

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

***Pseudomonas putida* İLE İZOÖJENOLDEN DOĞAL VANİLİN ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

HÜSEYİN KARAKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

ARALIK 2016

Tezin Başlığı: *Pseudomonas putida* ile İzoojenolden Doğal Vanilin Üretiminin Optimizasyonu

Tezi Hazırlayan: Hüseyin KARAKAYA

Sınav Tarihi: 16/12/2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: **Yrd. Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN**
İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Gökhan DURMAZ
İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Bayram YURT
Bingöl Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum '***Pseudomonas putida* ile İzöjenolden Doğal Vanilin Üretiminin Optimizasyonu**' başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Hüseyin KARAKAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Pseudomonas putida İLE İZOÖJENOLDEN DOĞAL VANİLİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Hüseyin KARAKAYA

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

77 + ix sayfa

2016

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN

Bu çalışmada *Pseudomonas putida* HUT 8100 bakteri kültürü kullanılarak izoöjenol'den doğal vanilin aroması üretilmiş ve üretim veriminin arttırılması amacıyla koşulların optimizasyon yolları araştırılmıştır.

Biyodönüşüm için öncelikli olarak *Pseudomonas putida* kültürünün gelişim kinetiği incelenmiştir. Agar üzerinde yapılan canlı bakteri sayımına göre popülasyon 48. saatte en yüksek değerine ulaşmış ve bu saatten itibaren popülasyonda nicel açıdan bir duraklama olduğu tespit edilmiştir.

Duraklama fazı içerisinde popülasyonun en yoğun noktasına ulaştığı 48. saatte kültür GYP (Glikoz Yeast Ekstrakt Pepton) sıvı besiyerinden alınarak biyodönüşümün gerçekleşeceği potasyum fosfat tampon çözeltisi içerisine alınmıştır. Erlen düzeyinde gerçekleştirilen üretimlerde 24, 28 ve 32 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde biyodönüşüm miktarı kontrol edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda bakterinin 28 °C'de en iyi üretim performansını gösterdiği saptanmıştır.

Daha sonraki aşamada çözelti içerisindeki potasyum iyonu konsantrasyonu ve dolayısıyla pH değişikliğine bağlı olarak kültürün vanilin üretim kapasitesinin ne şekilde değiştiği incelenmiştir. Buna göre en iyi üretimin 4.84 g/L K₂HPO₄ ile 16.65 g/L KH₂PO₄ içeren (pH 6.30) tampon çözelti içerisinde gerçekleştiği görülmüştür.

Ayrıca aerobik bir kültür olan *P. putida*'nın havalandırmasız ve yarı havalandırmalı ortamdaki biyodönüşüm performansı da araştırılmıştır. Yarı havalandırma yapılan ortam koşullarında daha yüksek biyodönüşüm verimi elde edilmiştir.

Elde edilen bulgulardan faydalanılarak (28 °C ve 6.30 pH'da) erlen içerisinde hazırlanan biyodönüşüm ortamına farklı miktarlarda izoöjenol ilavesi yapılmıştır. Ortama % 40 (w/v) oranında izoöjenol ilave edildiğinde, 120 saatlik biyodönüşüm süresi sonunda 9.14 g/L vanilin elde edilmiştir.

Sonuç olarak, biyodönüşüm üzerine etkisi bulunan parametrelerin optimizasyonu ile vanilin üretiminde önemli düzeyde artış kaydedilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Biyodönüşüm, *Pseudomonas putida*, vanilin, izoöjenol

ABSTRACT

Master Thesis

OPTIMIZATION OF NATURAL VANILLIN PRODUCTION FROM ISOEUGENOL BY *Pseudomonas putida*

Hüseyin KARAKAYA

Inonu University
Institute of Natural and Applied Science
Department of Food Engineering

77 + ix pages

2016

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN

In this study, natural vanillin was produced from isoeugenol using *Pseudomonas putida* HUT 8100 culture and it were investigated optimization ways of conditions which were effective on vanillin yield.

Pseudomonas putida culture's growing kinetics were examined primarily for bioconversion. According to viable cell counting results on agar surface, population has reached maximum level in 48 hours and after this moment there has been detected a stationary position in terms of quantitative amounts.

Culture was transferred to potassium phosphate buffer medium from GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) broth when population reached maximum level in stationary phase at 48th hour. In flask scale bioconversion experience, 3 temperature levels about 24, 28 and 32 °C were tested. It has determined in consequence of experiments; culture showed best vanillin production performance at 28 °C.

On next step, it was investigated how vanillin production capacity effected by changing potassium ion concentration and correspondingly changing pH of medium. The most effective production was seen in medium which contains 4.84 g/L K₂HPO₄ and 16.65 g/L KH₂PO₄ (with pH 6.30).

Bioconversion performance of *Pseudomonas putida*, an aerobe culture, was also studied in non-aerated and semi-aerated conditions. There was obtained higher bioconversion yield when semi-aerated conditions used.

Using obtained results (at 28 °C and 6.30 pH), different isoeugenol amounts added to bioconversion medium in erlen-mayer flasks. After 120 hours for bioconversion, vanillin reached 9.14 g/L in case of 40 % (w/v) isoeugenol was added to medium.

Eventually, optimizing of bioconversion parameters which are effective on yield caused a significant increase in vanillin yield.

KEY WORDS: Bioconversion, *Pseudomonas putida*, vanillin, isoeugenol

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteklerini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN'e;

Araştırmalarım süresince yakın ilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen başta Sayın Yrd. Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT ve Sayın Doç. Dr. Gökhan DURMAZ olmak üzere Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı üyelerine;

Lisansüstü eğitimdeki yol arkadaşlarım Fatma Sezer ÖZTÜRK, Başak BİLCANOĞLU ve Kübra TEKELİOĞLU'na;

Bakteri kültürünü temin eden HUT kültür koleksiyonuna ve çalışmayı 2015/17 proje numarası ile maddi olarak destekleyen başta İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi olmak üzere mensubu olduğum İnönü Üniversitesi'ne;

Ayrıca her zaman yanımda olan, hayata ümitle bakma ve mücadele etme sebebim annem, babam ve kardeşime;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Aroma Maddelerinin Sınıflandırılması	5
2.2. Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri.....	6
2.3. Biyoteknolojik Yollarla Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri	8
2.3.1. Bitki hücre kültürü ile aroma maddelerinin üretimi	10
2.3.2. Enzimatik yol ile aroma maddelerinin üretimi.....	12
2.3.3. Mikrobiyal yol ile aroma maddelerinin üretimi	14
2.4. Vanilin	20
2.5. Bitkilerde Vanilin Oluşum Mekanizması ve Vanilya Çubuğu Eldesi.....	21
2.6. Biyoteknolojik Yöntemlerle Vanilin Üretimi.....	23
2.6.1. Bitki hücre kültürü ile vanilin üretimi.....	24
2.6.2. Enzimatik yollarla vanilin üretimi.....	25
2.6.3. Mikrobiyal biyodönüşüm yoluyla vanilin üretimi	26
2.7. Mikrobiyal Biyodönüşüm Yolu İle Aroma Maddesi Üretiminin Eksik Yönleri, Karşılaşılan Güçlükler ve Çözüm Yolları	29
2.7.1. Besleme noktasının tespiti.....	31
2.7.2. Optimum biyodönüşüm sıcaklığının tespiti	33
2.7.3. Optimum pH değerinin tespiti.....	34
2.7.4. Biyodönüşüm ortamının havalandırılması	35

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1. Materyal.....	36
3.1.1. Bakteri kültürü.....	36
3.1.2. Besiyerleri ve kimyasallar	36
3.1.3. Alet, Ekipman ve Cihazlar	37
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Kültürün geliştirilmesi.....	37
3.2.2. Hücrelerin durağan faza hazırlanması.....	38
3.2.3. Biyodönüşüm ortamından örneklerin alınması	39
3.2.4. Kromatografik analizler	40
3.2.5. Kültürün gelişim kinetiğinin belirlenmesi.....	42
3.2.6. Sıcaklığın vanilin üretimi üzerine etkisi.....	43
3.2.7. pH'ın vanilin üretimi üzerine etkisi	43
3.2.8. Havalandırmanın vanilin üretimi üzerine etkisi	44
3.2.9. İzöjenol konsantrasyonunun vanilin üretimi üzerine etkisi.....	45
3.2.10. Kuru biyokütle değişiminin incelenmesi.....	45
3.2.11. pH değişiminin incelenmesi	47
3.2.12. Mikrobiyal canlılığın kontrolü	47
3.2.13. İstatistiksel analizler	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	49
4.1. Kromatografik Analizler	49
4.2. Kültürün Gelişim Kinetiğinin Belirlenmesi	51
4.3. Sıcaklığın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi	52
4.4. pH'ın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi	56
4.5. Havalandırmanın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi.....	59
4.6. İzöjenol Konsantrasyonunun Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
6. KAYNAKLAR	68
7. EKLER.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ülke mevzuatlarına göre aroma maddelerinin sınıflandırılması	5
Şekil 2.2. Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan biyoteknolojik yöntemler	9
Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon (tutuklanma) şekilleri	13
Şekil 2.4. <i>Ceratocystis variispora</i> tarafından üretilen terpenler	16
Şekil 2.5. Vanilin'in kimyasal yapısı	21
Şekil 2.6. Vanilin'in β -D-glikozit yapısı (Glikovanilin)	22
Şekil 2.7. Ferulik asidin vanilin'e 2 aşamalı biyodönüşümü	27
Şekil 2.8. İzöjenol'ün kimyasal yapısı	28
Şekil 2.9. İzöjenol'ün vanilin'e mikrobiyal biyodönüşümü	28
Şekil 2.10. Statik bir kültürde mikroorganizmaların gelişim eğrisi	32
Şekil 3.1. Gelişim ortamı için kullanılan GYP besiyeri ve biyodönüşüm ortamı	38
Şekil 3.2. Filtre edilerek steril hale getirilmiş izöjenol	39
Şekil 3.3. Biyodönüşüm ortamından alınan ekstrakt	39
Şekil 3.4. HPLC standart madde kalibrasyon grafiği	41
Şekil 3.5. HPLC için örnek hazırlama basamakları	42
Şekil 3.6. Havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesi	44
Şekil 3.7. Yaş ve kuru biyokütle arasındaki bağıntıyı gösteren kalibrasyon grafiği	46
Şekil 3.8. INT ile yapılan mikrobiyal canlılık kontrolü	47
Şekil 4.1. İzöjenol ve vanilin'e ait GC-MS pik profilleri	49
Şekil 4.2. Kütle spektral dağılımları	50
Şekil 4.3. İzöjenol ve vanilin standartlarına ait HPLC kromatogramı	50
Şekil 4.4. Gelişim süresi boyunca canlı hücre sayısı	51
Şekil 4.5. Farklı sıcaklık değerlerinde tutulan biyodönüşüm ortamlarında vanilin miktarındaki değişim	53
Şekil 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinde tutulan biyodönüşüm ortamlarında izöjenol miktarındaki değişim	54
Şekil 4.7. Farklı sıcaklıklarda biyodönüşüm süresi boyunca meydana gelen pH değişimi	55
Şekil 4.8. Biyodönüşüm ortam pH'ının vanilin üretimi üzerine etkisi	56
Şekil 4.9. Biyodönüşüm ortam pH'ının izöjenol tüketimi üzerine etkisi	57
Şekil 4.10. Biyodönüşüm süresince ortam pH'ında görülen değişim	58
Şekil 4.11. Biyodönüşüm ortamında havalandırmanın vanilin üretimi üzerine etkisi	59

Şekil 4.12. Biyodönüşüm ortamında havalandırmanın izoöjenol tüketimi üzerine etkisi	60
Şekil 4.13. Havalandırmanın biyodönüşüm ortam pH'ı üzerine etkisi	61
Şekil 4.14. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının vanilin üretimi üzerine etkisi	62
Şekil 4.15. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının izoöjenol tüketimi üzerine etkisi	63
Şekil 4.16. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarında ortam pH'ında görülen değişim	64



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hücre kültürü tekniği kullanılarak elde edilmiş bazı aroma maddeleri ve bunların eldesinde kullanılan bitki türleri	11
Çizelge 2.2. <i>De novo</i> sentezi ile üretilen bazı aroma sınıfları	15
Çizelge 2.3. Mikroorganizmalar tarafından fermentasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri	17
Çizelge 2.4. Fermentasyon ve mikrobiyal biyodönüşümle aroma üretimi arasındaki farklar	18
Çizelge 2.5. Mikrobiyal biyodönüşümle üretilen bazı aroma maddeleri	19
Çizelge 2.6. Curing işlemi sonrası kuru tohum zarfının bileşimi	22
Çizelge 2.7. Sıcaklık gereksinimine göre mikroorganizma grupları ve gelişme sıcaklıkları	33
Çizelge 3.1. Besiyeri bileşimleri	38
Çizelge 3.2. HPLC solvent yürütme programı	41
Çizelge 3.3. Biyodönüşüm ortamı bileşimleri ve pH değerleri	43
Çizelge 4.1. Ortam sıcaklığının biyokütle artışı üzerine etkisi	55
Çizelge 4.2. Ortam pH'nın biyokütle artışı üzerine etkisi	58
Çizelge 4.3. Havalandırmanın biyokütle artışı üzerine etkisi	61
Çizelge 4.4. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının biyokütle artışı üzerine etkisi ...	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)
GYP	Glucose Yeast Extract Pepton (Glikoz Maya Ekstraktı Pepton)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi)
HUT	Hiroshima University Culture Collection (Hiroshima Üniversitesi Kültür Koleksiyonu, Japonya)
IFO No: 802	Tanımlı besiyeri
INT	Iodonitrotetrazolium chloride
KH_2PO_4	Mono potasyum di hidrojen fosfat
K_2HPO_4	Di potasyum hidrojen fosfat
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat hidrat
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mt	Metre
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
RI	Alıkonma indeksi (Retention Index)
rpm	Revolutions per minute (Devir/Dakika)
\$	Amerikan doları
x g	Yerçekimi kuvveti (G-Force)

1. GİRİŞ

Aroma; kimyasal duyular olan koku ve tadın eşzamanlı olarak tetiklediği, duyuusal etkinin sonucu olarak ortaya çıkan algıdır (Fahlbusch vd., 2012). Lezzet maddeleri uçucu olan ve olmayan bileşenlerin karışımından meydana gelir. Uçucu olmayan bileşenler daha çok tada etki ederken, uçucu bileşenler hem tada hem kokuya etki ederler (Longo ve Sanroman, 2006). Koku; davranışları, bilinci ve bilinçaltını etkilemektedir (Fahlbusch vd., 2012). Bu nedenle aroma, tüketicinin gıdalara karşı algısını etkilediğinden önemli bir kalite kriteri olarak kabul edilmektedir (Reineccius, 2005).

Aroma maddeleri gıdalarda çok sayıda ve düşük miktarlarda (nanogram ile miligram arasında) bulunmalarına rağmen gıdanın kendine özgü duyuusal özelliğini belirler. Gıdaların aroması aldehitler, ketonlar, alkoller, esterler, laktonlar, terpenler, pirazinler, uçucu fenoller ve kükürtlü bileşikler gibi çeşitli kompleks gruplardan oluşmaktadır (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012).

Gıdalarda arzu edilen aromanın yeterli olmaması, işleme sırasında kaybolan aromayı geri kazandırmak, gıdaya farklı bir aroma vermek gibi çeşitli nedenlerle ürüne aroma maddesi ilavesi yapılmaktadır (Feron ve Wache, 2006). Ayrıca gıdada doğal olarak bulunan bir kokuyu maskelemek ve ürünü daha cazip kılmak için de sıklıkla aroma maddelerinden faydalanılmaktadır (Gusevskaya vd., 2012).

Gıdaların yanı sıra içeceklerde, kozmetik ürünlerinde ve farmasötik ürünlerde de katkı maddesi olarak sıkça kullanılan aroma maddeleri 2015 yılı itibarıyla 24 milyar dolarlık bir pazar payına sahiptir (Anonim, 2016a).

Aroma maddelerinin elde edildikleri kaynakların çok farklı ve çeşitli olması farklı sınıflandırmaların yapılmasına neden olmuştur. Amerika Birleşik Devletlerinde aroma maddeleri doğal ve yapay aroma maddeleri olarak sınıflandırılmaktadır. (Yılmaztekin vd., 2008). Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre ise aroma maddeleri doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, tütsü aromaları, ısıt işlemler aroma maddesi ve aroma karışımları olarak altı grupta sınıflandırılmıştır (Anonim, 1997).

Geçmişte aroma maddelerinin en önemli kaynağını bitkisel ürünler oluşturmaktaydı. Elde edilen bitkisel ekstraktlar, uçucu yağlar, kök, gövde, yaprak gibi

bitkinin bazı kısımlarından elde edilen ürünler doğal aroma maddesi olarak kullanılmaktaydı. Ancak doğal aroma maddelerinin maliyetli oluşu ve artan nüfusa bağlı olarak arz talep dengesinin bozulması, ilgili endüstri kollarını yeni kaynak arayışlarına yöneltmiştir. Bu bağlamda bazı aroma maddelerinin kaynağından izole edilmesi ve kimyasal yapısının ortaya çıkarılmasıyla, doğala özdeş ve sentetik aroma maddelerinin üretimi başlamıştır.

Günümüzde piyasada kullanılan aroma maddelerinin % 80'den fazlasını yapay aroma maddeleri oluşturmaktadır. Ancak son zamanlarda kimyasal ürünlerin insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmesi ve uluslararası mevzuatlarda kimyasal yollarla elde edilen ürünlere getirilen kısıtlamalar nedeniyle tüketici doğal ürünleri tercih etmektedir (Yılmaztekin vd., 2008). Tüketici talebinin doğal ürünlere kayması (ekonomik refah ve eğitim seviyesindeki artışa bağlı olarak) nedeniyle özellikle son 30 yıldır dünya aroma pazarı doğal aroma maddelerine yönelmiş ve yoğun bir talep oluşmuştur. Ancak doğal aroma maddelerinin eldesinde karşılaşılan güçlükler nedeniyle (düşük miktarlarda bulunmaları, ekstraksiyon ve saflaştırılmalarının güç olması, pahalı olmaları gibi) mevcut üretim artan talebi karşılayamamaktadır.

Birleşik Devletler ve Avrupa Birliği mevzuatlarına göre, öncülü doğal kaynaklı olan bir hammaddeden biyoteknolojik yollarla elde edilmiş ürünler de doğal olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2008; Brazinha vd., 2011). Bu nedenle doğal kaynaklardan doğrudan aroma eldesine alternatif olarak biyoteknolojik yollarla üretim ön plana çıkmış ve bu alanda yoğun çalışmalar başlamıştır.

Modern biyoteknolojide yaşanan gelişmeler sonucunda doğal aroma maddelerinin mikroorganizmalar, izole edilmiş enzimler ve bitki hücre kültürlerinden yararlanılarak üretilmesi mümkün olmuştur (Reineccius, 2006). Prensipte biyoteknolojik yolla aroma maddesi üretiminde iki yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Birincisi mikroorganizmaların kullanıldığı fermantasyon (*de novo sentezi*) ve biyodönüşümle üretim, ikincisi ise enzimlerin kullanıldığı biyodönüşümle üretimdir (Janssens ve ark., 1992). Bunun dışında bitki hücre kültürü yöntemi de zaman zaman tercih edilebilmektedir.

Biyoteknolojik yöntemlerin sağladığı en önemli avantajlar, tarımsal üretimde karşılaşılan sorunlardan (iklim, bitkisel hastalıklar, pestisit kullanımı, pazar arayışı, tarım politikaları vb.) bağımsız olması ve endüstriyel ölçekte uygulanabilir olmasıdır

(Krings ve Berger, 1998). Ayrıca kimyasal yollarla kıyaslandığında daha esnek reaksiyon koşullarına sahip, yüksek ürün ve substrat spesifikliği gösteren ve çevreyi daha az kirleten bir uygulama olduğu göze çarpmaktadır (Xu vd., 2007).

Mikroorganizmaların bir bileşiği yapısal yönden kendisine benzer başka bir bileşiğe dönüştürmesi olayına mikrobiyal biyodönüşüm denir. Biyodönüşümde verim fermentasyonla üretime göre çoğu zaman daha yüksektir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012). Mikrobiyal biyodönüşüm aynı zamanda yüksek substrat seçiciliği, az miktarda yan ürün oluşumu ve asıl ürünün kolay izole edilmesi ve saflaştırılması gibi önemli avantajlara sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem aroma maddelerinin yanında bazı katkı maddelerinin endüstriyel ölçekli üretimlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Xu vd., 2007). Günümüzde mikrobiyal biyodönüşümle birçok aroma maddesi üretilmesine karşın bunların halen büyük çoğunluğu araştırma düzeyindedir. Biyodönüşüm yolu ile üretilen başlıca aroma maddeleri arasında ise vanilin, benzaldehit, laktonlar, 2-feniletanol ve izoamil asetat sayılabilir.

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksi-benzaldehit), *Vanilla planifolia* tohum zarflarında oluşan ve tüm dünyada büyük önem verilen bir aroma bileşiğidir. Gıda, içecek, parfümeri, farmasötik ve çeşitli medikal alanlarında geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir (Longo ve Sanroman, 2006).

Dünya genelinde üretilen vanilin'in % 1'inden daha azını doğal vanilin oluşturmaktadır (Sciubba vd., 2009). Kağıt üretimi sırasında lignince zengin karasu içeriğinin NaOH ile muamelesi ve ardından oksidasyona maruz bırakılması ile doğala özdeş vanilin üretilir (Walton vd., 2000). Doğal vanilin'in kilogram fiyatı 1200 ile 4000 \$ arasında değişmektedir. Buna karşın, lignin veya guaikol'den kimyasal sentez yolu ile elde edilen vanilin'in kilogram fiyatı 15 doların altındadır (Walton vd., 2000; Xu vd., 2007).

Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünlere artan ilgisi ile doğal vanilin üretimi için biyoteknolojik yöntemin kimyasal yöntemle alternatif olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ferulik asit ve izoöjenol'den verimli bir şekilde vanilin elde edilebileceği tespit edilmiştir.

Ferulik asit öncül madde olarak kullanılarak *Aspergillus niger* tarafından vanilik aside indirgenmiş; sonrasında da *A. niger* uzaklaştırılarak yerine *Pycnoporus cinnabarinus* ortama inoküle edilmiştir. Ortamdaki vanilik asit *P. cinnabarinus*

tarafından vaniline dönüştürülerek 2 aşamalı bir biyodönüşüm gerçekleştirilmiştir (Meessen vd., 1996).

Diğer yöntemde ise öncül madde olarak karanfil bitkisi esansiyel yağında bulunan öjenol'ün okside edilmiş formu olan izoöjenol kullanılmıştır. İzoöjenol'den vanilin eldesi için yapılan çalışmalarda üretim miktarı çoğunlukla 0,5-4 g/L ile sınırlı kalmıştır.

Yapılan çalışmalarda en sık karşılaşılan sorun, prekürsör olarak biyodönüşüm ortamına verilen öncül maddenin bakteri üzerinde sitotoksik etki göstermesi ve üretimi sınırlamasıdır (Yamada, 2007). Hücrelerin canlılıklarını yitirmesi, oluşacak ürün verimini olumsuz şekilde etkileyecektir. Bu nedenle kullanılacak öncül madde miktarının üretime olumsuz etki yapmayacak en yüksek dozunun belirlenmesi gerekmektedir.

Meessen ve ark., (1996), yaptıkları çalışmada biyodönüşümün prosesini 2 aşamada gerçekleştirmişlerdir. Biyodönüşümün çok aşamalı olarak gerçekleşmesi süre ve maliyet açısından dezavantajı da beraberinde getirmektedir. Çalışılan kültürün tek aşamada istenilen ürünü ortaya çıkarması önem arz etmektedir.

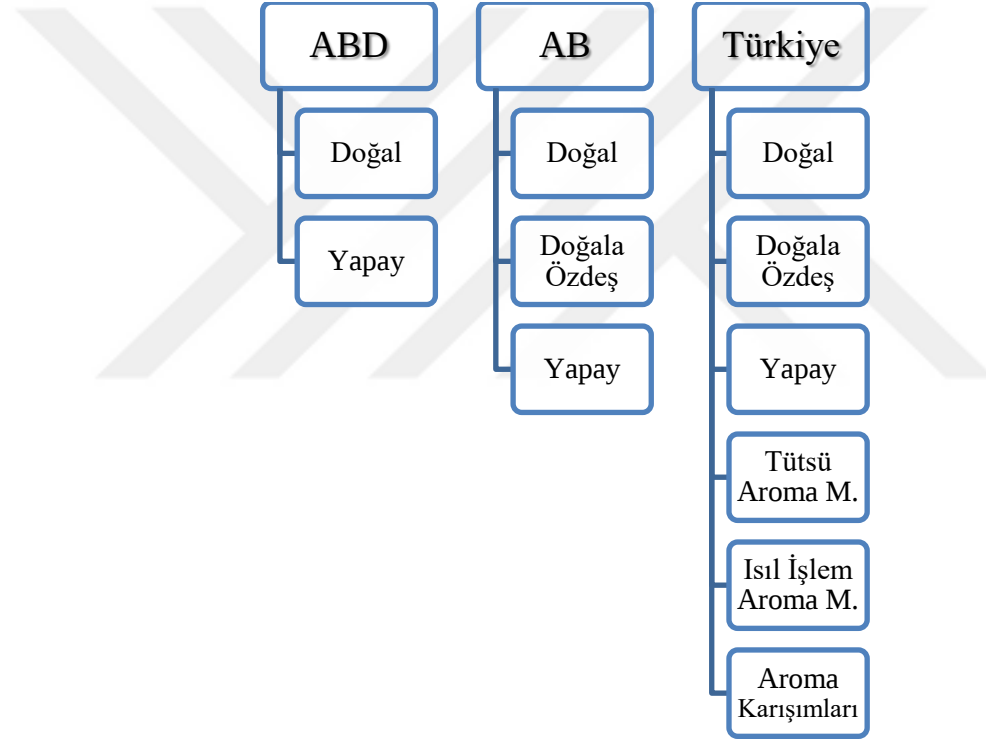
Bunların yanı sıra gerçekleştirilen prosesin biyolojik temele dayanması, birçok iç ve dış faktörün ürün verimini etkilemesine neden olmaktadır. Hangi değişkenin nasıl bir etki yapacağının yapılacak denemelerle ortaya konması gerekmektedir.

Bu çalışmada *Pseudomonas putida* HUT 8100 suşunun izoöjenol'den vanilin üretme potansiyeli araştırılmış ve üretilen vanilin miktarını arttırmak için ilgili parametrelerin optimizasyonu denenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Aroma Maddelerinin Sınıflandırılması

Aroma maddeleri farklı yöntemlerle elde edilebildiğinden, tüketiciyi bilgilendirme ve yasal düzenlemeler için sınıflandırma ihtiyacı duyulmuştur. Sınıflandırma, ülke mevzuatlarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre aroma maddeleri doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, tütsü aromaları, ısıl işlem aroma maddesi ve aroma karışımları olarak altı grupta sınıflandırılmıştır (Anonim, 1997).



