

156342

**MİKROBİYAL TRANSFORMASYON İLE GIDA
KATKI MADDESİ ÜRETİMİ**

Mesut KAPLAN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül – 2001

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu, tarafından
desteklenmiştir.**

Proje No: 00 10 57

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mesut Kaplan' ın ' Mikrobiyal Transformasyon ile Gıda Katkı Maddesi Üretimi başlıklı, Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi **04.09.2001** tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun **10.10.2001**... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL TRANSFORMASYON İLE GIDA KATKI MADDESİ ÜRETİMİ

MESUT KAPLAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Merih KIVANÇ
2001, 60 sayfa

Gıda Maddelerine çeşitli fonksiyonel özelliklerini modifiye etmek ve raf ömürlerini arttırmak için çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Uçucu yağlarda katkı maddesi olarak çeşitli gıdalara konulmaktadır.

Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünlere olan talebi giderek artmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerden olan biyotransformasyon ile elde edilen ürünlerde doğal olarak kabul edilmektedir. Günümüzde bakteri, maya ve küflerin kullanıldığı biyotransformasyon işlemlerinde elde edilen maddelerin insan sağlığına zarar vermediği bilinmektedir. Bu yüzden biyotransformasyon ile pek çok gıda katkı maddesinin üretimi sağlanabilir. Ancak Türkiye' de bu konuda yapılan çalışmalar yeterli düzeyde değildir.

Bu çalışmada öncelikle, başlangıç maddesi menton, mentol, limonen ve nane yağları olan ortamlarda mikroorganizmalar ile biyotransformasyon işlemi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Biyotransformasyon işleminde 18 mikroorganizmadan 10 tanesinin biyotransformasyon yaptığı saptanmıştır. Bu mikroorganizmalar ile elde edilen ürünlerden M₁ ve M₂ metabolitleri elde edilmiştir. Ancak bu metabolitler tanımlanamamıştır. *Aspergillus niger* tarafından mentondan mentofuran elde edilmiştir. İzolat 5 ile mentondan mentol elde edilebilmiştir. Uçucu yağların kullanıldığı biyotransformasyon çalışmalarında sonuç alınamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, terpen, uçucu yağ, aroma, mentol

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PRODUCTION OF FOOD ADDITIVE BY MICRIBIOL
TRANSFORMATION METHOD

MESUT KAPLAN

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology ProgramSupervisor: Prof. Merih KIVANÇ
2001, 60 pages

Various additives are used in food substances in order to modify their functional properties and to make them long lived. Volatile oils are also used as additives in various food substances.

In recent years, the demand of consumers for natural products has been increasing. Biotransformation one of the methods of biotechnology is considered as a natural product. Substances produced from biotransformation process, in which the bacteria, yeast and moulds are used, are known as harmless for the human health. For this reason, it can be said that the production of many food additive substances can be done by biotransformation. However, it can also be said that the studies done in Turkey and also in the world about this subject are not enough.

In this study, mainly biotransformation process is tried by using microorganisms and it is determined that ten microorganisms out of eighteen did biotransformation. M₁-M₁₁ metabolites are produced with the products produced from these microorganisms. However, these are not defined. Menthofurane is produced from Menthone by using *Aspergillus niger*. Menthole is produced from Menthone by using *Penicillium expansum-2*. Biotransformation did not take place when the volatile oils are used.

Keywords: Biotransformation, terpene, volatile oils, flavour, menthol

TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarımın bitimine kadar yardım ve eleştirirlerini esirgemeyen tez hocam, Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ' a teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca büyük bir fedakarlık ve sabır gösteren eşim Gıda Mühendisi Şükran KAPLAN' a;

A.Ü. Bilecik Meslek Yüksekokulu, Gıda ve Kimya Programlarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan, Sayın Yard. Doç. Dr Zakir POYRAZ' a;

Gıda ve Kimya programlarındaki tüm mesai arkadaşlarıma,

İzolatlarımızın tanımlanmasında yardımlarını esirgemeyen, Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümünden, Sayın Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU' na;

Ayrıca, Doç Dr. Kıymet GÜVEN' e ve Yard. Doç Dr. Fatih DEMİRCİ' ye

Her zaman moral ve destek aldığım arkadaşlarım; Bio. Gökalp İŞCAN ve Bio. M.Burçin MUTLU' ya;

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyoteknoloji ve Fermantasyon	2
1.2. Biyolojik Türevlerin Elde Edilmesi	6
1.3. Biyotransformasyon	7
1.3.1. Biyokatalizörler	8
1.3.2. Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri	9
1.3.3. Biyotransformasyon Teknikleri	10
1.4. Doğal Koku ve Tad Maddeleri	10
1.4.1. Nane (<i>Mentha</i>)	13
1.4.2. Terpenler	14
1.4.3. Mentol.....	18
1.4.3.1. Mentolün <i>Mentha sp.</i> den Elde Edilmesi	19
1.4.3.2. Mentolün Sentetik Yoldan Elde Edilmesi	20
1.4.3.3. Mentolün Biyotransformasyon ile Elde Edilmesi	21
1.4.4. Menton	22
1.4.5. Limonen	24
2. MATERYAL VE METOD	29

2.1. Materyal	29
2.1.1. Biyotransformasyonda Kullanılan Standart Maddeler	29
2.1.2. Biyotransformasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar	30
2.1.3. Standart Mikroorganizmaları Canlandırmak İçin Kullanılan Besiyerleri	31
2.1.3.1. PDA Besiyeri	31
2.1.3.2. Nütrient Broth Besiyeri	31
2.1.4. Biyotransformasyonda Kullanılan Besiyerleri	32
2.1.4.1. Genel Besiyeri	32
2.1.4.2. Alfa-medyum Besiyeri	32
2.1.4.3. Czapek Pepton Besiyeri	32
2.1.4.4. Gibberella İz Element Solüsyonlu Besiyeri	33
2.1.4.5. BA1 Agar Besiyeri	33
2.2. Metod	34
2.2.1. Mikroorganizmaların Hazırlanması	34
2.2.1.1. Nânedden Küflerin İzolasyonu ve İzolatların Tanımlanması	34
2.2.2. Optimum Koşulların Belirlenmesi	34
2.2.3. Biyotransformasyon Çalışmaları	34
2.2.3.1. Metabolitlerin Ekstraksiyonu	35
2.2.4. Uçucu Yağ Tayini ve Elde Edilmesi	36
2.2.5. Kolon Kromatografisi	38
2.2.6. İnce Tabaka Kromatografisi	39
2.2.7. Gaz Kromatografisi	40
3. BULGULAR	41
3.1. Mikroorganizmaların En İyi Geliştiği Koşullar	41
3.2. Biyotransformasyon Yapan Mikroorganizmalar	43
3.3. İnce Tabaka Kromatografisinde Kullanılan Çözücüler ve Oranları	45
3.4. Mentonun Biyotransformasyonu	46
3.5. Limonenin Biyotransformasyonu	47
3.6. Mentolün Biyotransformasyonu	47

3.7. 6- Benzilamin puran İçeren Besiyeri (BA1)' nin Kullanıldığı Biyotransformasyon	48
3.8. Nane Yağlarının Kullanıldığı Besiortamlarında Biyotransformasyonu	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
5. KAYNAKLAR	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Bazı Gıda Maddeleri ve Gıda Katkı Maddelerinin Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	3
1.2. Biyotransformasyon amaçlı, aroma Eldesinde Kullanılan Mikroorganizmaların Bazıları.....	7
1.3. Biyotransformasyonda Kullanılan Bazı Başlangıç Maddeleri ve Ürünleri	8
1.4. Biyotransformasyon Yapan Mikroorganizmaların Reaksiyon Özellikleri	9
1.5 Mentolün fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri	18
1.5. Substitutie monosiklik mentol türevlerinin kullanım oranları	19
1.6. Basidiomycetes ler tarafından saf limonenin biyotransformasyonunda karveolün izomerlerinin oluşumu.....	27
2.1. Kullanılan başlangıç maddeleri ve temin edildikleri yerler	29
2.2. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, 'Midwest Area' dan temin edilerek kullanılan mikroorganizmalar.....	30
2.3. A.Ü. Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından Temin Edilen Mikroorganizmalar.....	30
2.4. Nane bitkisinden izole elde edilen mikroorganizmalar	31
3.1. Biyotransformasyonda Kullanılan Mikroorganizmaların en iyi geliştikleri ortam koşulları.....	42
3.2. Biyotransformasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar ile Besiyerlerinin Arasındaki Gelişim İlişkisi.....	43
3.3 Biyotransformasyon Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar ve Biyotransformasyon Yapıp, Yapmadıkları	44
3.4. Biyotransformasyonda Metabolitlerin Elde Edildikleri Haftalar	45
3.5. İTK' da Kullanılan Çözücüler ve Kullanım Oranları	46
3.6. Menton un Biyotransformasyon İşlemi Sonuçlar Sonuçları.....	47
3.7. Limonenin Biyotransformasyon İşlemleri Sonuçlar.....	48
3.8. Mentolün Biyotransformasyon İşlemleri Sonuçları	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Flavour ifadesinin ana hatları.....	12
1.2. Uçucu yağların bileşiminde bulunan bazı maddeler.....	14
1.3. Asiklik (alifatik) monoterpenler.....	15
1.4. Asiklik monoterpenlerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri	15
1.5. Monosiklik monoterpenler.....	15
1.6. Monosiklik monoterpenlerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri	16
1.7. Bisiklik monoterpenler.....	16
1.8. Bisiklik monoterpenlerden alkol, ester ve ketonlu türevleri.....	16
1.9. Bazı seskiterpenler.....	17
1.10. Uçucu yağlarda bulunan aromatik maddelerden bazıları	17
1.11. Mentolün molekül yapısı	18
1.12. Timol' den L-Mentol' ün sentetik olarak sentezi	20
1.13. Mentil asetat' ın L-Mentol' e biyolojik dönüşümü.....	21
1.14. Sitranellol' dan mentolün biyotransformasyonu.....	21
1.15. D-L- Mentil süksinat tan L-Mentol' ün biyotransformasyonu.....	22
1.16. Nandede monoterpenlerin biyosentez aşamaları	23
1.17. Limonen' in organik yapısı	24
1.18. Limonen' nin biyotransformasyonu	25
1.19. Limonen' in Cladosporium tarafından biyotransformasyonu.....	25
1.20. <i>Penicillium digitatum</i> tarafından limonenin biyotransformasyonu.....	26
1.21. <i>Corynespora cassicola</i> tarafından (R)- (+)- limonenin biyotransformasyonu.....	26
1.22. <i>Corynespora cassicola</i> tarafından (R)-(-)-limonenin biyotransformasyonu	26
1.23. Limonen' in biyotransformasyon aşamaları	28
2.1. Uçucu yağ içeriğinin belirlenmesinde kullanılan, toplayıcı büret kısmı	36
2.2. Yöntemin aşamaları	37
2.3. Silikajel ile kolon kromatografisinin hazırlanması	38

2.4. Kolon kromatografisi yönteminin uygulanması ve fraksiyonların toplanması	38
2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) plakalarının hazırlanması	39
2.6. Elde edilen fraksiyonların ince tabaka kromatografisinde tayin edilebilmesi için, silikajelli tabakaların uygulanması ve çözgen maddelerde yürütülmesi	39
2.7. Elde edilen metabolitlerin U.V. ışık altında tespit edilmesi	40
2.8. Laboratuvarında kullanılan gaz kromatografisi cihazı	40
2.9. Gaz kromatografisinin kısımları	40
3.1. Biyotransformasyonda kullanılan standart maddelerden bazılarının pik değerleri	46
3.2. Mentondan elde edilen mentofuranın pik değerleri	47
3.3. Biyotransformasyon sonucunda elde edilen metabolitlerin pik özellikleri	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CAS	: Chemical abstract Search
EtOAc	: Etil asetat
FEMA	: Maddenin Gras listesindeki numarası
g	: gram
GC	: Gaz Kromatografisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
l	: Litre
MeOH	: Metil alkol
ml	: mililitre
PDA	: Potato Dextrose Agar
rpm	: Bir dakikada gerçekleşen dönme sayısı
sp.	: Tür
U.V.	: Ultra Viole (mor ötesi)

1 GİRİŞ

Mikroorganizmalar veya enzimler tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlere biyotransformasyonlar adı verilmektedir. Biyotransformasyon, canlı organizma veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla, kimyasal dönüşümlerin gerçekleştirilmesi ve yararlı ürünlerin elde edilmesi olup biyoteknoloji çalışmalarının da temelini oluşturmaktadır [1].

Biyoteknolojinin en eski kullanım alanlarından birisi gıda endüstrisidir. Alkollü içecekler, sirke ve fermente süt üretiminde mikroorganizmalardan yararlanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Ancak bugüne kadar gelinen aşamada biyoteknolojik uygulamalar deneysel çalışmalardan ileriye gidememiştir [1,2].

Gıda ürünlerine gerek onların çeşitli fonksiyonel özelliklerini modifiye etmek, gerek raf ömürlerini uzatmak amaçları ile katılan maddeler “ Gıda Katkı Maddeleri” olarak adlandırılmaktadır. Asitliği düzenleyiciler, topaklanmayı önleyiciler, antioksidanlar, aroma maddeleri, tatlandırıcılar, boyalar, antimikrobiyal maddeler, stabilizörler, v.b bu sınıfa girmektedir [2].

Tad ve koku maddelerinin gıda katkı maddeleri arasında önemli bir yeri vardır. Tad ve koku maddeleri süt ürünleri, düşük kalorili yağlar, toz haline getirilmiş gıdalar, içecekler, ekmek ve hamur işlerinde, diyet ürünler ve imitasyon ürünlerinde, baharatlar, soslar ve çorbalarda, işlenmiş et ürünlerinde, önceden hazırlanmış yemekler ve donmuş yiyeceklerde, draje, tablet ve şurup halindeki bazı ilaçlarda, çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ve ilaç sanayileri dışında güzellik bakımı ve cildiye, parfümeri ve sabunlarda, diş macunları, tozlar ve sigaralarda kullanılmaktadır. Son yıllarda ise tüketicilerin arasında gözlenen doğal ürünlere yönelik bariz eğilim, sentetik tad ve koku maddeleri yerine, doğal ve doğala özdeş bileşikleri tercih edilir kılınmıştır. Mikrobiyal transformasyon ile üretilen maddeler de doğal olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden gıda katkı maddelerinin biyotransformasyonla elde edilmesinin önemi daha da artmaktadır [3,4].

Eski dönemlerden beri, aroma maddeleri çoğunlukla bitkisel kaynaklardan ve genellikle de fermantasyonla elde edile gelmiştir. Ancak, son yarım yüzyılda yapılan çalışmalarla, bileşenlerin yapıları belirlendikten sonra, aroma maddelerinin yapay olarak üretilmesi hedeflenmiş ve başarılı sonuçlar elde

edilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda tüketicilerde doğal ürünlere hızlı bir dönüş gözlenmekte ve bu duruma doğal olmayan kimyasalların, sağlığa olumsuz etkilerinin saptanması ve bu yönde yapılan yayınların etkili olduğu düşünülmektedir. Sonuçta, marketlerde yer alan ‘doğal aroma’ etiketli gıdalar ‘iyi ve güvenli’ ile eş anlamlı alınarak , bu ürünlerin satışında gözle görülür artışlar izlenmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde , tamamı doğal olan ürünler, diğer katkı ürünlerine göre daha fazla pazar ve fiyat bulmaktadır. Doğal katkı ürün fiyatının fazla olması ; doğal aromaların genellikle bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilmesi ve bitkisel materyallerin istenilen aroma bileşenlerini çok küçük konsantrasyonlarda içermelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca hammaddenin mevsimlere ve iklim koşullarına bağlı olması da fiyatı etkilemektedir [3,4].

Uçucu yağların tad ve aroma maddelerini üretiminde önemli bir yeri vardır. Nane ise turunçgillerden sonra en fazla uçucu yağ elde edilen bitkidir. Türkiye’ de, birçok *Mentha* türü ve varyetesi, değişik bölgelerde yabani olarak yetişmektedir. Ülke genelinde ekonomik değeri bakımından fazla gelişmemiştir. Her yıl yüzlerce ton uçucu yağ ve mentol çeşitli amaçlar için ithal edilmektedir. Türkiye’ de nane baharat olarak oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir. Uçucu yağları ve mentol, çiklet, şekerleme, likör gibi gıda ve ilaç sanayiinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5]. Bakteri, maya ve küflerden doğal olarak elde edilebilen ve insan sağlığına zarar vermediği belirlenen tüm aroma maddeleri günümüzde beğeni görmekte ve tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda ticari olarak önem taşıyan mentolün biyotransformasyon ile elde edilmesine çalışılmıştır [3].

1.1. BİYOTEKNOLOJİ VE FERMANTASYON

Biyoteknoloji, canlı hücreler veya serbest hücre enzimleri ile yürütülen biyolojik reaksiyonları kapsamaktadır. Biyoteknoloji, bir yandan bazı maddeleri elde etmek için, diğer taraftan da arzu edilmeyen maddeleri ortamdaki uzaklaştırmak ve zararsız hale getirmek için uygulanan teknikleri de içermektedir. Enzimlerin mikroorganizmalardan veya hücre kültürlerinden üretimi tamamen biyoteknolojik bir süreçte gerçekleştirilmektedir [4,6].

Biyoteknolojinin en eski kullanım alanlarından birisi gıda endüstrisidir. Gerek alkollü içecekler ve sirke, gerek fermente süt ürünleri üretiminde mikroorganizmalardan süt, et ve unlu mamullerin elde edilmesinde *Lactobaciller*, *Pediococcuslar* ve *Lueconostoclar* dan yararlanılmaktadır (Çizelge 1.1.) [7]. Mayaların ise fermente içeceklerin aroma gelişimine yardımcı olduğu bilinmektedir. *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Monascus* veya *Fusarium* küflerinin içerdikleri zengin proteolitik ve amilolitik enzimler, et, tavuk, balık, baklagil, ve tahılların fermente edilmelerinde asıl etken olduğu bildirilmiştir [8]. *Trichoderma* ve *Kluyveromyces* gibi mikroorganizmalar tad ve aroma elde edilmesinde kullanılmaktadır [9].

Çizelge 1.1. Bazı Gıda Maddeleri ve Gıda Katkı Maddelerinin Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar [7].

