRIM
Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü / SAKARYA
Alınış Tarihi:27.04.2010 Kabul Tarihi:07.12.2010

Özet: (-)-Mirtenol bileşiğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 küflerinde nasıl metabolize edileceğini incelemek ve bunun sonucunda farklı amaçlar için çıkış maddesi olarak kullanılacak maddeler elde etmek amacı doğrultusunda söz konusu mikroorganizmalar ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. Biyotransformasyon çalışmaları için çalkalamalı inkübatörde yetiştirilen küf kültürleri kullanıldı. *A. terreus* ile (-)-mirtenol'ün 7 gün süren inkübasyonu neticesinde sentetik çalışmalar için çıkış maddesi olarak kullanılacak (-)-1-*p*-menthen-7,8-diol bileşiği elde edildi. (-)-Mirtenol bileşiği *A. fumigatus* ile 7 gün süren inkübasyonu sonucunda metabolize edilemedi ve sadece başlangıç maddesi elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Terpen, Monoterpenoid, (-)-Mirtenol, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*

Biotransformations of (-)-Myrtenol by *Aspergillus terreus* MRC 200365 and *Aspergillus fumigatus* MRC 200358

Abstract: The biotransformation of (-)-myrtenol by *Aspergillus terreus* MRC 200365 and *Aspergillus fumigatus* MRC 200358 was carried out in order to investigate how these fungi metabolise the substrate and to obtain some metabolites which may be used as starting materials for different purposes. Growing cells of these fungi on incubator shaker were used for biotransformation experiments. The incubation of (-)-myrtenol by *A. terreus* for 7 days afforded (-)-1-*p*-menthen-7,8-diol which may be used as a starting material for synthetic purposes. The incubation of (-)-myrtenol by *A. fumigatus* 7 days afforded only starting material which was not metabolised by the fungus.

Keywords: Biotransformation, Terpene, Monoterpenoid, (-)-Myrtenol, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*

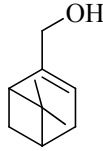
Giriş

Terpenler ve terpenoidler kolayca temin edilebilen, pahalı olmayan ve yenilenebilir doğal maddelerdir. Özellikle monoterpenler ve monoterpenoidler doğal aroma kimyasallarının üretiminde kullanılacak çok geniş bir ürün yelpazesine sahiptir (Demyttenaere ve De Kimpe, 2001). Buna rağmen söz konusu bileşiklerin uçuculuğu, sudaki düşük çözünürlüğü, hücreler için genellikle toksik olmaları sebebi ve kendiliğinden yükseltgenebilmeleri monoterpenoidlerin etkin bir şekilde kullanımını sınırlamaktadır (Henrikson, 2003).

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 yoğunlaşmasını 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 (Klings ve Berger, 1998). 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 (De-Oliveria vd., 1997). 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 (Carvalho ve Da Fonseca, 2006).

Şekil 1'de açık yapısı gösterilen (-)-mirtenol günlük temizlik maddelerinde, deterjanlarda, çeşitli esans maddelerinde, şampuanlar ve sabunlar gibi şahsi bakım ürünlerinde kullanılan doğal bir monoterpenoiddir (Bhatia vd., 2008).



Şekil 1. (-)-Mircenol'ün açık yapısı

(-)-Mircenol bileşiği bazı küfler ile biyotransformasyonlara maruz bırakılmıştır. *Cephalosporium aphidicola* ile (-)-mircenol'ün mikrobiyal hidroksilasyonu sonucu (-)-4β-10-dihidroksipin-2-en bileşiği elde edilmiştir (Farooq ve Hanson, 1995). Bir başka çalışmada ise *Aspergillus niger* ile (-)-mircenol biyotransformasyonunda tek ürün olarak (-)-1-*p*-menten-7,8-diol elde edilmiştir (Noma ve Asakawa, 2005).

Aspergillus terreus (Garcia vd., 2009; Asakawa vd., 1991; Yildirim ve Yilmazer-Keskin, 2010) ve *Aspergillus fumigatus* (Asakawa vd., 1991) küfleri (-)-mircenol haricindeki diğer bazı monoterpeneoidlerin inkübasyonları için başarılı bir şekilde kullanılmış ve birçok farklı amaç için kullanılacak metabolitler elde edilmiştir.