Şekil 2.1. Ülke mevzuatlarına göre aroma maddelerinin sınıflandırılması (Yılmaztekin vd., 2008; Anonim, 1997)

Doğal aroma maddeleri; bitkisel veya hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, enzimatik ya da mikrobiyolojik yöntemler ile elde edilen maddelerdir (Anonim, 1997; Anonim, 2008). Doğala özdeş aroma maddeleri ise kimyasal yollarla sentezlenen ya da izole edilen ve kimyasal yapısı, doğal aroma maddeleri ile aynı olan maddelerdir. Kimyasal yollarla sentezlenen ancak kimyasal yapısı doğal aroma maddelerinden farklı olan, doğada bulunmayan maddelere de yapay aroma maddeleri denmektedir. Isıl işlem

aroma maddesi en az biri azot/amino ve diğeri indirgen şeker içeren, kendiliğinden aroma verme özelliği olması gerekmeyen gıda ve/veya gıda dışındaki kaynak materyallerden oluşan karışımdan ısıtma işlem sonrasında elde edilen aroma maddesidir. Tütsü aroma maddeleri, yoğunlaştırılmış tütsüden ayrımsal damıtma ve saflaştırma yöntemleri ile elde edilen ürünlerdir. Aroma karışımları ise doğal aroma vericiler dışında uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik metotlarla bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen ürünlerdir (Anonim, 1997).

Birleşik Devletler ve Avrupa Birliği mevzuatlarına göre, öncülü doğal kaynaklı olan bir hammaddeden biyoteknolojik yollarla elde edilmiş ürünler de doğal olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2008; Brazinha vd., 2011).

Avrupa Birliği ve Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde yer alan 'Doğala Özdeş Aroma Maddesi' Amerika Birleşik Devletleri mevzuatına göre yapay aroma maddesi olarak kabul edilmektedir.

2.2. Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri

Aroma ve hoş koku verici maddelerin gıda ve içecek endüstrisi ile parfümeri sanayiinde geniş bir kullanım alanı mevcuttur (Xu vd., 2007). Tüm dünyada 24 milyar dolarlık bir pazara sahiptir ve bu pazar payı sürekli artış göstermektedir (Anonim, 2016a). Aroma maddelerinin üretiminde doğrudan ekstraksiyon, kimyasal transformasyon ve biyoteknolojik transformasyon teknikleri kullanılmaktadır (Molina vd., 2013). Bir yüzyıldan fazla bir süre önce sentezi gerçekleştirilen kumarin (1868) ve vanilin (1874) laboratuvar ortamında ilk kez sentezlenen aroma maddeleri olmuştur. Analitik bilginin artmasıyla birçok aroma maddesi sentetik olarak endüstriyel ölçekte üretilmektedir. (Serra vd., 2005). Organik kimya, parfümeri endüstrisi için yüksek kalitede ve daha düşük fiyatlarda doğala özdeş aroma ve koku maddeleri sunmaktadır (Frater vd., 1998). Dahası, kimyasal yapı çalışmaları ve bazen de tesadüfler sayesinde doğal aroma maddelerine benzer özellikte yeni yapılar üretilmiştir (Serra vd., 2005). Doğal olmayan metil ionon, doğal eşi olan α ve β ionon'dan daha güçlü koku vermektedir. Yine yapay bir aroma maddesi olan etil vanilin, doğal olan vanilin'e göre çok daha güçlü bir aromaya sahiptir (Frater vd., 1998). Günümüzde kimyasal sentez ile aroma üretimi diğer yöntemlere göre oldukça baskındır ve pazarın büyük kısmını kimyasal sentez yolu ile elde edilmiş aroma maddeleri oluşturmaktadır. Bitkisel ekstrakt

olanların piyasadaki oranı % 5'ten azdır. Bu durumun oluşmasında doğal aroma maddelerinin pazar ihtiyacını karşılayamaması ve yapay aroma maddelerinin çok daha düşük fiyattan temin edilebilmesi başlıca etkindir. Ancak kimyasal sentezde birbirine bağlı olarak gelişen bazı hususlar bu yöntem için aşağıdaki olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir (Xu vd, 2007):

- Substrat seçiciliği yetersizdir.
- Proses etkinliği düşüktür.
- Çoğunlukla çevre dostu olmayan uygulamalardır.
- İstenmeyen reaksiyon ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.
- Dolayısıyla işlem sonrası saflaştırma maliyeti yüksektir.

Bunlara ek olarak yapay aroma maddeleri sınıfına dahil edildiklerinden Avrupa Birliği mevzuatında da gıda, içecek ve kozmetik alanlarında kullanımı sınırlandırılmıştır. Bu nedenle doğal aromalar piyasada daha yüksek fiyatta olmalarına rağmen büyük rağbet görmektedir (Xu vd, 2007).

Doğal kaynaklarından aroma maddelerinin izolasyonu antik zamanlardan beri bilinmektedir (Serra vd., 2005). Aroma sanayinde işlenen çoğu doğal ürün ekstraksiyon veya destilasyon yolu ile elde edilmektedir. Ancak bu yöntemlerde de aşağıda belirtilen dezavantajlar görülmektedir (Molina vd., 2013; Xu vd, 2007):

- Aranan bileşiğin çok düşük konsantrasyonlarda bulunması
- Düşük konsantrasyona bağlı olarak ekstraksiyon ve saflaştırmanın güç olması
- Ekstraksiyon sonrası oluşabilecek muhtemel çevre kirliliği ve ekolojik sorunlar
- Hasat miktarının iklim koşullarından ve bitki hastalıklarından etkilenmesi

Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artması, geleneksel yöntemlerin talebi karşılamada yetersiz kalışı, sentetik ürünler ile ilgili olumsuz bakış ve mevzuat kısıtlamalarına bağlı olarak aroma üretiminde farklı uygulama ve teknik arayışlarına girilmiştir. Doğal aroma maddesi tanımından da anlaşıldığı üzere enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla üretilen aroma maddeleri de doğal olarak kabul edilmektedir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012). Bu nedenle doğal aroma üretiminde yararlanılabilecek alternatiflere dair yapılan araştırmalar biyoteknolojik yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Doğal aroma maddesi üretim yöntemleri:

- Fiziksel Yolla Üretim
 - ❖ Ekstraksiyon
 - ❖ Distilasyon
- Biyoteknolojik Yolla Üretim
 - ❖ Bitki Hücre Kültürü İle Üretim
 - ❖ Enzimatik Yol İle Üretim
 - ❖ Mikrobiyal Yol İle Üretim
 - Fermentasyon
 - Mikrobiyal Biyodönüşüm

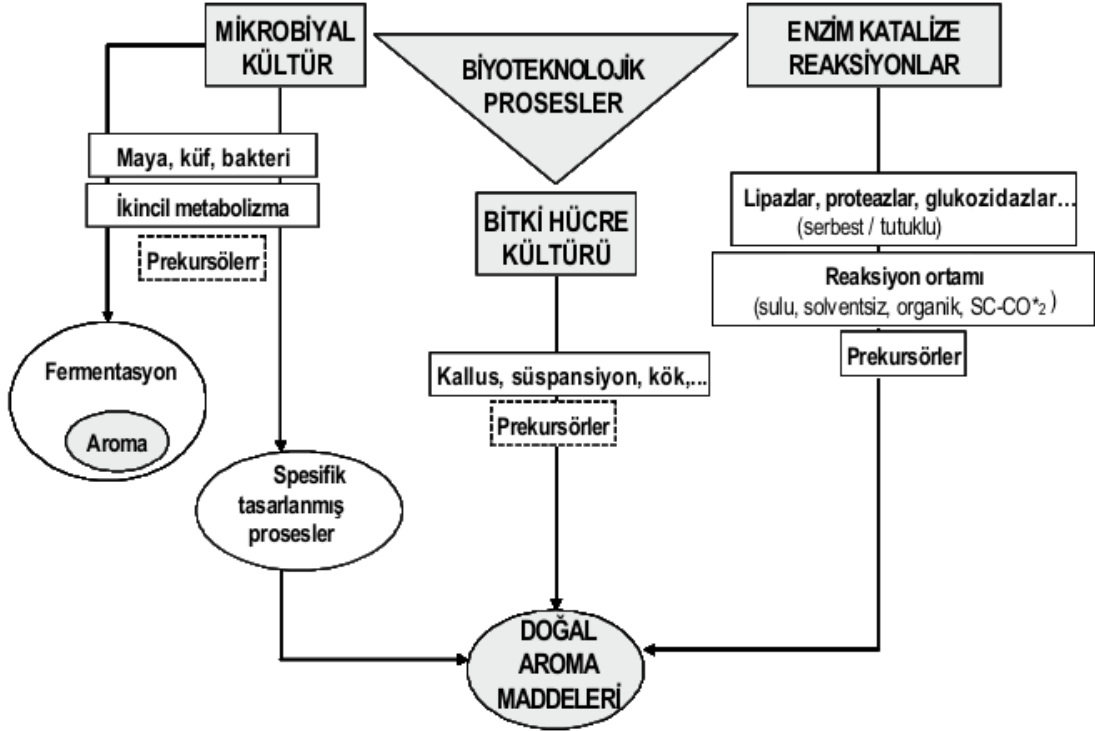
2.3. Biyoteknolojik Yollarla Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri

Uzun zamandan beri mikroorganizmaların aroma maddeleri ürettiği (özellikle geleneksel gıda ve içkilerde) bilinmesine rağmen mikrobiyal gelişim ile tipik aroma oluşumu arasındaki ilişki yeni keşfedilmiştir. Modern biyoteknolojide yaşanan gelişmeler sonucunda mikroorganizmalar, izole edilmiş enzimler ve bitki hücre kültürlerinden yararlanılarak doğal aroma maddelerinin üretilmesi mümkün olmuştur (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012). Analiz tekniklerinin gelişmesiyle saf mikroorganizma kültürleri ile çalışılmaya başlanmış ve bunların spesifik aroma maddesi üretme potansiyelleri araştırılmıştır (Molina vd., 2013).

Avrupa Birliği ve Birleşik Devletler mevzuatları, gerek fiziksel yollarla (doğal kaynaklardan ekstraksiyon) gerek de doğadan izole edilmiş prekürsör kullanılarak enzimatik veya mikrobiyal yollarla elde edilmiş maddeleri doğal olarak kabul etmektedir. Bu sınıflandırma aroma pazarını ikiye bölmüştür: yüksek fiyattan satılan 'doğal' ürünler ve kimyasal yöntemlerle elde edildiği için tüketicinin tercih etmediği 'doğala özdeş' veya 'yapay' ürünler. Bu ayrım, değerli bileşenlerin yeni geliştirilecek biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi üzerine yapılan araştırmaları teşvik etmiştir (Serra vd., 2005). Günümüzde yaklaşık 100 kadar doğal aroma bileşiği biyoteknolojik yöntemlerle üretilmektedir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012).

Doğal aroma maddelerinin üretiminde bileşenin kaynağından izolasyonu dışında kullanılan diğer yollar: doğal öncül maddenin biyokatalistler vasıtasıyla biyodönüşümü

ve *de novo* sentezidir (Janssens vd., 1992; Serra vd. 2005). Bu yöntemlerin dışında doğal aroma maddelerinin üretiminde bitki hücre kültürleri de kullanılabilir (Longo ve Sanroman, 2006).



Şekil 2.2. Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan biyoteknolojik yöntemler (Longo ve Sanroman, 2006)

Kiral yapıdaki aroma maddeleri doğada çoğunlukla tek bir enantiomer oluştururlar. Çünkü farklı enantiomer veya stereoizomerler farklı duyuşal özellikler göstermektedir. Bu nedenle aroma maddelerinin üretimi için spesifik bir sentez prosesi gerekmektedir. Bu alanda biyokataliz çalışmaları, kimyasal sentezde kolaylıkla elde edilemeyen stereo-, regioselektif özellik göstermesinden dolayı oldukça fayda sağlamıştır. Buna ek olarak çevre dostu uygulamalar olması, tüketicilerin doğal ve organik ürünleri tercih etmesi de biyoteknolojik orijinli aroma maddesi pazarını genişletmektedir (Serra vd. 2005).

Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak vanilin, benzaldehit, laktonlar (özellikle γ ve δ -laktonlar), esterler, diasetil, terpenler, pirazinler, alkoller (2-fenil etanol) ve metil ketonlar üretilmektedir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012; Molina vd., 2013; Feron ve Wache, 2006).

2.3.1. Bitki hücre kültürü ile aroma maddelerinin üretimi

Bitkiler farmasötikler, aroma ve koku bileşenleri, renklendiriciler, biyopestisitler ve gıda katkı maddeleri gibi ikincil metabolitler için değerli bir kaynaktır. Bilinen 30000 doğal bileşenin % 80'den fazlası bitkisel orijinlidir (Rao ve Ravishankar, 2002). Bitki hücre kültürleri bitkisel kökenli aroma maddelerinin üretiminde geniş bir yelpazeye sahiptir (bkz. Çizelge 2.1.). Bu yöntemin esası, benzersiz bir biyokimyasal ve genetik kapasiteye sahip bitki hücrelerinin farklılaşabilme yeteneğini (totipotent) esas almaktadır. Bitki kültürünün her bir hücresi bir aroma maddesinin üretilmesinde ihtiyaç duyulan sayısız kimyasal bileşeni üretmek için gerekli genetik bilgiyi yapısında ihtiva eder. Biyosentez reaksiyonlarının, ihtiyaç duyulan ara bileşenler ile desteklenmesiyle aromatik bileşenlerin üretimi arttırılabilir. Geleneksel zirai yöntemlere göre bitki hücre kültürü kullanımının bazı avantajları şunlardır (Longo ve Sanroman, 2006):

- Coğrafi, çevresel ve mevsimsel değişikliklerden bağımsızdır. Buna bağlı olarak üretim miktarında dalgalanma gözükmez. Yani, üretim miktarı planlanabilir, belli kalitede belli bir verimle ürün elde edilir. Dolayısıyla arz miktarı süreklilik gösterir.
- Ucuz prekürsörler kullanılarak bölgeye özgü yeni aroma maddeleri sentezleyebilmek mümkündür.
- Yüksek verimliliğe sahip türler seçilerek etkin bir üretim gerçekleştirilebilir.
- Hücre gelişiminin ve metabolik proseslerin kontrol edilmesi ile üretim etkinliği arttırılabilir ve maliyet düşürülebilir.
- Ürün geri kazanımı verimli bir şekilde gerçekleştirilebilir.
- Üretim süreci hızlıdır.

Araştırmacılar özel bir çaba sarf ederek çok rağbet gören bir aroma maddesi olan vanilin'i hücre kültürü kullanarak üretmeyi denemişlerdir. *Vanilla planifolia*'ya ait hücre kültürü kullanılmış ve ferulik asitle besleme yapılarak vanilin birikiminde artış sağlanmıştır (Longo ve Sanroman, 2006). Yine ferulik asitten vanilin'e biyodönüşüm için *Capsicum frutescens*'e ait tutuklanmış (immobilize) hücre kültürleri de kullanılmıştır (Johnson vd., 1996). Benzer çalışmalarla; *Perilla frutescens*'e ait kallus dokuları ve hücre süspansiyonları kullanılarak limonen, linalool gibi monoterpenlerin

üretimi ve *Oryza sativa* kallus kültürleri ile hint pirinci uçucu aroma maddelerinin üretimi de gerçekleştirilmiştir (Longo ve Sanroman, 2006).

Bazı durumlarda hücre kültürleri kullanılarak elde edilen aroma maddelerinin bitkiye akraba türlerin sahip olduğu aroma profilinden farklı olduğu görülmüştür. Salatalık/şarap benzeri bir aromaya sahip *Agastache rugosa* Kuntze'ye (Kore nanesi) ait kültür süspansiyonu ile bazı sıradışı alkol türevi aromalar (2-feniletanol gibi) elde edilmiştir. Ortama prekürsör ilavesi ile bitkinin sahip olduğu özgün aroma profilinin değişimi tetiklenebilir. Bu değişime *Allium cepa* L. (soğan) kök kültürü kanıt gösterilebilir (Longo ve Sanroman, 2006).

Çizelge 2.1. Hücre kültürü tekniği kullanılarak elde edilmiş bazı aroma maddeleri ve bunların eldesinde kullanılan bitki türleri (Longo ve Sanroman, 2006)

Ürün	Kullanılan Bitki Türü
Diasetil	<i>Agastache rugosa</i>
Elma aroması	<i>Malus silvestris</i>
Sinamik asit	<i>Nicotiana tabacum</i>
Karyofilen	<i>Lindera strychnifolia</i>
Hint pirinci aroması	<i>Oryza sativa</i>
Kakao aroması	<i>Theobroma cocoa</i>
Flavanol	<i>Polygonum hydropiper</i>
Sarımsak aroması	<i>Allium sativum</i>
Monoterpenler	<i>Perilla frutescens</i>
Triterpenoid	<i>Glycyrrhiza glabra</i> var. <i>glandulifera</i>
Vanilin	<i>Vanilla planifolia</i>

Hücre kültürü kullanımında henüz aşılamamış bazı sorunlar da bulunmaktadır. Yüksek ölçekli üretimler için bitki hücre kültürü tekniğinin geliştirilmeye ihtiyacı vardır. Ayrıca kayma gerilimine (shear stress) karşı duyarlı olması, diğer yöntemlere göre uzun gelişim döngüsüne sahip olması, zamanla üretkenliğin azalması ve elde edilmek istenen ürünün nadiren hücre dışı salgılanması üzerinde durulması gereken önemli noktalar (Longo ve Sanroman, 2006). Düşük ya da çok tutarlı olmayan üretim bitki hücre kültürü ve bazen de doku kültürüyle yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunlardandır. Bitki hücre ve dokularının nispeten yavaş gelişmesi, sterilitiyi de

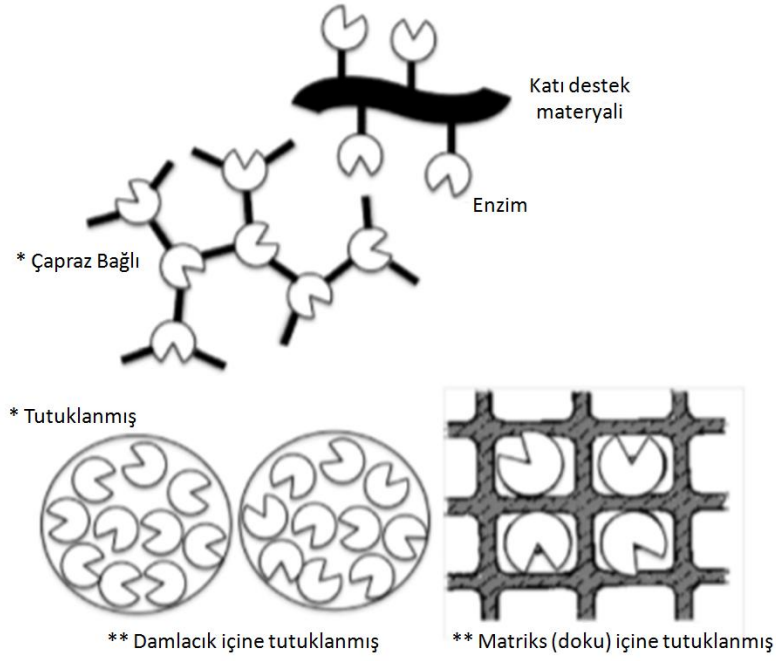
önemli bir parametre kılmaktadır. Ticari boyutta üretim bazı durumlarda uygun olmakla birlikte (*Lithospermum erythrorhizon* kültürü kullanılarak kırmızı naftakinon pigmenti üretiminde olduğu gibi); çoğu kez verim yeterince yüksek değildir. Bu nedenle uygulamanın pek ekonomik olduğu söylenemez (Walton vd., 2003). Yöntem ticari olarak ele alındığında, karşılaşılan sorunlar nedeniyle yalnızca belli başlı birkaç farmasötik bileşiğin (anti-HIV ve anti-kanser etkili bileşikler gibi) üretilmesinde kullanılmaktadır (Rao ve Ravishankar, 2002).

2.3.2. Enzimatik yol ile aroma maddelerinin üretimi

Metabolik faaliyetleri yerine getirebilmek için mikroorganizmalar çok çeşitli bileşikleri birbirine dönüştürür. Yüksek seçicilik ve etkinlikte gerçekleşen bu biyodönüşüm prosesleri, enzimler tarafından katalizlenir. Aktif kısım adı verilen enzime substratın bağlandığı bölge, özel geometriye sahip asimetrik bir yüzey olup; etkileşim sonunda belirli yapıda tek bir ürün oluşmasına neden olur (Glazer ve Nikaido, 2007).

Aroma maddelerinin kimyasal yapılarının belirlenmesi ve doğada gerçekleşen dönüşüm reaksiyonlarının açığa çıkartılmasıyla aroma maddelerinin enzimatik olarak laboratuvar koşullarında da üretilebileceği ortaya konmuştur. Markus ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada, soya fasulyesinden elde edilmiş lipoksigenaz enzimi ile koniferil alkol esterlerinden vanilin üretebilmişlerdir. Yine soya fasulyesinden ekstrakte enzimler kullanılarak izoöjenol'ün de vanilin'e biyodönüşümü sağlanmıştır (Li vd., 2005). Başka bir çalışmada ise *Penicillium*'a ait bir flavo-enzim olan vanilil alkol oksidaz kullanılarak vanililamin'in ve kreosol'ün vanilin'e biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir (Heuvel van den vd., 2001).

Bir bileşik, kimyasal olarak sentezlenebilse de bu sentez işlemi birçok basamaktan oluşur. Oysaki tek enzim katalize reaksiyonlar aynı işi tek aşamada gerçekleştirebilir. Bunun yanı sıra, enzimler oda sıcaklığı koşullarında ve atmosfer basıncı altında birçok reaksiyonu katalizleyebilir (Glazer ve Nikaido, 2007). Tekrar kullanılabilirlikleri, sürekli prosesler için ideal olmaları, atık birikimini azaltması ve çoğunlukla stabiliteyi korumaları nedeniyle enzim katalize biyodönüşüm reaksiyonlarında immobilize (tutuklanmış) enzimler tercih edilir (Sanchez ve Demain, 2011). Ancak endüstriyel uygulamalarda immobilize enzim kullanımı çoğunlukla hidroliz ve izomerasyon reaksiyonları ile sınırlıdır (Suresh vd., 2006).



Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon (tutuklanma) şekilleri (Sanchez ve Demain, 2011)

Enzimatik yollarla aroma üretimi mümkün olmasına rağmen gerek enzim saflaştırmada yaşanan güçlükler gerek çok kademeli bir proses uygulamasına ihtiyaç duyması gibi nedenlerle enzim katalize reaksiyonlar biyodönüşüm çalışmalarında pek tercih edilen bir yöntem değildir. Bunun yanı sıra izole edilmiş bazı enzimlerin stabil olmayışı, özellikle oksiredüktaz kullanılırken kofaktörlere ihtiyaç duyulması, reaksiyon ortamı için gerekli altyapının maliyetli oluşu, kullanılan metodun değiştirilmesi gerektiği durumlarda yaşanan birtakım güçlükler ve yeni tekniklerin araştırma safhasında olması da enzim katalize reaksiyonlarla çalışılırken karşılaşılan başlıca sorunlardandır (Hudlicky ve Reed, 2009). Bazı durumlarda ise biyodönüşüm için saflaştırılmış enzimlerin kullanımı daha avantajlı veya gerekli olabilir (Suresh vd., 2006). Eğer:

- Mikroorganizmanın hücre membranı, substratın nüfuz etmesini ya da ürünün hücre dışına çıkışını engelliyorsa,
- Mikrobiyal tekniklerde mevcut farklı enzim sistemleri nedeniyle istenmeyen yan reaksiyonlar ya da daha ileri ürün degradasyonu gözleniyorsa,
- Kullanılacak enzim hücre dışına salgılanıyor ve biyokütle ortamdan alındıktan sonra kolaylıkla saflaştırılabiliyorsa,

- Enzim immobilizasyonu ile ilgili doğruluğu ispatlanmış teknikler bulunuyor ve bu tekniklerde biyokatalist tekrar tekrar kullanılıp sürekli çalışan reaktörlerde uygulama fırsatı bulunuyorsa enzimatik yollar tercih edilebilmektedir (Suresh vd., 2006).

2.3.3. Mikrobiyal yol ile aroma maddelerinin üretimi

2.3.3.1. Fermantasyon

Fermantasyonda ortamda bulunan karbonhidrat, yağ ve protein gibi maddeler yıkıma uğramakta ve bu bileşiklerden aroma maddeleri üretilmektedir. Bu yöntem '*de novo*' sentezi olarak adlandırılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından ham maddede meydana gelen biyokimyasal değişiklikler sonucu açığa çıkan bileşenler son ürünün aromasına etki etmektedir. Şarap, bira, yoğurt, ekmek gibi birçok gıdanın spesifik özellikler ve aroması mikroorganizmaların faaliyetleri sonucunda meydana gelmektedir (Feron ve Wache, 2006).

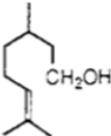
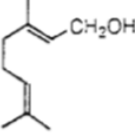
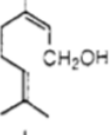
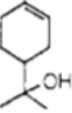
De novo sentezi gerçekleştiren mikroorganizmaların çoğu küf ve mayalardan oluşmaktadır. Bu durum funguslar arasındaki daha geniş biyoçeşitlilikten kaynaklanmaktadır (Feron ve Wache, 2006). Yaygın olarak kullanılan starter kültürler, fermantasyon esnasında yüksek miktarda birincil metabolit ürünler üretmelerinin yanı sıra iz miktarda da kompleks aroma bileşenleri üretirler. Kısa zincirli alkoller, aldehit, keton ve karboksilik asit bileşikleri üretirken aynı zamanda pirazin, lakton ve tiol bileşikleri de oluştururlar (Krings ve Berger, 1998). *De novo* sentezi ile üretilen bazı aroma sınıfları ve üretiminde kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. *De novo* sentezi ile üretilen bazı aroma sınıfları (Feron ve Wache, 2006)

	Mikroorganizma Cinsi	Aroma Sınıfı
Küfler	<i>Aspergillus</i>	Asitler, Alkoller, Terpenler
	<i>Cerastocystis</i>	Terpenler, Esterler, Alkoller
	<i>Fusarium</i>	Terpenler, Laktonlar
	<i>Geotrichum</i>	Esterler, Laktonlar
	<i>Trichoderma</i>	Terpenler, Esterler, Laktonlar
Mayalar	<i>Dipodascus</i>	Esterler, Alkoller
	<i>Hanensula</i>	Esterler, Alkoller
	<i>Kluyveromyces</i>	Terpenler, Esterler, Alkoller
	<i>Sporobolomyces</i>	Laktonlar
	<i>Saccharomyces</i>	Terpenler, Laktonlar, Esterler, Alkoller
Bakteriler	<i>Clostridium</i>	Asitler, Alkoller, Asitler
	<i>Corynebacterium</i>	Pirazinler
	<i>Pseudomonas</i>	Esterler, Pirazinler
	<i>Streptomyces</i>	Terpenler, Pirazinler

Kültür ortamındaki karbon ve azot kaynağı gibi basit bileşenler değiştirilerek de üretilen aroma maddelerinin çeşitliliği artırılabilir (Feron ve Wache, 2006). *Cerastocystis* türü bu konuda iyi bilinen bir örnektir. Meyvemsi ve çiçeksi kokulara sahip geniş bir terpen türevi aroma maddesi üretme yeteneğine sahiptir (bkz. Şekil 2.4.). *Cerastocystis moniliformis*'un başlıca ürettiği aroma maddeleri etil asetat, propil asetat, isobütil asetat, isoamil asetat, citronellol ve geraniol'dür. Ayrıca *Trichoderma viride* ve *T. Harzianum* türleri de Hindistan cevizi aroması benzeri bir aromaya sahip 6-pentil- α -piron'u verimli bir şekilde üretmektedir (Vandamme ve Soetaert, 2002).