ET ÜRÜNLERİ	
Lübnan Salamı	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i> , karışımı
Yaz salamı	<i>P.cerevisiae</i>
Yaz salamı	<i>P.cerevisiae</i> ve <i>L. Plantarum</i> karışımı
Domuz sosisi	<i>P.cerevisiae</i>
Biberli sosis	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i> , karışımı
Kurutulmuş sosis	<i>P.cerevisiae</i>
Avrupa sosisi (kurutulmuş)	<i>Micrococcus species</i>
Salam	<i>Micrococcus species</i> ve <i>Lactobacillus species</i>
Salam	<i>L. plantarum</i>
Sert salam türleri	<i>Micrococcus species</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> ve <i>Lactobacillus species</i> türlerinin karışımları.
Snack salamlar	<i>P.cerevisiae</i>
Bacon	<i>Laktik asit bakterileri</i>
Bacon	<i>L. plantarum</i>
Konserve jambon	<i>P.cerevisiae</i>
Frankfurter sosisi	<i>Micrococcus species</i> ; <i>Vibrio species</i>
Taze etler (biftek)	<i>Streptococcus lactis</i> ve <i>Leuconostoc citrovorum</i>
Taze etler (biftek)	<i>S.diacetilactis</i>
Taze etler (biftek)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>L. Lactis</i> ; <i>P. Cerevisiae</i> ; <i>L. brevis</i>
Yarı kutulmuş Türk sucuğu	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Kurutulmuş Türk sucuğu	<i>P. cerevisiae</i>
Kurutulmuş Türk sucuğu	<i>P. cerevisiae</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i> karışımı
Tütsülenmiş, vakum ambalajlanmış et ürünleri	<i>P. cerevisiae</i>
Tavuk ve diğer kümes hayvanlarından elde edilen et ürünleri	<i>P. cerevisiae</i> ve/ veya <i>L.plantarum</i>
SÜT ÜRÜNLERİ	
Permesan ve Romano peyniri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ve <i>Streptococcus thermophilus</i> karışımı
Çedar ve Colby peyniri	<i>S. lactis</i> ; <i>S.cremoris</i>
Emmental peyniri	<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. Thermophilus</i> ve <i>Propionibacterium shermanii</i>

Tablo 1.1. (Devam) Bazı Gıda Maddeleri ve Gıda Katkı Maddelerinin Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Provolone peyniri	Isiya dirençli <i>Lactobacillus species</i> ve <i>S. Thermophilus</i>
Kamembert peyniri	<i>Penicillium camemberti</i>
Munster peyniri	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus species</i>
Mozzerella peyniri	Isiya dirençli <i>Lactobacillus species</i> ve <i>S. Thermophilus</i>
Krem peynirler	<i>S. lactis</i> ; <i>S. cremoris</i> karışımı
Ayran tipi fermente sütler	<i>L. bulgaricus</i> ; <i>L. Acidophilus</i>
Yoğurt	<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S.thermophilus</i> karışımı
Taze süt	<i>S. diacetilactis</i> ; <i>L.acidophilus</i>
Tereyağı	<i>S. diacetilactis</i>
SEBZE VE MEYVE ÜRÜNLERİ	
Havuç turşusu	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ve <i>Pediococcus cerevisiae</i> karışımları
Salatalık turşusu	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ve <i>Pediococcus cerevisiae</i> karışımları
Dilimlenmiş ve kübik doğranmış salatalık turşusu	<i>L. plantarum</i>
Biber ve domates (karışık turşular)	<i>L. plantarum</i>
Zeytin türleri	<i>L. plantarum</i>
Lahana turşusu	<i>L. plantarum</i>
Şarap türleri	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces species</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> .
HUBUBBATLAR	
Bira (malt; mısır, pirin ve arpa dan)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ; <i>S. Cerevisiae</i>
Sake (pirinç)	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Endomycopsis burtonii</i>
Fermente yerfıstığı sütü	<i>Lactobacillus species</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i>
Soya sosu	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i> ve <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Ekmek ve çeşitleri	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Streptococcus lactis</i> ve <i>Saccharomyces rouxii</i>

Doğal aroma maddelerinin elde edilmesi, herhangi bir ürünün kavurma, ısıtma veya enzimatik tepkimelere uğratılması ile sağlanabilmektedir. Bu ürünler, baharatlar, meyve veya meyve suları, sebze veya sebze suları, süt ve süt ürünleri, su veya kümes hayvanları ve fermantasyon ürünleri olabilmektedir. Üretimi gerçekleştiren bu aroma bileşikleri temel yağ, oleorezin, öz veya protein hidrolizati olup, ekstraksiyon veya damıtma ile elde edilebilmektedirler [10].

Fermentasyon ilk zamanlardan beri gıda biliminde sürekli kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda , organik asitlerin , antibiyotiklerin , amino asitlerin ve nükleik asit türevlerinin üretimi için de uygun bir teknolojidir. Bu teknikle , ucuz karbon ve azot kaynakları kullanılarak amaçlanan ürün, mikroorganizmaların karmaşık metabolik etkilerine dayanan fermentasyon olayı sonucu elde edilmektedir. Bakterilerin , mayaların ve küflerin karmaşık bazı aroma maddelerini sentezleyebilme yeteneğinde oldukları bildirilmiştir [11,12].

Bazı bakteri türlerinin belirli aroma maddelerini ürettikleri bilinmektedir. Örneğin fermente ürünlerde, fermentasyonda etken olan mikroorganizmaların varlığı ile elde edilen metabolitler, o gıdalarda belirlenmiş karakteristik aromayı oluşturmaktadır. Böylece, farklı cins ve türden bakteriler süt, et veya undan yapılan klasik fermente gıdaların üretiminde önemli rol oynamaktadırlar. Uçucu aroma maddelerinin oluşumu, doğrudan mikrobiyal bir metabolit veya mikrobiyal etki ile meydana gelen kimyasal parçalanma ile gerçekleşebilmektedir. Fermentasyonda kullanılan bakterinin metabolik yolla oluşturduğu aroma maddelerinin oluşum aşaması izlenerek, bazı aroma bileşenleri elde edilebilmektedir [13,14].

Bakteriyel metabolitler arasında bulunan aroma bileşenlerinin en önemlileri ise diasetil ve asetoindir. Bu maddeler glikoz veya sitrik asit yıkımı ile meydana gelen, sekonder metabolitlerdir. Bu iki ürünün en fazla kullanıldığı alan, tereyağı üretimi ile peynirlerin olgunlaştırılmasıdır. Endüstriyel diasetil üretimi, bakterilerin biyoteknolojik olarak kullanımlarına iyi bir örnektir. Mikrobiyel diasetil oluşumu, laktik asit bakterileri tarafından, sitrat metabolizmasının bir gereği olarak, öncelikle *Lactococcus*, *Diacetylactis* ve bazı *Leuconostoc* türleri tarafından gerçekleştirilebilmektedir [15,16].

Küfler kullanılarak mantar benzeri tat ve koku, uçucu bileşenler ve laktonlar elde edilmektedir. Bunlar mantar benzeri tad ve koku, uçucu bileşenleri ve laktonlardır [17].

Mikroorganizmalar ve enzimler kullanarak üretilen aroma maddeleri iki genel başlık altında incelenebilmektedir. Bunlardan ilki geleneksel fermente gıda ürünlerinin karakteristik aromalarını oluşturan çok bileşenli aroma karışımlarıdır. Peynir ve şarapların kendilerine özgü tad ve kokularını veren bileşiklerin oluşturduğu sistemler bu gruba girmektedir. Süt yağının enzimler ile lipolizi sonucu açığa çıkan serbest yağ asitlerinin göreceli oranları çeşitli peynirlerin karakteristik tadlarını oluşturmaktadırlar. İkincisi ise bireysel aroma karışımlarıdır. Bireysel aroma maddelerinin başlıcaları ise esterler, laktonlar, terpenler, pirazinler, aldehitler gibi kimyasal yapıları kesin tespit edilebilen ve herhangi birinin kendisine özgü karakteristik özelliği bulunan bileşiklerdir. Üretimleri de çeşitli biyokatalistlerden yararlanarak spesifik biyodönüşüm

sistemleri ile gerçekleştirmektedir. Bu oluşum mekanizmaları; Biyosentez, direkt enzimatik, dolaylı enzimatik ve pirolik sistemler olarak bildirilmiştir. Bu sistemlerden bir veya birkaçının kullanılması mümkün olabilmektedir [3,18,19].

Son zamanlarda bitkisel kaynaklardan doğal aroma maddelerinin üretiminde, daha ekonomik olması nedeniyle mikrobiyel ve enzimatik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır [12,15,16].

Mikrobiyal sentezle üretilebilecek katkı maddelerinin hemen hemen sınırsız olmasına karşın, bu alandaki teknik uygulamalar oldukça kısıtlı olup, günümüzde ticari açıdan önem taşıyanlar sadece bazı amino ve organik asitlerdir [4,5].

1.2. BİYOLOJİK TÜREVLERİN ELDE EDİLMESİ

Biyolojik türevlerin elde edilmesi çeşitli yöntemler ile sağlanabilmektedir.

Mikrobiyal transformasyon; Uygun bir besi ortamında mikroorganizmaların geliştirildiği ve daha sonra ortama bir başlangıç maddesinin ilave edilerek biyodönüşümlerin sağlandığı reaksiyonlardır. En kolay ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [20,21].

Prekürsörler tarafından yönlendirilmiş biyosentez; Biyosentetik prekürsörlerin analogları besi ortamına eklenerek sekonder metabolitler elde edilmektedir. Penisilin ve antibiyotiklerin endüstriyel üretiminde kullanılan bu yöntemin uygulanabilmesi için organizmanın iyi tanınması ve biyosentezin her aşamasının iyi bilinmesi gerekmektedir [20,21].

Enzimatik olmayan biyotransformasyon; Sekonder metabolitlerin oluşumunda, enzimlerin rol almadığı biyosentetik basamaklardır. Bu reaksiyonlarda ısı, ışık gibi fiziksel etkenler veya kimyasal maddeler katalizör görevini görmektedir [21].

Metabolik manipülasyon; Sıcaklık ve pH değişimi, kültür ortamına farklı kimyasal maddelerin ilâvesi, çalkalama hızı ve şekli gibi kültür şartlarının belli parametrelerinin değiştirilmesi ile reaksiyon ürünlerinin değişip, farklı maddelerin oluşumunu sağlayan yöntemdir [21,22].

Enzim inhibisyonu; Biyosentetik reaksiyonlarda büyümekte olan hücre kültürüne spesifik bir enzim inhibitörü ilâve edilmesidir. Reaksiyonun bloke edilmesi ve böylece farklı ürünler elde edilmesidir [21,22].

Mutasentez; Kimyasal bir madde veya U.V. radyasyonu ile biyosentetik reaksiyonların mutasentezi sonucu enzimlerin daha önce spesifik özellikteki maddeler yerine farklı maddeleri oluşturması sağlanır [19,20].

Genetik Mühendisliği; Genetik manipülasyonlar sonucu biyosentetik yolların değişimi sağlanarak yeni ürünlerin elde edilmesidir. Son yıllarda hibrit antibiyotiklerin üretimi bu yolla sağlanmaktadır [21,22].

1.3. BİYOTRANSFORMASYON

Mikroorganizmalar veya enzimler tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlere mikrobiyal transformasyonlar (biyotransformasyonlar) adı verilmektedir. Biyotransformasyon, canlı organizma veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla, kimyasal dönüşümlerin gerçekleştirilmesi ve yararlı ürünlerin elde edilmesi olup biyoteknoloji çalışmalarının da temelini oluşturmaktadır [19,20,21].

Gıda, ilaç ve koku alanlarında biyotransformasyon çalışmaları hızlı bir artış göstermektedir. Ayrıca endüstriyel atık maddelerin geri kazanılması gibi alanlarda da kullanım olanakları bulunabilmektedir [20].

Çizelge 1.2. Biyotransformasyon amaçlı, aroma eldesinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları [8,9].

Mikroorganizma	Kimyasal Adı	Tat ve lezzetin türü
<i>Ceratocytis sp. ve Leuconostoc ceromans</i>	Sitranelol	Meyvensi tat
<i>Streptococcus lactis</i>	Diasetil	Tereyağı lezzeti
<i>Sporobolomyces odorum</i>	Gama delakton	Şeftali lezzeti
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	3-Metilbutil asetat	Muz lezzeti
<i>Pseudomonas sp.</i>	Yağ asidi esterleri	Meyve lezzeti
<i>Lentinus lepideus ve Bacillus subtilis</i>	Seskiterpenler	Meyve lezzeti
<i>Trichoderma viride</i>	6-Pentil-2-piren	Hindistan cevizi lezzeti
<i>Corynebacterium glutaenicum</i>	Tetrametil pirazin	Fındık lezzeti

Biyotransformasyon yöntemleri kullanarak mikroorganizmalar yardımı ile meyve lezzeti, hindistan cevizi lezzeti gibi bir çok tat ve aroma maddesi elde edilmektedir (Çizelge 1.2) [8,9,20]. Bu tad ve lezzetlerin elde edilmesinde kullanılan biyotransformasyon yöntemlerinde alkoller, asitler, şekerler, amino asitler, doymamış yağ asitleri, terpenler gibi çeşitli başlangıç maddeleri kullanılmaktadır (Çizelge 1.3) [8].

Çizelge 1.3. Biyotransformasyonda kullanılan bazı başlangıç maddeleri ve ürünler [8]

Ürünler	Başlangıç Materyali	Ajanlar
Esterler:	Alkoller+ asitler Şekerler+ amino asitler (malt)	Enzim: Lipaz Strainler: Bakteriler (<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Laktobacillus</i>)
Laktonlar	Doymamış yağ asitleri	Strains: Mayalar (<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Tyromyces</i>). Fungi: (<i>Cladosporium</i> , <i>Polyporus</i> , <i>Poria</i> , <i>Trichoderma</i>)
Terpenik alkoller:	Terpenler, Şekerler+ amino asitler	Strains:Mayalar: (<i>Kluyveromyces</i>), Bakteri: (<i>Pseudomonas</i>), Fungi: (<i>Ceratocystium</i> , <i>Lentinus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phellinus</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Trametes</i> , <i>Aspergillus</i>)
Pirazinler:	Amino asitler	Strains: Bakteriler: <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>)
Alkol, aldehit ve asitler:	Şekerler, Amino asitler, Alkoller	Direkt Fermentasyon. Enzim: (Kloroperoksidaz)

1.3.1 BİYOKATALİZÖRLER

Biyotransformasyon reaksiyonlarında, mikroorganizmalar, canlı bitkiler, bitki doku ve kültürleri, canlı hayvanlar, hayvan doku ve kültürleri, insan metabolizması gibi bütün hücre sistemleri ve enzimler biyokatalizör olarak rol almaktadır [20,22].

Biyotransformasyonda mikroorganizmaların, bitki hücrelerine nazaran belirgin üstünlükleri bulunmaktadır. Mikroorganizmaların çoğalması 20-40 dakika kadar sürerken, bitki hücreleri 20-300 saat kadar sürebilmektedir. Bu durum biyotransformasyon zamanını uzatmaktadır. Mikroorganizmalar ile yapılan biyotransformasyonların verimi çok yüksektir. Biyotransformasyonda fare, tavşan, rat ve solucan gibi canlı hayvanlar kullanılabilir. Bitki hücrelerinin kullanımında meydana gelen olumsuzluklar, hayvan hücreleri içinde söz konusu olmaktadır. Bazı reaksiyonların kullanımında enzimlerin çok iyi sonuç

verebilmesi ve birçok kez kullanılabilir olması gibi nedenlerle son yıllarda üzerinde önemle durulan konuların başında gelmektedir [19,22,23,24].

1.3.2 BİYOTRANSFORMASYONDA REAKSİYON TIPLERİ.

Biyotransformasyon işlemlerinde, mikroorganizmaların meydana getirdikleri reaksiyonlar şu şekilde sıralanmaktadır (Çizelge 1.4) [19,22,23,24].

1. Oksidasyon (Hidroksilasyon, Epoksidasyon, Dehidrojenasyon, Baeyer Villiger Oksidasyonu, Kısmi oksidatif degradasyon),
2. Redüksiyon (Ketonların, Aldehitlerin, Karboksilik asitlerin, Hetero atomların indirgenmesi, Çifte bağların hidrojenasyonu),
3. Hidrolitik Reaksiyonlar (Esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlanma su girişi, N-demetilasyon),
4. Katılım ve Kondensasyon (Ester ve amit bağlarının oluşumu, Asikloin kondensasyonu, C=C bağlanma amonyak ilâvesi, kupling reaksiyonları),
5. İzomerizasyon,
6. Yeni C-C bağlarının oluşumu,
7. Yeni hetero atomların ilâvesi.

Çizelge 1.4. Biyotransformasyon yapan mikroorganizmaların, reaksiyon özellikleri [22].

Prokaryotlar: <i>Bacillus</i> <i>Cornynebacterium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	Hidroksilasyon, dioller, razematların rezülasyonu Hidroksilasyon Oksidasyon, razematların rezülasyonu Oksidatif parçalanmanın tüm çeşitleri Hidroksilasyon, epoksidasyon, siklizasyon
Mayalar: Candida, Hansenula <i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i>	Razematların rezülasyonu, stereoselektif redüksiyon, C-C bağlarının formasyonu
Yüksek Fungi Absidia <i>Alginomonas</i> <i>Aspergillus</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Chaetomium</i> <i>CladosporiumDiplodia</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibberella</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i>	Razematların rezülasyonu, hidroksilasyon Razematların rezülasyonu, hidroksilasyon Oksidatif parçalanmanın tüm çeşitleri Oksidatif pathwayler Dioller Hidroksilasyon, epoksidasyon, dioller Hidratasyon Razematların rezülasyonu, hidroksilasyon Epoksidasyon, redoks reaksiyonları Epoksidasyon, hidroksilasyon

1.3.3. BİYOTRANSFORMASYON TEKNİKLERİ

Büyüyen Hücreler İle Biyotransformasyon; Mikroorganizmalar için en uygun besiyortamı tespit edildikten sonra mikroorganizma bu ortamda geliştirilir. Daha sonra ortama biyotransformasyona uğrıtılacak madde ilave edilir [20,23,24].

Stasyonier Hücreler ile Biyotransformasyon; Bu yöntemde mikroorganizmanın geliştirilmesi ve biyotransformasyon ayrı ayrı yapılmaktadır. Mikroorganizmalar uygun besi ortamında üretilmekte ve uygun teknikler kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Biyotransformasyon sırasında ortamdaki hücre sayısı sabit tutulabilmektedir [20,23,24].

Sporlar ile Biyotransformasyon ; Biyotransformasyonda mikroorganizmaların sporlarından yararlanılmaktadır. Uygun besiyortamlarında geliştirilen mikroorganizmalar misellerinden ayrılmakta ve sporlar muhafaza edilmektedir. Biyotransformasyon işlemi sırasında kullanılan sporlar defalarca kullanılabilir [20,23,24].

İmmobilize Hücreler ile Biyotransformasyon; Mikroorganizmalar poliakrilamid, kappa-karragenan, alginat, selüloz, nişasta gibi ortamlarda immobilize hale getirilir. İmmobilize hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir ve yeniden kullanılabilir [20,23,24].

Serbest ve İmmobilize Enzimler ile Biyotransformasyon; Enzimler pahalı maddeler olduğundan, serbest enzimlerin yerine immobilize enzimlerde kullanılabilir. Enzimler saf halde kullanıldıklarında ortamda istenmeyen maddeler oluşmaması nedeniyle son yıllarda tercih edilen bir yöntemdir [20,23,24].

1.4. DOĞAL KOKU VE TAT MADDELERİ

"Doğal Koku ve Tat Maddeleri" nin tanımı Amerikan Federal İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) yönetmeliklerine göre; uçucu yağ, oleorezin, esans veya ekstre, hidrolize protein, gıda değerinden çok gıdalarda koku ve tat fonksiyonu olan kavrulmuş, ısıtılmış, enzimatik faaliyet sonucu elde edilmiş veya türetilmiş baharat, meyve, meyve suyu, yenilebilir mantar/maya, ot, kabuk, tomurcuk, kök, yaprak veya benzer bir bitkisel materyal, et, deniz ürünü, kümes hayvanı,

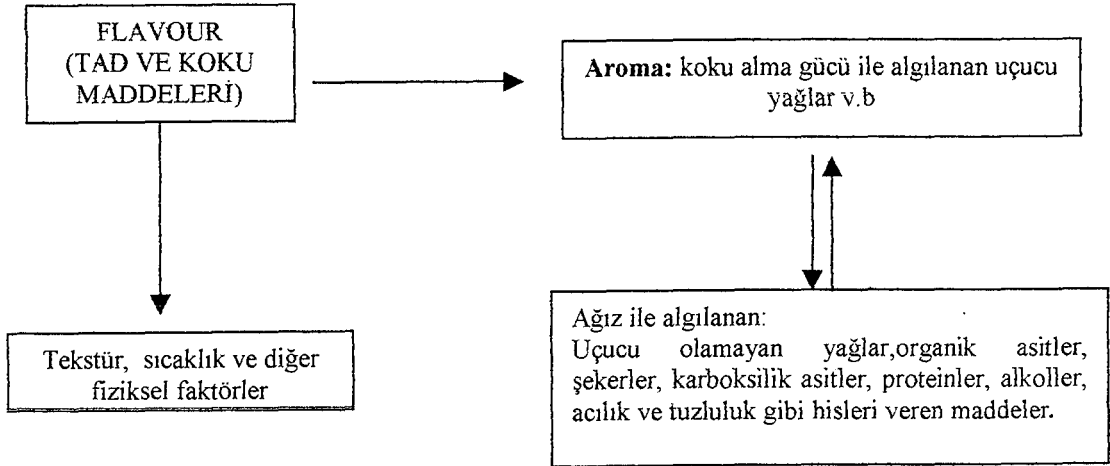
yumurta, süt ürünü veya bunların fermantasyon ürünleri olarak verilmektedir [20,26].