Bu çalışmada *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri ile (-)-mircenol bileşiğinin biyotransformasyonlarının küflerde nasıl metabolize edileceği ve metabolizasyonları sonucunda farklı sentetik amaçlar için kullanılacak bileşiklerin elde edilebilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Biyotransformasyon deneylerinde 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. ¹H-NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. ¹³C-NMR ve ¹³C DEPT NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Kolon kromatografisi için analitik saflıkta (Merck 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-H₂SO₄ reaktifine daldırıldıktan sonra 120 °C'de üç dakika ısıtılarak görünür hale getirildi.

Mikrobiyal biyotransformasyonlarda kullanılan *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.

Metot

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 yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmalarında kullanıldı.

Biyotransformasyon çalışmalarına hazırlık ve substratın ilave edilmesi

Aspergillus terreus (Subrahmanyam vd., 2001) ve *Aspergillus fumigatus* (Kosalec vd., 2005) kültürleri için hazırlanmış olan 1 L besiyeri çözeltileri (Tablo 1) 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 muhtevassında 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.

Çizelge 1. Küf kültürleri için besiyeri bileşenleri (1L)

Bileşenler	<i>A. terreus</i>	<i>A. fumigatus</i>
Glukoz	30,0 g	-
Sukroz	-	30,0 g
NaNO ₃	2,0 g	3,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g	1,0 g
KCl	0,5 g	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	0,5 g
FeSO ₄	-	0,01 g

Biyotransformasyonu gerçekleştirilecek olan (-)-mircenol (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.

Bileşiklerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

İnkübasyon tamamlandıktan sonra besiyeri bir filtrasyon işlemiyle 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. Kolonda kromatografisi çalışmalarında çözgen sistemi olarak heksan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Başlangıç maddeleri %30'luk çözgen sistemi ile metabolitler ise %50'lik çözgen sistemi kullanılarak kolondan ayrıldı.

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.

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.

Sonuçlar

***Aspergillus terreus* ile (-)-Mirtenol'ün Biyotransformasyonu**

Şekil 2'de gösterilen (-)-mirtenol bileşiğinin (500 mg) *A. terreus* küfö ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde değişmeyen başlangıç maddesi (300 mg) ve (-)-1-*p*-menten-7,8-diol (38 mg, %6,8) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının, (-)-mirtenol bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

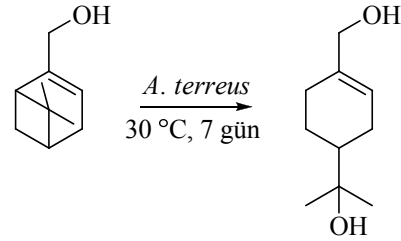
(-)-1-*p*-menten-7,8-diol;
Yağimsı madde

[α]_D²⁰: -28.0°, *c* 0.1, CHCl₃, [lit. (Miyazawa ve Ohsawa, 2002), [α]_D¹⁷: -22,4°, *c* 0.2, CHCl₃]

IR: 3240, 1665 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 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).

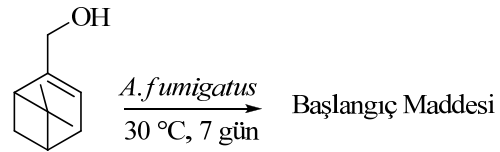
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 137,20; 122,63; 73,07; 67,06; 44,94; 27,23; 26,50; 26,50; 26,19; 23,52.



Şekil 2. (-)-Mirtenol'ün *A. terreus* ile inkübasyonu

***Aspergillus fumigatus* ile (-)-Mirtenol'ün Biyotransformasyonu**

(-)-Mirtenol bileşiğinin Şekil 3'de gösterilen *A. fumigatus* küfö ile 30 °C 'de 7 gün süren inkübasyonu neticesinde elde edilen bileşiğe (375 mg) ait ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ile (-)-mirtenol'ün ¹H ve ¹³C NMR spektrumları karşılaştırıldığında inkübasyon neticesinde söz konusu bileşiğin başlangıç maddesi olduğu belirlendi.