Mayalar da aynı zamanda *de novo* sentezi ile aroma bileşenleri üretme kabiliyetine sahiptir. En iyi bilinen örneklerinden biri *Sporidiobolus salmonicolor*'dur. γ -dekalakton ve δ -laktonlar gibi geniş çeşitlilikteki laktonları üretebilme yeteneğine sahiptirler (Feron ve Wache, 2006). *Kluyveromyces lactis* de citronellol, linalool ve geraniol gibi meyvemsi-çiçeksi kokulara sahip terpenleri *de novo* sentezi ile üretebilmektedir. *Willopsis saturnus* var. *mrakii* başlıca muz aroması karakteri veren önemli miktarlarda uçucu asetat türevleri sentezlemektedir (Vandamme ve Soetaert, 2002).

Terpen	Kimyasal Yapı	Duyusal Özellikleri
Sitronellol		Gül benzeri bitter tat, serinletici
Geraniol		Tatlı, meyvemsi, gül benzeri
Linalol		Tatlı, çiçeksi, turuncgil kokulu, serinletici
Nerol		Tatlı, çiçeksi, gül benzeri, hafif acı serinletici
α -Terpineol		Tatlı, çiçeksi, seyreltildiğinde meyvemsi koku

Şekil 2.4. *Ceratocystis variopora* tarafından üretilen terpenler

Sınırlı genetik çeşitliliklerinden dolayı bakteriler aroma maddeleri üretiminde mayalar ve küfler gibi yetenekli değildirler (Feron ve Wache, 2006). Ancak fermentasyon esnasında bakterilerin de az miktarda da olsa önemli sayılabilecek çeşitlilikte aroma maddelerini üretebileceğini bilinmektedir (Krings ve Berger, 1998). Özellikle gıda ürünlerinin işlenmesindeki birtakım değişiklikler nedeniyle doğal olarak oluşan aroma maddeleri yeni işleme teknikleri kullanılarak elde edilen gıdalarda, normal proseslerde doğal olarak oluşan aroma maddeleri oluşmayabilmektedir. Örneğin, mikrodalga uygulamalarında pirazin oluşumu gözlenmemektedir. Bu durum ürüne kavrulmuş, pişmiş tadın verilebilmesi için pirazin gibi aroma maddelerine talep yaratmaktadır. *Corynebacterium glutamicum*, *de novo* sentezi ile pişmiş tat veren pirazinleri üretebilmektedir. (Vandamme ve Soetaert, 2002).

Çeşitli mikroorganizmalar tarafından fermentasyon yolu ile üretilen aroma maddeleri ve bu maddelerin verdiği kokular Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Mikroorganizmalar tarafından fermentasyon ile üretilen bazı aroma maddeleri

	Mikroorganizma Türü	Aroma Maddesi	Oluşan Koku	Kaynak
Maya	<i>Yarrowia lipolytica</i>	γ -dekalakton	Şeftali	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bütil asetat	Elma, muz kokusu	Molina vd., 2013
	<i>K.marxianus</i>	Fenil etanol	Gül	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Williopsis saturnus</i>	İzoamil asetat	Muz	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Pichia anomala</i>	Etil asetat	Meyvemsi	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
Küf	<i>Pycnporous cinnabarinus</i>	Vanilin	Vanilya	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Benzaldehit	Badem	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Mycena pura</i>	Sitronellol	Portakal çiçeği	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Sporobolomyces odorus</i>	γ -dekalakton	Şeftali	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Trichoderma spp.</i>	6-pentil- α -piron	Hindistan cevizi	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Neurospora spp.</i>	Etil hekzonat	Bira kokusu	Molina vd., 2013
	<i>Geotrichum fragrance</i>	2-Fenil etanol	Gül	Molina vd., 2013
Bakteri	<i>Lactobacillus lactis</i>	Diasetil	Tereyağı	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Pirazin	Pişmiş gıda	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Propiyonik asit	Ekşimiş süt	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
	<i>Enterbacteriaceae spp.</i>	Nutketon	Greyfurt	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012

Fermentasyon yoluyla aroma maddeleri üretiminde verim genellikle düşüktür. Bu nedenle çalışmalar daha ekonomik çözümler sunan biyodönüşüm prosesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Molina vd., 2013).

2.3.3.2. Mikrobiyal biyodönüşüm

Gıda aroması üretiminde, mikroorganizmalar oksidasyon, redüksiyon, dehidrasyon ve diğer birçok reaksiyonu gerçekleştirebilirler (Feron ve Wache, 2006). Mikroorganizmaların bir bileşiği yapısal yönden kendisine benzer başka bir bileşiğe dönüştürmesi olayına mikrobiyal biyodönüşüm denir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012). *De novo* sentezinden farklı olarak, biyodönüşüm prosesinde üretilen aroma maddesi konsantrasyonu endüstriyel açıdan bakıldığında yeterince yüksektir (Feron ve Wache, 2006). Bu nedenle öncül madde kullanılarak gerçekleştirilen ve istenen aroma maddesi birikiminin yüksek olduğu biyokatalitik dönüşüm, aroma maddesi üretiminde bir adım öne çıkmaktadır (Molina vd., 2013).

Çizelge 2.4. Fermantasyon ve mikrobiyal biyodönüşümle aroma üretimi arasındaki farklar (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012)

Özellik	Fermantasyon	Mikrobiyal Biyodönüşüm
Mikroorganizmalar	Çoğalan hücreler	Çoğalma veya duraklama evresindeki hücreler
Substrat	Ucuz karbon ve azot kaynağı	Spesifik (bazen pahalı)
Reaksiyon	Karmaşık	Basit
Reaksiyon süresi	Uzun	Kısa
Ürün miktarı	Az	Yüksek
Ürünün saflaştırılması	Zor	Kolay
Endüstriyel üretim	Nadir	Yaygın

Çoğu biyodönüşüm olayında iki substrat gereklidir. Bunlardan birisi mikroorganizmaların gelişimi için gerekliyken diğeri ise hedef aromayı oluşturmak üzere dönüşüme uğrayacak substrattır (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012). Mikrobiyal biyodönüşümde ortama ilave edilen ve reaksiyonu başlatan ön bileşiklerden (prekursör) tek basamaklı reaksiyonlarla aroma maddeleri üretilmektedir (Janssens vd., 1992).

Mikrobiyal biyodönüşümle üretilen bazı aroma maddeleri Çizelge 2.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Mikrobiyal biyodönüşümle üretilen bazı aroma maddeleri

Bileşen	Aroma	Öncül madde	Mikroorganizma	Kaynak
Vanilin	Vanilya	Ferulik asit	<i>Serretia spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
			<i>Pycnopus spp.</i>	Feron ve Wache, 2006
		Öjenol	<i>Amycolatopsis spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
		İzoöjenol	<i>Pseudomonas spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
			<i>Bacillus pumilis</i>	Molina vd., 2013
γ -dekalakton	Şeftali	Risinoileik asit	<i>Yarrowia lypolitica</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
			<i>Sporobolomyces spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
			<i>Candida spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
γ -oktalakton	Hindistan cevizi	Oktanoik asit esterleri	<i>Mucor spp.</i>	Feron ve Wache, 2006
Benzaldehit	Badem	Fenil alanin	<i>Bjerkandera adusta</i>	Feron ve Wache, 2006
			<i>Pycnopus cinabarinus</i>	Feron ve Wache, 2006
			<i>Ischnoderma spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
İzoamil asetat	Muz	Amil alkol	<i>Williopsis saturnus</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
2-Fenil etanol	Gül ve benzeri, bal	Fenil alanin	<i>S. cerevisiae</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
			<i>Kluyveromyces spp.</i>	Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012
Pirazin	Pişmiş koku	Treonin	<i>Bacillus subtilis</i>	Feron ve Wache, 2006
Karvon	Nane benzeri	Limonen	<i>Rhodococcus opacus</i>	Molina vd., 2013
Noot katon	Greyfurt	Valensen	<i>Pleurotus sapidus</i>	Molina vd., 2013
			<i>Chlorella sp.</i>	Molina vd., 2013

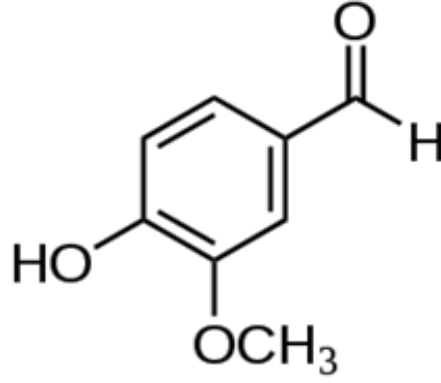
Mikrobiyal biyodönüşüm reaksiyonlarının başlıca avantajları şunlardır (Suresh vd., 2006; Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2012; Molina vd., 2013):

- Yüksek substrat seçiciliği
- İstenilen bileşiğin üretilmesinde verimliliğin artırılması
- Az miktarda yan ürün oluşumu
- Daha az toksik madde birikimi

- Asıl ürünün kolay izole edilebilmesi ve saflaştırılması
- Hızlı bir şekilde üretimin gerçekleşmesi
- Çevre dostu bir uygulama olması
- Coğrafik etkilerden uzak, iklimsel değişikliklerden bağımsız olması
- Ürünün doğal olarak kabul edilmesi
- Yeni bileşenlerin üretilebilmesi
- Katalistin normal koşullarda çalışabilmesi; yani yüksek basınç, ekstrem koşullar gibi ihtiyacı olmaması
- Az enerji tüketimi ve maliyetin düşmesi
- Kimyasal sentez reaksiyonlarında karşılaşılan problemlerin ortadan kaldırılması
- Biyodönüşüm çalışmalarının, ilgili maddenin biyosentez yolunun açığa çıkarmada yeni bilgiler sağlaması

2.4. Vanilin

Vanilya orkideleri, büyük oranda Endonezya, Madagaskar ve Çin'de yetiştirilmektedir (Kaur ve Chakraborty, 2013). Vanilin (4-Hidroksi-3-metoksi benzaldehit) ise, *Vanilla planifolia*, *V. tahitensis* ve *V. pompona* türü orkidelerin tohum zarfında oluşan en önemli aroma maddesidir ve bitkinin içerdiği aroma maddelerinin 1/3'ünü oluşturur (Walton vd., 2003; Anuradha vd., 2013; Kaur ve Chakraborty, 2013). Beyaz renkli ve iğne benzeri kristal yapıdadır. Yoğun tatlılık derecesine ve kuvvetli bir vanilya benzeri kokuya sahiptir (Kaur ve Chakraborty, 2013). Yaklaşık 180 milyon dolarlık pazar payı ile geniş bir kullanım alanına sahiptir (Son vd., 2014). Şekerleme, dondurma ve içecekler başta olmak üzere birçok gıda ürününde kullanımı oldukça yaygın olup; parfüm endüstrisinde de kullanılmaktadır (Priefert vd., 2001). Ayrıca gıdaların bozulmasına neden olan bakteri, maya ve küfler üzerinde de inhibitör etki yaratmasından ötürü gıda koruyucusu olarak kullanımı da mevcuttur (Jadhav, 2009). Antioksidan ve antimutajenik etkileri vardır (Gounaris, 2010). Yine farmasötik alanında aldomet, dopamin, papaverin ve L-Dopa gibi ilaç etken maddelerinin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Köpük kırıcı ajanların üretiminde de vanilin'den yararlanılmaktadır. Çeşitli fonksiyonel özelliklerinin bulunmasının yanında esasen aroma maddesi olarak kullanılır (Kaur ve Chakraborty, 2013).



Şekil 2.5. Vanilin'in kimyasal yapısı (Havkin-Frenkel ve Belanger, 2008)

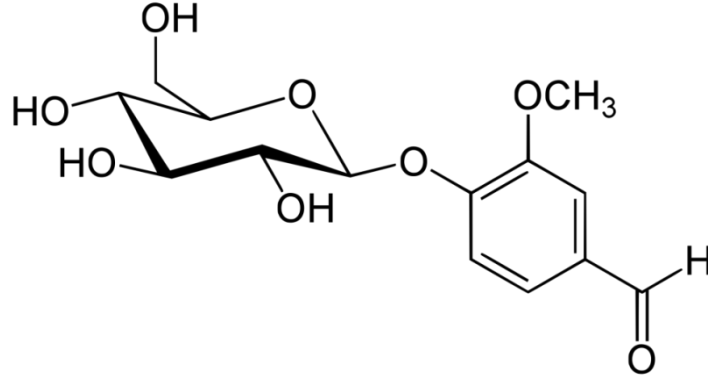
2.5. Bitkilerde Vanilin Oluşum Mekanizması ve Vanilya Çubuğu Eldesi

Vanilin oluşumu başta *V. planifolia* olmak üzere az miktarda da *V. tahitensis* ile *V. pompona* tür orkidelerin tohum zarflarında gerçekleşir (Dignum, 2007). *V. planifolia* orkidelerinin anavatanı Meksika olmakla beraber; orkideler büyük ölçüde Madagaskar, Endonezya, Taiti ve Tonga'da yetiştirilir (Waliszewski vd., 2006). *V. planifolia* (Bourbon vanilyası) ile birlikte ticari değere sahip diğer türler *V. pompona* ve *V. tahitensis*'tir ancak dünyadaki toplam üretimin % 75'ini Madagaskar ve Hint Okyanusu'ndaki diğer adalarda yetiştirilen Bourbon vanilyası oluşturur (Anuradha vd., 2013; Rasoamandrary vd., 2013).

Tohum zarfının teşekkül edebilmesi için öncelikli olarak çiçeklerin tozlaştırılması gerekmektedir. Tozlaştırma işi Meksika, Porto Riko ve Orta Amerika ülkelerinde Melipona cinsi arılar tarafından yapılır. Ancak bu yolla çiçeklerin sadece % 1'inin tozlaştığı ve doğal tozlaşmanın bu bölgeye has olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çiçeklerinin tohum oluşturmaları için elle tozlaştırma tekniği ile uygulanır. Tozlaşmadan yaklaşık 8-9 ay sonra vanilya fasulyesi (tohum zarfı) için hasat yapılır (Anuradha, 2013). Tohum zarfı içindeki vanilin, β -D-glikozid bağları ile konjuge haldedir (Dignum, 2007). Bu aşamada henüz vanilyaya has aromaya dair bir iz mevcut değildir.

Karakteristik vanilya aroması, 'curing' adı verilen işlem (6 aydan fazla sürebilecek bir süreç) sonunda teşekkül eder. Curing sırasında β -D-glikozidaz enzimi ile β -D-glikozit bağları kırılır ve vanilin (4-Hidroksi-3-metoksi benzaldehit) ortaya çıkar. Oluşan vanilin, kürlenmiş tohum zarfının % 2-2,5'ini oluşturur ve vanilin'e yaklaşık 200 minör bileşen eşlik eder (Walton vd., 2003). Bunlardan minör düzeydeki 26 tane önemli aktif koku bileşeni vanilya aromasını oluşturmaktadır. Ancak vanilin bu bileşenler

içerisindeki hakim bileşendir (Silva vd., 2011). Vanilya aromasının 1/3'ü vanilin'den ileri gelirken; geri kalan 2/3'ü uçucu ve uçucu olmayan bileşenler tarafından oluşturulur (Anuradha, 2013).



Şekil 2.6. Vanilin'in β -D-glikozit yapısı (Glikovanilin)

Curing işlemi için her ülke/firmanın kendi üretim prosesi vardır. Bu proses genel olarak haşlama, güneşletme, kurutma ve iklimlendirme olmak üzere 4 aşamadan oluşur (Dignum, 2001).

Çizelge 2.6. Curing işlemi sonrası kuru tohum zarfının bileşimi (Rao ve Ravishankar, 2000)

Bileşen	Miktar (gr/kg)
Vanilin	20
Vanilik asit	1
p-Hidroksibenzaldehit	2
p-Hidroksibenzil metil ester	0,2
Karbonhidrat	250
Yağ	150
Selüloz	150-300
Mineral	60
Su	350

2.5.1. Haşlama/Öldürme

Gerek devam eden biyokimyasal aktivitenin durdurulması gerekse tohum zarfının çatlayıp açılmasını önlemek için haşlama işlemi uygulanır. Bu aşamada vejetatif gelişim durdurulur (Dignum, 2001; Rao ve Ravishankar, 2000). Dokular tahrip edilerek

enzimatik aktivite için uygun bir ortam oluşturulur. Sıcak suyla haşlamanın yanı sıra güneş altında da öldürme işlemi gerçekleştirilebilir (Rao ve Ravishankar, 2000). Eğer sıcak suyla haşlama yapılıyorsa bu işlem için yaklaşık 65 °C'de 2-3 dakika haşlama yeterlidir (Dignum, 2001).

2.5.2. Güneşletme/Terletme

Tohum zarfları bir tahta üzerine serilir ve üzerine battaniye ya da keten branda örtülerek fermentasyona bırakılır. Haşlama sonucu tahrip olan hücre ve dokulara enzimler etki eder. Glikovanilin tohum zarfı içerisinde merkeze yakın iken β -glukozidaz enzimi dış kısma daha yakındır. Bu aşamada özellikle glukozidaz ve oksidaz enzimleri oldukça aktiftir (Dignum, 2001). Gündüz güneş altında bekletilen zarflar gece hava geçirmez tanklara alınarak terletilir. Bu işlem yaklaşık 7-10 gün sürer (Rao ve Ravishankar, 2000). 48. saatten itibaren tohum zarfı kararır, glikovanilin yapısındaki glikozid bağları kopar ve vanilin serbest kalır. Böylece tipik vanilya aroması oluşur.

2.5.3. Kurutma

Hala yaş olan tohum zarflarında mikrobiyal bozulmanın önüne geçilebilmesi için kurutma yapılır. Tohum zarfları güneş almayan kapalı bir alanda 2-4 hafta kurutulur (Dignum, 2001). Kurutma başlangıcında % 70 civarında olan nem, kurutma sonunda % 25-32 seviyesine iner (Anuradha vd., 2013).

2.5.4. İklimlendirme

Tohum zarfları sıcaklık ve nem ayarı yapılmış bir oda içerisinde 6 aya kadar bekletilir. Bu aşamada esterifikasyon ve oksidatif degradasyon gibi bazı biyokimyasal reaksiyonlar devam eder (Dignum, 2001).

2.6. Biyoteknolojik Yöntemlerle Vanilin Üretimi

Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünlere olan ilgisinin artması ve yasal düzenlemeler nedeniyle doğal ürünlerin üretimi büyük önem kazanmıştır. Bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon yolu ile vanilin eldesi yoğun işçilik ve uzun süre gerektiren;

aynı zamanda ekonomik olmayan bir üretim şeklidir. 1 kg vanilin elde edebilmek için 500 kg tohum zarfına; bunun için de 40000 çiçeğin başarılı şekilde tozlaştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Hansen vd., 2009). Dolayısıyla yetiştirme güçlüğü, tohum zarflarının toplanması ve çiçeklerin elle tozlaştırılması için yoğun işgücü gerektirmesi ve arzın talebi karşılayamıyor olması vanilin'in yüksek maliyetli bir ürün olmasına yol açmıştır. Bu durum da sentetik olarak üretilen vanilin'in doğal vanilin'in yerini almasıyla sonuçlanmıştır (Li ve Frost, 1998). Dünya genelinde üretilen vanilin'in % 1'inden daha azını doğal vanilin oluşturmaktadır (Sciubba vd., 2009). Vanilin yıllık 12000 ton civarında üretilir ve bunun başlıca kaynağı guaikol'dür. Sadece 20 ton kadarını vanilya tohum zarflarından ekstraksiyon ile elde edilen vanilin oluşturmaktadır (Gounaris, 2010). Talebin geri kalanı guaikol veya lignin'den kimyasal sentez yolu ile üretilen sentetik vanilin tarafından karşılanmaktadır. Esasen arzın düşük olmasının nedeni üretim maliyetinin yüksek olmasıdır (Rana vd., 2013).

Doğal vanilin, safrandan sonra en pahalı ikinci gıda katkı maddesidir (Anuradha vd., 2013). Sentetik vanilin'in kilogram fiyatı 11 \$ civarında iken doğal vanilin'in (biyoteknolojik yollarla elde edilen) fiyatı 1000-3000 \$/kg arasında değişmektedir (Rana vd., 2013). Vanilya tohum zarflarından elde edilen vanilin'in kilogram fiyatı ise 16000 \$'a kadar çıkabilmektedir (Berger, vd. 2010).

Kimyasal sentez ile elde edilmiş vanilin ekonomik olduğu için doğal vanilin'e alternatif sunmaktadır. Ancak diğer aroma maddelerinin üretiminde olduğu gibi sentetik vanilin üretiminde de kullanılan prosesin çevre kirliliğine yol açması ve doğal ürünlere karşı artan ilgi, bilim adamlarını yeni alternatif yöntem arayışlarına itmiştir. Doğal prekürsörlerden biyoteknolojik yollar ile elde edilen ürünlerin Avrupa Birliği ve Birleşik Devletler mevzuatlarınca doğal kabul edilmesiyle çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır.

2.6.1. Bitki hücre kültürü ile vanilin üretimi

Bitki hücre kültürü kullanımı aroma maddelerinin üretiminde geniş bir yelpazeye sahip olması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar için uygun bir metot olarak gözükmektedir. Bitki hücre kültürlerinin sahip olduğu metabolik potansiyel değerli bileşiklerin sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmacılar özel bir çaba sarf ederek çok rağbet gören bir aroma maddesi olan vanilin'i hücre kültürü kullanarak

üretmeyi denemişlerdir. *Vanilla planifolia*'ya ait hücre kültürü çeşitli bitki hücre ve dokularından elde edilebilmiştir. Ayrıca, prekürsör olarak kullanılan ferulik asitle besleme yapılarak vanilin birikiminde artış sağlanmıştır (Longo ve Sanroman, 2006). Yine ferulik asitten vanilin'e biyodönüşüm için *Capsicum frutescens*'e ait tutuklanmış (immobilize) hücre kültürleri de kullanılmıştır (Johnson vd., 1996).

Bu yöntemle ilgili asıl sorun bitki kültürlerinin doğal olarak yavaş gelişmesi ve arzu edilen ürünün düşük miktarlarda elde edilmesidir. Aynı sorun vanilin üretiminde de yaşanmaktadır. Biyoteknolojik yaklaşımlar her ne kadar yeni gelişmelere açık olsa da bu yöntemin ticari geleceği açısından şüpheler mevcuttur (Havkin-Frenkel ve Belanger, 2008).

2.6.2. Enzimatik yollarla vanilin üretimi

Vanilin'in biyosentez mekanizmasının aydınlatılması ve bu biyosentez işleminin çeşitli basamaklarını başarılı bir şekilde katalizleyen enzimler hakkında elde edilen bilgiler, vanilin üretiminde enzim bazlı sistemlerin ortaya çıkmasına fırsat tanımıştır. Biyoteknoloji, ilgili enzimlerin sentezlenmesinde görev alan genlerin klonlanması ile bunların vanilin ve yan ürünlerinin sentezinde kullanılmasıyla da ilgilenmektedir. Bu sistem, üretim sürecinin belli basamaklarının kontrol altında tutulmasında fayda sağlamaktadır. Örneğin; mikroorganizmaların öncül madde ile beslenmesi esnasında üretilmiş vanilin'in vanilil alkol veya vanilik aside dönüştürüldüğünün tespit edildiği durumlarda bu teknikten yararlanılabilmektedir (Havkin-Frenkel ve Belanger, 2008).

Enzimatik vanilin üretimine örnek vermek gerekirse, kırmızı biber yapısında bulunan kapsaisin'in enzimatik olarak vanililamin'e hidrolizi gerçekleştirilebilmektedir. Oluşan vanililamin, vanilil alkol oksidaz (VAO) enzimi varlığında kademeli olarak vanilin'e dönüştürülmektedir (Heuvel vd., 2001).

Yine soya fasulyesinden ekstrakte enzimler kullanılarak izoöjenolün enzimatik olarak vanilin'e biyodönüşümü sağlanabilmektedir. Optimize koşullar altında 36 saat içerisinde % 13.3 molar verim ile 2.46 g/L düzeyinde vanilin üretimi gerçekleştirilmiştir (Li vd., 2005).

2.6.3. Mikrobiyal biyodönüşüm yoluyla vanilin üretimi

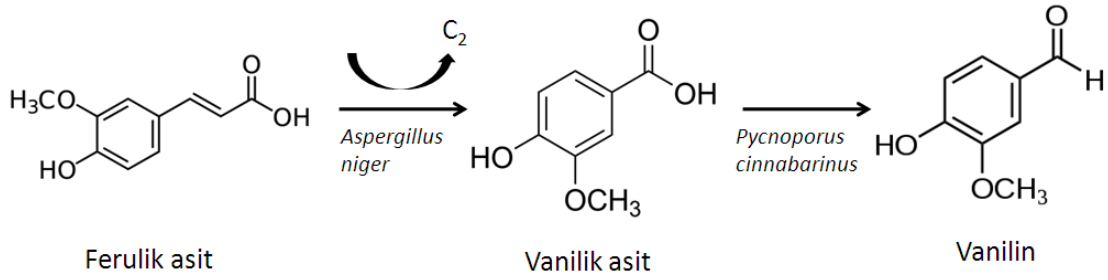
Mikrobiyal biyodönüşümde öncül maddeden bir veya birkaç aşamada aroma maddelerinin üretimi mümkün olabilmektedir. Vanilin üretiminde de mikrobiyal biyodönüşüm yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır. Vanilin üretiminde kullanılan prekürsörler arasında başta ferulik asit ve izoöjenol olmak üzere, öjenol, glikoz ve bazı aromatik amino asitler yer almaktadır.

2.6.3.1. Ferulik asidin vanilin'e biyodönüşümü

Ferulik asit bitkiler aleminde en bol bulunan hidroksisinamik asittir ve hücre duvarlarının yapısında lignin ve diğer polimerlere kovalent bağlarla bağlı halde bulunurlar. Çeşitli çalışmalarda *Psychrobacter sp. CSW4*, *Candida galli PGO6*, *Pseudomonas resinovorans SPR1*, *Bacillus pumilus S-1*, *Streptomyces*, *Actinomycetes* ve *Brevibacillus agri 13* gibi bazı mikroorganizma türlerinin ferulik asit ve benzer yapıli substratları kullanarak vanilin üretebildiği ortaya konmuştur (Ma ve Daugulis, 2014).