Bu tanım hayvansal ve bitkisel ürünlerin yanında enzimatik ve fermantasyon ürünlerini de kapsamaktadır. Bir bileŒiđin doğal kabul edilebilmesi iin doğal bir baŒlangı maddesinden üretilmesi ve üretimde hibir sentetik maddenin rol almamıŒ olması gerekir. Dolayısıyla kimyasal reaksiyonla elde edilen madde doğal olarak nitelendirilemezken, biyotransformasyon ile elde edilen madde yönetmeliklere göre doğal olarak kabul edilebilir. Sentezler ile elde edilen ürünler ise "suni tatlandırıcılar" olarak adlandırılmaktadır. Bu uygulama benzer bir Œekilde Avrupa da kabul görmektedir. Ancak aynı tanım bitkisel doku hücreleriyle yapılan biyotransformasyon ve ürünleri iin henüz tam olarak aık değildir [21,25,26].

Tat ve lezzet maddeleri gıda katkı maddelerinin miktar olarak % 10-15' ini ve parasal değer olarak ta % 25' ini oluŒturmaktadır. Tat ve lezzet maddeleri Dünya ticaretinde yılda % 30' lara varan bir artıŒ göstermektedir. Yirmibirinci yüzyılda tat ve lezzet maddelerinin hızlı bir Œekilde artıŒ göstereceği bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan alıŒmalarda 5000 ile 10000 arasında tat ve lezzet maddesinin bulunduğu ve bunlardan sadece 4300' tanesini tanımlanabildiği bildirilmiŒtir [26,27].

Doğal ürünlere olan aŒırı talepten dolayı, doğal ürün olarak tad ve lezzet bileŒiklerinin biyotransformasyon ile üretilmesi, son yıllarda araŒtırmaların yođunlaŒtıđı alanlardan olmuŒtur . Aroma biyoteknolojisi adı altında yeni bir terim ve araŒtırma alanı geliŒmiŒtir. Henüz verimler ve ürün eŒitleri istenen boyutlara ulaŒmamıŒtır, ancak vanilin gibi ekonomik değerli ürünler üzerinde optimizasyon alıŒmaları ve bir ok terpenik madde ile de araŒtırmalar sürmektedir [28].

Flavour ifadesi; Bir maddenin kokusu yanında, tadı ve tekstürel yapısını da kavramaktadır (Œekil 1.1). Burun ile algılanan koku, dil ile algılanan tat (tatlılık, acılık, keskin tad, tuzluluk, ekŒi, v.b.) ve dokunma duyusu olan deri ile algılanan tekstürel yapıların bir bütünüdür [9,29,30].



Şekil 1.1. Flavour ifadesinin ana hatları [9].

Bitkiler besin öğeleri olmaları yanında flavour maddesi olarakta kullanılmaktadır. Bazı bitkiler ise çok iyi aroma verme özelliğindedir. Bitkilerde bulunan tad ve lezzet maddeleri hem uçucu hemde uçucu olmayan özellikte, duysal özellikte, flavor profillerini içine almaktadır. Acı, tatlı, gibi duysal özellikteki olguların şiddet ve kalitesi bitkinin tür ve özelliklerine göre değişmektedir. Bu tad ve aroma özelliklerini ifade etmek tanımlamak ve şiddetini ifade etmek oldukça güçtür. Etki özelliklerine göre tad ve aroma maddelerini sınıflamak mümkündür. Uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yöntemlerle bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen , aroma özelliği taşıyan maddelere doğal aroma vericiler, kimyasal yollarla sentezlenen veya izole edilen, kimyasal yapı olarak doğal aromalar ile aynı olan maddelere doğala özdeş aroma vericiler, kimyasal yollarla sentezlenen ancak kimyasal yapısı doğal aromalardan farklı olan maddelere yapay aroma vericiler adı verilmektedir [31,32].

Aroma maddesi hayvansal kaynaklı ise hangi hayvana ait olduğu üretici tarafından belgelenmek zorundadır. Türk Gıda Kodeksi' nde aroma maddesinin etiketinde "doğal" ifadesi veya aynı anlama gelen bir başka ifade, aroma maddesi bünyesinde sadece doğal aroma vericiler ve/veya aroma karışımlarını içeriyorsa kullanılabileceği bildirilmiştir. Doğal bir aroma maddesinin adı "Doğal Çilek Aroması" ifadesinde olduğu gibi bir gıda maddesine veya bir aroma kaynağına

referans oluşturuyorsa, bu aromanın tamamının uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla bu gıdadan veya kaynaktan elde edilmesi zorunludur. Aksi durumda “doğal” ifadesi kullanılamaz, ifadesi yer almaktadır [33].

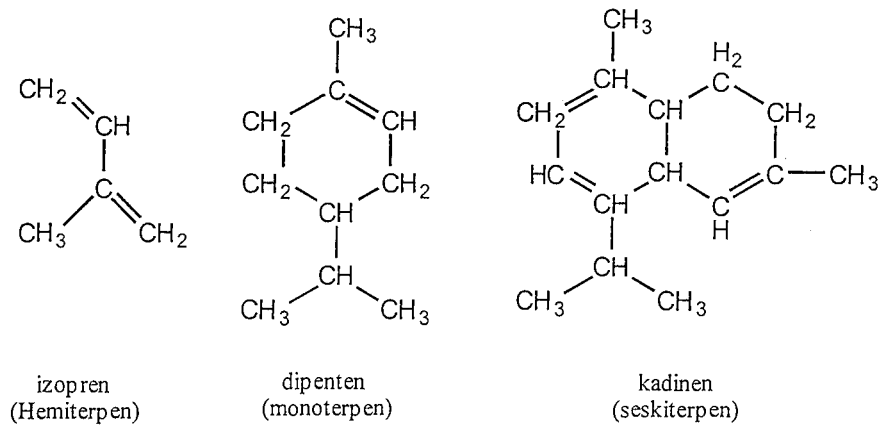
Yapılarındaki kimyasalların özellikleri bakımından tad ve aroma maddeleri, bir başlangıç maddesi yardımıyla, çevresel etkiler ile beraber, bitki yapısında fiziksel, kimyasal ve biyolojik dönüşüm içinde bulunmaktadır. Tad ve aroma oluşumu bitkinin yetiştirme koşullarına bağlı olarak gelişmektedir. Ürünün işlenmesi sırasında da bu maddelerin korunması istenmektedir. Bu arada bazı maddelerin tad ve aromaları istenmeyen özellikler de olabilmektedir. Tad ve lezzet maddelerinin organik yapıları incelendiğinde; terpen, oksijene edilmiş terpenik bileşikler, benzen ve türevi maddelerden oluştuğu görülmektedir [34,35].

1.4.1. NANE (*Mentha*)

Mentha türü ve varyetesinin yaprakları, taze veya kurutulmuş olarak baharat şeklinde tüketilmekte ve uçucu yağ üretiminde kullanılmaktadır. Nane vanilya ve turuncgillerden sonra, dünyada en çok kullanılan aroma kaynağıdır. Nane bitkisinde, çevre faktörleri, yetiştirme ve hasat gibi pekçok etken nedeniyle, renk, görünüş, koku, lezzet, uçucu yağ verimi ve bileşimi, aynı tür veya varyete için de bile oldukça büyük farklılık gösterebilmektedir. Kullanılan bitkiler ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye değişmektedir. *Mentha piperita* L.(Bahçe Nanesi, Biberi nane, Tıbbi Nane, Peppermint, *M. Aquatica* L. İle *M. Spicata* L.’nin melezi), *Mentha spicata* L. (Yeşil Nane, Sivri Nane, Kıvırcık Nane, Başak Nane, Rumi Nane, *Spearmint*), *Mentha arvensis* L. (Tarla Nanesi, *Corn Mint*, *Field Mint*), *Mentha pulegium* L. (Yarpuz, Filiskin, Habak, *European Pennyroyal*), *Mentha aquatica* L. (Su Nanesi), *Mentha longifolia* L. Huds. (Tüylü Nane, Uzun Nane), *Mentha rotundifolia* L. (Küt Nane): (*M.suaveolens* Ehrh., Apple Mint) en yaygın olarak bulunanlardır. *Mentha*’nın başlıca bileşenleri, terpenik bileşenlerden mentol, menton, limonen, mentil asetat, piperiton, pulegon ve karvondur. Bu bileşenlerin oranları tür özelliklerine göre değişmektedir [5,35].

1.4.2. TERPENLER

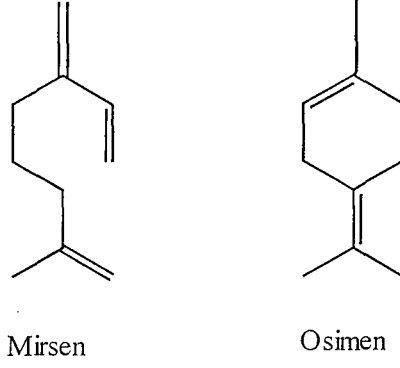
Terpenler; uçucu yağların en önemli bileşik grubunu oluşturmaktadır. $(C_5H_8)_n$ formülüne uyan bu hidrokarbonlardan “terpen” ($C_{10}H_{16}$), iki izopren (C_5H_8) molekülünün birleşmesiyle oluşmuştur ve “monoterpen” olarak da bilinmektedir. Buna göre; $C_{15}H_{24}$ “seskiterpen”, $C_{20}H_{32}$ “diterpen”, $C_{30}H_{48}$ “triterpen” ve $(C_{10}H_{16})$ “politerpen” adını almaktadır. Uçucu yağlarda monoterpener ile bazı seskiterpen bileşikleri bulunmaktadır. Diğerleri ise uçucu olmadıkları için, uçucu yağa geçememektedirler (Şekil 1.2) [5,36].



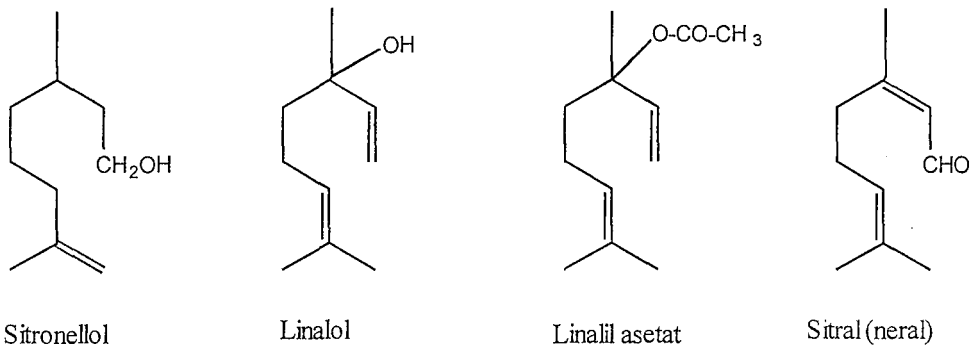
Şekil 1.2. Uçucu yağın bileşiminde bulunan bazı maddeler [5,36,37].

Terpen hidrokarbonlar uçucu yağlarda önemli miktarlardaysa da, koku özellikleri zayıftır. Bu bileşikler genellikle kolay uçucudurlar. Uçucu yağ soğutulduğunda sıvı halde kalırlar. Hava ile temasta kolayca polimerize olmaktadır [5,36,37].

Monoterpenler, asiklik (alifatik), monosiklik ve bisiklik yapıda olabilirler. Asiklik (alifatik) monoterpener üç çift bağ içermektedirler (Şekil 1.3). Asiklik monoterpenerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri bulunmaktadır (Şekil 1.4.) [5,36,37].

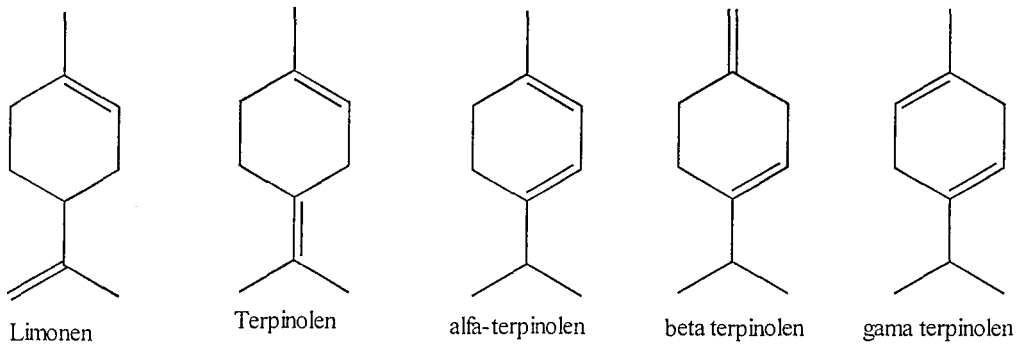


Şekil 1.3. Asiklik (alifatik) monoterpener [5,36,37]

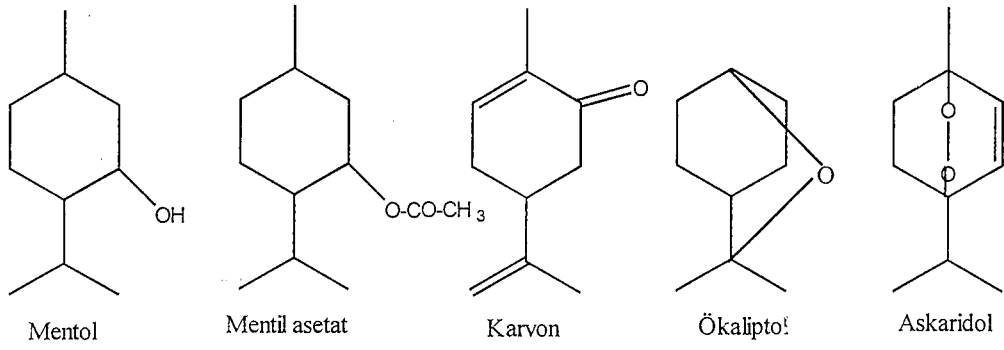


Şekil 1.4. Asiklik monoterpenerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri monoterpener (5,36,37).

Monosiklik monoterpenerde iki çift bağ bulunmaktadır (Şekil 1.5). Monosiklik monoterpenerin oksijenli türevleri alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grubu taşıyabilmektedirler (Şekil 1.6). [5,36,37].

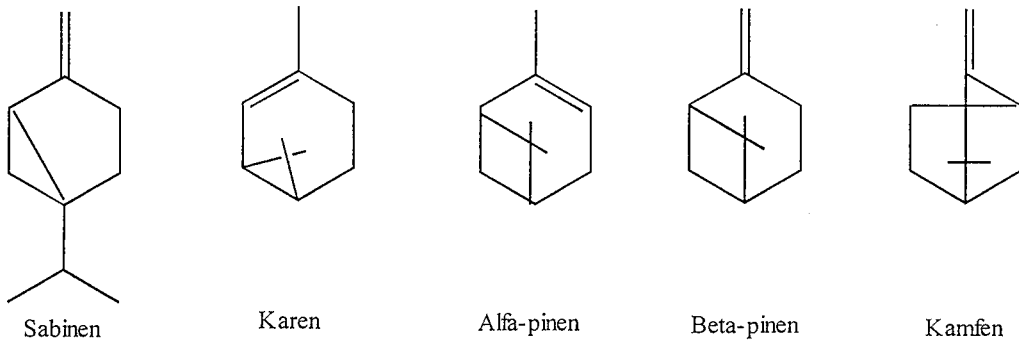


Şekil 1.5. Monosiklik Monoterpener [5,36,37]

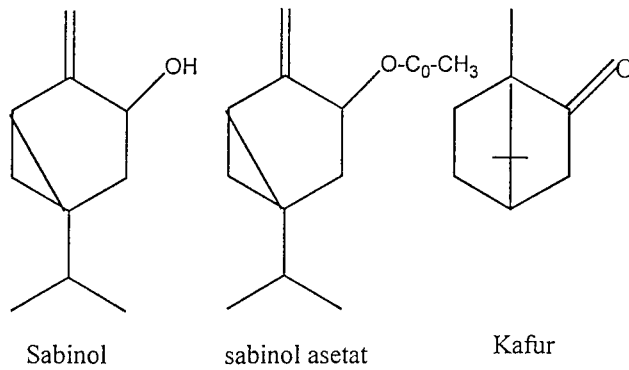


Şekil 1.6. Monosiklik monoterpenerin oksijenli, alkol, ester, keton, epoksit, ve peroksit grubu türevleri [5,36,37]

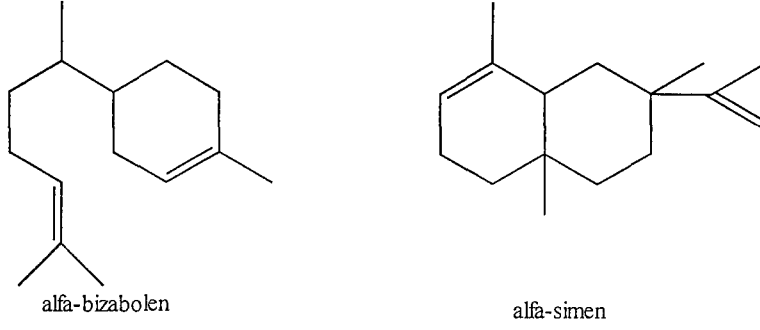
Bisiklik monoterpener bir çift bağ içerirler (Şekil 1.7). Bisiklik monoterpenerin alkol, ester, veya ketonlu türevleri bulunmaktadır (Şekil 1.8) [5,36,37].



Şekil 1.7. Bisiklik monoterpener [5,36,37]



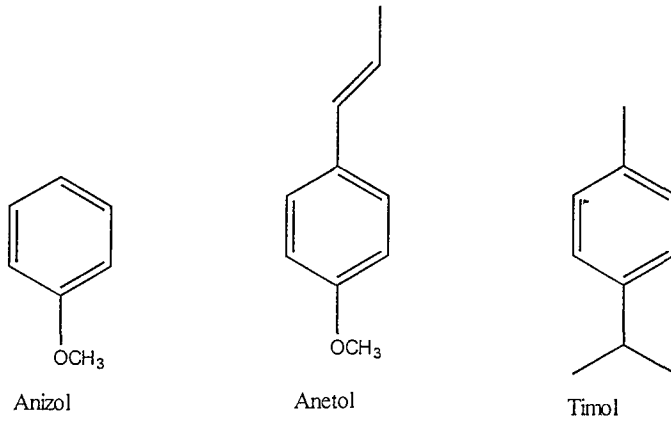
Şekil 1.8. Bisiklik monoterpenerden alkol, ester ve ketonlu türevleri [5,39,40]



Şekil1.9. Bazı seskiterpenler [5,36,37]

Seskiterpenler, asiklik, monosiklik ve bisiklik yapıda olabilmektedirler. Seskiterpenlerin oksijenli türevleri (alkol ve keton) yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar: Farnesol, Zingiberol, Kadinol, Turmeron, Alfa-iyonon ve α -İron' dur (Şekil 1.9) [5,36,37].