Şekil 3. (-)-Mirtenol'ün *A. fumigatus* ile inkübasyonu

Tartışma

(-)-Mirtenol'ün *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu sonucunda tek bir metabolit elde edildi. Metabolitin ¹H NMR spektrumundaki δ_H 1,17 ve 1,18 ppm'de iki metil grubu rezonansı gözlemlendi. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunda bileşikteki siklobütül halkası açıldığını ve yeni bir tersiyer hidroksil grubu içerdiğini gösteren δ_C 27,23 ve 26,19 ppm'de iki metil grubu ve δ_C 73,07'de yeni bir kuartern C atomu rezonansı gözlemlendi. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunda 10 C atomu rezonansı gözlenirken ¹³C DEPT spektrumunda 2 metil, 4 metilen ve 2 metin C atomu rezonansı gözlemlendi. Metabolit -28.0° (*c* 0.1, CHCl₃) değerinde bir spesifik rotasyon gösterdi. Bütün bu sonuçlardan metabolitin (-)-1-*p*-menten-7,8-diol olduğu anlaşıldı. Metabolitin spektrumları ve optik rotasyonunun literatür değerleri ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu gözlemlendi (Miyazawa ve Ohsawa, 2002).

(-)-Mirtenol'ün *Aspergillus fumigatus* ile biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Bileşiğin yapısı ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumlarının orijinal başlangıç maddesinin spektrumları ile karşılaştırılmak suretiyle tespit edildi. Bu sonuç *Aspergillus fumigatus* küfünün bileşiği metabolize edemediğini gösterdi.

(-)-Mirtenol bileşiğinin *A. terreus* ile inkübasyonu bir diğer *Aspergillus* türü olan *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonuna benzer şekilde siklobütül halkası açıldıktan sonra yeni bir tersiyer hidroksil grubu taşıyan (-)-1-*p*-menten-7,8-diol bileşiği ile sonuçlanmıştır (Noma ve Asakawa, 2005). Literatürde (-)-mirtenol ile aynı sonucu veren diğer herhangi bir inkübasyon bildirilmemiştir. Çalışmadan elde edilen ve bir *p*-mentan monoterpenoidi olan (-)-1-*p*-menten-7,8-diol bileşiği diğer bazı bileşiklerin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılabilir.

Kaynaklar

- Asakawa, Y., Takahashi, H., Toyota, M., Noma, Y. 1991. Biotransformation of Monoterpenoids, (-)-Menthols and (+)-Menthols, Terpinolene and Carvotanacetone by *Aspergillus* Species. 30(12), 3981-3987.
- Bhatia, S.P., McGinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M. 2008. Fragrance Material Review on Myrtenol. Food and Chemical Toxicology, 46, 237-240.
- Carvalho, M.C.C.C.R., Da Fonseca, D.M.R. 2006. Biotransformation of Terpenes. Biotechnology Advances, 24, 134-142.
- Demyttenaere, J., De Kimpe, N. 2001. Biotransformation of Terpenes by Fungi Study of the Pathways Involved, Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic, 11, 265-270.
- De-Oliveria, A.C.A.X., Riberio-Pinto, L.F., Paumgartten F.J.R. 1997. *In vitro* Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by β -Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds. Toxicology Letters, 92, 39-46.
- Farooq, A., Hanson, J.R. 1995. The Microbial Hydroxylation of Some Pinane Monoterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*. Phytochemistry, 40, 815-817.
- Garcia, C., Rodriguez, P., Dias, E., Heinzen, H., Menendez, P. 2009. Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 59(1-3), 173-176.
- Henrikson, M.L. 2003. Biotransformations of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification. PhD. Thesis, 31-32.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Jandrljic, M. 2005. Influence of Media and Temperature on Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Strains. Arh Hig Rada Toksikol, 56, 269-273.
- Krings, U., Berger, R.G. 1998. Biotechnological Production of Flavours and Fragrances. Applied Microbiology and Biotechnology, 49, 1-8.
- Miyazawa, M., Ohsawa, M. 2002. Biotransformation of α -Terpineol by Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4916-4918.
- Subrahmanyam, S., Kodandapani, N., Shanmugam, K., Moovarkumuthalvan, K., Jeyakumar, D., Subramanian, T.V. 2001. Cyclic Voltametric Measurements of Growth of *Aspergillus terreus*, Analytical Sciences, The Japan Society for Analytical Chemistry, 17, 481-484.
- Yildirim, K., Yilmazer-Keskin, S. 2010. Biotransformation of (-)-Verbenone by *Aspergillus tamarii* and *Aspergillus terreus*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 75(6), 649-652.