Ferulik asidin öncül madde olarak kullanıldığı çalışmalarda ferulik asit öncelikle *Aspergillus niger* tarafından vanilik aside indirgenmiş; ardından da *A. niger* uzaklaştırılarak yerine *Pycnopus cinnabarinus* ortama inoküle edilmiştir. Ortamdaki vanilik asit *P. cinnabarinus* tarafından vaniline dönüştürülerek 2 aşamalı bir biyodönüşüm gerçekleştirilmiştir (Meessen vd., 1996). Ancak verim, endüstriyel açıdan bakıldığında oldukça düşük kalmıştır. İlerleyen araştırmalar, *P. cinnabarinus*'un ortam koşulları optimize edildiğinde tek aşamada vanilin eldesi gerçekleştirebildiğini göstermiştir. Yine de molar verim % 54 seviyesine kadar yükseltilebilmiş ve 126 mg/L vanilin üretilebilmiştir. (Tilay vd., 2010). Zheng ve ark. (2007) tarafından çift kültür kullanılarak gerçekleştirilen vanilin üretim çalışmalarında üretilen vanilin miktarı 2.8 g/L'ye kadar çıkarabilmiştir.

Ma ve Daugulis (2014) ise ferulik asitten vanilin üretiminde *Amiclatopsis sp. ATCC39116* türünden faydalanmış ve % 96.1 molar verim ile 9.18 g/L vanilin üretmeyi başarmışlardır.



Şekil 2.7. Ferulik asidin vanilin'e 2 aşamalı biyodönüşümü (Meessen vd., 1996)

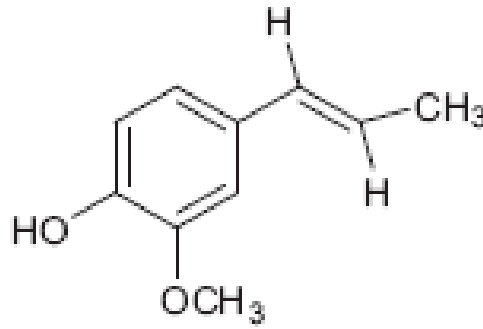
2.6.3.2. Öjenol ve izoöjenol'ün vanilin'e biyodönüşümü

Bitkiler, yaralanma ve enfeksiyon gibi biyotik ve abiyotik strese karşı fenil propanoid bileşikler üretmektedirler. Fenil propanoidler doğada yaygın bulunuşu nedeniyle, aroma ve esans üretiminde düşük maliyetli doğal prekürsörler olarak kabul edilirler. Özellikle biyodönüşüm yolu ile vanilin üretiminde ferulik asit, stilben, lignin, öjenol ve izoöjenol gibi fenil propanoid bileşiklerden yararlanılmaktadır (Ryu vd., 2013).

Öjenol, karanfil bitkisi (*Syzygium aromaticum*) esansiyel yağının temel bileşenidir (Priefert vd., 2001). İzöjenol [2-metoksi-4-(1-propenil)fenol] ise karanfil, defne ve tarçın yaprağında makul miktarlarda bulunabilen önemli bir bileşiktir (Chen vd., 2012). Doğal öjenol ve izoöjenol, bitki esansiyel yağlarından ekstraksiyon yolu ile elde edilir. Ayrıca izoöjenol, öjenolün izomerizasyonu ile de endüstriyel boyutta üretilebilmektedir (Ashengroph vd., 2012). Aromatik yapısı nedeniyle gıda endüstrisinde; antibakteriyel ve antifungal etkilerinden ötürü eczacılık alanında ve antioksidan özelliği ile de kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (Chen vd., 2012).

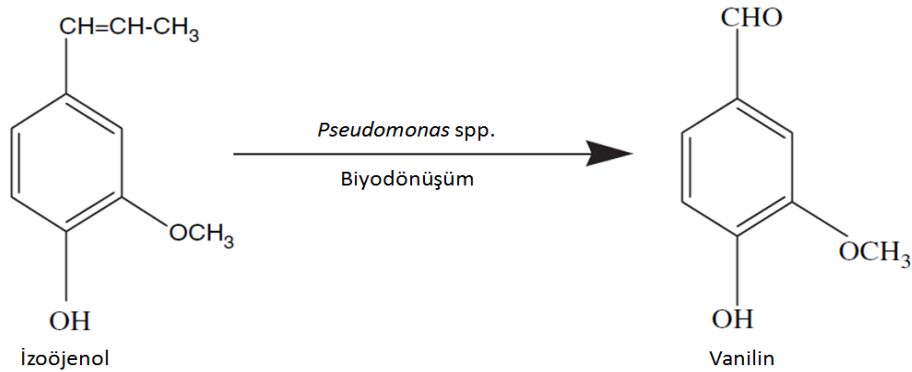
Öjenol, piyasadan çok uygun fiyatlarla temin edilebildiği için biyodönüşüm çalışmalarında ticari açıdan ideal bir hammaddedir. *Corynebacterium* türleri ile *Fusarium solani*'nin öjenol'ü başta vanilin olmak üzere çeşitli aromatik ürünlere indirgeyebildiği bildirilmiştir. Öjenol üzerinde yapılan çalışmalarda üretilen vanilin miktarı çok düşük düzeylerde kalmış ve araştırmalar mutant türler üzerine kaymıştır. Mutant *Pseudomonas* türleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada öjenol'den 17 saat içinde 0.44 g/L vanilin elde edilmiştir. Ancak mutant türde bulunan koniferil aldehit dehidrogenaz enzimi ilerleyen süreçte oluşan vanilin'i okside etmiş ve vanilin üretiminde rol alan vanilin dehidrogenaz aktivitesini etkisiz hale getirmiştir (Priefert vd., 2001).

İzoöjenol'de yine öjenol'de olduğu gibi doğal, çevre dostu ve yenilenebilir bir kaynağının olması nedeniyle biyodönüşüm yolu ile doğal vanilin üretiminde yararlanılan önemli bir prekürsördür. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından tolere edilebildiği ve vanilin'e biyodönüşümünün gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. *Aspergillus niger*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Rhodococcus rhodocrous*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chloraphis* ve *Nocardia iowensis* gibi mikroorganizmaların izoöjenol'ün vanilin'e biyodönüşümünü gerçekleştirebildiği bildirilmiştir (Ashengroph, 2012).



Şekil 2.8. İzoöjenol'ün kimyasal yapısı (Gusevskaya vd., 2012)

Öncül madde olarak izoöjenol'ün kullanıldığı çalışmalarda umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* kültürü kullanılarak izoöjenol'den 0.9 g/L vanilin üretilirken; *Pseudomonas putida* IE27 kullanılarak gerçekleştirilen izoöjenol'den vanilin üretiminde % 71 molar verimle 16 g/L vanilin üretilmiştir (Shimoni vd., 2000; Yamada vd., 2007). Zhao ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada ise biyokatalist olarak *Bacillus fusiformis* kullanılmış ve 72 saatlik biyodönüşüm denemesinde 32.5 g/L düzeyinde vanilin üretilmiştir.



Şekil 2.9. İzoöjenol'ün vanilin'e mikrobiyal biyodönüşümü (Kasana vd., 2007)

2.6.3.3. Aromatik amino asitlerin biyodönüşümü

Fenilalanin; bitkilerde flavonoid, kumarin, stilben ve lignin biyosentezinde başlangıç noktası olarak bilinmektedir. L-fenilalanin metabolizması, *Proteus vulgaris* ve fenilalanin amonia liyaz aktivitesine sahip beyaz kök mantarlarında incelenmiştir. Çalışmalar, *Proteus vulgaris*'in metoksitirozin'in fenilpirüvik aside deaminasyonunu gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Elde edilen fenilpirüvik asit, seyreltik NaOH uygulaması ile vanilin'e dönüştürülmüştür (Priefert vd., 2001).

2.6.3.4. Glikoz'un vanilin'e biyodönüşümü

E. coli suşları, aromatik bileşiklerin üretim potansiyelinin arttırılması için genetik olarak modifiye edilebilmektedir (Priefert vd., 2001). Bu kapsamda modifiye *E. coli* KL7 glikozun vanilik aside biyodönüşümü için kullanılmıştır. Üretilen vanilik asit biyodönüşüm ortamından alınmış ve *N. crassa*'dan elde edilmiş aril aldehit dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla enzimatik olarak vanilin'e dönüştürülmüştür (Li ve Frost, 1998). Ancak kateşol-O-metiltransferaz aktivitesinin yetersiz kalması nedeniyle fermentasyonda baskın ürün olarak prokateşuik asit oluşmuştur. Dahası, kateşol-O-metiltransferaz'ın çok seçici olmaması yan ürün olarak izovanilin oluşumuna da yol açmıştır (Priefert vd., 2001).

2.7. Mikrobiyal Biyodönüşüm Yolu İle Aroma Maddesi Üretiminin Eksik Yönleri, Karşılaşılan Güçlükler ve Çözüm Yolları

Biyodönüşümün sürecinin işleyebilmesi için en önemli parametreler kültürün sahip olduğu enzim sistemi ve çevresel koşullardır. Bazı mikroorganizma kültürleri tek aşamada istenilen biyodönüşümü gerçekleştirirken bazı kültürlerin biyodönüşümü tek aşamada gerçekleştirmede yetersiz olduğu görülmüştür. Bu tip çalışmalarda biyodönüşümün gerçekleştirilebilmesi için birden fazla kültür kullanılmış ve kademeli olarak biyodönüşüm işlemi gerçekleştirilmiştir (Meessen vd., 1996). Biyodönüşümün çok aşamalı olarak gerçekleşmesi süre ve maliyet açısından dezavantajı da beraberinde getirmektedir

Biyodönüşüm işleminin mantığına uygun olarak tek kademeli biyodönüşüm süreci gerçekleştiren biyokatalistlerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. İzöjenol'den vanilin üretimi çalışmalarında çoğunlukla *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türler kullanılmaktadır (Zhao vd., 2005; Zhang vd., 2006; Hua vd., 2007; Kasana vd., 2007; Ashengroph vd., 2011; Vasudevan ve Bhat, 2011). Bu türlerin tercih edilmesindeki en büyük sebep enzim sistemlerinin oldukça zengin olmasıdır (Muratoğlu vd., 2011). Enzim sistemlerinin çok çeşitli olmasında bu cinslerin sahip olduğu biyoçeşitlilik önemli rol oynamaktadır. Biyodönüşüm verimi açısından bakıldığında suş düzeyinde bile farklılıklar görülebilmektedir. Bu nedenle her ne kadar *Bacillus* ve *Pseudomonas* türleri ile ilgili biyodönüşüm çalışmaları gerçekleştirilmiş olsa da denenmemiş yeni suşlar üzerinde çalışılmaya ihtiyaç vardır.

Biyodönüşüm çalışmalarında çeşitli bitkisel uçucu yağlardan sıklıkla faydalanılmaktadır. Ancak bitkisel uçucu yağlar apolar nitelikte olup su bazlı besiyeri ortamlarında homojen olarak çözünmemektedir. Dolayısıyla biyodönüşüm çalışmalarında kültürün yağ fazı ile temas yüzeyini arttırmak amacıyla Tween, gliserol di metil sülfoksit ve çeşitli organik çözücülerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Kasana vd., 2007; Yamada vd., 2007). Emülgatör ve yüzey aktif madde kullanımı özellikle biyodönüşüm çalışmalarında birtakım sorunları da beraberinde getirmektedir:

- Düşük miktarda emülgatör kullanımında stabil bir emülsiyon elde edilemeyebilmektedir.
- Yüksek oranda yüzey aktif madde kullanımının esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğini düşürdüğü bilinmektedir (Mondello vd., 2009). Bu duruma benzer bir etki biyodönüşüm verimi için de söz konusudur. Yüksek miktarda emülgatör kullanımında, emülgatör yağ fazını sararak mikroorganizma ile doğrudan temas alanını kısıtlamaktadır. Doğrudan temasın kesilmesi sonucu mikroorganizma prekürsör maddeye erişememekte ve biyodönüşüm verimi olumsuz etkilenmektedir.
- Emülgatör kullanılarak elde edilen emülsiyonlarda, su fazı içinde dağılan yağ fazının yüzey alanının artmasına bağlı olarak sitotoksik etki görülebilmektedir.

Emülsiyon oluşturularak yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunları ortadan kaldırmak için çift fazlı biyodönüşüm çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Zhao ve ark.

(2005) tarafından *Bacillus fusiformis* kullanılarak gerçekleştirilen izoöjenol'den vanilin'e biyodönüşüm çalışmasında % 2 izoöjenol konsantrasyonundan başlayarak % 100'e kadar çıkılmıştır. İlk başta su içinde yağ fazı bulunurken, artan konsantrasyon ile birlikte yağ fazı çözücü konumuna gelmiştir.

Biyodönüşüm ortamına verilen öncül maddenin biyodönüşümü gerçekleştirecek kültür üzerinde sitotoksik etki göstermesi de üretimi sınırlayıcı bir faktördür (Yamada, 2007). Çift fazlı biyodönüşüm denemelerinde kültür su fazı içerisinde dağılmış bulunmaktadır. Herhangi bir anda su içerisinde dağılan yağ miktarı belli sınırlar içerisinde kalmaktadır (Zhao vd., 2005). Dolayısıyla biyokatalist ile prekürsör teması kısıtlandığından yüksek prekürsör dozlarında bile herhangi bir sitotoksik etki görülmeyebilmektedir. Ayrıca yüksek miktarlarda öncül kullanımı, besleme olmaksızın uzun süreli biyodönüşüm gerçekleştirilmesine imkan sağlamaktadır.

Bazı çalışmalarda biyodönüşüm sonucu üretilen vanilin kültür tarafından bir ara ürün gibi kullanılarak ileri degradasyon gerçekleşmektedir. Bu durum son ürün veriminde ciddi düşüslere sebep olmaktadır (Hua vd., 2007; Yamada vd., 2007). Yapılacak çalışmalarda son üründe degradasyona sebep olmayan suşların tespitine veya vanilin inhibisyonu engelleyecek tedbirlere ihtiyaç duyulmaktadır.

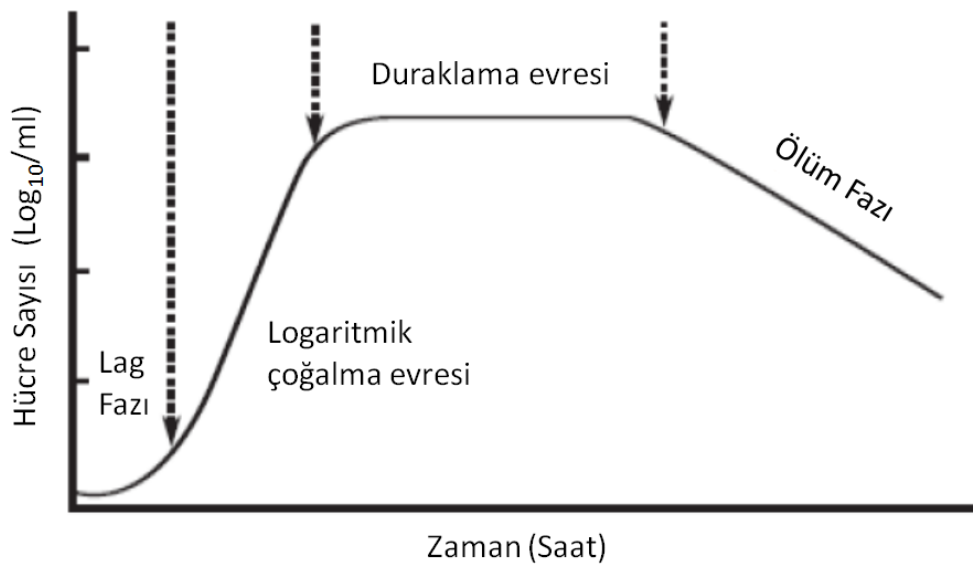
Tüm bunlara ek olarak vanilin üretiminin endüstriyel bir proses olduğu gerçeği de göz önünde bulundurulmalı; buna bağlı olarak çalışılan suşun biyodönüşüm ortamındaki çalışmasını etkileyecek parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Özellikle biyodönüşüm verimi üzerine etkili olduğu bilinen sıcaklık, pH, havalandırma ve öncül madde konsantrasyonu gibi değişkenler bu açıdan öne çıkmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar incelendiğinde biyodönüşüme başlangıç için öncül maddenin ortama ilave edileceği zaman aralığının tespiti henüz net bir şekilde ortaya konulmamıştır.

2.7.1. Besleme noktasının tespiti

Mikroorganizma popülasyonundaki sayıca artış gelişme olarak adlandırılır. Gelişme periyodu sırasında ortama besin maddesi ilave edilmezse ve atık maddeler alınmazsa bu tip gelişmeye durgun veya kesikli kültür adı verilir. Eğer saf bir mikroorganizma sıvı besiyerine ekildikten sonra uygun şartlarda inkübasyona bırakılırsa

belirgin dönemler gösterir. Bu dönemler lag fazı, logaritmik çoğalma dönemi, duraklama dönemi ve ölüm fazıdır.

- Lag fazı (Bekleme evresi): Bu dönemde belirgin bir kitle artışı görülmez. Kültür yeni aktarıldığı ortama uyum sağlamaya çalışmaktadır. Lag fazı içerisinde hasarlı hücrelerin onarımı ve bölünme için gerekli enzim sentezi gibi hazırlıklar gerçekleştirilir (Adams ve Moss, 2008).
- Logaritmik çoğalma dönemi: Üssel artış evresinde bölünme hızı sabit ve maksimum seviyededir. Hücre sayısı artarken, besin maddeleri azalır ve metabolizma ürünleri ortamda birikmeye başlar (Pamir, 1985). Logaritmik artış evresindeki hücreler çoğunlukla ısı, düşük pH ve antimikrobiyal gibi stres faktörlerine karşı durağan fazdaki hücrelere göre daha duyarlıdır (Adams ve Moss, 2008).
- Duraklama dönemi: Üssel artış evresindeki gelişmenin bir sonucu olarak besi ortamındaki değişimler çoğalma evresinin sonlanmasına neden olur. Besin kaynaklarının tükenmesi veya inhibitör metabolitlerin birikimi duraklama fazına girilmesinin başlıca nedenidir (Adams ve Moss, 2008). Mikroorganizma depo maddelerinden ve proteinlerden faydalanabildiği sürece canlı kalır. Çok hassas hücreler ise ölür (Pamir, 1985).
- Ölüm fazı: Ortam şartlarının elverişsiz hale gelmesiyle canlı hücre sayısında logaritmik olarak bir azalma görülür (Pamir, 1985).



Şekil 2.10. Statik bir kültürde mikroorganizmaların gelişim eğrisi (Pamir, 1985)

Öncül madde ile besleme zamanı biyodönüşüm araştırmalarında önemli bir parametredir. İzoöjenol'ün toksik etkisinden dolayı doğrudan olgunlaşmamış hücreler üzerine ilavesi tavsiye edilmemektedir (Ashengroph vd., 2011). Bu tür durumlarda son ürün verimi düşük kalmaktadır. Diğer taraftan, geç kalınması durumunda da yaşanan kültür metabolik aktivitesini kaybetmeye başlayacağından verimde ciddi düşüş gözlenmektedir (Ashengroph vd., 2010). Biyodönüşüm için en uygun zamanın popülasyonun en yüksek seviyeye ulaştığı geç dönem çoğalma fazı (late-exponential phase) veya dengeye ulaştığı duraklama dönemi olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle besleme noktasının tespiti etkin bir üretim için önem arz etmektedir.

2.7.2. Optimum biyodönüşüm sıcaklığının tespiti

Sıcaklık mikrobiyal gelişmeyi etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmalar çok değişik sıcaklıklarda gelişebilmektedir. Doğada -8 °C ve 90 °C gibi çok uç noktalarda bile gelişebilen mikroorganizmaların varlığından söz edilmektedir. Her mikroorganizma gelişebildiği bir minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerine sahiptir. Mikroorganizmalar sıcaklık gereksinimlerine göre psikrofil, mezofil ve termofil olarak üç gruba ayrılırlar. Çizelge 2.7.'de sıcaklık gereksinimine göre mikroorganizma grupları ve gelişme sıcaklıkları verilmiştir (Ünlütürk vd., 2003).

Çizelge 2.7. Sıcaklık gereksinimine göre mikroorganizma grupları ve gelişme sıcaklıkları (Ünlütürk vd., 2003)

Grup	Sıcaklık		
	Minumum	Optimum	Maksimum
Psikrofil (Zorunlu)	(-15) – 5	15 – 20	20 – 30
Psikrofil (Fakültatif)	(-5) – 7	20 – 30	30 – 40
Mezofil	5 – 25	30 – 40	40 – 50
Termofil (Fakültatif)	35 – 40	45 – 55	60 – 80
Termofil (Zorunlu)	40 – 45	55 – 65	70 – 90

Pseudomonas spp. psikrofil bir bakteridir ve 20-30 °C arasında optimum gelişme gösterir (Ünlütürk vd., 2003). Farklı *Pseudomonas* türlerinin 5 ile 37 °C'ler arasında gelişme gösterdikleri bilinmektedir (Kasana vd., 2007). Sıcaklık 50 °C'ye çıktığında ise

biyokatalist olarak kullanılan *Pseudomonas putida* kültürü vanilin üretimi aktivitesini tamamen yitirmektedir (Yamada vd., 2007).

Mikroorganizmalar için bu gelişme sıcaklıkları her zaman sabit olmayıp, suş farklılıkları ve çevre faktörlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Ünlütürk vd., 2003). Daha önce gerçekleştirilen biyodönüşüm çalışmaları incelendiğinde yeterince sıcaklık denemesi yapılmadığı; yapılan çalışmalarda ise gerek kullanılan biyokatalist türünün gerekse biyodönüşüm ortamlarının birbirinden çok farklı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, biyodönüşüm çalışmasında mikroorganizmanın optimum etkinlik göstereceği gelişme sıcaklığının tespit edilmesi elzemdir.

2.7.3. Optimum pH değerinin tespiti

Mikrobiyal gelişim, fiziksel etkiler ve çevre şartlarına oldukça bağlıdır (Ünlütürk vd., 2003). Dolayısıyla çevresel faktörler ve besi ortamı bileşimindeki değişim biyodönüşüm verimini de etkilemektedir. Biyodönüşüm çalışmalarında özellikle durağan faz içerisindeki hücrelerin kullanımı oldukça yaygındır. Durağan fazdaki hücrelerin gelişimi için tampon çözelti ortamları tercih edilmektedir. Bu amaçla biyodönüşüm çalışmalarında sıklıkla sodyum veya potasyum hidrojen fosfat tuzları kullanılmaktadır. Tampon çözelti içerisindeki bileşenlerin oransal olarak değiştirilmesi ile tampon çözeltinin başlangıç pH'ı standardize edilebilmektedir.

Pseudomonas chlororaphis'in pH 5 ile 10 arasında gelişme kaydedebileceği belirtilmiştir. Bu değerlerin altında ve üstünde ise mikrobiyal gelişim gözlenmemektedir. (Kasana vd., 2007). *P. aeruginosa* ise pH 4-11 arası gelişme gösterebilmektedir (Ashengroph vd., 2011). Geçmiş biyodönüşüm çalışmalarında kullanılacak ortam için farklı formülasyonlardan yararlanılmıştır. Ancak *P. putida* kültürünün hangi formülasyonda daha iyi vanilin üretimi gerçekleştireceği henüz denenmemiştir. Daha etkin bir vanilin üretimi için farklı oranlarda potasyum hidrojen fosfat tuzları kullanılarak biyodönüşüm ortamında pH ayarlaması ve optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.4. Biyodönüşüm ortamının havalandırılması

Pseudomonas putida, aerobik bir bakteri olduğundan besiyeri ortamında gelişme gösterebilmek için oksijene ihtiyaç duyar (Molina vd., 2013; Anonim, 2014b). Ancak biyodönüşüm çalışmalarında kültür gelişimi üzerine etkili olduğu bilinen birtakım parametrelerin değiştirilmesiyle kültürün durağan faz içerisinde mümkün olduğunca uzun kalması sağlanmaya çalışılmaktadır. Durağan fazın uzatılması ile biyodönüşüm veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir. Havalandırmanın durdurulması ve oksijen alımının kısıtlanmasının biyodönüşüm verimi üzerine nasıl bir etki yapacağı şu ana kadar çalışılmamış bir konudur. Yarı havalandırmalı ve havalandırmaz ortamlar kıyaslanarak, bundan sonraki biyodönüşüm çalışmaları için de yol gösterici verilerin ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri kültürü

Denemelerde, *Pseudomonas putida* HUT 8100 kodlu bakteri kültürleri kullanılmış olup HUT (Hiroshima, Japonya) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Stok bakteri kültürleri gliserol ortamında -22 °C'de dondurulmuş ve daha sonra Nutrient Broth ortamında aktifleştirmesi gerçekleştirilmiştir. Aktif hale gelen kültürler, IFO 802 kodlu (10 gr pepton, 2 gr maya ekstraktı, 1 gr MgSO₄.H₂O, 15 gr agar ve 1 litre distile su) tanımlı besiyerlerine tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılarak 28 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu yöntemle elde edilen kültürler bir sonraki denemelerde kullanılmak üzere +4 °C'de yatık agar içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve kimyasallar

Bakterileri aktif hale getirmek için kullanılan Nutrient Broth Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Tek koloni düşürmek için kullanılan IFO No: 802, kültürün geliştirilmesi için kullanılan Glucose Yeast Ekstrakt Peptone Broth (GYP) besiyerleri ile biyodönüşüm ortamındaki tampon çözelti içerisinde yer alan bileşenlerden glikoz, pepton, agar, magnezyum sülfat, potasyum di hidrojen fosfat ve di potasyum hidrojen fosfat trihidrat Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilirken, granül maya ekstraktı ise Merck (Darmstadt, Almanya) firmasında temin edilmiştir.

Ayrıca biyodönüşüm için gerekli izoöjenol ve vanilin'in tespitinde faydalanılacak vanilin standardı ile mikrobiyal canlılığın kontrolünde kullanılan iyodonitrotetrazolyum klorit (INT) de Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Ekstraksiyon aşamasında kullanılan % 96'lık teknik etanol Tekkim (Bursa, Türkiye) firmasından alınmış olup; kromatografik analizlerde kullanılan % 99.9'luk metanol Sigma-Aldrich (Louis, ABD), asetik asit ise Carlo Erba (Milano, İtalya) firmasından temin edilmiştir. Besiyeri hazırlamada kullanılan saf su ve kromatografik analizlerde kullanılan ultra saf su bölümdeki cihazlardan temin edilmiştir.

3.1.3. Alet, Ekipman ve Cihazlar

Bu çalışma kapsamında çalkalamalı inkübatör (Sartorius), laminar akışlı ekim kabini (Esco), soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific SL 16R), otoklav (Nüve), etüv (Nüve), vorteks (Heidolph), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Velp), pHmetre (Hanna pH211) ve hassas terazi (Ohaus PA214C) kullanılmıştır.