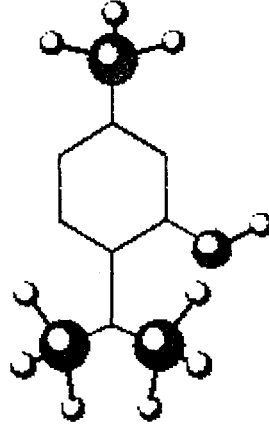
Anizol, anefol, timol gibi bazı aromatik maddeler uçucu yağların tad ve koku açısından çok önemli, belirgin fizyolojik özelliklere sahip bileşenleridir. Bu aromatik maddeler, terpenler gibi doğrudan bitki metabolizmasıyla ilgili biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşmuş bileşenlerdir (Şekil 1.10) [5,36,37]



Şekil 1.10. Uçucu yağlarda bulunan aromatik maddelerden bazıları [5,36,37]

1.4.3. MENTOL

L-mentol (1-Metil-4 izopropil siklohegzan-3-ol), $C_{10}H_{20}O$ molekül yapısına sahip, monoterpen yapısında olan parfüm ve gıda sanayiinde kullanılan organik bir maddedir (Çizelge 1.5). Mentol özellikle nane yağında bulunan kristal alkol, keskin koku ve serinletici özelliktedir (Şekil 1.11). Tad ve lezzet maddesi olarak tüketici beğenisi bulunan mentolün kullanım alanları giderek artmaktadır [40]. Adams ve arkadaşları tarafından yapılan açıklamalara göre; Mentolün 1982 yılında yıllık kullanım hacmi 44.440 kg iken, 1987 yılında 54.400 kg. olarak belirlenmiştir. Mentolün monosiklik monoterpenler içinde kullanım oranının en yüksek olduğu çizelge 1.6 ' de görülmektedir. Mentol nane bitkisinden ve sentetik olarak üretilmektedir [26,38,41].



Şekil 1.11. Mentol (1-Metil-4 izopropil siklohegzan-3-ol) ' ün molekül yapısı

Çizelge 1.5. Mentolün fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri [41,42]

Ürün adı	Mentol
Diğer adı	1-Metil-4 izopropil siklohegzan-3-ol
Formülü	$C_{10}H_{20}O$
Molekül ağırlığı	156.27
Çözünürlüğü	Alkolde çözünür
Erime noktası	42-44 derece
Optik rotasyon derecesi	-49, -50 ⁰
Uçucu olmayan madde	% 0.05
Saflik derecesi	Mentol % 99.7 den fazla

Tablo1.6. Substutie monosiklik mentol türevlerinin kullanım oranları [26].

NO	MADDE ADI ve FEMA ¹ NO	CAS ² No.	YILLIK HACIM, 1982, (KG)	YILLIK HACIM, 1987, (KG)	MAKSİMUM KULLANILMA DÜZEYİ (PPM)	GIDALARIN DOĞAL YAPISINDA BULUNABİLİR LİĞİ	TÜKETİM ORANI
1	Mentol (2665)	89-78-1	44.400	54.400	2300	+++	4
2	d-neo-Mentol (2666)	20752-34-5	0.1	140	595	+	---
3	Menton (2667)	89-80-5	7530	13.300	70	+++	8
4	DL-izo-Menton (3460)	491-07-6	19	0.5	600	+	>10.000
5	Mentil asetat (2668)	16409-45-3	2180	2940	55	+	5
6	Mentil izo valerat (2669)	16409-46-4	140	0.3	25	+	>1.000
7	l-Mentil laktat (3748)	59259-38-0	---	0.5	800	---	---
8	p-Ment-1-en-3-ol (3179)	491-04-3	0.1	<0.01	15	+	>10.000
9	d-Piperiton (2910)	6091-50-5	5	50	40	+++	>10
10	3-1-Mentoksipropan-1,2-diol (3784)	87061-04-9	2150	---	4000	---	---

¹. FEMA: Maddenin GRAS listesindeki genel numarası

². CAS NO: Chemical Abstract Search

1.4.3.1. Mentolün *Mentha sp. den Elde Edilmesi*

Mentol, *Mentha sp. den* üç farklı yöntemle elde edilmektedir.

Su destilasyonu: Bu yöntemde bitki materyali yavaş hareket eden bir karıştırıcı ile donatılmış çift cidarlı bir imbiğe doldurulmakta, üzerine su konularak kaynama noktasına getirilmektedir. Tüm uçucu yağlar ayrılincaya kadar damıtmaya böylece devam edilmekte ve yoğunlaşan su sürekli olarak imbiğe geri dönmektedir [43,44].

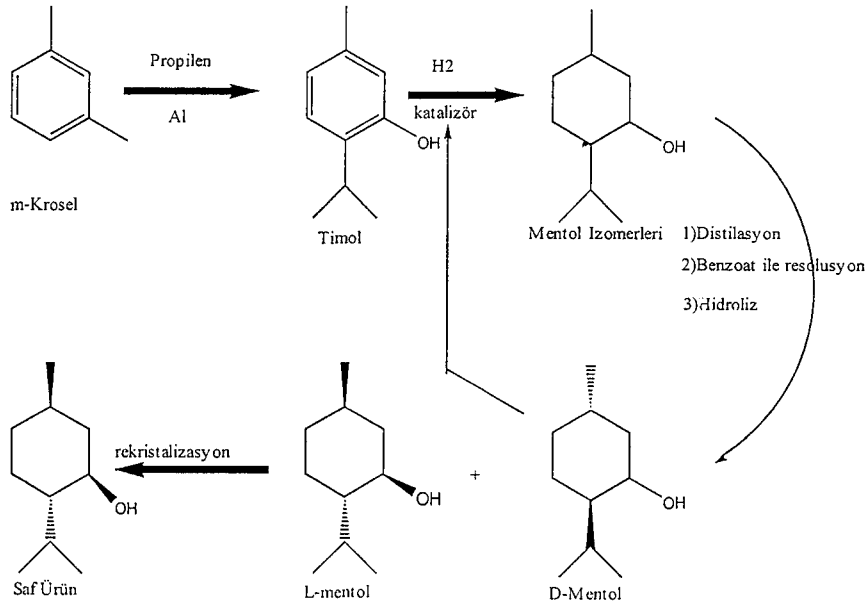
Su ve buhar destilasyonu: Bu yöntemde bitki materyali buhar boruları vasıtası ile kaynama noktasına getirilen suyun hemen üst kısmına yerleştirilmiş bir ızgaraya yüklenmektedir. Bu teknik yeşil yapraklı materyalin (nane) damıtılmasında büyük ölçüde kullanılmaktadır [43,44].

Buhar destilasyonu : Bu yöntemde bitki materyali, buharın tabandan püskürtüldüğü uygun bir imbiğe yerleştirilmektedir. Kondens suyunun yeniden

dolaşımını sağlamak için yeniden kaynatma ünitesi imbiğe monte edilmiştir. İmbik gövdesinin şekli, besleme materyalinin doğasına bağlıdır. Örneğin ABD'nin, batı eyaletlerinin çoğunda nanenin damıtılması, doğrudan tarlalardan yüklenen kamyonların arka kısmında yapılan imbikler içinde yürütülmektedir. Bu kamyonlar doğrudan bir imbik sistemi bulunan merkezlere götürülmektedir. Statik buhar imbikleri uzun olmakta ve genellikle homojen bir yüklemenin sağlanması amacıyla bir ızgara ile içten bölümlendirilmektedir. Bu işlemde temizleme, öğütme, doldurma ve boşaltma gibi bazı ön çalışmalar yapılmaktadır [43,44].

1.4.3.2. Mentolün Sentetik Yolla Üretilmesi:

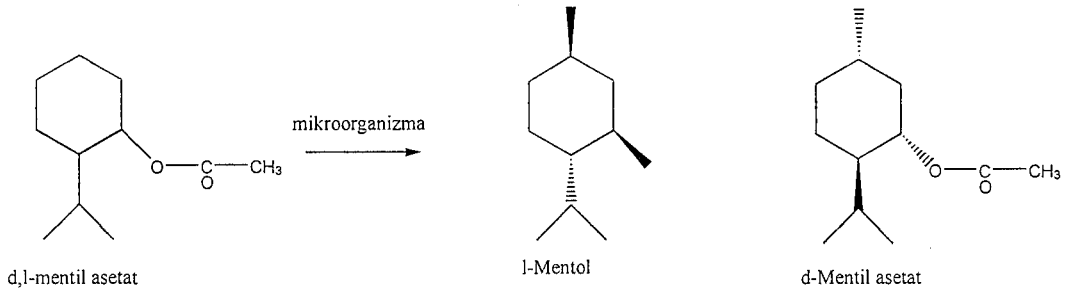
Mentolün sentetik olarak üretilmesinde gıda sanayiinde en çok timol kullanılmaktadır (Şekil 1.12). Timol tarafından katalitik hidrojenasyon sonucu mentol enantiyomerleri elde edilmektedir. Bu enantiyomer maddelerden, distilasyon, rezolüsyon, hidroliz gibi işlemler sonunda teknolojik öneme sahip L-Mentol elde edilebilmektedir [45].



Şekil 1.12. Timol' den L-Mentol' un sentetik olarak sentez [45]

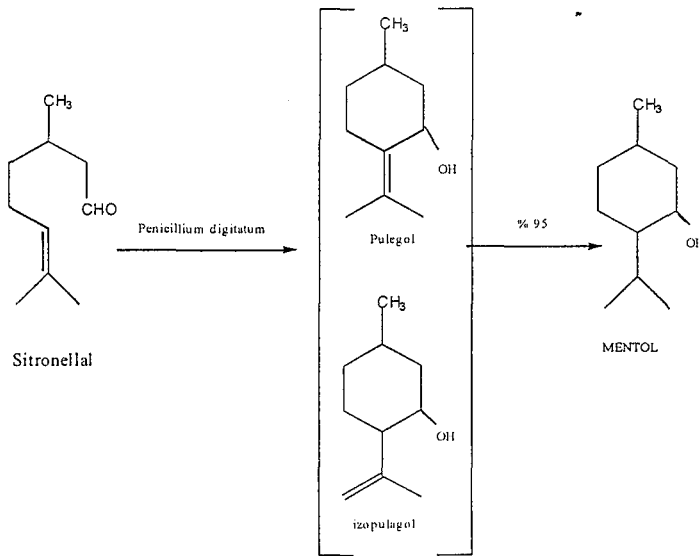
1.4.3.3. Mentolün, Biyotransformasyon İle Elde Edilmesi

Doğal olarak kabul edilen biyotransformasyon ürünleri arasında mentol ve türevlerinin elde edilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir [46]. Mentolün biyolojik transformasyonu için bir çok çalışmalar yapılmıştır. *Pseudomonas putida* ve *Rhodotorula minuta* ile yapılan çalışmalarda saflık derecesi çok yüksek olan ürünler elde edilmiştir. Biyotransformasyon aşamalarının özeti şekil 1.13' de verilmiştir [46].



Şekil 1.13. Mentil asetat' ın L-Mentol' e biyolojik dönüşümü [46]

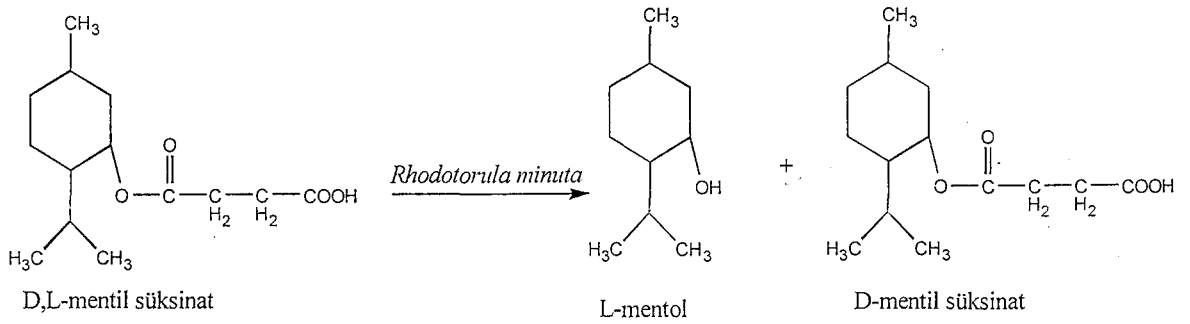
Doğal L-mentol *Mentha sp.* den ve nane yağının kristalizasyonundan çeşitli yollarla elde edilebilmektedir. Benzoik asidin parçalanması ile rasemik d-l-mentol çeşitli aşamalardan geçerek oluşturulabilir. Bazı mikroorganizmalar yardımıyla d,l-mentil asetat dan, l-mentol elde edilebilmektedir. Bu oluşumun sağlanabilmesi, ekonomik açıdanda çok önemlidir (Şekil 1.14) [46].



Şekil 1.14. Sitranollol ' dan mentolün biyotransformasyonu [48].

Babicka ve arkadaşları Şekil 1.15' de gösterildiği gibi *Penicillium digitatum* ile sitronellol un siklizasyonu sonucunda pulegol, izoplekol elde etmişlerdir. Araştırmacılar reaksiyonun devamında ise % 95 verimle mentole dönüşüm sağlandığını bildirmişlerdir [48,52,53].

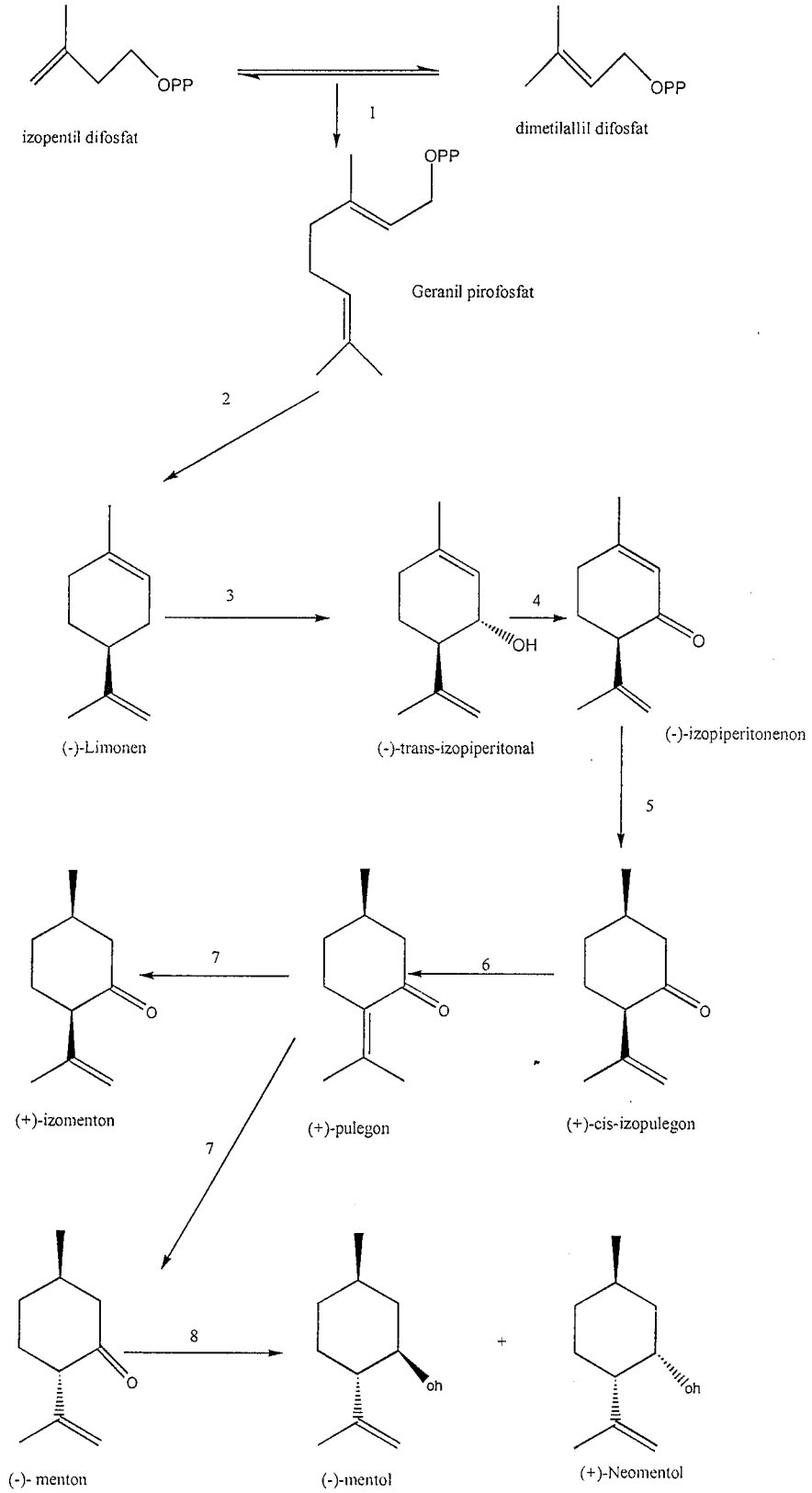
Rhodotorula mucilaginosa nın besi ortamında biyotransformasyonunda 24 saat inkübasyonu sonucunda % 4.4 oranında saf (-)-mentol, % 3 oranında mentil asetat elde edildiği bildirilmiştir [46]. Fukui ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *Rhodotorula minuta* uygun besi ortamında geliştirilmiş, başlangıç materyali olarak D,L-Mentil süksinat kullanılarak hazırlanan besi ortamından % 71 oranında L-Mentol elde edilmiştir (Şekil 1.15) [48,46].



Şekil 1.15. D-L-Mentil süksinat tan L-Mentol' ün biyotransformasyonu [48].

1.4.4. MENTON

Menton, monoterpen yapısına sahip organik bir moleküldür. Nane yağlarında tür özelliklerine göre farklı oranlarda bulunmaktadır. Biyotransformasyonda genellikle ara bileşik olarak oluşmaktadır. Menton geranil difosfattan enzimatik yolla mentol elde edilmesinde, 7. Basamakta elde edilmektedir (Şekil 1.16). Bu basamaktan sonra mentol ve neomentol oluşmaktadır. Mentonun ekonomik değerinin fazla olmamasına rağmen, mentolün önemi daha fazladır. Türkiye' de yetişen nane türlerinde menton oranının oldukça fazla olduğu bilinmektedir [5].



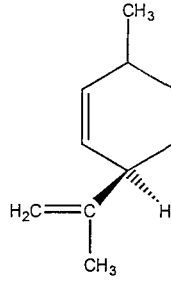
Şekil 1.16. Nandede Monoterpenlerin Biyosentez Aşamaları: Grenil difosfat sentetaz (1), (4S)-(-)-limonen sentaz (2), Sitokrom P450 (-)-limonen -3- hidroksilaz (3), (-)-trans-izopiperitenol dehidrogenaz (4), (-)-izopiperitenon redüktaz (5), (+)- cis-izopulegon izomeraz (6), (+)-pulegon redüktaz (7) ve (-)-menton redüktaz (8) [39].

1.4.5. LİMONEN

Limonen (4-izopropil-1-metil-siklohegzan), monosiklik monoterpen yapısında olup çok yaygın bulunan bir monoterpen maddedir. Çok sayıda bitkiden elde edilebilir. Limonen turuncgillerden elde edilen uçucu yağların en büyük bileşenidir. Limonen, mentol ve karvon yapısındaki aroma, lezzet ve tad veren bir maddedir [53,55].

Limonenin biyotransformasyonunda monoterpen yapısına sahip olan maddelerin oluşumunda aşağıdaki maddelerin meydana geldiği gözlenmiştir:

- Alillik oksidasyon tarafından cis ve trans karveollerin oluşumu.
- Metil sübtütüsyon ile perilla maddelerinin oluşumunun oksidasyonu
- Δ 8,9-çift bağı dan alfa-terpineolün redüktif epoksidasyonu
- Çift bağı bileşiklerden oluşan diollerin epoksidasyonu [53,55].

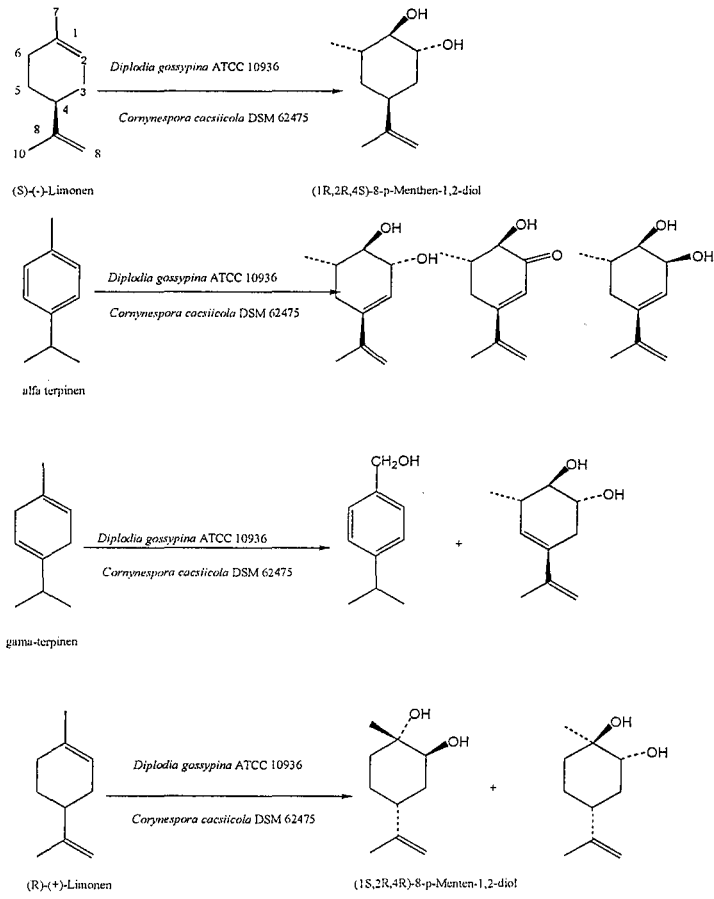


Limonen
4-izopropenil-1-metilsiklohegzan

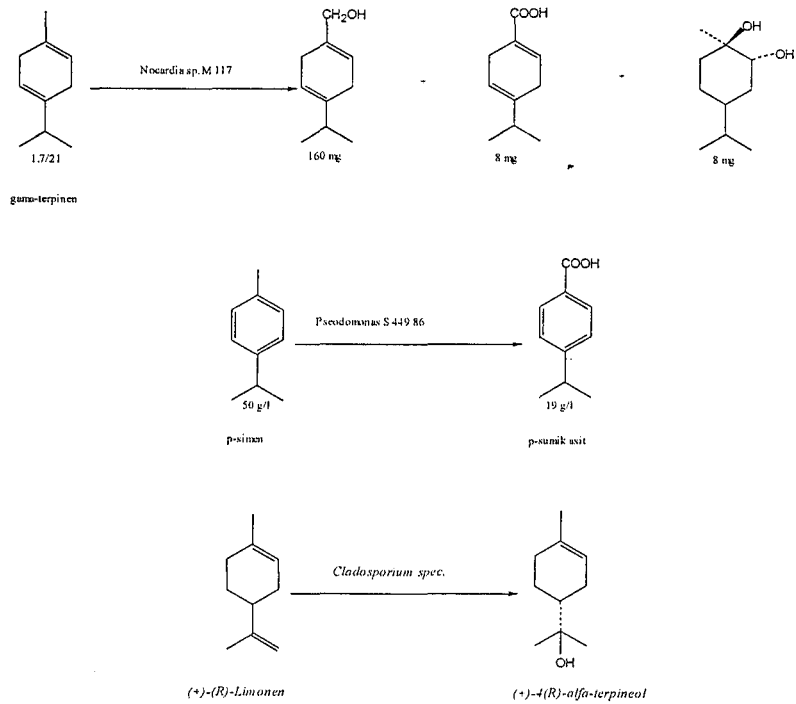
Şekil 1.17. Limonen' in organik yapısı

Dhavlikar ve arkadaşları limoneni başlangıç materyali olarak kullanan 300 ün üstünde mikroorganizmanın olduğunu bildirmiştir (Şekil 1.18) [58].

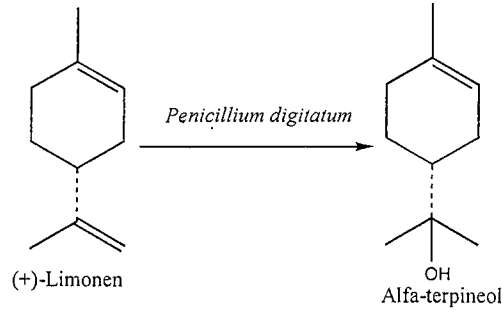
Diplodia gossypina ATCC 10936 ve *Corynespora cassicola* DSM 62475' nin kullanıldığı biyotransformasyonlarda limonen başlangıç materyalinden (1R,2R,4S)-8-p-Menten-1,2-diol oluştuğu bildirilmiştir (Şekil 1.18) [48].



Şekil 1.18. Limonen' in biyotransformasyonu [48].

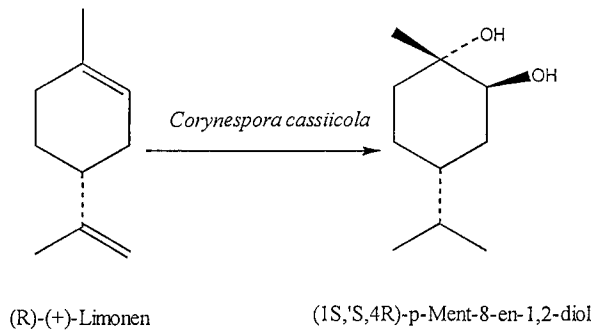


Şekil 1.19. Limonen' in *Cladosporium* tarafından biyotransformasyonu [56].

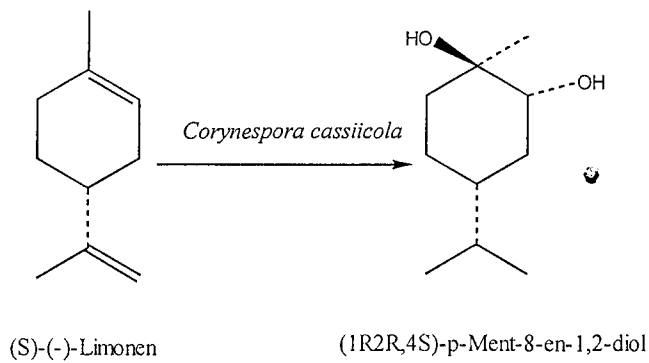


Şekil 1.20. *Penicillium digitatum* tarafından limonen in biyotransformasyonu [56].

Penicillium digitatum ile limonen başlangıç maddesinden % 46 saflıkta alfa terpineol elde edilmiştir (Şekil 1.20) [56].



Şekil 1.21. *Corynespora cassiicola* tarafından (R)-(+)-limonen in biyotransformasyonu [56].



Şekil 1.22. *Corynespora cassiicola* tarafından (S)-(-)-limonen in biyotransformasyonu [56].

Limonenin başlangıç materyali olarak kullanıldığı biyotransformasyon reaksiyonları ile bir çok metabolit elde edilebilmiştir. Limonenin mikrobiyal transformasyonu hakkında bugüne kadar beş değişik yol bildirilmiştir

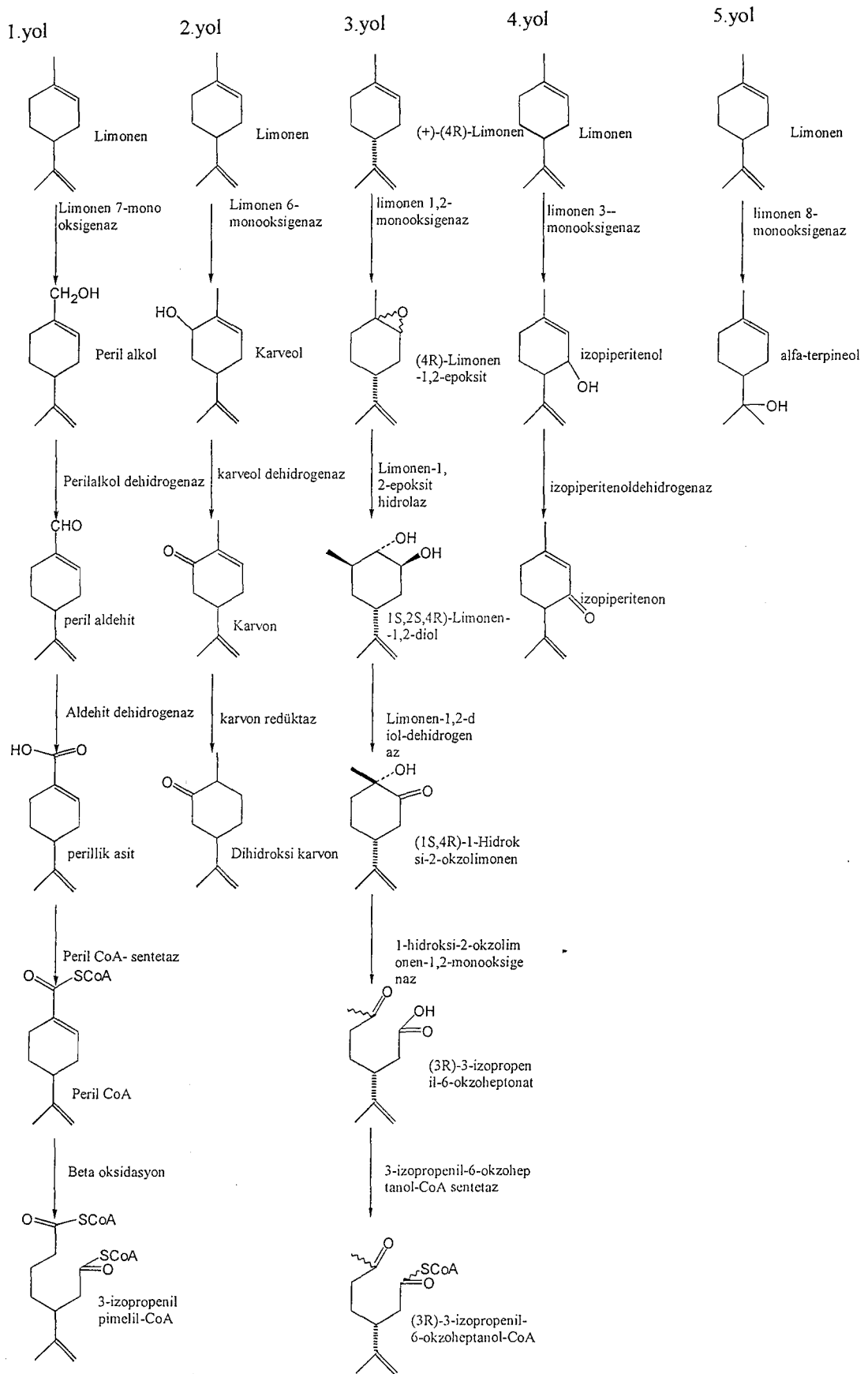
(Şekil 1.23). *Pseudomonas putida*, *Penicillium digitatum*, *Yarrow lipolitica* 1 nolu yolu izleyerek limonenden 3-izopropenil-pimelil-CoA ya, *Aspergillus cellulose* 2 nolu yolu izleyerek limoneni, karvon ve dihidroksikarvona indirgediği, *Rhodococcus erytropolis*' in 3 nolu yolu izleyerek 3-izopropenil-6-okzo heptanol-CoA ya indirgediği ve *Aspergillus cellulase* ise 4 nolu yolu izleyerek limoneni izopiperitona indirgediği bildirilmiştir.

Limonenin *Pseudomonas* sp. ve *Aspergillus niger* ile meydana gelen biyotransformasyonlarında yüksek substrat uçuculuğu ve toksisitenin önüne geçilebildiği bildirilmiştir. [33].

Chaetomium sp tarafından limonenin biyotransformasyonunda (6S)- ve (6R)-karveol oluşmaktadır. *Aspergillus cellulosa*e limoneni karbon kaynağı olarak kullanarak izopiperiton, cis-karveol, ve peril alkol oluşturmaktadır. Çizelge 1.7' de *Basidiomycetes* lerin (+) limonenden karveolün izomerlerini biyotransforme etme oranları verilmiştir [33,56].

Çizelge 1.7. *Basidiomycetes* ler tarafından saf limonenin biyotransformasyonunda karveolün izomerlerinin oluşumu [33].

Species/Substrat	Ürün			
	(+)-cis-karveol	(-)-cis-karveol	(+)-trans-karveol	(+)-trans-karveol
(+)-limonen				
<i>Ganoderma applanatum</i>	35.4	18.4	25.8	20.3
<i>Marasmius alliaceus</i>	22.3	29	30	18.6
<i>Pleurotus sapidus</i>	10.5	23.2	36.4	29.9
(-)-limonen				
<i>G.applanatum</i>	11.7	17.3	33.6	38.6
<i>M.alliaceus</i>	15.3	21.8	27.3	33.5



Şekil 1.23. Limonen' nin biyotransformasyonu

2 MATERYAL VE METOD

2.1.MATERYAL

2.1.1. STANDART MADDELER

Çizelge 2.1' de standart olarak kullanılan maddeler ve temin edildiği yerler verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan başlangıç maddeleri ve temin edildikleri yerler.

No	İsim	Markası
1	(+)-Menthol ^{1,2}	63658-Fluka
2	(-)-Menthol ^{1,2,3}	M-2258-Sigma
3	Neo menthol ^{1,2}	63658-Fluka
4	(-)-Linalool	6139-Fluka
5	Limonene ^{1,2}	18,316-4-Sigma
6	Isomenthol ^{1,2}	63658-Fluka
7	(+)-Menthofurane ^{1,2}	63661-Fluka
8	(-)-Menthone ^{1,2}	82569-Fluka
9	(+)-Menthone ^{1,2}	63675-Fluka
10	Neo Menthone ^{1,2}	63675-Fluka
11	Iso menthone ^{1,2}	63675-Fluka
12	Menthyl acetate ^{1,2}	45985-Fluka
13	Piperitone ¹	-----
14	<i>Mentha piperita</i> ¹ uçucu yağı	-----
15	<i>Mentha arvensis</i> ¹ uçucu yağı	-----
16	<i>Mentha speciate</i> ¹ uçucu yağı	-----
17	Terpinolene ²	86485-Fluka
18	Terpinolene ²	86485-Fluka
19	(+)-Pulegone ²	82569-Fluka
20	(-)-Pulegone ²	63675-Fluka

¹ : Firmenich (Firmenich SA, Route Des Jeunes 1 CH_1211 GENEVE) den temin edildi.

² : Piyasadan temin edildi

³ : Mentol kristali ESSENCE NATURAL PRODUCTS(P) LTD.(Hindistan)' den temin edilmiştir.

2.1.2. KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

Araştırmamızda kullandığımız mikroorganizmalar; USDA United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Midwest Area, Peoria, Illinois (ABD)' den temin edilmiştir (Çizelge 2.2). Diğer suşlar ise A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve naneden laboratuvarlarımızda izole edilerek kullanılmıştır (Çizelge 2.3 ve 2.4.).

Çizelge 2.2. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, Midwest Area' dan temin edilerek kullanılan mikroorganizmalar.

NO	MİKROORGANİZMALAR
1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36
2	<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504
3	<i>Aspergillus putida</i> NRRL 252
4	<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786
5	<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607
6	<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754
7	<i>Rhodotorula minuta</i> NRRL-Y-1589
8	<i>Ambrosiozyma monospora</i> NRRL Y-1484
9	<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i> NRRL Y-17594

Çizelge.2.3 A.Ü. Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından Temin Edilen Mikroorganizmalar.

No	MİKROORGANİZMA
1	<i>Aspergillus niger</i>
2	<i>Penicillium</i> sp.

Çizelge 2.4. Nane bitkisinden izole elde edilen mikroorganizmalar

No	MİKROORGANİZMA
1	<i>Penicillium verrucosum var. cyclopium</i>
2	<i>Penicillium expansum -1</i>
3	<i>Penicillium expansum -2</i>
4	<i>Cladosporium herbarum</i>
5	İzolat-1
6	İzolat-2

2.1.3. STANDART MİKROORGANİZMALARİ CANLANDIRMAK İÇİN KULLANILAN BESİYERLERİ

2.1.3.1. PDA Besiyeri:

Agar.....	13 g
Maya Özütü.....	1.5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0.5 g

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 6 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [28,29].

2.1.3.2. Nütrient Broth

Glikoz.....	2.5 g
Maya Özütü.....	12.5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
MgSO ₄	0.5 g

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 7 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [56,57].

2.1.4. BİYOTRANSFORMASYONDA KULLANILAN BESİYERLERİ

2.1.4.1.Genel Besiyeri

Sakkaroz.....	15 g
NaNO ₃	0.1 g
KCl.....	0.025 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.002 g
CaSO ₄	10.1 g

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 6 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [28,29,57].

2.1.4.2.Alfa-medyum Besiyeri

Glikoz.....	20 g
Pepton.....	5 g
Yeast ekstresi.....	5 g
NaCl.....	5 g
Na ₂ HPO ₄	5 g

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 7 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [28,29].

2.1.4.3.Czapek Pepton Besiyeri

Glikoz	15 g
Sakkaroz.....	15 g
Pepton.....	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1 g
KCl.....	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.01 g

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 7 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [28,29,57].

2.1.4.4. Gibberella İz Element Solüsyonlu Besiyeri

Glukoz.....	100 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4 g
KCl.....	2 g
Glisin.....	4 g
Gibberella iz element solusyonu	
Co(NO ₃) ₂	%0.01(w/v)
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	% 0.1
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	% 0.1
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	% 0.161
MnSO ₄ .H ₂ O.....	% 0.01
Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	% 0.01
Distile su.....	100 ml

Gibberella iz element solüsyonu' nundan belirtilen miktarlarda alınan maddeler 100 ml destile su içerisine karıştırılır. Bu karışımdan 4 ml alınır ve ana besiyerindeki bileşenler ile beraber 2 litre distile su ile karıştırılır. PH 6 olacak şekilde asitliği ayarlandıktan sonra 121 °C' de sterilize edilmiştir [28,29,56].

2.1.4.5. BA1 Agar Besiyeri

Sukroz.....	30 gr/L
Agar.....	9 gr/L
6-Benzilaminpuran.....	1 mg/L

Yukarıdaki maddeler 1 litrelik balon içerisine alınıp saf su ile 1 litreye tamamlanarak pH asitliği 7 olacak şekilde 0.1 N KOH ve 0.1 N HCl ile ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir [28,29,56,57].

2.2. METOD

2.2.1. MİKROORGANİZMALARIN HAZIRLANMASI

2.2.1.1. Neden Küflerin İzolasyonu Ve İzolatların Tanımlanması

Bilecik ilinde, nanenin yetiştiği toprak, gövde ve yapraklardan alınan örnekler steril erlenmayerlerde laboratuvara getirilmiş ve dilisyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilisyonlardan patates dekstroz agar (PDA) ve malt ekstrakt agar (MEA) besiyerlerine ekim yapılarak 25°C de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutularında oluşan farklı koloniler ayrı ayrı saflaştırılmış ve yatık besiyerinde buzdolabında saklanmıştır [58,59].

2.2.2. OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

Araştırmada kullandığımız mikroorganizmaların en iyi geliştikleri sıcaklık, zaman, pH ve besiyerleri saptanmıştır.

Optimum pH ve sıcaklığı belirlemek için PDA besiyerinin pH' sı 3.5, 4, 5, 5.5, 6, 6.5' e ayarlanmış ve mikroorganizmalar ekilerek 20, 22, 24, 26, 28 ve 30°C de 2- 6 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresince mikroorganizmaların gelişimi günlük olarak izlenmiş ve her çalışma üç paralel olarak yürütülmüştür.