Kromatografik analizler ise Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu HPLC) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (Shimadzu GC-MS) cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GC-MS analizinde TRB-WAX kolon (Teknokroma, 60 mt x 0.5 µm x 0.25 mm) kullanılırken; HPLC analizlerinde C₁₈ kolon (HICROM LiCrospher RP18-5, 5 µm partikül çapı, 0.25 mt x 6.35 mm x 4.60 mm) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Biyodönüşüm çalışması için öncelikli olarak kültürün gelişim kinetiği ortaya konmuş ve çoğaltılan hücreler gelişim ortamından alınarak biyodönüşüm ortamına aktarılmıştır. Biyodönüşüm ortamında verim üzerine etkili olabileceği düşünülen çeşitli parametreler incelenerek her bir parametre istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

Optimizasyon denemesinde 'Aynı anda tek değişken' tekniği kullanılmış; tüm ortam değişkenleri sabit tutulurken sadece bir etken değiştirilerek üretilen vanilin miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. 120 saatlik denemeler sonucunda en yüksek vanilin miktarının elde edildiği parametre sabit tutularak bir sonraki denemeye geçilmiştir.

Her bir deneme en az 3 tekerrür halinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar 3 tekerrürün ortalaması baz alınarak değerlendirilmiştir.

3.2.1. Kültürün geliştirilmesi

IFO yatık agar içerisinde +4 °C'de muhafaza edilen kültürler, loop öze yardımıyla 250 ml'lik erlenler içerisinde 50 ml GYP Broth içeren sıvı besiyeri ortamına alınmıştır. Kültür, 28 °C ve 180 rpm'de 48 saat boyunca gelişmeye bırakılmıştır.

IFO agar besiyeri HUT kültür koleksiyonun tavsiye ettiği şekilde hazırlanırken; GYP Broth, Zhao ve ark. (2005) belirttiği şekilde (bkz. Çizelge 3.1.) hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Besiyeri bileşimleri (Anonim, 2014a¹; Zhao vd., 2005²)

IFO No: 802 ¹		GYP Broth ²	
Bileşen	Miktar (g/L)	Bileşen	Miktar (g/L)
Pepton	10	Glikoz	5
Maya Ekstraktı	2	Maya Ekstraktı	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	Pepton	5
Agar	15	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	15
Distile Su	1 L'ye tamamla	KH ₂ PO ₄	5.2
		MgSO ₄ .7H ₂ O	1
		Distile Su	1 L'ye tamamla

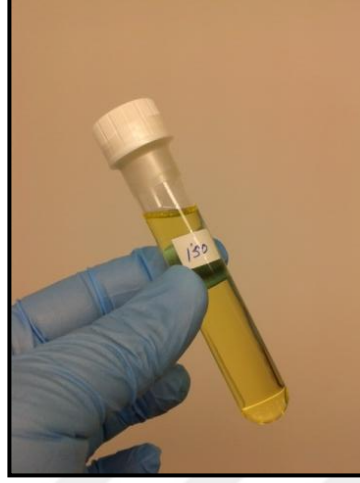
3.2.2. Hücrelerin durağan faza hazırlanması

50 ml GYP broth içerisinde 28 °C'de 48 saat geliştirilen kültürlerden 40 ml alınarak 3600 x g kuvvet ile 4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatant kısmı uzaklaştırılarak ortalama 0.63 gr yaş ağırlığa sahip (0.12 gr kuru ağırlığa denk) biyokütle elde edilmiştir. Biyokütle 20 ml'lik biyodönüşüm ortamı ile süspanse edilerek 250 ml'lik erlenlere alınmıştır. Biyodönüşüm ortamı denemeler sırasında farklı oranlarda hazırlanan K₂HPO₄.3H₂O, KH₂PO₄ ve izoöjenol'den oluşmaktadır (Zhao vd., 2005).



Şekil 3.1. Gelişme ortamı için kullanılan GYP besiyeri ve biyodönüşüm ortamı

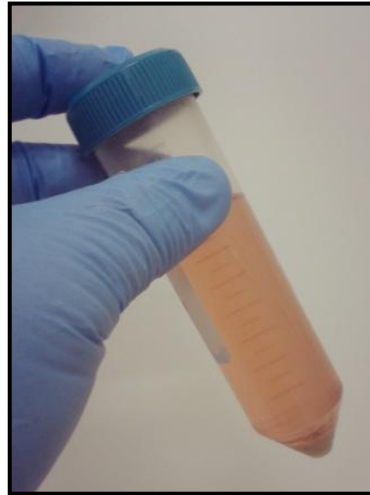
Biyodönüşüm çalışmalarında kullanılacak izoöjenol, 0.20 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Filtre edilerek steril hale getirilmiş izoöjenol

3.2.3. Biyodönüşüm ortamından örneklerin alınması

Erlen içerisindeki 20 ml biyodönüşüm ortamı 50 ml'lik falkon tüpü içerisine alınmış ve üzerine 20 ml % 96'lık etil alkol ilave edilmiştir. Karışım 1 dk boyunca vortekslenerek etil alkol ve biyodönüşüm ortamının iyice karışması sağlanmıştır. Ardından örnekler 3600 x *g* kuvvet ile 4 °C'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiş ve falkon tüpünün üst kısmında yer alan sıvı kısım behere alınmıştır. Falkon tüpü içerisinde kalan biyokütle çökeltisi üzerine 7.5 ml daha % 96'lık etil alkol ilave edilerek 3600 x *g* kuvvet ile 4 °C'de bu kez 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.3. Biyodönüşüm ortamından alınan ekstrakt

Elde edilen supernatant ilk santrifüj sonrası elde edilen kısım ile birleştirilerek biyokütleden arındırılmış; izoöjenol ve vanilin içeren biyodönüşüm ekstraktı elde edilmiştir.

3.2.4. Kromatografik analizler

Vanilin tespiti GC-MS'de, miktar tayini ise HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir.

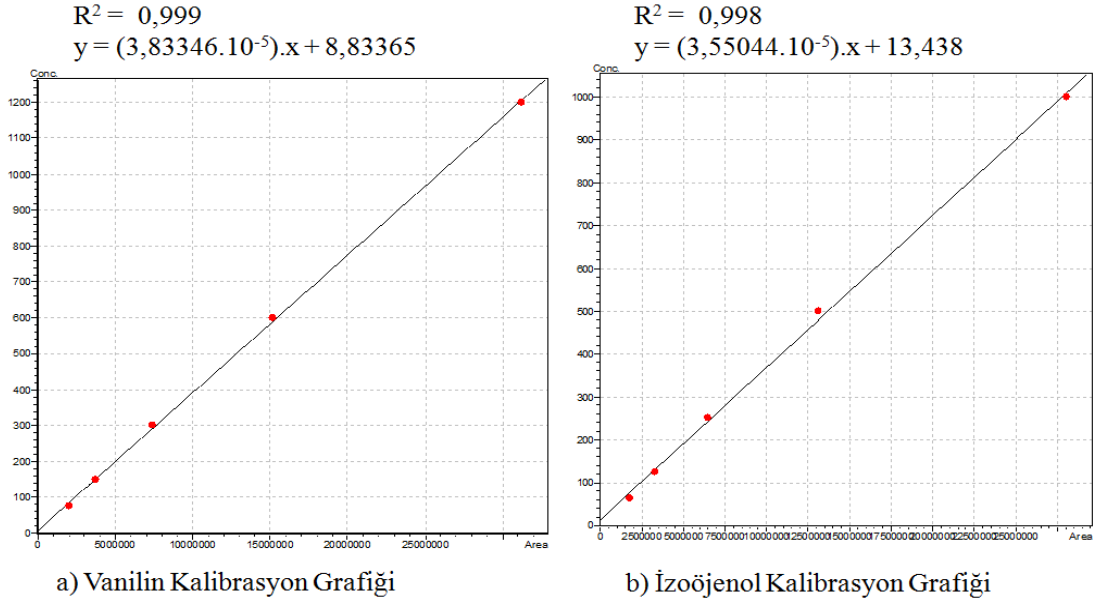
Alkolle muamele sonrası elde edilen örneklerden 100 µL alınarak 3.9 mL saf su ile seyreltilmiş ve vial içersine alınmıştır. Vial içi sıcaklık 45 °C olacak şekilde 15 dk ısıtma yapıldıktan sonra vial tepe boşluğuna DRB-CAR-PDMS yapıdaki fiber daldırılmıştır. 30 dk boyunca tepe boşluğundan örnekleme yapılmıştır. Örnekleme sonrası fiber 5 dk boyunca 260 °C'deki enjeksiyon bloğunda tutularak uçucu aroma maddeleri GC-MS'e verilmiştir. Arayüz sıcaklığı 250 °C iken, iyon kaynağı 200 °C'dir. Analiz sırasında sıcaklık programlaması ilk 3 dk boyunca 60 °C, sonrasında 20 °C/dk artış ile 250 °C'ye tırmanış ve bu sıcaklıkta 10 dk bekleme şeklindedir. Helyum gazının sürükleyici gücü (1.5 ml/dk; split oranı 75:1) ile TRB-WAX kolon (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) içerisinde sürüklenen uçucu bileşenler alıkonma sürelerine göre farklı sürelerde pikler halinde tespit edilmiştir. Wiley, Nist, FFNSC kütüphaneleri, alıkonma indeksi ve iyon dağılım spektrumları incelenerek; elde edilen piklerin ait olduğu bileşiğin tanımlaması gerçekleştirilmiştir.

Miktar tayininde kullanılacak izoöjenol ve vanilin'e ait pikler ise ters faz HPLC sistemi ile elde edilmiştir. Bölüm 3.2.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ekstraktlar 0.45 µm'lik naylon filtreden geçirildikten sonra 1.5 ml'lik HPLC vialleri içersine alınmıştır. Örnekler viallerden 20 µL enjeksiyon ile alınarak C₁₈ kolon içersine verilmiştir. Analiz süresi boyunca kolon sıcaklığı 30 °C'de tutulmuş, mobil faz 1 mL/dk hızla akıtılmıştır. % 0.01 asetik asitli ultra saf su çözeltisi (A) ve % 99.9 metanol (B) solventlerinden oluşan mobil fazın sürükleyici gücü ile ilerleyen bileşikler PDA dedektör tarafından 270 nm'de pikler halinde tespit edilmiştir. Solvent yürütme programı için Li ve ark. (2004) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. HPLC solvent yürütme programı¹

Zaman (dk)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	40	60
3	40	60
5	50	50
9	0	100
13	0	100
15	40	60
18	40	60

İzoöjenol ile vanilin standartları içeren ve içermeyen çözeltilere ait kromatogramlar kıyaslanarak izoöjenol ve vanilin'in pik verdiği dakikalar tespit edilmiştir. Konsantrasyonu bilinen standart çözeltilere ait kalibrasyon eğrisi oluşturularak örneklerde bulunan vanilin ve izoöjenol konsantrasyonları hesaplanmıştır.

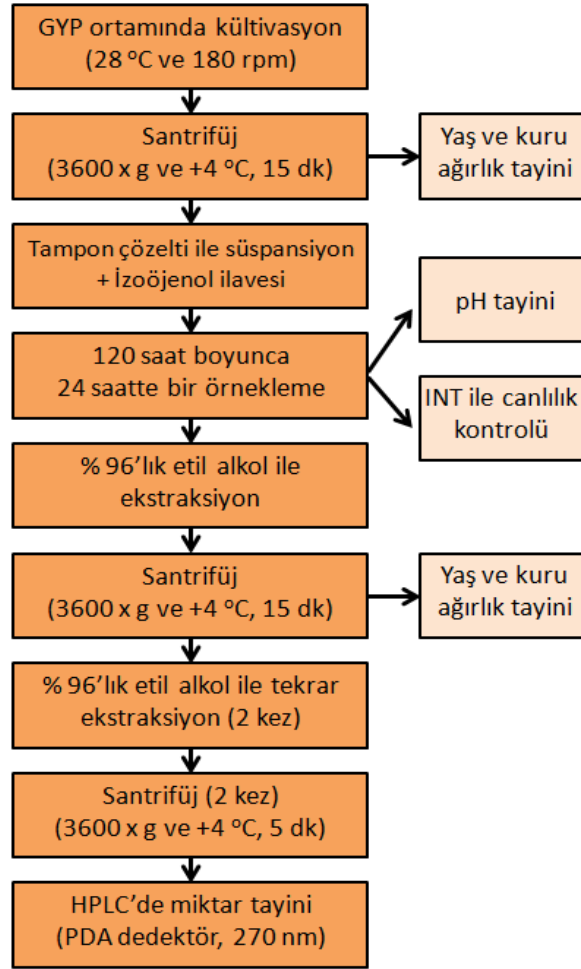


Şekil 3.4. HPLC standart madde kalibrasyon grafiği

HPLC için örnek hazırlama basamakları genel hatları ile Şekil 3.5.'te verilmiştir.

¹ Solvent A: % 0.01 Asetik asitli su, Solvent B: % 99.9 Metanol

HPLC ÖRNEK HAZIRLAMA BASAMAKLARI



Şekil 3.5. HPLC için örnek hazırlama basamakları

3.2.5. Kùltürün gelişim kinetiğinin belirlenmesi

IFO agar üzerinde +4 °C'de muhafaza edilen, tek koloni düşürölmüş kùltürlerden öze ile bir loop alınarak 250 ml'lik erlenler içerisinde yer alan 50 ml GYP broth sıvı besiyerlerine inokölasyon yapılmıştır. Çalkalamalı etöv içerisinde 28 °C ve 180 rpm'de gelişmeye bırakılan kùltürlerden belirli saatlerde örnekler alınmıştır. Bu örneklerden 8.5 g/L NaCl içeren Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) çözeltisi ile seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Elde edilen dilüsyonlardan 100 µL alınarak IFO agar üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 28 °C'de 24 saat bekletilen petriler üzerinde tespit edilen opak beyaz zonlar *Pseudomonas putida* kolonisi olarak değeriendirilmiştir. 10-200 arası koloni içeren petriler sayım için kabul edilmiş ve sonuç kob/mL cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.6. Sıcaklığın vanilin üretimi üzerine etkisi

Pseudomonas putida için optimum gelişme sıcaklığı 26-30 °C olarak belirtilmiştir (Anonim, 2014a; Anonim, 2014b; Şeker vd., 2007). Belirtilen sıcaklık değerine istinaden her deneme öncesi GYP ortamında yapılan kültür çoğaltma işlemi 28 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Kültürün geliştirilmesi işlemine müteakip 3.2.2.'de belirtilen şekilde santrifüj işlemi uygulanarak kültür biyodönüşüm ortamına alınmıştır.

Optimizasyon çalışması kapsamında kültürün optimum gelişme sıcaklığı olan 28 °C dışında; 24 ve 32 °C'lerde de 120 saat boyunca denemeler gerçekleştirilmiş ve biyodönüşüm etkinliğinin ne şekilde değiştiği araştırılmıştır.

3.2.7. pH'ın vanilin üretimi üzerine etkisi

Yapılan çalışmalarda farklı *Pseudomonas* türlerinin pH 5 ile 10 arasında gelişme gösterebildiği, bu değerler dışında ise gelişme olmadığı tespit edilmiştir (Kasana vd., 2007). Denemelerde, Zhao ve ark. (2005) belirttiği gibi 14 g/L K₂HPO₄ ve 5.2 g/L KH₂PO₄ içeren biyodönüşüm ortamı esas alınmıştır. Belirtilen biyodönüşüm ortamının pH değerinin 7.30 olduğu tespit edilmiştir.

pH denemelerinde, farklı miktarlarda potasyum hidrojen fosfat kullanılarak hazırlanan biyodönüşüm ortamları kullanılmıştır. Kullanılan biyodönüşüm ortamlarına ait bileşim ve pH değerleri Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Biyodönüşüm ortamı bileşimleri ve pH değerleri

Biyodönüşüm Ortamı (pH)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
5.30	0.40	15.53
6.30	4.84	16.65
7.30	14.00	5.20
8.30	21.62	0.82

3.2.8. Havalandırmanın vanilin üretimi üzerine etkisi

50 ml GYP broth ortamında 48 saat geliştirilen kültürlerden 40 ml alınarak santrifüj işlemi ile çöktürülmüş ve sıvı kısım ise biyokütleden uzaklaştırılmıştır. Elde edilen biyokütle son hacim 20 ml olacak şekilde tampon çözelti ile tekrar süspanse edilmiştir. Biyodönüşüm ortamına % 1 (w/v) oranında izoöjenol ilave edilerek yarı havalandırılmalı ve havalandırmasız ortamlarda denemeler gerçekleştirilmiştir.

Yarı havalandırılmalı biyodönüşüm denemeleri 250 ml'lik steril erlenler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Erlenlerin ağzına kapatılan pamuklar ile 20 ml'lik biyodönüşüm ortamının kısmen havalandırılması gerçekleştirilmiştir.

Havalandırmasız biyodönüşüm denemelerinde ise 250 ml'lik şişeler içerisine 1 dk boyunca 0.20 µm'lik steril filtreden geçirilmiş azot gazı verilmiştir. Böylece şişe içerisinde yer alan atmosferik oksijenin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Azot ile muamele sonrası şişe kapakları sıkıca kapatılmış ve şişeler parafilmlenerek hava ile teması kesilmiştir. Bu sayede kültürün, sadece tampon çözelti içerisinde çözünmüş halde bulunan sınırlı miktardaki oksijeni kullanması sağlanmıştır.



Şekil 3.6. Havalandırmasız ortamda gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesi

3.2.9. İzoöjenol konsantrasyonunun vanilin üretimi üzerine etkisi

48 saat boyunca GYP ortamında geliştirilerek santrifüjle çöktürülmüş kültürden sıvı besiyeri uzaklaştırılmış ve biyokütle tampon çözelti ile tekrar süspanse edilmiştir. Optimizasyon parametrelerin araştırılmasında tercih edilen % 1 izoöjenol konsantrasyonunun yanı sıra % 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'luk (w/v) izoöjenol konsantrasyonları da denenmiştir. Kullanılan izoöjenol ve tampon çözeltinin toplam hacmi 20 ml olacak şekilde biyodönüşüm ortamı ayarlanmıştır.

120 saatlik biyodönüşüm süresi sonunda toplam vanilin üretimi açısından en etkili oluşu düşünülen konsantrasyon optimum prekürsör miktarı olarak kabul edilmiştir. Molar verim ise aşağıdaki verilen formüle göre hesaplanmıştır (Wangrangsimagul vd., 2012):

$$\text{Molar Verim (\%)} = \frac{\text{Üretilen vanilin miktar ı (gr)} \times \text{İzo öjeno l'ün molekül ağırlığı (gr)}}{\text{Tüketilen izo öjenol miktar ı (gr)} \times \text{Vanilin'in molekül ağırlığı (gr)}} \times 100$$

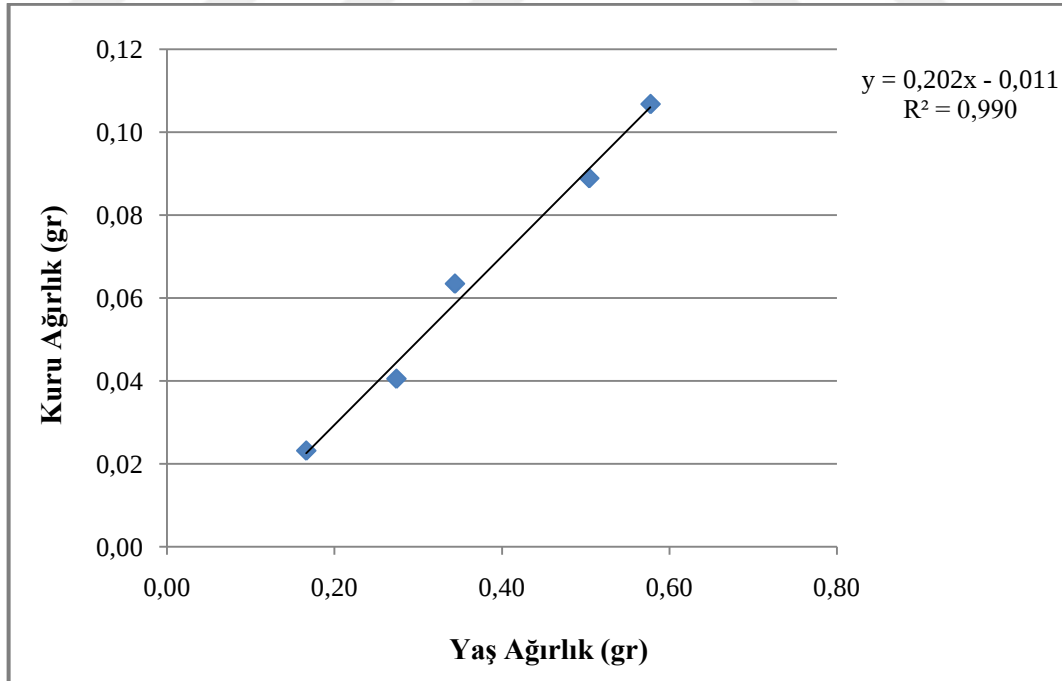
3.2.10. Kuru biyokütle değişiminin incelenmesi

250 ml'lik erlenler içerisinde 50 ml GYP broth ortamına tek koloni olarak inoküle edilen *Pseudomonas putida* HUT 8100 kültürü 28 °C'de ve 180 rpm'de geliştirilmiştir. 48 saat sonunda her bir erlenden 40 ml besiyeri darası alınmış steril falkon tüplerine transfer edilmiştir. Falkon tüpleri, 3600 x g'de ve +4 °C'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen sıvı kısım falkon tüpünden uzaklaştırılmış ve hassas terazide yaş ağırlık tartılmıştır. Elde edilen tartım sonucundan, falkon tüpünün darası düşülerek yaş ağırlık belirlenmiştir.

Sıvısı uzaklaştırılmış biyokütle üzerine son hacim 20 ml olacak şekilde belirli oranlarda tampon çözelti ve izoöjenol ilavesi yapılmıştır. Her 24 saat sonunda erlenlere % 96'luk etil alkol ilave edilerek örnek aynı koşullarda tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında etil alkol-tampon çözelti karışımı bir beher içerisine alınmıştır. Geriye kalan biyokütle tekrar tartılarak 24 saat aralıklarla biyodönüşüm ortamında ulaşılan yaş ağırlık miktarları tespit edilmiştir.

Kuru hücre ağırlığı, yaş biyokütleden 80 °C'de yaklaşık 24 saat boyunca suyun uçurulması sonucunda gravimetrik olarak hesaplanmıştır (Sen ve Dastidar, 2010). GYP ortamından alınan 40 ml'lik kültür santrifüj edildikten sonra steril bir şekilde tampon ortamına alınmaktadır. Sterilite bozulmaması gerektiğinden kuru ağırlık tayini için ayrıca bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Biyodönüşüm denemelerinde kullanılacak kültürler ile aynı şekilde geliştirilen kültürlerden 10, 20, 30, 40 ve 50 ml'lik miktarlar falkon tüplerine alınarak yine 3600 x g'de ve +4 °C'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısımlar uzaklaştırılarak falkon tüpü içerisinde sadece biyokütle bırakılmıştır. Daha önceden 102 °C'de sabit tartıma getirilmiş alüminyum kaplar içerisine biyokütle alınmıştır. Falkon tüpü içerisine 1 ml saf su ilave edilerek çalkalanmış ve tüpte kalan kısım da yıkanarak alüminyum kap üzerine aktarılmıştır. Örnekler sabit tartım ağırlına gelinceye kadar 80±1 °C'de sabit suyu uçurulmuştur. Elde edilen son ağırlıktan kabın darası çıkarılarak kuru örnek ağırlığı bulunmuştur.

Her bir örnekten (10, 20, 30, 40 ve 50 ml besi ortamından alınmış kültürler) 3 paralel hazırlanarak bunların yaş ve kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. 3 paralelin ortalaması alınarak yaş ağırlığa karşılık elde edilen kuru ağırlık miktarı grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.7. Yaş ve kuru biyokütle arasındaki bağıntıyı gösteren kalibrasyon grafiği

3.2.11. pH değişiminin incelenmesi

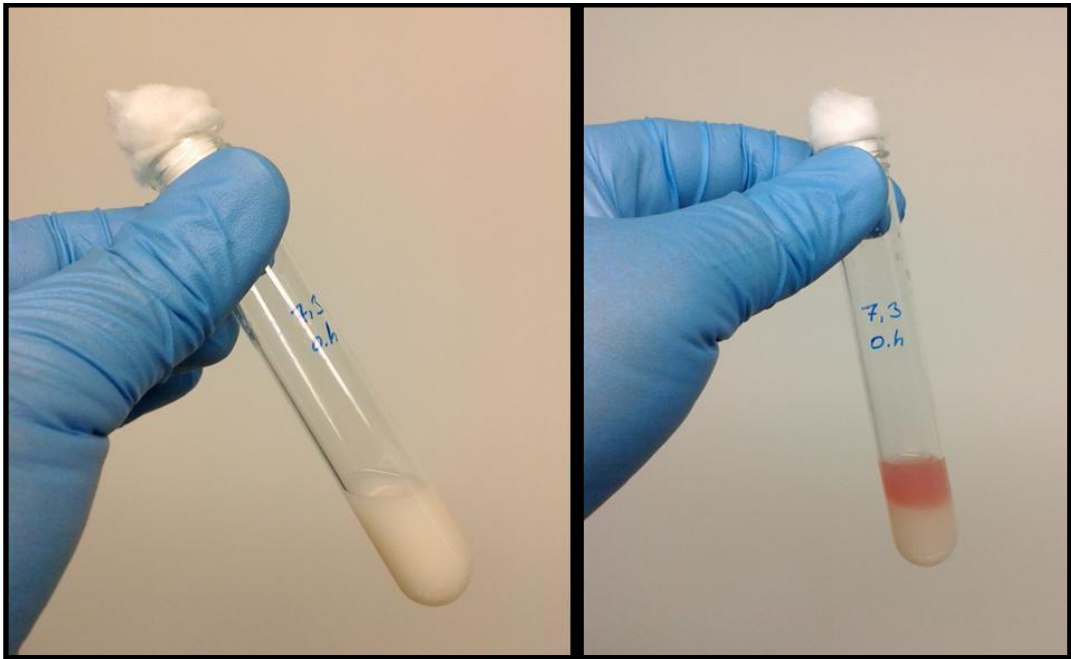
Biyodönüşüm başlangıcında ve belirli saatlerde alınan örneklerin alkolle ekstraksiyonundan önce pH değerleri kontrol edilmiştir. Böylece biyodönüşüm sırasında pH'nın ne şekilde değiştiği tespit edilmiştir.

pH ölçümleri pHmetre'de gerçekleştirilmiş olup, okumalar 24 ± 1 °C'de yapılmıştır.

3.2.12. Mikrobiyal canlılığın kontrolü

Her bir denemede, negatif kontrol ve pozitif kontrol için erlenler hazırlanmıştır. Negatif kontrol erleninde steril tampon çözelti ve izoöjenol bulunurken; erlene kültür ilavesi yapılmamıştır. Pozitif kontrol erlenine ise birebir biyodönüşüm koşulları uygulanmıştır.

Canlılığın kontrolünde Al-Bayati (2008) 'in kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Erlenlerden biyodönüşüm başlangıcında ve 120 saat sonunda 3'er ml örnek alınarak, örnekler ağzı pamuklu steril deney tüplerine aktarılmıştır. Deney tüplerinde bulunan örnekler üzerine 100 µL iodonitrotetrazolium chloride (INT) indikatör çözeltisi damlatılmıştır. 30 dk 28 °C'de bekletilen tüplerin üst kısmında kırmızı/pembe halka oluşanlarda mikrobiyal canlılığın var olduğu sonucuna varılmıştır.



şekil 3.8. INT ile yapılan mikrobiyal canlılık kontrolü

Çalışmada kullanılan INT, saf su içerisinde 0.2 mg/mL olarak hazırlanmış ve güneş ışığı almayacak şekilde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

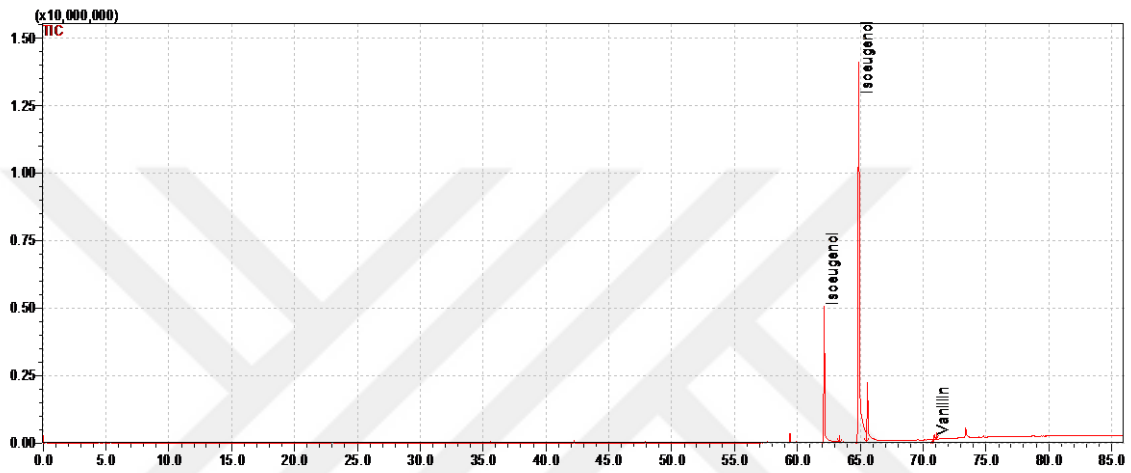
3.2.13. İstatistiksel analizler

Tüm analizler üç tekerrür olarak yapılmıştır. Analiz sonuçları ortalama ve $\pm$ standart sapma olarak grafiklerde belirtilmiştir. İstatistiksel analizde 'SPSS 16.0 for Windows' programı kullanılmıştır. Biyodönüşüm verimi üzerine etkili parametreler için elde edilen analiz sonuçları arasındaki farkların önem düzeyi One Way ANOVA testi ve Duncan post testiyle belirlenmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak önem düzeyleri 1, 2, 3... şeklinde sınıflandırılarak gösterilmiştir. Bu harflerin sayısı Duncan testinde oluşan grup sayısına göre, en düşük değerden en yüksek değere doğru belirlenmiştir. İstatistik verilerin değerlendirmesinde 0.05'lik önem düzeyi esas alınmıştır. Elde edilen istatistik tabloları 7. EKLER bölümünde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kromatografik Analizler

GC-MS ile gerçekleştirilen bileşen tanımlama işlemlerinde izoöjenol ve vanilin NIST ve FFNSC kütüphaneleri ile tespit edilmiştir. İzoöjenol cis- ve trans- formlara sahip olduğundan iki farklı noktada pik elde edilmiştir.



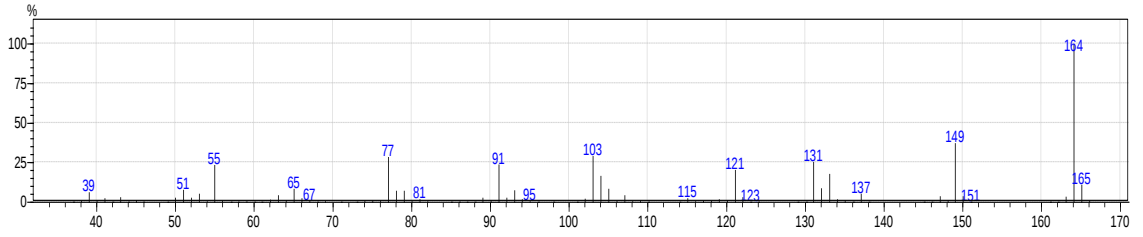
Şekil 4.1. İzoöjenol ve vanilin'e ait GC-MS pik profilleri

GC-MS kütüphaneleri dışında temel iyon dağılımları da kontrol edilerek piklerin doğrulaması gerçekleştirilmiştir. İzoöjenol'ün her iki izomerinde de 164 m/z'ye sahip iyon, temel iyon pikini oluşturmaktadır.

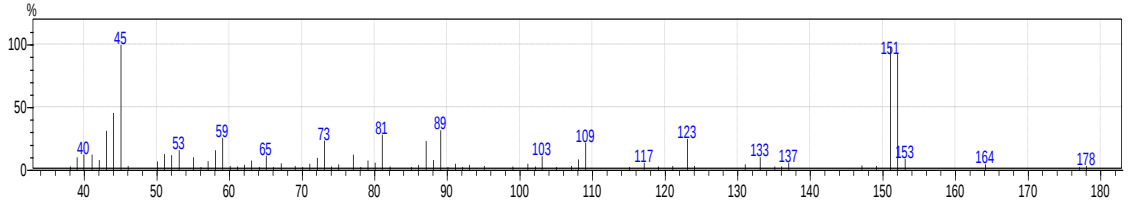
Vanilin'in kütle spektral dağılımı incelendiğinde 151 m/z'ye sahip iyon temel iyon olarak görülmektedir. Ayrıca kütle spektrumu içerisinde daha önce Vasudevan ve Bhat (2011) tarafından da belirtilen 137, 123, 109, 81, 65 ve 53 m/z'ye sahip iyonlar olduğu da görülmektedir. Elde edilen kütle spektral dağılımı biyodönüşüm sonucunda oluşan bileşiklerin içerisinde vanilin de olduğunu doğrular niteliktedir.

Ayrıca GC-MS'te tespit edilen piklere ait alıkonma indeksi (retention index, RI) literatür ile kıyaslanarak piklerin hangi bileşiklere ait olduğu kesinleştirilmiştir. İzoöjenol izomerlerine ait RI değerleri 2239 ve 2332 olarak bulunmuştur. Vanilin'in ise RI değeri 2547 olarak tespit edilmiştir. Kovats alıkonma indeksleri incelendiğinde izoöjenol için RI değeri 2365, vanilin için RI değeri 2589 olarak belirlenmiştir (Anonim, 2016b).

a) İzöjenol



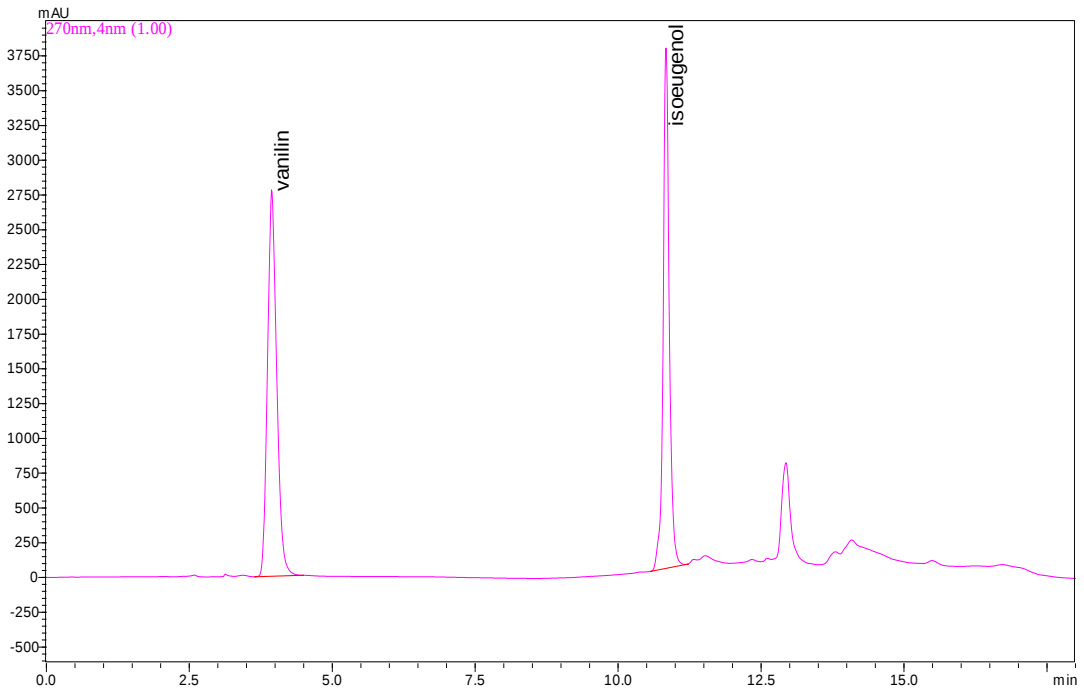
b) Vanilin



Şekil 4.2. Kütle spektral dağılımları

İzöjenol, aynı kütle spektral dağılımlara sahip cis- ve trans- izomerlere sahip olduğundan, GC-MS kullanılarak miktar tayini yapılması çok tatmin edici sonuçlar vermemektedir (Wang ve Sung, 2011). Bu nedenle GC-MS tanımlama için uygun iken HPLC miktar tayini için daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

İzöjenol ve vanilin standartları kullanılarak 270 nm'de gerçekleştirilen HPLC denemelerinde vanilin 3.9 dk'da gelirken izöjenol 10.9 dk'da gelmiştir. Elde edilen sonuçlar Li ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışma ile de uyum göstermektedir.



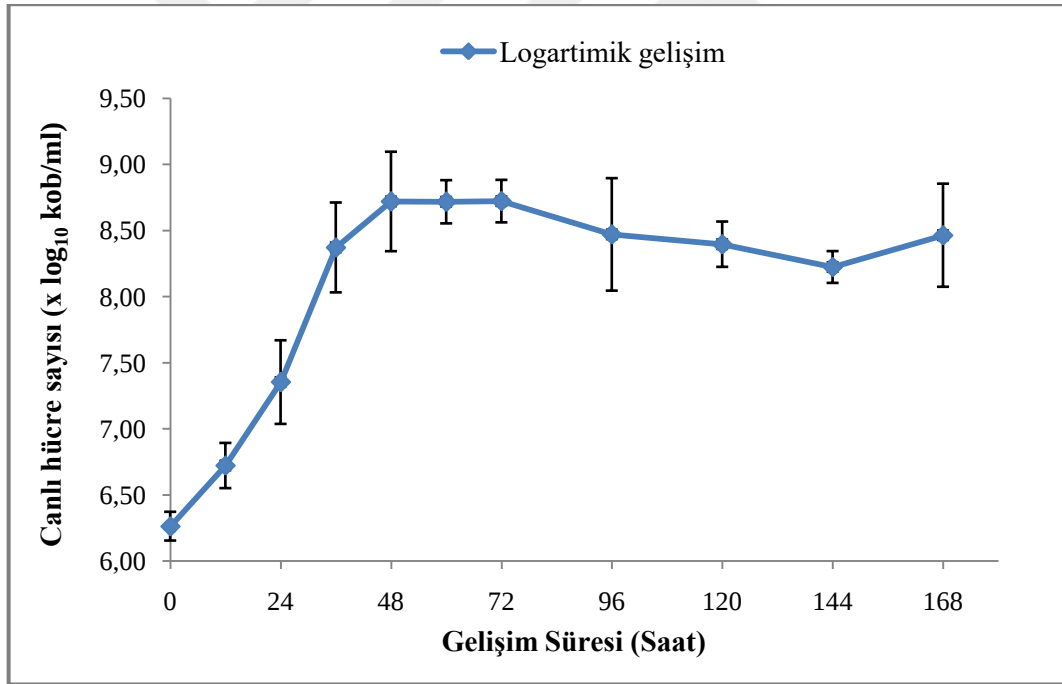
Şekil 4.3. İzöjenol ve vanilin standartlarına ait HPLC kromatogramı

Negatif kontrol denemeleri biyodönüşüm denemeleri ile birebir aynı şekilde gerçekleştirilmiş ancak negatif kontrol erlenlerine kültür inokülasyonu yapılmamıştır. HPLC ile gerçekleştirilen miktar tespit analizlerinde negatif kontrol erlenlerinde vanilin tespit edilmemiştir. Bu sonuç izoöjenol'ün vanilin'e abiyotik olarak dönüşümünün gerçekleşmediğine kanıt olarak kabul edilmiştir (Ashengroph vd., 2012).

4.2. Kültürün Gelişim Kinetiğinin Belirlenmesi

Biyodönüşüm çalışmalarının verimli bir şekilde yürütülebilmesi için kültürün geç dönem gelişme fazının (late-exponential phase) içinde bulunduğu an ya da duraklama fazının başlangıç anının tespiti büyük önem taşımaktadır.

GYP sıvı besiyeri içerisinde geliştirilen kültürlerden belli aralıklarla örnekler alınmış ve yapılan sayım sonuçları logaritmik olarak grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 4.4. Gelişim süresi boyunca canlı hücre sayısı

GYP sıvı besiyeri ortamına öze ile bir loop kültür alınarak yapılan inokülasyon sonucu ilk anda ortamda 1.9×10^6 kob/ml ($\approx 6.3 \times \log_{10}$) olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistik değerlendirmeleri sonucunda 0. ve 12. saatlerde koloni miktarları açısından önemli düzeyde bir fark olmadığı görülmüştür. Buna göre ilk 12 saatlik süre içerisinde

kültürün ortama adaptasyonun gerçekleştiği lag fazı içerisinde olduğu sonucuna varılmıştır.

24. saatte yapılan sayımda ise kendisinden önceki ve sonraki sayımlara göre anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde kültürün 24. saatte logaritmik artış evresinde olduğu tespit edilmiştir.

36. saat ve bunu izleyen saatlerde ise önemli düzeyde bir değişiklik tespit edilememiştir. Canlı hücre sayısının durağanlaştığı bu evrenin duraklama fazı olduğu sonucuna varılmıştır.

168 saatlik gelişim süresi boyunca en yüksek canlı hücre sayısına 48. saatte ulaşılmış ve 6.8×10^8 kob/ml ($\approx 8.8 \times \log_{10}$) düzeyine ulaşılmıştır. Bu saatten itibaren canlı hücre sayısı aynı logaritmik değer içerisinde kalmış ve kayda değer bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Biyodönüşüm çalışmalarında geç dönem logaritmik faz veya duraklama evresi başlangıcındaki kültürler tercih edilmektedir (Ashengroph vd., 2011). Çünkü lag fazı içerisinde hücreler henüz gelişim ve adaptasyon süreçlerini tamamlamamıştır. Öncül geç ilave edilmesi durumunda ise hücrelerin metabolik faaliyetlerini kaybetmeye başlamaları nedeniyle etkin bir üretim gerçekleştirilememektedir. Yapılan çalışmalar, öncül ile besleme zamanının vanilin verimi üzerine büyük etkisi olduğunu ortaya koymuştur (Ashengroph vd., 2010). Nitekim elde ettiğimiz sonuçlara göre logaritmik fazın bittiği ve hücrelerin duraklama evresine girdiği dönem olarak tespit edilen 48. saat besleme zamanı olarak seçilmiştir. Ayrıca bu sürede popülasyonun nicel olarak en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir.

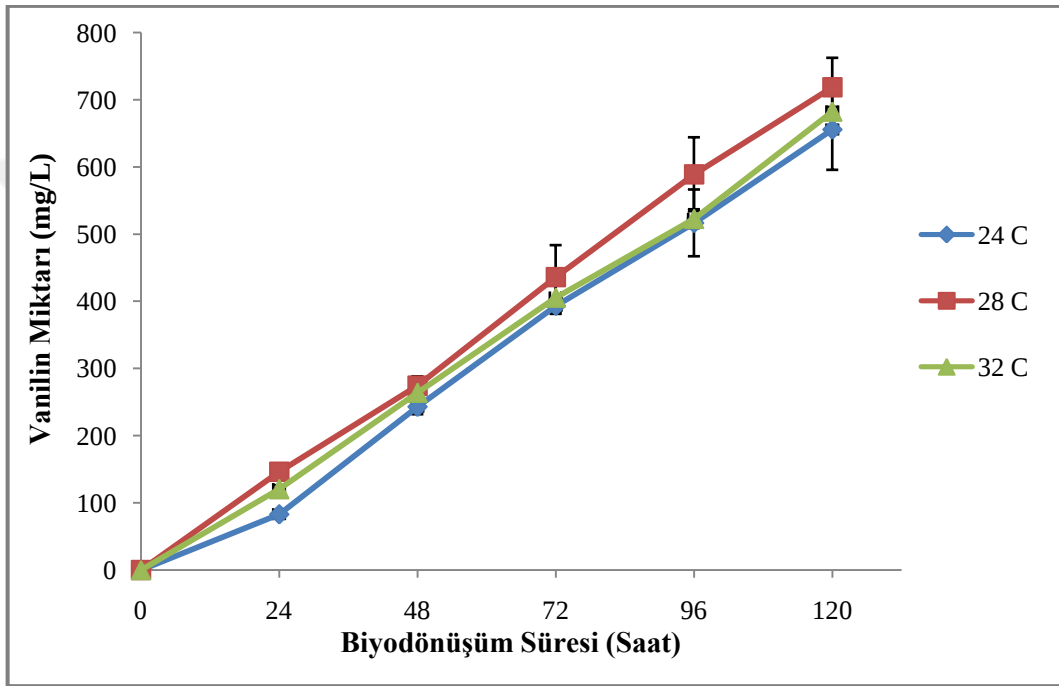
4.3. Sıcaklığın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın mikroorganizma gelişmesinde en önemli parametrelerden biri olduğu bilinmektedir. Mikroorganizmanın en iyi gelişme gösterdiği optimum sıcaklık değerinin aynı zamanda biyodönüşüm çalışması için de geçerli olup olmayacağı yapılan sıcaklık denemeleri ile belirlenmiştir.

26-30 °C kültür için belirlenen optimum gelişme sıcaklığıdır (Anonim, 2014a; Anonim, 2014b; Şeker vd., 2007). Bu noktadan hareketle belirtilen değerlerin altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda vanilin üretiminin ne şekilde etkilendiği araştırılmıştır.

Şekil 4.5. incelendiğinde gerek 24 gerekse 32 °C'de üretilen vanilin miktarının 28 °C'ye göre nispeten düştüğü görülmektedir. Literatürde de 20 °C'de vanilin oluşumunun yavaşladığı belirtilmiştir. Ayrıca vanilin oluşumunda 30 °C'de % 28, 40 °C'de % 30 ve 50 °C'de % 100 kayıp olduğu ortaya konulmuştur (Yamada vd., 2007).

İstatistiksel olarak 120 saat sonunda vanilin düzeyleri arasında anlamlı bir fark oluşmadığı belirlenmiştir. Biyodönüşüm süresince en yüksek vanilin üretimi 718.8 mg/L ile 28 °C'de elde edilmiştir.

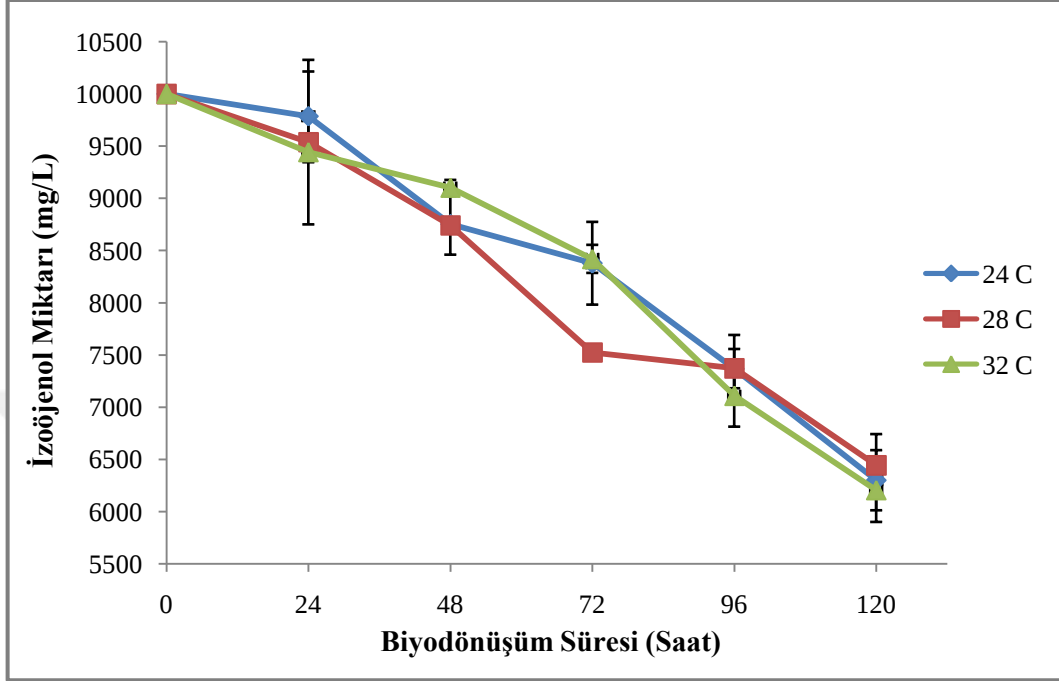


Şekil 4.5. Farklı sıcaklık değerlerinde tutulan biyodönüşüm ortamlarında vanilin miktarındaki değişim

Endüstriyel açıdan bakıldığında vanilin üretimi yanı sıra izoöjenol tüketimi de önem arz etmektedir. Sıcaklık denemelerinde biyodönüşüm ortamına % 1 izoöjenol ilave edilmiş ve meydana gelen değişim 24 saatlik aralıklarla 120 saat boyunca incelenmiştir.

Şekil 4.6.'ya bakıldığında 120 saat sonunda en az izoöjenol tüketiminin 28 °C'de olduğu görülmektedir. 28 °C'de gerçekleştirilen biyodönüşümün ilk günlerinde hızlı bir izoöjenol tüketimi olmasına rağmen ilerleyen saatlerde tüketim hızının yavaşladığı 120. saatin sonunda biyodönüşüm ortamında 6443.8 mg/L izoöjenol kaldığı tespit edilmiştir. Yine de denemesi yapılan sıcaklık değerlerinde izoöjenol tüketimi açısından önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır.

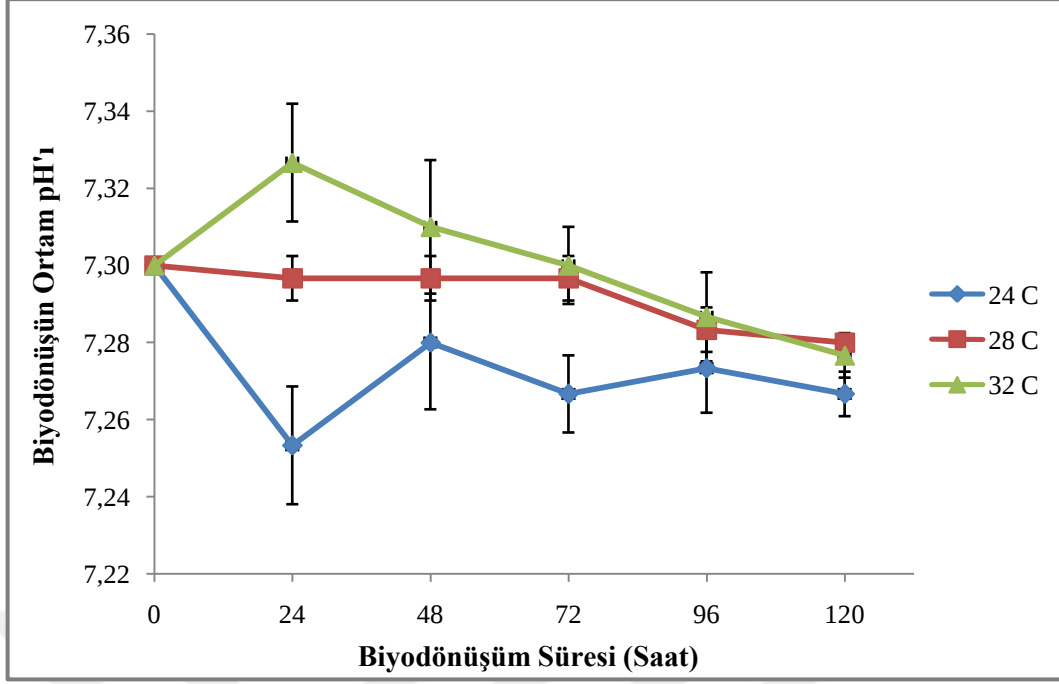
Sıcaklık etkisiyle oluşan vanilin ve tüketilen izoöjenol miktarlarında farklılık görülmesi, izoöjenol'ü indirgeyen enzim aktivitesinin sıcaklıktan etkilenmesine bağlanmaktadır (Yamada vd., 2007).



Şekil 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinde tutulan biyodönüşüm ortamlarında izoöjenol miktarındaki değişim

Molar verimin en üst seviyede tutulabilmesi adına vanilin üretiminin yüksek izoöjenol tüketiminin düşük olduğu değer olan 28 °C biyodönüşüm için optimum sıcaklık değeri olarak kabul edilmiştir.

Biyodönüşüm süresince ortamın pH değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçtan hareketle üretilen ve ortama bırakılan metabolitlerin pH değerlerinin, besiyeri pH'ından çok da farklı olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.7. Farklı sıcaklıklarda biyodönüşüm süresi boyunca meydana gelen pH değişimi

Tek karbon kaynağı olarak kullanılan izoöjenol, hücreler tarafından biyodönüşüm ile vanilin'e dönüştürülürken aynı zamanda hücrenin ihtiyaç duyduğu enerji gereksinimi karşılanmaktadır. Dolayısıyla biyodönüşüm oranının en yüksek olduğu koşullarda biyokütle artışının da en yüksek olması beklenmektedir. Biyodönüşüm sırasında biyokütlede en fazla ağırlık artışı 28 °C'de gerçekleşirken; en az değişim 24 °C'de görülmüştür. İzoöjenol'den en fazla yararlanan sıcaklık değerinin 28 °C, bu düşüncüyü ispatlar niteliktedir.