Biyotransformasyon için en uygun besi ortamının belirlenmesi amacıyla; Genel Besiyeri, Alfa medyum Besiyeri, Czapek Pepton Besiyeri, Gibberella İz Element Solusyonlu Besiyeri ve BA1 Besiyeri kullanılmıştır. Besiortamları 100 ml olacak şekilde 250 ml. lik erlenlere dağıtılmış ve mikroorganizmalar ayrı ayrı ekilerek daha önce saptanan optimum pH ve sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

2.2.3. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARI

Genel Besiyeri, Alfa medyum Besiyeri, Czapek Pepton Besiyeri, Gibberella İz Element Solusyonlu Besiyeri, BA1 besiyerleri kullanılarak 250 ml lik erlenlere 100 ml olarak dağıtılmış ve daha sonra 121°C ' de 15 dakika steril edilmiştir. Besi ortamları üzerine laminar flow' da hücre kültüründen veya spor solüsyonundan 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Erlenler 140 rpm de $24-26^{\circ}\text{C}$ ' de 2 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu şekilde mikroorganizma gelişimi

sağlanan erlenlere ayrı ayrı 25 µl mentol, menton, limonen ve nane uçucu yağları ilave edilerek aynı koşullarda inkübasyona devam edilmiştir.

Erlenlerden her hafta örnek alınarak başlangıç maddelerinin tüketilip, tüketilmediği kontrol edilmiş ve azalan başlangıç maddesi biyotransformasyonun başladığının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Başlangıç maddesi azaldıkça ortama ilave edilmiştir. Bu işlemler 5 hafta boyunca devam etmiştir.

Tüm biyotransformasyon çalışmalarında kontrol olarak, aynı koşullarda hazırlanmış ve saklanmış üç erlen kontrol olarak kullanılmıştır. Kontroller; Besiyeri, Besiyeri + başlangıç maddesi, Besiyeri + mikroorganizma şeklinde yapılmıştır. Bu üç kontrol ile transformasyonun gerçekleştirildiği besiyeri karşılaştırılarak metabolitlerin gerçek mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığı belirlenmiştir. Çalışmalar ikişer paraleller halinde yapılmıştır.

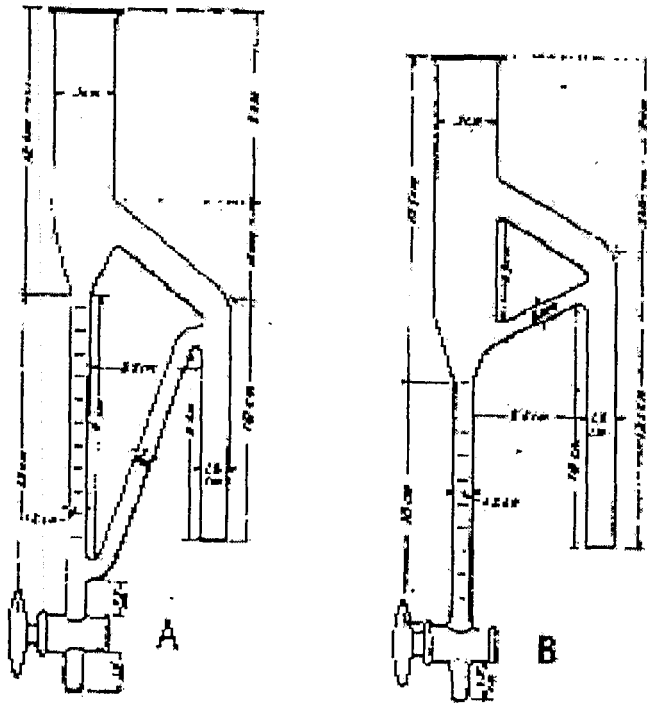
Biyotransformasyon işleminin sona erdiği ve dönüşümlerin maksimuma ulaştığı İTK ve/veya GC sistemi ile tespit edildiğinde numuneler üzerine EtOAc ilave edilerek mikroorganizmaların canlılığına son verilmiş biyotransformasyon durdurulmuş, ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarına geçilmiştir [56,60,61].

2.2.3.1. Metabolitlerin Ekstraksiyonu

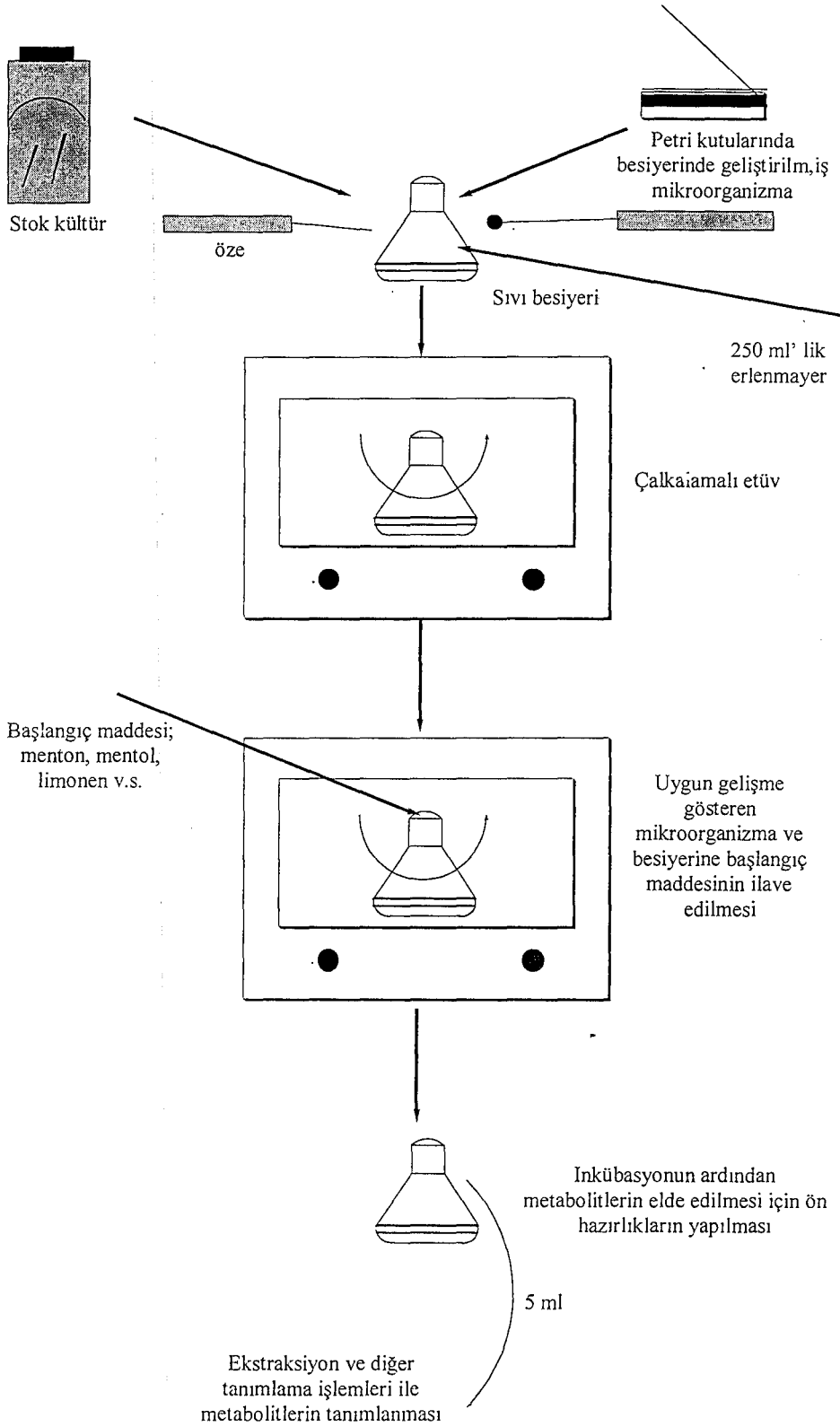
Metabolit oluşumunu izlemek amacıyla yapılan işlemdir. Steril koşullar altında, önceden 3-5 ml EtOAc ilave edilmiş deney tüplerine steril uçlu pipetörler ile biyotransformasyon besi ortamından eşit miktarda aktarılmış, 1 dakika vorteks kullanarak karıştırılmıştır. EtOAc' lı üst faz, başka bir pipet ile susuz Sodyum sülfat tan geçirilerek bir numune kabına aktarılıp 40-50°C' de çözücü uzaklaştırılmıştır. İTK veya GC sistemi ile kontrol edilmiştir [61].

2.2.4. UÇUCU YAĞ TAYİNİ VE ELDE EDİLMESİ

Yağ elde edilmek üzere toplanan nane bitkisi, kurutulup, öğütüldükten sonra , 40-50 gr öğütülmüş örnek alınıp uygun hacimdeki bir balona konmuştur. Üzerine numuneyi tamamen ıslatacak kadar suyun biraz fazlası ilave edilmiştir. Aygıt şekil 2.2.' de görüldüğü gibi kurulmuştur. Uçucu yağın taksimatlı kısmına 1 ml ksilen ilave edilmiştir. Soğutucu takılıp su musluğu açıldıktan sonra balon ceketli bir ısıtıcıda ısıtılmıştır. Yaklaşık 6 saatlik bir damıtmadan sonra, sabit bir okuma değerine ulaşıldığı zaman damıtmaya son verilmiştir. Taksimatlı bölmeden okunan yağ miktarından ksilen miktarı çıkarılarak hesaplama yapılmıştır [57]. Bu işlem sonucu elde edilen uçucu yağ biyotransformasyonda başlangıç maddesi olarak kullanılmıştır.



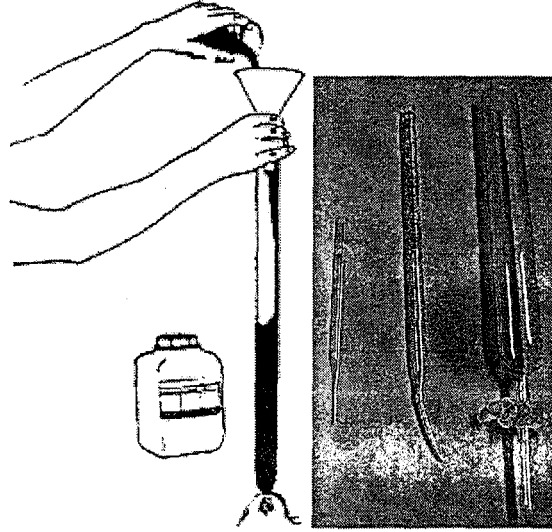
Şekil 2.1. Uçucu yağ içeriğinin belirlenmesinde, toplayıcı büret kısmı; (A):Sudan hafif uçucu yağlar için, (B): Sudan ağır uçucu yağlar için.



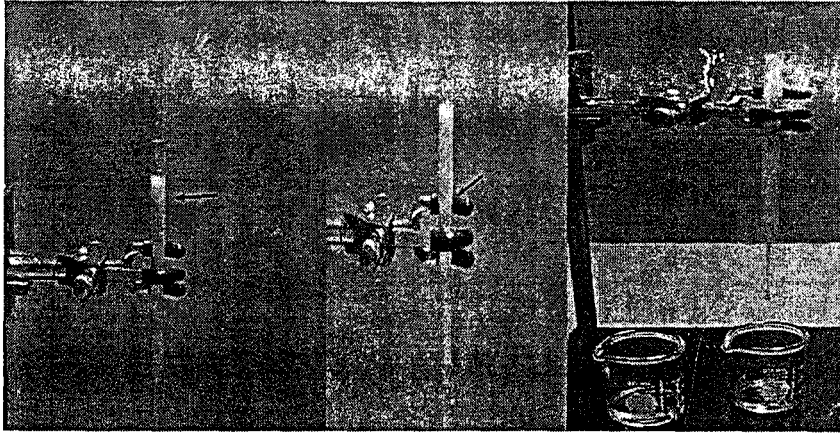
Şekil.2.2. Yöntemin aşamaları

2.2.5. KOLON KROMATOĞRAFİSİ

1:30-50 oranında silikajel ve hekzan ile yaş olarak hazırlanmış kolon (Şekil 2.3) içindeki silikajele emdirilerek ve/veya doğrudan uygulanmıştır. Hekzandan başlamak üzere, hekzan-dietileter,dietileter,aseton ve etilasetat ile 10 ml' lik fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 2.4.). Kolon son olarak Metil alkol ile yıkanmıştır [62,63].



Şekil 2.3. Silikajel ile kolon kromatografisinin hazırlanması

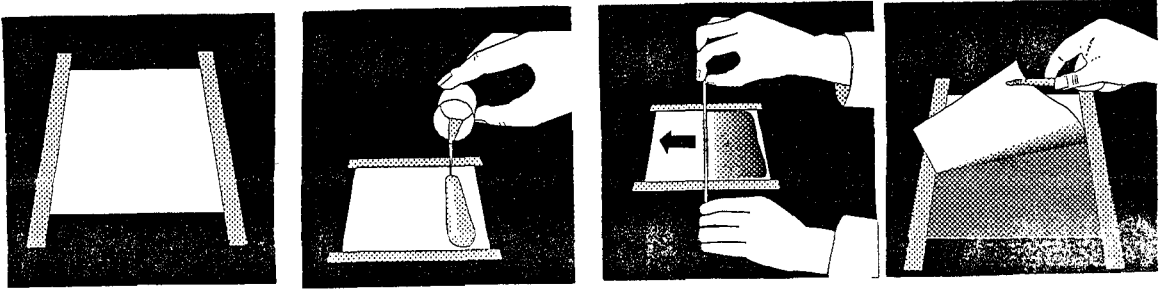


Şekil 2.4. Kolon kromatografisi yönteminin uygulanması ve fraksiyonların toplanması

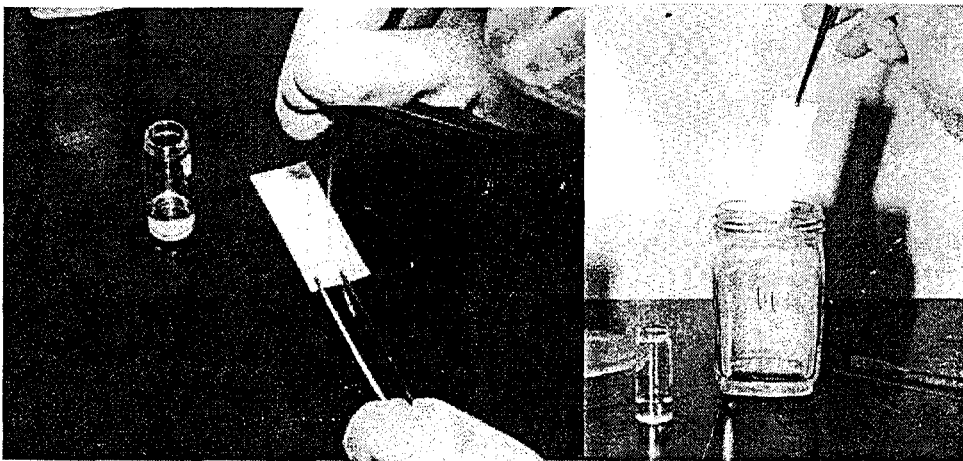
Elde edilen fraksiyonlar rotavoporda uçucu maddelerden uzaklaştırıldıktan sonra İTK ve GC' de tayin edilmeye çalışılmıştır.

2.2.6. İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ

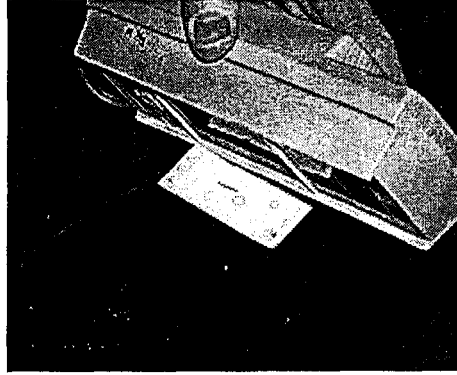
5x20, 10x20 ve 20x 20 ebatlarında laboratuvarında hazırlanmış plaklar ve hazır plaklardan yararlanılmıştır. Laboratuvarımızda hazırlanan plaklar Şekil 2.1' de görüldüğü gibi hazırlanmıştır. Şekil 2.2' de görüldüğü gibi tayin edilecek olan madde geliştirilme tankına alınmıştır. Çözücü sistemde sürüklenen numuneler kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boylarında incelenmiştir (Şekil 2.3-2.4). UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde renk reaktifi olarak % 3 Vanilin - % 1 H₂SO₄, % 5 H₂SO₄ + % 1 Vanilin reaktifi + ısı, anisaldehit /H₂SO₄ + ısı veya iyot buharından yararlanılmıştır [62,63].



Şekil 2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) plakalarının hazırlanması. (A), cam levhalar, (B), silikajelin hazırlanması ve plakaların üzerine dökülmesi, (C), silikajelin plakalarda ince bir tabaka oluşturması, (D), hazırlanan plakaların alınarak etüvde kurutulması.



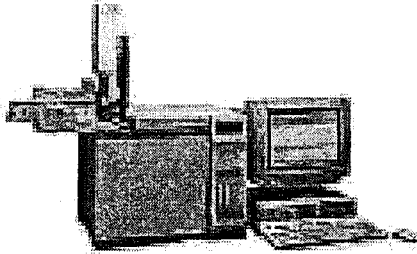
Şekil 2.6. Elde edilen fraksiyonların İnce Tabaka Kromatografisinde tayin edilebilmesi için, silikajelli tabakalara uygulanması ve çözgen maddelerde yürütülmesi.



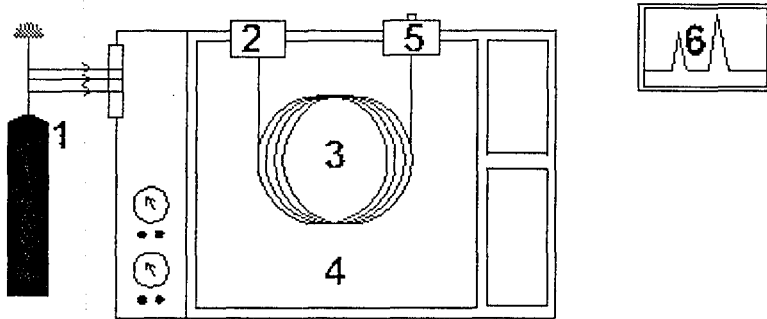
Şekil 2.7. Elde edilen metabolitlerin U.V. Işık altında tespit edilmesi.

2.2.7. GAZ KROMATOĞRAFİSİ:

Gaz Kromatografisi (Hewlett-Packard 6890), (Şekil 2.7.), innowax FSC kolon (30m x 19091 J-413, 0.25 mikrometre film kalınlığında) ile kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır [58,62,63].



Şekil 2.8. Laboratuvarda kullanılan gaz kromatografisi cihazı (HP 6890).



Şekil 2.9. Gaz Kromatografisinin Aşamaları; 1.Taşıyıcı gaz girişi, 2.Enjektör, 3.Kolon, 4.Termostat fırın, 5.Dedektör, 6.Kayıt, yazıcı

Gaz kromatografisi yönteminde kullanılan sıcaklık programlarından bazıları şunlardır:

- 1.) 100 °C'de 5 dak, 200 °C' ye 20 °C/dak, 220 °C' de 11.5 dak.
- 2.) 60 °C'de 10 dak, 220 °C' ye 4 °C /dak, 220 °C de 10 dak, 240 °C ' ye 1 °C/dak

3. BULGULAR

3.1. MİKROORGANİZMALARIN EN İYİ GELİŞTİĞİ KOŞULLAR

Biyotransformasyon çalışmalarında en yüksek verimi elde edebilmek için mikroorganizmaların gelişebileceği en uygun koşullar belirlenmiştir. Mikroorganizmaların en iyi geliştikleri sıcaklık, pH ve süre çizelge 3.1’ de verilmiştir. Optimum pH, sıcaklık ve süre mikroorganizmaya göre değişiklik göstermiştir. İnkübasyon sıcaklığı 24-34 °C arasında değişmiştir. Mikroorganizmaların en iyi geliştikleri pH ise 5-6.5 arasında olmuştur. İnkübasyon süresi ise 2-6 gün arasında belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Biyotransformasyonda Kullanılan Mikroorganizmaların en iyi geliştikleri ortam koşulları.