Çizelge 4.1. Ortam sıcaklığının biyokütle artışı üzerine etkisi

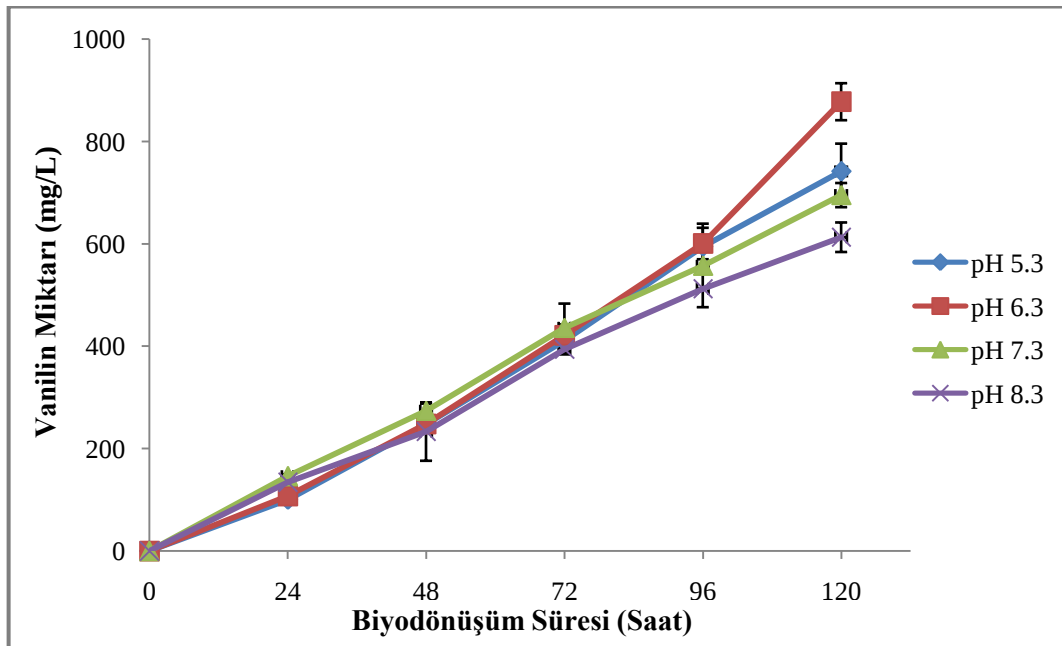
Sıcaklık (°C)	Başlangıç Kuru Biyokütle (gr)	120. Saat Sonunda Kuru Biyokütle (gr)	% Artış
24	0.1181 ± 0.0024	0.1302 ± 0.0077	10.3
28	0.1108 ± 0.0012	0.1264 ± 0.0108	14.1
32	0.1200 ± 0.0032	0.1344 ± 0.0020	12.0

Tüm sıcaklık değerlerinde INT indikatör kontrolü (+) sonuçlar vermiştir. Bu da kültürün, diğer *Pseudomonas putida* suşlarında olduğu gibi aromatik hidrokarbonları tek karbon kaynağı olarak kullanabildiği kanıtlanmıştır (Simon vd., 2014).

4.4. pH'ın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi

Sıcaklık denemelerinde durağan fazda tutulacak hücrelerin oluşturulması için Zhao ve ark. (2005) tarafından tanımlanan 14 g/L K_2HPO_4 ve 5.2 g/L KH_2PO_4 içeren tampon çözelti kullanılmıştır. Bu biyodönüşüm ortamının pH'ı 7.30 olarak saptanmıştır. Geçmiş çalışmalarda ise kültürün optimum gelişme gösterdiği pH değeri 6.80 olarak belirtilmiştir. (Şeker vd., 1997). K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 miktarlarında yapılan değişikliklere bağlı olarak biyodönüşüm ortamındaki pH değerleri değiştirilmiş ve kültürün mevcut durumda vanilin üretim kapasitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

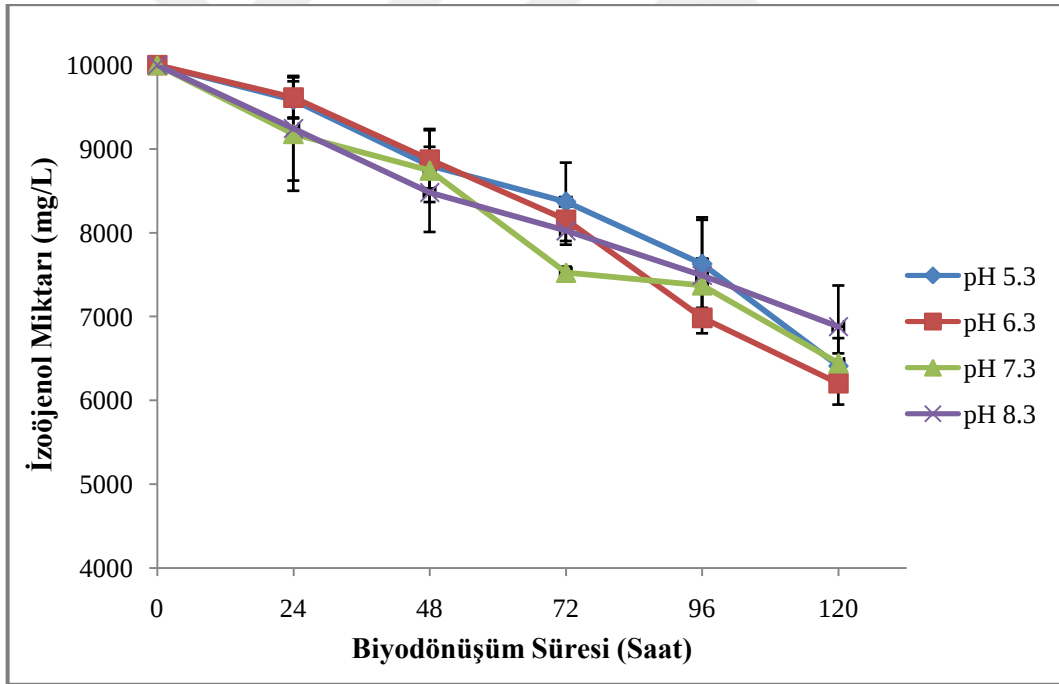
Şekil 4.8.'den de anlaşıldığı üzere, vanilin üretiminde pH 5.30 ve 7.30'da birbirine yakın değerler elde edilirken; pH 8.30'da vanilin üretiminin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür. Buna sebep olarak yüksek pH'ın mikrobiyal aktivite üzerine olumsuz etki yaptığı düşünülmektedir. pH 6.30'da ise diğer pH değerlerine nazaran anlamlı bir artış tespit edilmiştir. % 1 (w/v) izoöjenol konsantrasyonuna sahip pH 6.30'luk ortamda 120 saatte 877.9 mg/L vanilin elde edilmiştir. Bu miktar kültür pH 8.30'luk ortamda geliştirildiğinde 613.2 mg/L'ye düşmektedir. Deneme sonuçlarına dayanılarak kültürün hafif asidik ortamlarda daha etkin biyodönüşüm gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. En iyi gelişme gösterdiği pH değerine yakın bir noktada daha iyi biyodönüşüm etkinliği göstermesi enzimatik metabolizmanın bir sonucudur.



Şekil 4.8. Biyodönüşüm ortam pH'ının vanilin üretimi üzerine etkisi

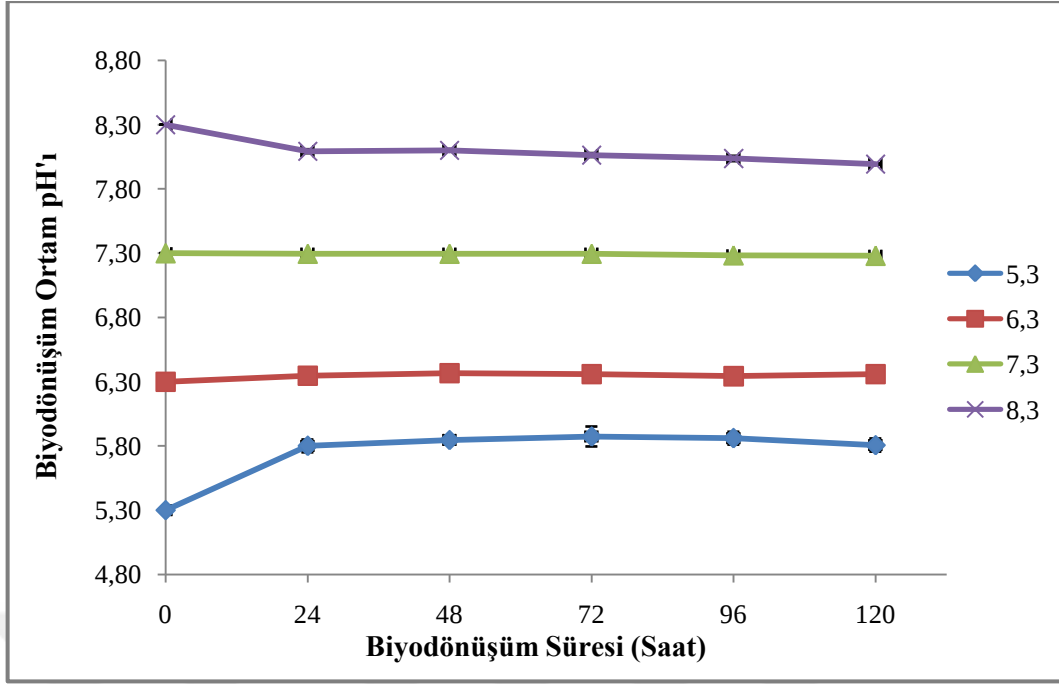
Biyodönüşüm çalışmalarında pH'ın vanilin verimine etkisi üzerine kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır. Ashengroph ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada potasyum fosfat tuzlarının üretilen vanilin miktarı üzerine önemli düzeyde etki yaptığını saptamışlardır. Elde edilen deneme sonuçlarına göre potasyum tuzlarının ve dolayısıyla pH'ın vanilin verimi üzerine etkili olduğu doğrulanmıştır.

Farklı pH değerlerinde tutulan kültürler arasında izoöjenol tüketimi açısından pH 6.30 ve 8.30'da anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. pH 8.30'da diğer deneme ünitelerine nazaran daha az izoöjenol tüketimi gerçekleşmiştir. pH 6.30'da ise diğer pH değerlerine oranla izoöjenol tüketiminin yüksek olduğu görülmektedir. pH 6.30'da tüketilen izoöjenol miktarının yüksek olması üretilen vanilin miktarında da artışla sonuçlanmıştır. Bu duruma kültürün hafif asidik koşullarda daha iyi gelişim göstermesinin sebep olduğu düşünülmektedir. pH 8.30 ise kültür yüksek pH değerinden etkilenmiş ve biyodönüşüm etkinliği önemli düzeyde azalmıştır.



Şekil 4.9. Biyodönüşüm ortam pH'ının izoöjenol tüketimi üzerine etkisi

24 saatlik ara ile yapılan pH ölçümleri sonucu ortam pH'ının 6.30-7.30 değerleri arasına ilerlediği görülmüştür. Bu duruma mikroorganizma tarafından üretilen ve ortama bırakılan metabolitlerin sebep olduğu; bu metabolitlerin ise 6.30-7.30 pH değerlerinde bulunduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.10. Biyodönüşüm süresince ortam pH'ında görülen değişim

Farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen denemelerde elde edilen biyokütle ağırlıkları içinde en fazla artış pH 6.30'da gerçekleşirken, en az artış pH 8.30'da gerçekleşmiştir. Nitekim vanilin ile biyokütle ağırlığı arasında doğrudan bir korelasyon bulunmamakla birlikte, izoöjenol'ün tüketiminin biyokütle artışı ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Zhao ve ark., 2005).

Biyodönüşüm ortamında izoöjenol dışında başka bir karbon kaynağı bulunmayışı, kültürü izoöjenolden faydalanmaya yöneltmiştir. Dolayısıyla izoöjenol tüketiminin yüksek olduğu pH değerlerinde elde edilen kuru biyokütle artışı da fazla olmuştur. Kültür gelişiminin daha iyi olduğu koşullarda izoöjenol tüketiminin yüksek olacağı ve buna bağlı olarak da vanilin üretiminin artacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.2. Ortam pH'ının biyokütle artışı üzerine etkisi

pH	Başlangıç Kuru Biyokütle (gr)	120. Saat Sonunda Kuru Biyokütle (gr)	% Artış
5.30	0.1148 ± 0.0053	0.1405 ± 0.0034	22.4
6.30	0.1128 ± 0.0069	0.1569 ± 0.0084	39.0
7.30	0.1108 ± 0.0012	0.1264 ± 0.0108	14.1
8.30	0.1177 ± 0.0061	0.1229 ± 0.0036	4.4

Pseudomonas türlerinin pH 5.0 ile 10.0 arası gibi geniş bir yelpazede gelişimlerine devam ettikleri bilinmektedir (Kasana vd., 2007; Ashengroph vd., 2011).

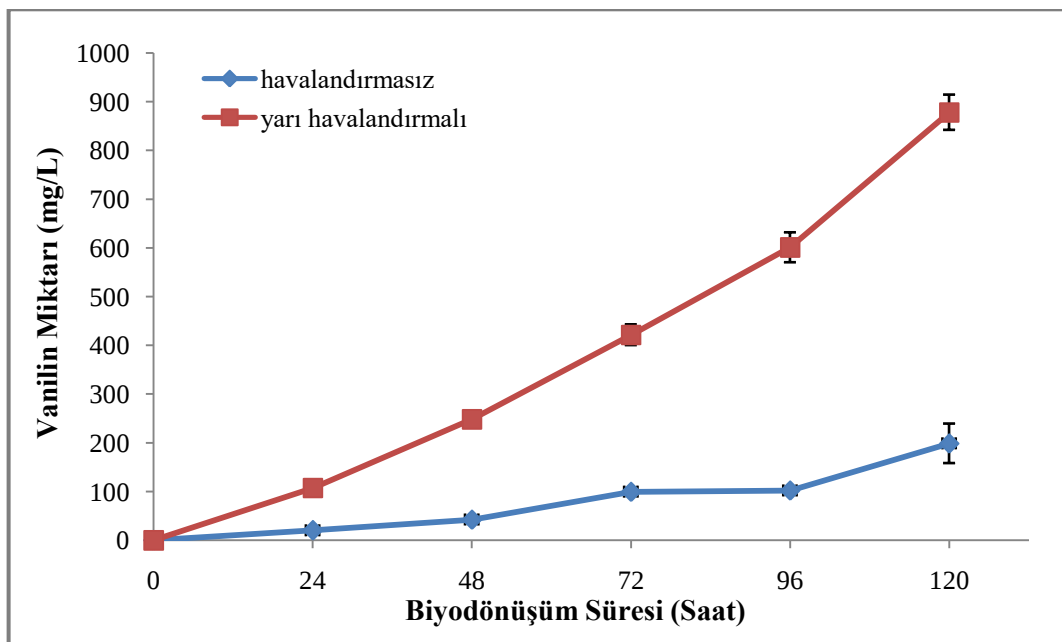
120 saat boyunca mikroorganizmalar pH 5.30 ile 8.30 arasında değişen biyodönüşüm ortamlarında tutulmuşlardır. INT ile gerçekleştirilen canlılık kontrollerinde biyodönüşüm süresince hücrelerin canlılıklarını korudukları tespit edilmiştir. Canlılığın korunmasında biyodönüşüm ortam pH'ının ekstrem noktalara gitmemesi ve kültürün izoöjenol'den faydalanabilmesi en önemli etkenlerdir.

4.5. Havalandırmanın Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi

Anaerobik koşullarda izoöjenol'den vanilin'e biyodönüşüm gerçekleşmediği bilinmektedir (Furukawa vd., 2003). Ancak oksijenin kısıtlandığı ve havalandırmanın kesildiği durumlarda biyodönüşüm veriminin nasıl etkileneceğine dair herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

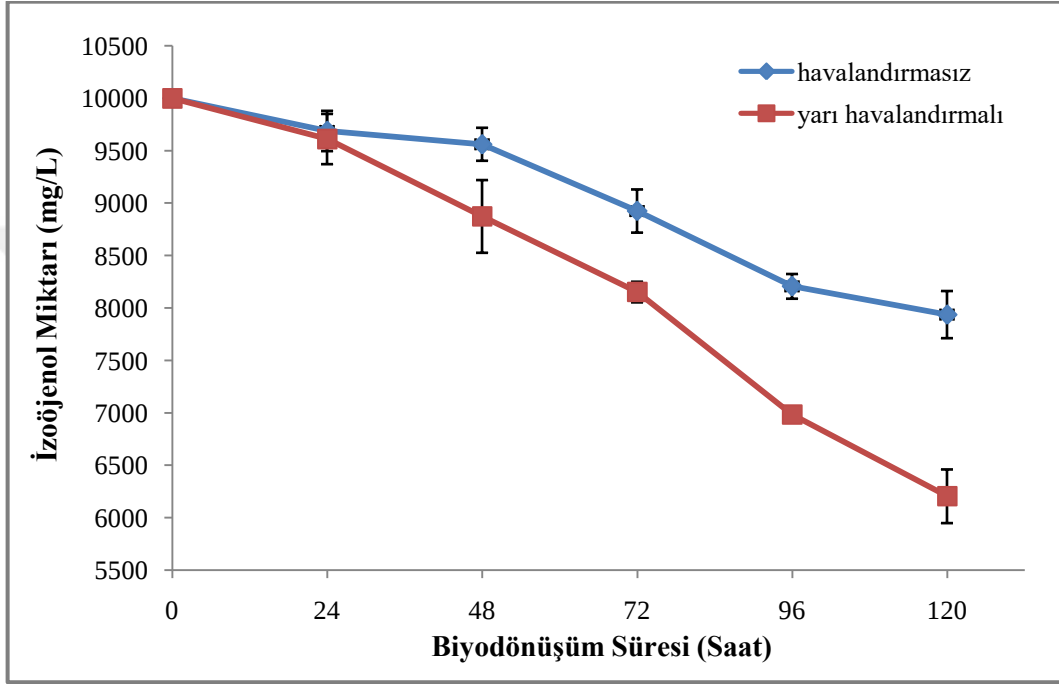
Biyodönüşüm ortamı içerisine azot gazı verilerek atmosferik oksijen biyodönüşüm ortamından uzaklaştırılmıştır. Ayrıca biyodönüşüm ortamının hava ile teması tamamen kesilmiştir. Bu sayede kültürün, tampon çözelti içerisinde çözünmüş oksijeni kullanarak biyodönüşüm faaliyetine devam etmesi sağlanmıştir.

Yapılan denemeler sonucunda biyodönüşüm ortamında oksijen miktarının azaltılması ve havalandırmanın kısıtlanması ile vanilin miktarında ciddi bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Yarı havalandırılmalı ortamda 877.9 mg/L vanilin elde edilmişken; havalandırmazsız ortamda 198.7 mg/L düzeyinde vanilin elde edilebilmiştir.



şekil 4.11. Biyodönüşüm ortamında havalandırmanın vanilin üretimi üzerine etkisi

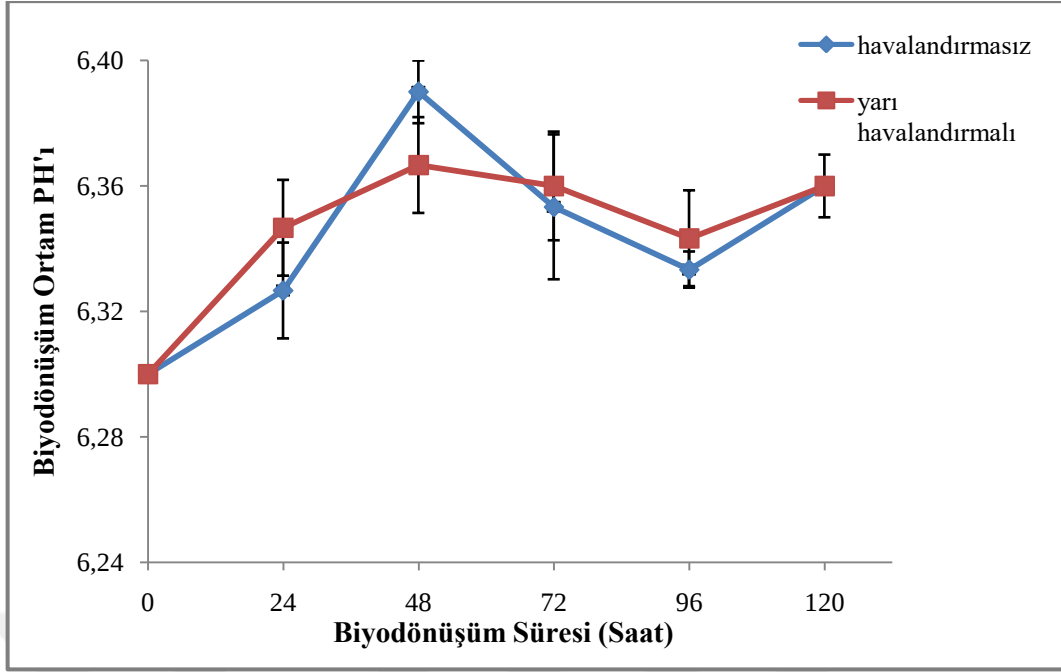
Havalandırmanın kısıtlandığı ortamda izoöjenol tüketiminin de oldukça azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda sadece izoöjenol tüketimi ve vanilin üretimi azalmakla kalmamış; kültürün birim izoöjenol'den yararlanma oranı da düşmüştür. Biyodönüşüm ortamında kültür tarafında kullanılan izoöjenol miktarı baz alındığında yarı havalandırmalı ortamda molar verim % 25.0 iken havalandırmasız ortamda molar verim % 10.4'te kalmıştır.



Şekil 4.12. Biyodönüşüm ortamında havalandırmanın izoöjenol tüketimi üzerine etkisi

Buna göre havalandırmanın kısıtlanması mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerini yavaşlattığı; dolayısıyla hem molar verimin hem de vanilin miktarının anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır. Özellikle izoöjenol'ün degradasyonunun oksidatif reaksiyonlarla gerçekleştiği ve ortamdaki oksijenin kısıtlanmasıyla vanilin üretiminde düşüşün kaçınılmaz olduğu düşünülmektedir (Furukawa vd., 2003).

Havalandırmanın kısıtlandığı ortamda yarı havalandırmalı ortama göre önemli bir pH değişimi görülmemiştir. Bunun nedeni Bölüm 4.4'te açıklandığı gibi mikroorganizma tarafından üretilen metabolitlerin 6.30-7.30 arası pH değerlerinde olmasıdır. Ortam pH'ının da 6.30 seviyesinde olması nedeniyle üretilen metabolit miktarındaki değişimlere rağmen ortam pH'ı etkilenmemiştir.



Şekil 4.13. Havalandırmanın biyodönüşüm ortam pH'ı üzerine etkisi

Yarı havalandırılmalı ortamda, havalandırmazsız ortama göre nispeten daha yüksek biyodönüşüm gözlenmesi biyokütle de daha fazla artışa sebep olmuştur. Havalandırmazsız ortamda % 10.5 oranında kuru ağırlık artışı tespit edilirken bu oran yarı havalandırılmalı ortamda % 39'a çıkmıştır. Bu durum yarı havalandırılmalı ortamda biyodönüşümle izoöjenol'den daha fazla yararlanmanın doğal bir sonucudur.

Çizelge 4.3. Havalandırmanın biyokütle artışı üzerine etkisi

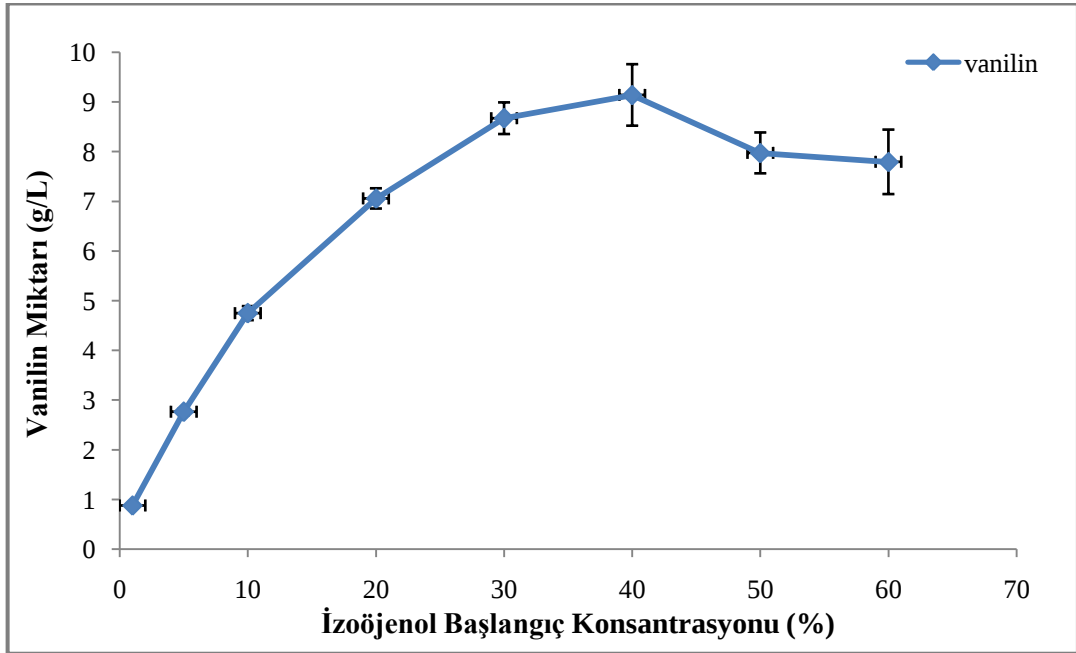
Havalandırma	Başlangıç Kuru Biyokütle (gr)	120. Saat Sonunda Kuru Biyokütle (gr)	% Artış
Havalandırmazsız	0.1167 ± 0.0015	0.1289 ± 0.0033	10.5
Yarı Havalandırılmalı	0.1128 ± 0.0069	0.1569 ± 0.0084	39.0

Havalandırmazsız ortamda oksijen sadece biyodönüşüm ortamı atmosferinden uzaklaştırılmış olup, tampon çözelti içerisindeki çözünmüş oksijene müdahale edilmemiştir. Ayrıca denemelerin gerçekleştiği 250 ml'lik şişeler içindeki atmosferik oksijen uzaklaştırıldıktan sonra şişelerin kapakları sıkıca kapatılmış ve hava ile teması tamamen kesilmiştir. INT indikatörü ile yapılan kontrollerde aerobik bir bakteri olan *Pseudomonas putida*'nın oksijeni sınırlandırılmış ortamda 120 saat boyunca canlılığını koruyabildiği ortaya konmuştur.