Mikroorganizma Adı	İnkübasyon zamanı (Gün)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	Ortam Asitliği (pH)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36	2	30	6
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i> NRRL Y-17594	4	24	5
<i>Ambrosiozyma monospora</i> NRRL Y-1484	5	25	6
<i>Aspergillus niger</i>	3	28	6
<i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 252	4	24	6
<i>Cladoporium herbarum</i>	6	26	6
<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754	4	24	6
<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607	5	24	5
<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786	4	24	6
<i>Penicillium expansum-1</i>	5	25	6
<i>Penicillium expansum-2</i>	4	24	6
<i>Penicillium sp.</i>	4	26	5.5
<i>Penicillium verrucosum</i> var <i>cyclopium</i>	5	25	5
<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504	2	34	6.5
<i>Rhodotorula minuta</i> NRRL-Y-1589	4	24	6
<i>Torulaspora delbrueckii</i> NRRL Y-866	3	28	6
İzolat-1	4	28	6
İzolat-2	5	24	6

Seçilen mikroorganizmaların biyotransformasyon ortamlarındaki gelişme durumları da farklılık göstermiştir. Biyotransformasyon ortamı olarak beş farklı besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların bu besiyerlerindeki gelişme durumları birbirleri ile karşılaştırılarak kaydedilmiştir (Çizelge 3.2).

Agrobacterium tumefaciens NRRL B-36 ile İzolat 3, α - medyum besi ortamında ve BA-1 besi ortamında İzolat 1 ise sadece BA-1 besi ortamında gelişmemiştir. Diğer mikroorganizmalar ise besiyerlerinde az veya çok gelişme göstermişlerdir.

Çizelge 3.2. Biyotransformasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar ile Besiyerlerinin Arasındaki Gelişim İlişkisi

NO	KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR	KULLANILAN BESİYERLERİ				
		Czapek pepton besiyeri	Giberelli trace	Genel besiyeri	α -medyum besiyeri	BA-1 Besiyeri
1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36	+	++	++++	-	-
2	<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i> NRRL Y-17594	+++	+++	+++	++++	++
3	<i>Ambrosiozyma monospora</i> NRRL Y-1484	++++	+++	++	++++	+
4	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++	++++	++
5	<i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 252	++++	+++	++	++++	++
6	<i>Cladosporium herbarum</i>	+++	+++	+++	+++	++
7	<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754	++++	++	+	++++	++
8	<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607	+++	+++	++	++++	++
9	<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786	+++	++	++	+++	++
10	<i>Penicillium expansum-1</i>	++	++	+	++	++
11	<i>Penicillium expansum-2</i>	+++	+++	+++	+++	++
12	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	+++	++++	+	-	-
13	<i>Penicillium sp.</i>	+++	+++	+++	+++	+
14	<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504	+	+	++++	+	++
15	<i>Rhodotorula minuta</i> NRRL-Y-1589	++++	++	+	++++	+
16	<i>Torulaspora delbrueckii</i> NRRL Y-866	++	++	+++	++	++
17	İzolat-1	+	++	++	++++	-
18	İzolat-2	+++	+	++	+++	++

DEĞERLENDİRME

++++ :Çok iyi gelişme

+++ :İyi gelişme

++ :Orta düzeyde gelişme

+

:Düşük derecede gelişme

-

:Gelişme yok

3.2. BİYOTRANSFORMASYON YAPAN MİKROORGANİZMALAR

Seçilen mikroorganizmaların başlangıç materyali olarak menton, mentol, limonen ve nane yağlarının kullanıldığı ortamlarda biyotransformasyon yapıp yapmadıkları gaz kromatografisi ile izlenmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları çizelge 3.3’ de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar ve biyotransformasyon yapıp, yapmadığı.

KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR:	BİYOTRANSFORMASYONUN OLUP OLMADIĞI				
	MENTON	LİMONEN	MENTOL	NANE YAĞI (OLEUM MENTHA)	NANE YAĞI (TÜRK NANESİ)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36	-	+	-	-	-
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i> NRRL Y-17594	+	-	-	-	-
<i>Ambrosiozyma monospora</i> NRRL Y-1484	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 252	-	-	-	-	-
<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754	-	+	-	-	-
<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607	-	+	+	-	-
<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i> NRRL-Y-1589	-	-	-	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i> NRRL Y-866	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	-	+	+	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	-	-	-
İzolat-1	-	-	-	-	-
İzolat-2	-	-	-	-	-
<i>Penicillium verrucosu var. cyclopium</i>	-	+	-	-	-
<i>Penicillium expansum-1</i>	-	-	-	-	-
<i>Penicillium expansum-2</i>	+	+	+	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	+	-	-	-

Çizelge 3.4. Biyotransformasyonda metabolitlerin elde edildikleri haftalar.

MİKROORGANİZMA	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA	5.HAFTA
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36	2				
<i>Ambrosiozyna cicatricosa</i> NRRL Y-17594	1				
<i>Ambrosiozyna monospora</i> NRRL Y-1484					
<i>Aspergillus niger</i>		1			
<i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 252					
<i>Cladosporium herbarum</i>		2			
<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754				2	
<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607			2,3		
<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786			3	2	
<i>Penicillium expensum-1</i>					
<i>Penicillium expensum-2</i>	1		3	2	
<i>Penicillium verrucosum var. cyclopium</i>		2	2		
<i>Penicillium sp.</i>			2,3		
<i>Pseudomonas citronellolis</i> NRRL B-2504					
<i>Rhodotorula minuta</i> NRRL-Y-1589					
<i>Torulaspora delbrueckii</i> NRRL Y-866					
İzolat-1					
İzolat-2					

1. Başlangıç Maddesinin **Menton** Olduğu Durumda Biyotransformasyon Sırasında Metabolit Eldesi
2. Başlangıç Maddesinin **limonen** Olduğu Durumda Biyotransformasyon Sırasında Metabolit Eldesi
3. Başlangıç Maddesinin **Mentol** Olduğu Durumda Biyotransformasyon Sırasında Metabolit Eldesi

Biyotransformasyon çalışmalarında kullandığımız 18 adet mikroorganizmadan 10 tanesi biyotransformasyon yapmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* NRRL, B-36, *Culvalaria lunata* NRRL 25754, *Diplodia gossypina* NRRL 13607, *Penicillium digitatum* NRRL 786, *Penicillium sp*, İzolat 3,5,6 Limoneni başlangıç materyali olarak kullanmışlardır.

Ambrosiozyna cicatricosa NRRL Y-17594, *Aspergillus niger* ve İzolat 5, başlangıç maddesi olarak mentonu kullanmışlardır.

Diplodia gossypina NRRL 13607, *Penicillium digitatum* NRRL 786, *Penicillium sp.* ve *Penicillium expensum-2* başlangıç maddesi olarak mentolü kullanmışlardır.

Nane yağlarında ise mikroorganizmaların hiçbiri ile biyotransformasyon elde edilememiştir.

Agrobacterium tumefaciens NRRL B-36 limonen'i birinci haftada biyotransformasyona uğratılırken, İzolat 3 ve 6 ikinci haftada, *Diplodia gossypina*, *Penicillium* sp., tarafından üçüncü haftada, *Culvalaria lunata* NRRL 25754, *Penicillium digitatum* NRRL 786 ve izolat 5 ise dördüncü haftada biyotransformasyona uğratmıştır.

Mentonu biyotransformasyona uğratan mikroorganizmalar birinci haftada biyotransformasyona uğratmışlardır.

Mentölü başlangıç maddesi olarak kullanan mikroorganizmalardan elde edilen metabolitler üçüncü haftada elde edilmişlerdir (Çizelge 3.4).

3.3. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİNDE KULLANILAN ÇÖZÜCÜLER VE ORANLARI

Biyotransformasyon işleminin durdurulması sonucunda kolon kromatografisinde elde edilen metabolitler İnce Tabaka Kromatografisinde tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu işlem için çok farklı çözücüler denenmiştir. Sonuç alınabilen çözücü ve oranlarından bazıları çizelge 3.5 ' de verilmiştir.

Çizelge 3.5. İTK' da kullanılan çözücüler ve kullanım oranları

No	Çözücüler	Oranları
1	Hekzan/Etil asetat	12/1
2	Hekzan/Etil asetat	8/1
3	Hekzan/Etil asetat/su	8/1/1
4	Hekzan/Etil asetat/su	4/1/1
5	Hegzan/aseton	2/1
6	Hekzan/Dietileter	10/1
7	Petrol eter/Etil asetat	4/1
8	Petrol eter/Etil asetat	2/3
9	Petrol eter/Etil asetat	1/1
10	Petrol eter/Etil asetat	3/7

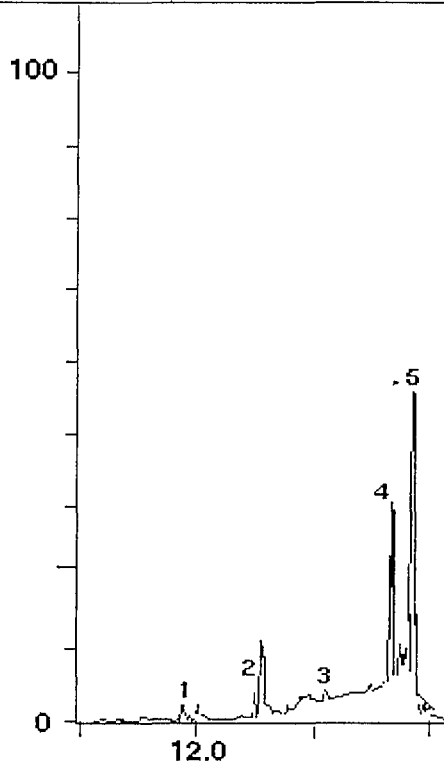
3.4. MENTONUN BIYOTRANSFORMASYONU

Menton' un biyotransformasyonu için yapılan çalışmalarda 18 mikroorganizma kullanılmıştır. Biyotransformasyonda başlangıç maddesi olarak kullanılan mentonun miktarı her erlenmayer için 25 µl dir. Bu mikroorganizmalardan *Ambrosiozyma cicatricosa* NRRL-Y 17594, *Aspergillus niger* ve *İzolat 5* biyotransformasyon yapabildiği gözlenmiştir. Bu maddelerden mentol ve mentofuran İTK ve GC ile tanımlanabilmiştir.

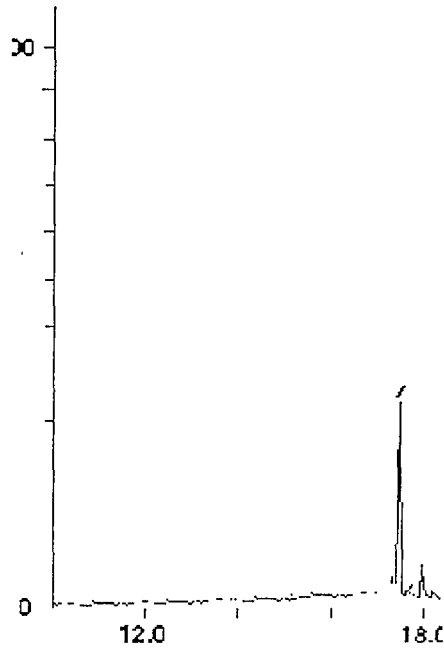
Çizelge 3.6' da , menton un biyotransformasyon çalışmaları sonunda elde edilebilen metabolitler ve tayin yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 3.6. Menton un biyotransformasyon işlemi sonuçları

KULLANILAN MİKROORGANİZMA	METABOLİT	TAYİN ŞEKLİ
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i> NRRL-Y 17594	M ₁	İTK, GC
<i>Aspergillus niger</i>	MENTOFURAN, M ₂	İTK, GC
<i>İzolat 5</i>	MENTOL	İTK, GC



Şekil 3.1. Biyotransformasyonda kullanılan standart maddelerden bazılarının pik değerleri
2. Limonen, 3. Linalol, 4. Menton, 5. Mentol



Şekil 3.2. Mentondan elde edilen mentofuranın pik görünümü

3.5. LIMONEN'İN BİYOTRANSFORMASYONU

Limonen' in biyotransformasyonunda kullanılan 18 mikroorganizmanın 6 adetinin biyotransformasyon yaptığı bulunmuştur. Bu metabolitlerin hiçbiri tanımlanamamıştır.

Tablo 3.7.Limonenin biyotransformasyon işlemleri sonuçları

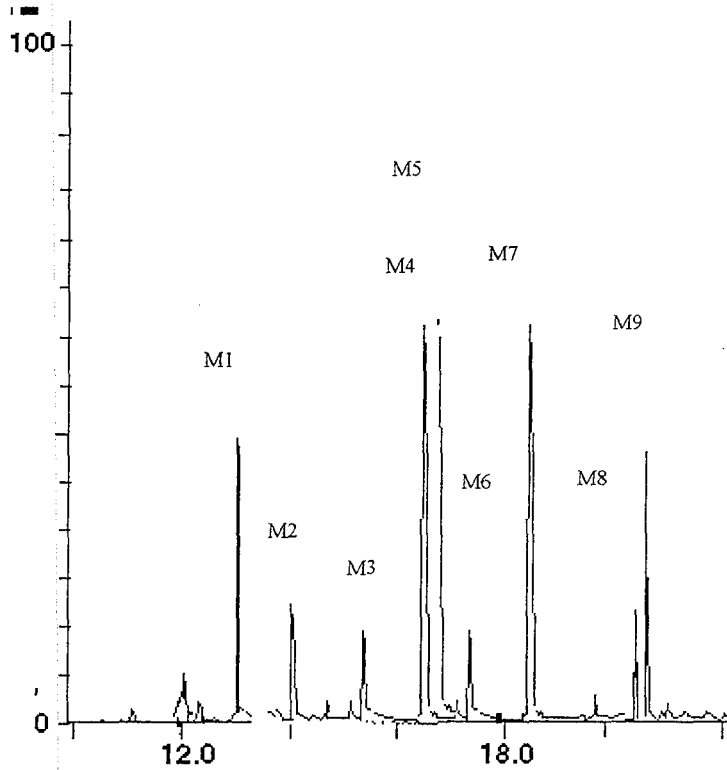
MİKROORGANİZMA	METABOLİT	TAYİN YÖNTEMİ
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NRRL B-36	M ₃	İTK,GC
<i>Culvalaria lunata</i> NRRL 25754	M ₄	İTK,GC
<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607	M ₅	İTK,GC
<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786	M ₆	İTK,GC
<i>Penicillium sp</i>	M ₇ , M ₈	İTK,GC
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	M ₉	İTK,GC

3.6. MENTOL'ÜN BİYOTRANSFORMASYONU

Mentol'ün başlangıç maddesi olarak kullanıldığı biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan 18 mikroorganizmanın 2 tanesinin biyotransformasyon yaptığı bulunmuştur. Bu dört adet mikroorganizmadan 2 adet metabolit elde edilmiştir.

Tablo 3.8.Mentolün biyotransformasyon işlemleri sonuçları

MİKROORGANİZMA	METABOLİT	TAYİN YÖNTEMİ
<i>Diplodia gossypina</i> NRRL 13607	M ₁₀	İTK,GC
<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 786	M ₁₁	İTK,GC



Şekil 3.3. Biyotransformasyon sonucunda elde edilen metabolitlerin pik özellikleri

3.7. 6-BENZİLAMİN PURAN İÇEREN BESİYERİ (BA1)' NİN KULLANILDIĞI BIYOTRANSFORMASYONU

Yapılan bu çalışmalarda hiçbir metabolit elde edilememiştir.

3.8. NANE YAĞLARININ KULLANILDIĞI BESI ORTAMLARINDA BIYOTRANSFORMASYONU

Yapılan bu çalışmalarda hiçbir metabolit elde edilememiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyoteknolojik yöntemler, geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen bitkisel materyallere karşı birçok avantajlara sahiptir. Yüksek verim, yüksek saflık, ve yüksek güvenilirlik düzeyi bu avantajlardan bazılarıdır. Doğal çeşni maddelerinden en önemlileri, uçucu yağlar ve oleoresinlerdir. Ekstraksiyon, destilasyon veya mekanik presyon ile doğrudan bitkilerden izole edilen uçucu yağlar çok eskiden beri kullanılmaktadır. Tad ve lezzet maddelerinin içerisinde badem, anason, tarçın, limon, vanilya ekonomik değeri en yüksek olanlardır [9, 12, 59].

Mikrobiyal transformasyon çok hızlı bir gelişim içindedir. Ancak; gıda katkı maddelerinin üretiminde henüz yeterli bir büyüme yoktur. 2000' li yıllarda özellikle tad ve koku maddelerinin çok hızlı bir şekilde büyüyeceği bildirilmektedir [7, 9, 12, 59]. Monoterpenler bol miktarda ve ucuz olarak bulunduğu için özellikle koku ve aroma maddelerinin sentezlerinde tercih edilen başlangıç maddeleridir [7, 9, 15, 59].

Biyotransformasyon çalışmaları günümüzde giderek önem taşımaktadır. Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalar hiç yok denecek kadar azdır.

Çalışmalarımızda seçilen başlangıç maddelerini biyotransformasyona uğratan mikroorganizmalar belirlenmeye çalışılmıştır. Seçilen 18 mikroorganizmadan 10 tanesinin biyotransformasyon yaptığı belirlenmiştir. Nane bitkisinin yetiştiği topraktan ve bitkiden izole edilen izolat *Penicillium verrucosum var. cyclopium*, başlangıç maddesi limonen olduğunda, *Penicillium expansum-2* ise başlangıç maddesi menton, limonen ve mentol olduğunda biyotransformasyon yapmıştır.

USDA kültür koleksiyonundan temin ettiğimiz mikroorganizmaların hepsi daha önce biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmış mikroorganizmalardan seçilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda farklı mikroorganizmaların, farklı başlangıç materyallerini biyotransformasyona uğrattığını ortaya koymuştur. Bu konuda ilk patent limonenden karvon elde edilmesinde *Corynebacteria* cinsine ait mikroorganizmalara aittir. Daha sonra monoterpenlerin biyotransformasyonda *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizopus*,

Trichoderma ve *Candida* cinslerine ait mikroorganizmaların rol aldığı bildirilmiş ve patentleri alınmıştır [7, 9, 15, 24, 59].

Spencer ve arkadaşları [53], *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak *mentha* türlerinden elde edilen yağlarda, invitro ortamlarda monoterpenlerin biyosentezini, gerçekleştirmişlerdir. Mikroorganizmanın geliştiği en uygun besiyerinde, inokulum geliştirilmiş ve inkübasyonun 22. ve 44. günlerinde biyotransformasyon ürünlerinin maksimum üreme gösterdiği bildirilmiştir. Mentol üretiminin en yüksek olduğu zaman aralığı ise 15. gün olarak tespit edilmiştir [53,60] Bizim çalışmamızda kullandığımız *Agrobacterium tumefaciens* NRRL B-36 nın biyotransformasyon yaptığı tespit edilmiştir. *A. tumefaciens* NRRL B-36 tarafından limonden ikinci haftada M₃ metaboliti elde edilmiştir.

Hanssen ve arkadaşları *Ambrossiozyme cicatricosa* CBS 6158 in çeşitli başlangıç materyallerini kullanarak monoterpenleri sentezleyebildiğini bildirmişlerdir [53]. Çalışmamızda *Ambrossiozyme cicatricosa* NRRL Y- 17594 mentonu başlangıç maddesi olarak kullanmış ve üçüncü haftada M₁ metabolit elde edilmiştir.

Hanssen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalardan, *Ambrossiozyme monospora* CBS 2554 ve *Aspergillus sydowii*' monoterpenlerin elde edilmesinde kullanılabileceği bildirilmişlerdir [53]. Ancak - bizim kullandığımız mikroorganizmalar *Ambrossiozyme monospora* NRRL Y-1484 ve *Aspergillus sydowii* NRRL 252 biyotransformasyon yapamamıştır. Kullandığımız mikroorganizmanın biyotransformasyon yapabileceği sıcaklık, zaman, pH ve besiyer ortamı gibi koşulların sağlanması durumunda biyotransformasyon yapması beklenebilir. Ancak bazı durumlarda ortam koşulları tam olarak sağlansa dahi kullanılan mikroorganizma süşunun farklı olması durumunda biyotransformasyonun gerçekleşmediği bildirilmiştir [23,26],

Abraham ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda *Diplodia gossypina* ATCC 10936, kullanarak asiklik monoterpenlerin, terminal izopropenil grupları ile (S)-2,3-dihidro-2,3- diollere dönüştürdüğü bildirmektedirler. Ayrıca *D. gossypina* L-Menthenin oksidasyonu ile 1,2-dihidro-1,2 trans diollere

dönüştürebilmekte ve asiklik izoprenoid maddelerin biyotransformasyonunu meydana getirmektedir [53], Kieslich ve arkadaşları ise *D. gossypina* nın limonen, α -terpinen, γ -terpinen, (R)-(+)-limonen, (R)-(-)- α -fenilandreni biyotransformasyona uğrattığı bildirilmiştir [48]. Çalışmamızda kullandığımız *Diplodia gossypina* NRRL 13607, limonen ve mentöl biyotransformasyona uğratmıştır. M₅ ve M₁₀ metabolitleri üçüncü haftada elde edilmiştir. Ancak bu metabolitlerde tarafımızdan tanımlanamamıştır [53].

Penicillium digitatum hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır ve biyotransformasyonda çok başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir [26,53]. Kieslich ve arkadaşları tarafından, *Penicillium digitatum* ile Sitraneloldan önce pulegon ve izopulegon elde edilmiştir. Biyotransformasyonu devamında % 95 saflıkta mentol elde edilebildikleri açıklanmıştır[23]. Abraham ve arkadaşları ise *Penicillium digitatum*' un uygun besiyortamlarında, başlangıç maddesi olarak (+)-Limoneni kullanarak α -terpineolün elde edildiğini bildirmişlerdir [53]. Çalışmamızda kullandığımız *Penicillium digitatum* NRRL 786 limonen ve mentöl başlangıç maddesi olarak kullanabilmiştir. İnkübasyon süresinin üçüncü ve dördüncü haftalarında M₆ ve M₁₁ metabolitleri elde edilmiştir.

Fuganti ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda *Rhodotorula minuta* monotermen alkollerden timöl başlangıç maddesi olarak kullanarak (-)-mentol elde edilebileceğini bildirilmiştir [23]. Bizim çalışmamızda *Rhodotorula minuta* NRRL Y-1589 kullanıldığı ve bu mikroorganizmanın kullandığımız koşullarda biyotransformasyon yapmadığı ortaya çıkmıştır. Yine *P.citronellosis* NRRL B-2504, *Torulaspora delbruechii* NRRL Y-866, *Penicillium expansum*-1, ve İzolat 1 ile İzolat 2 nin kullanıldığı biyotransformasyon çalışmalarında da herhangi bir metabolit elde edilememiştir. Bu mikroorganizmaların biyotransformasyon yapmamasının nedeni başlangıç maddesinin ve biyotransformasyon koşullarının uygun olmaması olabilir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda biyotransformasyon koşullarının mikroorganizmaya göre yeniden düzenlenmesi ve başlangıç maddesinin değiştirilmesi durumunda kullanılan mikroorganizma ile metabolit elde edilmesinin mümkün olacağı bildirilmektedir [52].

Başlangıç materyali olarak menton kullanıldığında *Aspergillus niger* ile mentofuran ve M₂ kodlu metabolit elde edilmiştir. Nane bitkisinin yetiştiği topraktan ve bitki aksamından izole edilen ve *Penicillium expansum-2* olarak isimlendirdiğimiz mikroorganizma ile mentole dönüşüm sağlanmıştır.

L-mentol, şekerlemelerden, tıbbi ürünlere kadar çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan monoterpen yapısına sahip organik bir maddedir. Ürünlere nane tadı verir ve serinletici özelliği bulunmaktadır. Nane bitkisinde yağ oluşumu, çiçeklenme başlangıç dönemi ile tamamen çiçeklenme arasındadır. Bu sırada sadece L-mentolün az bir miktarı (%40), L-mentole çevrilirken, büyük bir kısmı ticari değeri düşük olan diğer ürünlere dönüşmektedir. L-mentolün bitkiden en yüksek seviyede ekstrakte edilerek daha sonra *Pseudomonas putida* gibi mikroorganizmaların dehidrogenaz aktivitesi yoluyla L-mentole dönüştürülebileceği öne sürülmüştür [25,26].

Mentol farklı başlangıç maddelerinden de biyotransformasyonla elde edilmiştir. Sitranellol dan *P. digitatum* ile mentol elde edildiği bildirilmiştir [25]. Mentondan mentol ve neomentolün ayrılmasına sebep olan enzim (-)-mentol redüktaz enzimi olarak bildirilmiştir [53]. Sonuç olarak İzolat 5 bu enzimi salgılayan bir mikroorganizma olabilir. Yine bizim yaptığımız çalışmada (-)-menton kullanılmıştır. (+)-menton kullandığımız ortam koşullarında ise bu dönüşüme rastlanamamıştır [50].

Menton başlangıç maddesi olarak kullanıldığı biyotransformasyon çalışmalarında *Aspergillus niger* ile mentofuran elde edilmiştir. Mentofuran ara bir bileşik olmakla beraber sentetik olarak elde edilmiş bir bileşik olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar daha önce daha önce biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmış olmasına karşın mentolün biyotransformasyonunda ilk kez denenmiştir.

Başlangıç materyali olarak limonen kullanıldığında *A. tumefaciens*, *C. lunata*, *D. Gossypina*, *P. digitatum*, *Penicillium sp.*, *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium*, *Penicillium expansum-2* ve *Cladosporium herbarum* kullanılarak yapılan çalışmalarda sırasıyla, M₃, M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉, M₁₀, M₁₁ kodlu metabolitler elde edilmiştir. *Penicillium sp* ile M₄ ve M₈ kodlu iki metabolit elde

edilmiştir. Bu metabolitler kullandığımız yöntemler ile saptanamamıştır. Çalışmalarımızda kullandığımız yöntemler metabolitlerin tanımlanmasında oldukça yetersiz kalmıştır. Metabolitlerin daha sağlıklı tespiti için kütle spektroskopisi ve NMR tekniği gibi tekniklerin kullanılabilmesi gerekmektedir. Headspace SPME (Katı faz mikroekstraksiyonu) nun iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Limonenin biyotransformasyonu hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır [25, 50, 51]. Metabolit elde ettiğimiz çalışmalarda alfa medyum besiyerlerinde iyi sonuçlar alınmıştır. Kullanılan mikroorganizma diğer besi yerlerinde daha iyi gelişmesine rağmen, metabolit elde edilememiştir. Bu yüzden çalışmalarda gelişme olan bütün besiyerleri kullanılmıştır.

Turner ve arkadaşları nane yağından monoterpenlerin biosentezi çalışmasında reaksiyonun 7. aşamasında (+)- pulegondan, pulegon redüktaz enzimi ile (-)- menton elde etmişlerdir. Reaksiyonların devamında (-)-mentondan, menton redüktaz enzimi ile (-)-mentol ve (+)-neomentol elde edildiği bildirilmiştir [39]. Yine Bouwmeester ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, biyotransformasyon da başlangıç maddesi olarak karbonhidratlar kullanıldığında, izopentil difosfat (IPP), geranil difosfat (GPP)' den (+)- Limonen sentetaz enzimi ile limonen ve son olarak (+)-karvonun enzimatik biyotransformasyonla elde edilmesinin çok daha kolay olduğu bildirilmiştir [53]. Bu çalışmalarda biyotransformasyon işlemi mikroorganizmalar ile değil, enzimler ile gerçekleştirilmiştir. Enzimler ile yapılan biyotransformasyon çalışmalarının daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Bu yüzden gerek mikroorganizmalar ile, gerekse enzimler ile meydana gelen biyotransformasyon çalışmalarında en iyi sonuç veren yöntemin kullanılmasına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal etkinin mikroorganizmaların gelişimine etki etmesi yüzünden sözkonusu işlem aşamalarında herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Örneğin nanenin bileşiminde bulunan mentolün antimikrobiyal özelliği olduğu bilinmektedir [41].

Mikroorganizmaların antimikrobiyal özellikleri hakkında yapılan çalışmalarda bazı metabolitlerin, bu özellikten dolayı oluşumunun engellendiği belirtilmiştir. Bu sebeple biyotransformasyonda başlangıç materyali ve beklenen

biyotransformasyon ürünlerinin özelliklerinin iyi bilinmesi ve antimikrobiyal etkinin izlenmesi gerekmektedir [1,26,60].

Sonuç olarak, mikroorganizmalar tarafından bu dönüşümün sağlanmış olması gelecek için ümit vadetmektedir. Çünkü *Mentha piperita* gibi bazı nane türlerinde menton oranı diğer türlere göre daha fazla, mentol oranı daha azdır. Bitkiden elde edilen mentonun dönüşümünün sağlanması ekonomik olarak daha fazla mentolün gıda, ilaç ve koku sanayilerine kazandırılması söz konusudur. Ayrıca bu konuda çalışmaların geliştirilmesi yeni tad ve koku maddelerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- 1 ŞAHİN, İ., *Biyoteknoloji ve Tarım*, Gıda, 2, Sayı:5, 32-33, (1987).
- 2 KIVANÇ, M., *Doğal Aroma Maddeleri Üretimine Biyoteknolojik Yaklaşım*, Gıda, 14(3), 165-170, (1989).
- 3 KORUKOĞLU, M., *Doğal Aroma Maddeleri Üretiminde Mikroorganizmalar*, Gıda 1, 48-50, (1998).
- 4 KARAALİ, A., *Bazı Gıda Katkı Maddelerinin Mikrobiyal Sentezle Üretimi Olanakları Üzerinde Çalışmalar* Gıda, 15(3), 173-185. (1987).
- 5 AKGÜL, A. *Baharat Bilimi ve Teknolojisi* Gıda Teknolojisi derneği, Ankara. Damla Matbaacılık , 127-133, (1993).
- 6 <http://www.ftns.wau.nl/imb/research/Terpenes.html>
- 7 SMITH, J.L. ve PALUMBO, S.A., *Microorganisms as Food Additives*, Journal of Food Protection, 44, 936-955,(1981).
- 8 AMSTRONG, D.W., *Natural Flavours production: a Biotechnological Approach*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam ,265-268, (1986).
- 9 AMSTRONG, D.W., MARTIN, S.M., ve YAMAZAKI, H., *Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing*. Biotech. Lett., 6 , 183-188, (1984)
- 10 DORNENBURG, H., ve KNORR, D., *Generation of Colors and Flavors in Plant Cell and Tissue Culture*, Critical Reviews in Plant sciences, 15(2), 141-168, (1996).
- 11 GATFIELD, I. L., *Generation of Flavor and aroma Components by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology*. In: Parliment Th. (ed), Biogenerationof aromas, 310-322. American Chemical society, Washington, D.C, (1986).
- 12 FUGANTİ, C., SERVİ, S., BARBENİ, M. ve CABELLA, P., *Studies in Natural Products, Chemistry*, 13, 295-345, (1998).

- 13 <http://www.mentholword.com.products.htm>
- 14 CURTIN, M.E., *Harvesting profitable products from Plant Tissue Culture*, Bio. Technol. **1**, 649, (1983).
- 15 MISRA G.,PAYLOSTATHIS, S.G., " Aerobic biodegration of Selected Monoterpenes", Appl. Microbiol Biotechnology, **45**, 831-838, (1996).
- 16 KONING, W.A., BULOW, N., SARITAŞ, Y., "*Identification of sesquiterpene hydrocarbons by gas phase analytical methods*" Flavour and Fragrance Journal, flavour Frag., **J.14**, 367-378, (1999)
- 17 ROBERTS, S. M., TURNER, N. J., WILLETTS, A. J., AND TURNER, M. K., *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press, Cambridge, (1995).
- 18 MIRZA, M., AHMADI, L., TAYEBI, M., "*Volatile constituents of Hymenocrater incanus Bunge, an Iranian endemic species*" Flavour and Fragrance Journal, **16**, 239-240, (2001)
- 19 RAMSTROM, L.Y., ANSELL, R.J., MANSSON, M.O., *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 650-655 (1999)
- 20 RAJAGURU, P., KALAISELVI, K., SUBBURAM,V., "*Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system*", Appl. Microbiol Biotechnol, **54**, 268-273, (2000).
- 21 BERGER, R ABRAHAM, W.R., HOFFMANN, M.R. *Microbial Transformation of Some Monoterpenoids and sesquiterpenoids*, pp:146-160,G., *Aroma Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin, (1995).
- 22 FABER, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg, (1997).
- 23 ANONYMOUS, *Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği*, Resmi Gazete Sayı No. 19746, (1988).

- 24 ARMSTRONG, D.W., ve YAMAZAKI, H., *Natural Flavours Production*, Trends in Biotechnology, No.4, 264-268, (1986).
- 25 GATFIELD, I. L., *Production of Flavour and Aroma Compounds by Biotechnology*, Food Technology, **42 (10)**, 110, (1988).
- 26 ADAMS, T.B., HALLOGAN, J.B., PUTNAM, M., GIERKE, T.L., DOULL, J., MUNRO, J.C., ve NEWBERNE, P., *The Fema Gras Assesment of Alicyclic Substances Used as Flavour Ingredients.*, Food and Chemical Toxicology, **34**, 763-828, (1996).
- 27 REICLING, J., MARTIN, R., BURKHARDT, G., ve BECKER, H., *Comparative Study on the Production and Accumulation of Essential Oil in the Whole Plant and in Tissue Cultures of Pimpinella Anisum*, Progres in Esential Oil Research, Walter de Gruyter & Co., Berlin- New York- Printed in Germmany, (1986).
- 28 KIESLICH, W.R. *Transformation of Terpenoids*, Progres in essential Oil research, Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York- Printed in Germany. Pp.366-394, (1986).
- 29 PISANO, R.C., *The Future of Natural Essential Oils in the Flavor and Fragrance Industry*. Perfumer and Flavorist. **11**, 35-41,(1986).
- 30 GREENHALGH, P.. *Production Trade and Markets for Culinary Herbs*. Trop. Science **22(2)**, 159-188 (1980).
- 31 WHITAKER, R., ve EVANS. A.D., "*Plant Biotechnology and the Production of Flavor Conpounds*" Flavor Trends & Technologies, Food Technology, pp.86-87, (1987).
- 32 DEMİRÇİ, F., Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognazi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir, (2000)

- 33 BRUN, G., BESSIERE, J.M., GENEVIEVE, M. ve MARIOTTE, A. M., "*Volatile Component of Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynaceae)*", *Flavour and Fragrance Journal*, flavour Frag., J. **16**, 116-119, (2001)
- 34 BARNARD, D. ve DONALD, R., *Repellancy of Essential Oils to Mosquitoes*, *J.of Med. Entomol*, **1**, 625-629, (1999).
- 35 <http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene-en.html>
- 36 OSKAY, E., *Organik Kimya*, Hacettepe Yayınları, A-17, 3. Baskı, (1983).
- 37 <http://www.ea-menthol.com/products.htm>
- 38 TURNER, G.W., GERSHENZON, J. ve CROTEAU, R.B., *Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint*, **124**, 665-663, (2000)
- 39 TURNER, G.W., GERSHENZON, J. ve CROTEAU, R.B., *Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint*, *Plant Physiology*, **124**, 665-679, (2000)
- 40 MANLEY, C.H., *Processing and Biotechnology as a Source of Flavors*. *Perfumer & Flavorist*, 11-12, (1987).
- 41 <http://www.ensia.infra.fr/-courtois/fidel/Lisbon/flaves.html>
- 42 LANGE, B.M., WILDUNG, M.R. ve STAUBER, E. J., *Probing essential oil biosynthesis and expressed sequence tags from mint glandular trichomes*, **97**, no: **6**, 2934-2939, (2000).
- 43 GIOIA, D., FAVA, F., BERTIN, L. ve MARCHETTI, L., "*Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria*" *Appl. Microbiol Biotechnol*, **55**, 619-626, (2001).
- 44 FUCHS, S., GROSS, A., BECK, T. ve MOSANDL, A., "*Monoterpene biosynthesis in piperitone and piperitonone*", *Flavour and Fragrance Journal*,

- 15, 84-90, (2000).
- 45 KUES, U., LIU, Y., "Fruting body production in basidiomycetes", *Appl. Microbiol Biotechnol*, **54**, 141-152, (2000).
- 46 PARK S.Y. ve KIM, S.U., "Modified Monoterpenes from Biotransformation of (-)-isopiperitone by Suspension Cell Culture of *Mentha piperita*." *J.Nat.Prod.*, **61**, 354-357, (1998).
- 47 RAHMAN, A., YAQOOB, M., FAROOQ, A., ANJUM, S., ASIF, F., ve CHOUDHARY, I., *fungal Transformation of (1R, 2S, 5R)-(-)-Menthol by Cephalosporium*, *J., Nat. Prod.*, **61**, 1340-1342, (1998).
- 48 KIESLICH, K., *Biotransformations In: Fungal Biotechnology*, Anke, T., (Ed.), pp. 297-362, Chapman & Hall, Weinheim, (1997).
- 49 ORIHARA, Y., MIYATAKE, H., ve FURUYA, T., *Triglucosylation on the Biotransformation of (+)-menthol, by Cultured Cells of Eucalyptus Perriana*, *Phytochemistry* vol. **30**, No. 6, 1843-1845, (1991).
- 50 ROBINSON, T., SINGH, D. ve NIGAM, P., "Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production", *Appl. Microbiol Biotechnol*, **55**, 284-289, (2001).
- 51 <http://course.che.umn.edu/00fscn4345-1f/Applications-Beverage.htm>
- 52 GERSHENZON, J., McCONKEY, M.E. ve CROTEAU, R.B., *Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint*, *Plant Physiology*, **122**, 205-213, (2000).
- 53 SPENCER, A., HAMILL, J.D., ve RHODES, J.C., *In Vitro Biosynthesis of Monoterpenes by Agrobacterium Transformed Shoot Cultures of Two Mentha Species*, *Phytochemistry*, Vol. **32**, No.4, 911-919, (1993).
- 54 VAN DER WERF ve M.J., BOOT, A., *Metabolisms of carveol in Rhodococcus erythropolis DCL 14*, *Microbiology*, **146**, 1129-1141, (2000)

- 55 COLEMAN, W.,M., PERFETTI, T.A. ve SUBER,R.L., *Quantitative Analysis of Menthol Isomer Distributions in Selected Samples*, Journal of Chromatographic Science, Vol.36, 318-322, (1998).
- 56 ABRAHAM,W.R., ERNST, L. ve ARFMANN, H.A., "Rearranged Caryophyllenes by Biotransformation with *Chaetomium cochliodes*", Phytochemistry, 29, no:3, 757-763, (1990).
- 57 BOHLMANN, J., MARTIN, D. ve OLDHAM, N.J., *Terpenoid Secondary Metabolism in Arabidopsis thaliana: cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of a Myrcene/ (E)- β -Ocimene Synthase*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 375, No:2, 261-269, (2000).
- 58 BOHLMANN, J., PHILIPS,M. ve RAMACHANDIRAN, V., "cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of Four New Monoterpene Synthase Members of the Tpsd Gene Family from Grand Fir (*Abies grandis*)." Archives of Biotechnology and Biophysics, 368, No:2, 232-243, (1999).
- 59 AMSTRONG, D.W., *Selective Production of Ethyl Acetate by candida utilis*, Bioengineering of Aroma ACS publ. (Advences in Chem.Series) (1996).
- 60 RIJHWANI, S. ve SHANKS, V.S., *Effect of elicitor dosage and Exposure Time on Biosynthesis of Indole Alkaloids by Cacharanthus roseus Hairy Root Cultures*", Biotechnol. Prog., 14, 442-449, (1998) .