4.6. İzoöjenol Konsantrasyonunun Vanilin Üretimi Üzerine Etkisi

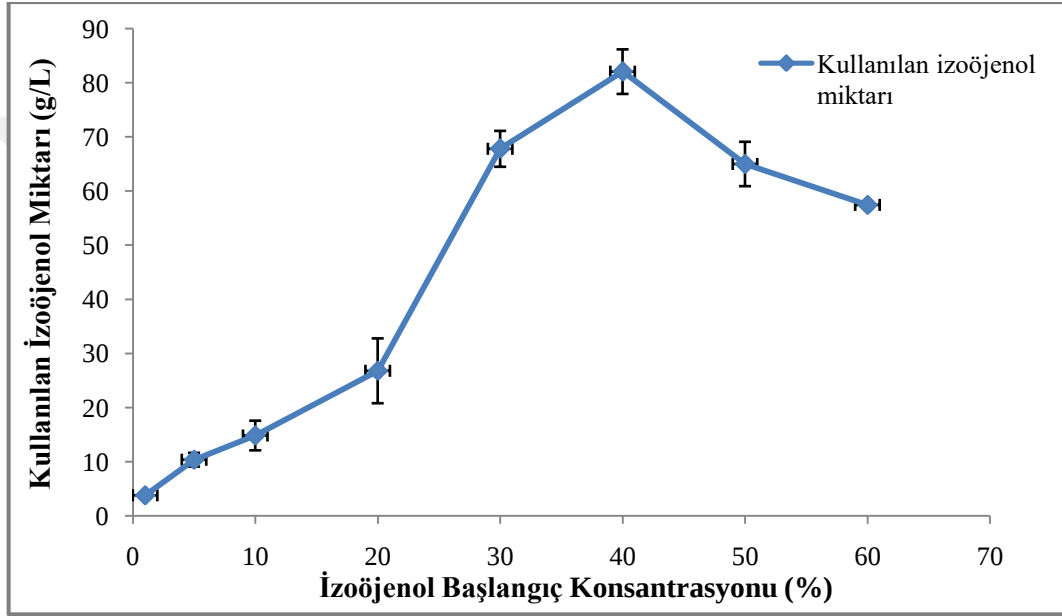
Biyodönüşüm için optimum sıcaklık, pH ve havalandırma durumu belirlendikten sonra izoöjenol miktarının artırılması ile toplam vanilin üretimi ve molar verimin hangi konsantrasyona kadar artacağı araştırılmıştır. Denemelerde % 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'lık (w/v) izoöjenol konsantrasyonları kullanılmıştır. 120 saat sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.14.'te verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre 120 saat sonunda % 40 izoöjenol içeren biyodönüşüm ortamında 9.14 g/L ile en yüksek vanilin miktarına ulaşılmıştır. % 50'den itibaren vanilin miktarında önemli düzeyde bir düşüş olduğu görülmektedir. Zhao ve ark. (2005) tarafından *Bacillus fusiformis* kültürü kullanılarak gerçekleştirilen benzer bir çalışmada % 60 (v/v) izoöjenol içeren ortamda en yüksek vanilin üretimine ulaşılmış, daha yüksek konsantrasyonlarda ise vanilin miktarında azalma görülmüştür. Dolayısıyla çift fazlı sistem denemelerinde belli bir substrat oranına kadar vanilin üretiminin arttığı ancak bir noktadan sonra etkinliğin düşmeye başladığı görülmektedir. Bu düşüşe sebep olarak yüksek izoöjenol konsantrasyonlarında dispers olan prekürsör miktarının arttığı; buna bağlı olarak da mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon görülmeye başladığı düşünülmektedir. Zhao ve ark. (2005) tarafından elde edilen sonuçlar da denememizde ulaşılan sonucu ve görüşleri destekler niteliktedir.



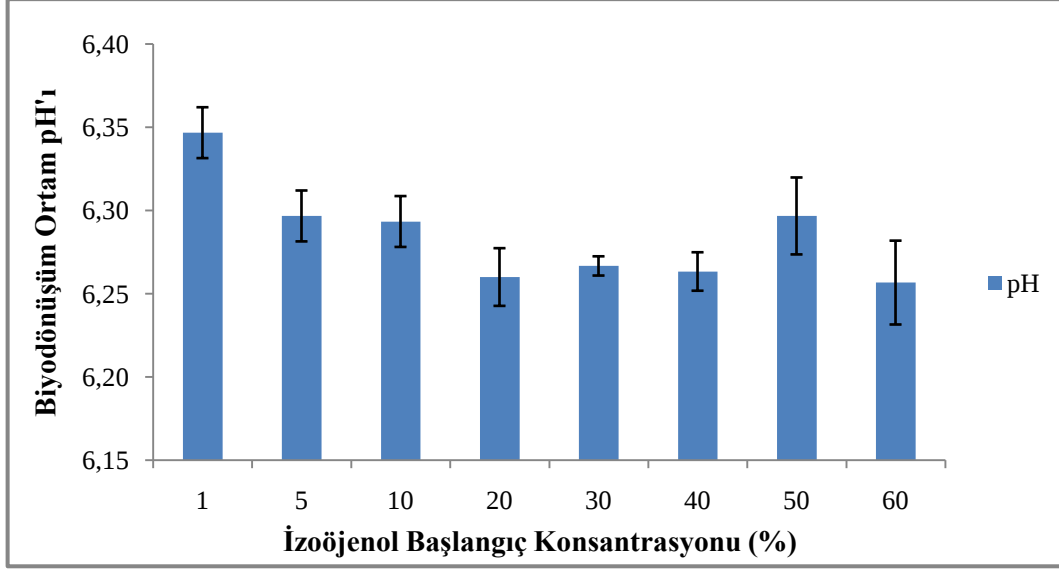
Şekil 4.14. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının vanilin üretimi üzerine etkisi

İzoöjenol kullanım miktarları incelendiğinde % 40'lık prekürsör konsantrasyonuna kadar izoöjenol tüketiminin de arttığı ancak daha yüksek miktarlarda ise tüketilen izoöjenol miktarının azaldığı görülmektedir. % 40'lık konsantrasyonların üzerine çıkıldıkça öncül maddenin sitotoksik etkisine bağlı olarak izoöjenol'den faydalanma oranının da azaldığı sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar vanilin üretimi ile paralellik göstermektedir. Geçmiş çalışmalar da en yüksek vanilin seviyesine ulaşıldıktan sonra artan prekürsör konsantrasyonuna rağmen izoöjenol tüketiminde bir miktar düşüş olduğunu göstermiştir (Zhao ve ark., 2005).



Şekil 4.15. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının izoöjenol tüketimi üzerine etkisi

Biyodönüşüm ortamında izoöjenol miktarındaki artışa bağlı olarak ortam pH'ında önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bunda biyodönüşüm ortamı ile ortama bırakılan hücrel metabolitlerin pH'ları arasında önemli düzeyde bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.16. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarında ortam pH'ında görülen değişim

Biyodönüşüm ortamına alınmış hücreler canlılığını sürdürebilmek ve gelişebilmek için izoöjenol'ü tek karbon kaynağı olarak kullanmak zorundadırlar. Buna bağlı olarak izoöjenol tüketiminin fazla olduğu konsantrasyonda daha fazla biyokütle oluşumu beklenir. Çizelge 4.4. incelendiğinde yüzdesel olarak en fazla biyokütle artışının % 40 izoöjenol içeren ortamda gerçekleştiği görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise öncül maddenin sitotoksik etkisine bağlı olarak gelişim hızı yavaşlamaya başlamıştır.

Çizelge 4.4. Farklı izoöjenol konsantrasyonlarının biyokütle miktarı üzerine etkisi

İzoöjenol Konsantrasyonu (%)	Başlangıç Kuru Biyokütle (gr)	120. Saat Sonunda Kuru Biyokütle (gr)	% Artış
1	0.1217 ± 0.0034	0.1360 ± 0.0014	11.8
5	0.1132 ± 0.0036	0.1262 ± 0.0151	11.4
10	0.1164 ± 0.0016	0.1365 ± 0.0017	17.3
20	0.1095 ± 0.0015	0.1336 ± 0.0022	22.0
30	0.1107 ± 0.0010	0.1405 ± 0.0011	26.9
40	0.1189 ± 0.0056	0.1630 ± 0.0075	37.1
50	0.1205 ± 0.0088	0.1563 ± 0.0065	29.8
60	0.1188 ± 0.0036	0.1531 ± 0.0031	28.9

Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'ten artan izoöjenol konsantrasyonunun % 40'dan sonra toksik etki yapmaya başladığı görülmektedir. INT ile yapılan canlılık kontrolünde ise 120 saatlik süreçte % 60 prekürsör konsantrasyonuna kadar kültürün tam olarak (% 100) inhibe olmadığı anlaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Pseudomonas putida* kültürü kullanılarak izoöjenol'den doğal vanilin üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek vanilin miktarının artırılması için yapılan denemelerle biyodönüşüm üzerine etkili olduğu düşünülen parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik analizlerde kültür içermeyen biyodönüşüm ortamında vanilin tespit edilemezken; ortama kültür inoküle edildiğinde vanilin oluşumu görülmüştür. Bu durum abiyotik olarak vanilin oluşumu gerçekleşmediği ve oluşan vanilin'in biyokatalist tarafından üretildiğine kanıt kabul edilmiştir.

Kültürün gelişim kinetiği incelendiğinde 36. saate kadar hızlı bir gelişim gözlenirken bu saatten sonra popülasyonda önemli düzeyde bir değişiklik görülmemiştir. Populasyon en üst noktaya 6.8×10^8 kob/ml ile 48. saatte ulaşmıştır. Canlı hücre sayısının en üst düzeye ulaştığı 48. saate durağan faz içerisindeki hücrelerin biyodönüşüm denemelerinde kullanılması kararlaştırılmıştır.

En yüksek vanilin üretimi 28 °C'de ve pH'ı 6.30 olan biyodönüşüm ortamında elde edilmiştir. Geçmiş çalışmalarda bu değerler aynı zamanda kültürün optimum gelişme koşulları olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla kültürün optimum gelişme gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinde biyodönüşüm etkinliği de yüksek olmaktadır. Diğer durumlarda metabolik faaliyetlerin yavaşlamasına bağlı olarak vanilin üretim hızının da ivmesini kaybettiği düşünülmektedir.

Havalandırmanın kısıtlandığı durumda ise vanilin üretiminde ciddi oranda azalma kaydedilmiştir. Bu düşüş, izoöjenol'ün hücrede oksidatif degradasyonla vanilin'e indirgenmekte olduğunu düşündürmüştür.

% 1'den % 60'a (w/v) kadar izoöjenol içeren ortamlarda kültürün biyodönüşüm performansları araştırılmıştır. Denemeler sonucu % 40'a kadar vanilin üretimi ve izoöjenol tüketimi eş zamanlı olarak artarken; % 40'ın üzerine çıkıldıkça hem üretilen vanilin hem de tüketilen izoöjenol miktarları düşmüştür. Bu düşüşe sebep olarak öncül maddenin *P. putida* kültürü üzerinde sitotoksik etki göstermeye başladığı düşünülmektedir. % 40 izoöjenol konsantrasyonunda gerçekleştirilen 120 saatlik denemeler sonucunda % 12.0 molar verimle 9.14 g/L vanilin üretilmiştir.

Tüm denemelerde ortam pH'ının 6.30-7.30 arasında kalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Dolayısıyla hücre tarafından ortama bırakılan metabolitlerin besiyeri pH'ını değiştirecek kuvvette olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ayrıca izoöjenol'ün vanilin'e biyodönüşümü ile izoöjenol'ün *P. putida* tarafından tek karbon kaynağı olarak kullanılabildiği görülmüştür. Elde edilen kuru hücre ağırlığı ve tüketilen izoöjenol arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. İzoöjenol tüketimi arttıkça elde edilen biyokütle miktarı da artmaktadır. Bu sonuçtan hücrenin, gelişimi için gerekli enerjiyi biyodönüşüm sayesinde temin ettiği değerlendirilmiştir.

Günümüzde mikrobiyal yollarla vanilin üretimi çoğunlukla ferulik asidin biyodönüşümü ile gerçekleştirilmektedir. Ma ve ark. (2014), *Amycolatopsis sp.* ile gerçekleştirdikleri çalışmada ferulik asitten 9.18 g/L vanilin elde etmeyi başarmışlardır. Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde daha yüksek kapasiteli prosesler geliştirilmeye çalışılmaktadır. İzoöjenol'ün biyodönüşümü de ferulik asit biyodönüşümüne alternatif olarak araştırması yapılan yollardan biridir. Geçmiş çalışmalar incelendiğinde izoöjenol'den üretilen vanilin miktarının çoğunlukla 2 g/L'nin altında olduğu görülmektedir. Zhao ve ark. (2005) diğer biyodönüşüm denemelerinden farklı olarak çift fazlı sistem denemesi gerçekleştirmiş ve daha yüksek miktarda vanilin üretmeyi başarmışlardır. *B. fusiformis* 'in biyokatalist olarak kullanıldığı bu çalışmada % 60 (v/v) izoöjenol içeren biyodönüşüm ortamında 72 saatte 32 g/L vanilin üretilmiştir. *P. putida* HUT 8100 kültürü ile yaptığımız 120 saatlik biyodönüşüm denemesinde % 12.0 molar verimle 9.14 g/L vanilin elde edilmiştir. Bu miktar, mutant olmayan kültürlerle gerçekleştirilen izoöjenol'den vanilin'e biyodönüşüm çalışmaları içerisinde elde edilen en yüksek 3. vanilin miktarıdır.

Düşük izoöjenol konsantrasyonlarında çalışıldığında prekürsör, kültür tarafından yaklaşık olarak 72 saatte tüketilmektedir. Ancak çift fazlı sistemde yüksek miktarda izoöjenol konsantrasyonu kullanılmış ve herhangi bir anda su fazı içerisinde dispers olan yağ miktarı belli sınırlar içerisinde kalmıştır. Bu sayede hem yüksek dozların toksik etki göstermesi engellenmiş hem de besleme ihtiyacı ortadan kalkmıştır. 120. saatten sonra da vanilin'e biyodönüşümün devam edeceği öngörülmektedir. 120. saatten sonra da her 24 saatte bir örneklemeye devam edilerek, kültürün biyodönüşüme ne kadar devam edeceği tespit edilmelidir.

Endüstriyel uygulamalarda üretilen ürünün miktarı yanında verimlilik de ön plana çıkan parametrelerden biridir. Biyodönüşüm etkinliğinin arttırılabilmesi için minimum izoöjenol sarfiyatı ile maksimum ürün alınması gerekmektedir. Kültürün zaman içinde yaşlanmasına bağlı olarak ilerleyen süreçte etkinliğini kaybedeceği aşıkardır. Proses sonlandırıldığında biyodönüşüm ortamında kalan izoöjenol'ün geri kazanımıyla molar verim endüstriyel açıdan arzu edilen seviyeye çıkarılabilir. Keza biyodönüşüm ortamından alınan izoöjenol'ün tekrar tekrar kullanılabileceği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2006). Yoğunluk farkından yararlanılarak santrifüjleme ile veya kaynama noktası farkından yararlanılarak evaporasyon ile izoöjenol'ün geri kazanılabileceği öngörülmektedir.

Biyodönüşüm işlemi sonunda vanilin'in saflaştırılması için en etkili yöntemin de belirlenmesine ihtiyaç vardır. Aromatik maddelerin eldesinde adsorbsiyon reçinelerinin kullanımı oldukça yaygındır. Saflaştırma için öncelikli olarak biyodönüşüm denemesine uygun reçine türünün tespiti gerekmektedir. Reçinenin belirlenmesine müteakip saflaştırma basamaklarının da ortaya konulması ilerleyen çalışmalarda araştırılması gereken konulardandır.

6. KAYNAKLAR

Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). Factors affecting the growth and survival of microorganisms in foods (20-62). Adams, M.R., Moss, M.O. (Ed.), *Food Microbiology* (3rd Ed.). RSC Publishing, Cambridge.

Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **116**, 403-406.

Anonim. (1997). *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*. Resmi Gazete No. 23172, Tarih 16 Kasım, 1997.

Anonim. (2007). SPSS 16.0.0. *IBM Analytics*. Sürüm Tarihi: 13 Eylül, 2007.

Anonim. (2008). *Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council*. Official Journal of the European Union L 354/34, Tarih 31 Aralık 2008.

Anonim. (2014a). <http://home.hiroshima-u.ac.jp/hut/search.html>. (Erişim tarihi: 28 Aralık, 2014).

Anonim. (2014b). https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/12633.aspx?geo_country=tr#culturemethod. (Erişim tarihi: 28 Aralık, 2014).

Anonim. (2016a). http://www.leffingwell.com/top_10.htm. (Erişim tarihi: 30 Temmuz, 2016).

Anonim. (2016b). <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>. (Erişim tarihi: 24 Kasım, 2016).

Anuradha, K., Shyamala, B.N., Naidu, M.M. (2013). Vanilla: its science of cultivation, curing, chemistry and nutraceutical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **53**, 1250-1276.

Ashengroph M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Momenbeik, F. (2010). Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. *Biocatalysis and Biotransformation*. **28** (5-6), 339-347.

Ashengroph M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Momenbeik, F. (2011). Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of natural vanillin via conversion of isoeugenol. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **10** (4), 749-757.

Ashengroph M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Momenbeik, F. (2012). Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1-12.

Brazinha, C., Barbosa, D.S., Crespo, J.G. (2011). Sustainable recovery of pure natural vanillin from fermentatiton media in single pervaporation step. *Green Chem.* **13**, 2197-2203.

- Berger, R.G., Krings, U., Zorn, H. (2010). Biotechnological flavour generation (89-126). Taylor, A.J., Linforth, R.S.T. (Ed.), *Food Flavour Technology* (2nd Ed.). Wiley-Blackwell Publishing, Sussex.
- Cabaroğlu T., Yilmaztekin, M. (2012). Aroma biyoteknolojisi (375-392). Aran, N. (Ed.), *Gıda Biyoteknolojisi* (2nd Ed.). Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Chen, H., Yao, J., Wang, F., Cai, M., Liu, H. (2012). Toxicity of perfluorooctanoic acid to *Pseudomonas putida* in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. **262**, 726-731.
- Dignum, M.J.W., Kerler, J., Verpoorte, R. (2001). Vanilla production: technological, chemical and biosynthetic aspects. *Food Reviews International*. **17** (2), 199-219.
- Fahlbusch, K.G., Hammerschmidt, F.J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2012). Flavors and fragrance (73-192). Wiley VCH (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Vol. 15, Wiley-VCH, Weinheim.
- Feron, G., Wache, Y. (2006). Microbial Biotechnology of Food Flavour Production (407-433). Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Ed.), *Food Biotechnology*, CRC Press, New York, USA.
- Frater, G., Bajgrowicz, J.A., Kraft, P. (1998). Fragrance chemistry. *Tetrahedron*. **54**, 7633-7703.
- Furukawa, H., Morita, H., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2003). Conversion of isoeugenol to vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol degrading activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **96** (4), 401-403.
- Glazer, A.N., Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* (2nd Ed). Cambridge University Press, Cambridge, 554 s.
- Gounaris, Y. (2010). Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates: A review. *Flavour Fragr. J.* **25**, 367-386.
- Gusevskaya, E.V., Menini, L., Parreira, L.A., Mesquita, R.A., Kozlov, Y.N., Shul'pin, G.N. (2012). Oxidation of isoeugenol to vanillin by the 'H₂O₂-vanadate-pyrazine-2-carboxylic acid' reagent. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. **363-364**, 140-147.
- Hansen, E.H., Moller, B.L., Kock, G.R., Bünner, C.M., Kristensen, C., Jensen, O.R., Okkels, F.T., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Hansen, J. (2009). *De novo* biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Applied and Environmental Microbiology*. **75** (9), 2765-2774.
- Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C. (2008). Biotechnological production of vanillin (83-103). Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C. (Ed.), *Biotechnology in Flavor Production*. Blackwell Publishing, Oxford.

- Heuvel van den, R.H.H., Fraaije, M.W., Laane, C., Berkel van, B.J.H. (2001). Enzymatic synthesis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2954-2958.
- Hua, D., Ma, C. Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B., Xu, P. (2007). Biotransformation isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites. *Journal of Biotechnology*. **130**, 463-470.
- Hudlicky, T., Reed, J.W. (2009). Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3117-3132.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P.R., Rathod, V.K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*. **93**, 421-426.
- Janssens, L., de Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*. **27**, 195-215.
- Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., Venkatamaran, L.V. (1996). Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **44**, 117-121.
- Kasana, R.C., Sharma, U.K., Sharma, N., Sinha, A.K. (2007). Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanilin. *Current Microbiology*. **54**, 457-461.
- Kaur, B., Chakraborty, D. (2013) Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Appl Biochem Biotechnol*. **169**, 1353-1372.
- Krings, U., Berger, R.G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**, 1-8.
- Li, K., Frost, J.W. (1998). Synthesis of vanillin from glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10545-10546.
- Li, Y.H., Sun, Z.H., Zhao, L.Q., Xu, Y. (2005). Bioconversion of isoeugenol into vanillin by crude enzyme extracted from soybean. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **125**, 1-10.
- Li, Y.H., Sun, Z.H., Zheng, P. (2004). Determination of vanillin, eugenol and isoeugenol by RP-HPLC. *Chromatographia*. **60**, 709-713.
- Longo, M.A., Sanroman, M.A. (2006). Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotech.* **44**, 335-353.
- Ma, X., Daugulis, A.J. (2014). Effect of bioconversion conditions on vanillin production by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation. *Bioprocess Biosyst Eng.* **37**, 891-899.
- Markus, P.H., Peters, A.L.J., Roos, R. (1992). *Process for the preparation of phenylaldehydes*. European Patent Application, EP 0 542 348 A2.

- Meessen L.L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J.F., Ceccaldi, B.C., Brunerie, P., Asther, M. (1996). A two step bioconversion for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*. **50**, 107-113.
- Molina, G., Bicas, J.L., Moraes, E.A., Marostica, M.R., Pastore, G.M. (2013). Recent Developments and Industrial Perspectives in the Microbial Production of Bioflavors (122-157). Gupta, V.K., Schmoll, M., Mautti, M.A., Maki, M., Tuohy, M.G. (Ed.), *Application of Microbial Engineering*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Muratoğlu, H., Demirbağ, Z., Sezen, K. (2011). An entomopathogenic bacterium, *Pseudomonas putida*, from *Leptinotarsa decemlineata*. *Turk J Biol*. **35**, 275-282.
- Pamir, M.H. (1985). Teknikte kullanılan mikroorganizmalar (10-43). Pamir, M.H. (Ed.), *Fermentasyon Mikrobiyolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**, 296-314.
- Rana, R., Mathur, H., Jain, C.K., Sharma, S.K., Mathur, G. (2013). Microbial production of vanillin. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. **4** (3), 227-234.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of and Agriculture*. **80**, 289-304.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **20**, 101-153.
- Rasoamandrary N., Fernandes, A.M., Bashari, M., Masamba, K., Xueming, Xu. (2013). Improved extraction of vanillin 4-Hidroxy-3-methoxybenzaldehyde from cured vanilla beans using ultrasound assisted extraction: a comparison of ultrasound-assisted hot water bath extraction. *Akademik Gıda*. **11** (1), 6-12.
- Reineccocus, G. (2005). *Flavor Chemistry and Technology* (2nd Ed.). CRC Press, Boca Raton, USA, 520 s.
- Ryu, J.Y., Seo, J., Park, S., Ahn, J.H., Chong, Y., Sadowsky, M.J., Hur, H.G. (2013). Characterization of an isoeugenol monooxygenase (Iem) from *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 that transforms isoeugenol to vanillin. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **77** (2), 289-294.
- Sanchez, S., Demain, A.L. (2011). Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*. **15**, 224-230.
- Sciubba, L., Di Gioia, D., Fava, F., Gostoli, C. (2009). Membrane-based solvent extraction of vanilin in hollow fiber contactors. *Desalination*. **241**, 357-364.

- Sen, M., Dastidar, M.G. (2010). Biosorption of Cr (VI) by resting cells of *Fusarium Solani*. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* **8** (2), 153-158.
- Serra, S., Fuganti, C., Brenna, E. (2005). Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology.* **23**, 193-198.
- Shimoni E., Ravid, U., Shoham, Y. (2000). Isolation of *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Journal of Biotechnology.* **78**, 1-9.
- Silva, A.P., Gunata, Z., Lepoutre, J.P., Odoux, E. (2011). New inside on the genesis and the fate of odor-active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Research International.* **44**, 2930-2937.
- Simon, O., Klaiber, I., Huber, A., Pfannstiel, J. (2014). Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin. *Journal of Proteomics.* **109**, 212-227.
- Son, G.E., Sugartseren, N., Yoon, W.B., Kwak, S.K. (2014). Phase behavior of ternary mixtures of water-vanillin-ethanol for vanillin extraction via dissipative particle dynamics. *Journal of Chemical & Engineering Data.* **59**, 3036-3040.
- Suresh, B., Ritu, T., Ravishankar, G.A. (2006). Biotransformations as Applicable to Food Industries (1655-1690). Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Ed.), *Food Biotechnology*, CRC Press, New York, USA.
- Şeker, Ş., Beyenal, H., Salih, B., Tanyolaç, A. (1997). Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol.* **47**, 610-614.
- Tilay, A., Bule, M., Annapure, U. (2010). Production of biovanillin by one-step biotransformation using fungus *Pycnoporous cinnabarinus*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4401-4405.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., Acar, J., Karapınar, M., Temiz, A., Gönül, Ş.A., Tunçel, G. (2003). *Gıda Mikrobiyolojisi* (3rd Ed.). Meta Basımevi, İzmir, 606 s.
- Vasudevan, S., Bhat, S. (2011). Biotransformation isoeugenol catalyzed by growing cells of *Pseudomonas putida*. *Biocatalysis and Biotransformation.* **29** (4). 147-150.
- Vandamme, E.J., Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* **77**, 1323-1332.
- Waliszewski, K.N., Pardio, V.T., Ovando, S.L. (2006). A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry.* **101**, 1059-1062.
- Walton, N.J., Melinda, M.J., Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry.* **63**, 505-515.
- Walton N.J., Narbad, A., Faulds, C.B., Williamson, G. (2000). Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Current Opinion in Biotechnology.* **11**, 490-496.

Wang, L.H., Sung, W.C. (2011). Rapid evaluation and quantitative analysis of eugenol derivatives in essential oils and cosmetic formulations on human skin using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. *Spectroscopy*. **26**, 43-52.

Wangrangsimagul, N., Klinsakul, K., Vangnai, A.S, Wongkongkatep, J., Inprakhon, P., Honda, K., Ohtake, H., Kato, J., Pongtharangkul, T. (2012). Bioproduction of vanillin using an organic solvent-tolerant *Brevibacillus agri* 13. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 555-563.

Xu, P., Hua, D., Ma, C. (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology*. **25**, 571-576.

Yamada M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2007). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1025-1030.

Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T., Erten, H. (2008). Biyoteknolojik yollarla aroma maddelerinin üretimi. *Gıda*. **33**, 35-41.

Zhang, Y., Xu, P., Han, S., Yan, H., Ma, C. (2006). Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**, 771-779.

Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., Zhu, L.L. (2005). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. *Biotechnology Letters*. **27**, 1505-1509.

Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., He, J.Y. (2006). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. *Process Biochemistry*. **41**, 1673-1676.

Zheng, L.R., Zheng, P., Sun, Z., Bai, Y., Wang, J., Guo, X. (2007). Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology*. **98**, 1115-1119.

7. EKLER

EK-1. Gelişim Kinetiği Üzerine İstatistik Verileri

Logaritmik Artış

Duncan

saat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	6,2633		
12	3	6,7200		
24	3		7,3533	
144	3			8,2233
36	3			8,3700
120	3			8,3967
168	3			8,4633
96	3			8,4700
48	3			8,7167
60	3			8,7167
72	3			8,7200
Sig.		,055	1,000	,067

EK-2. Sıcaklığın Biyodönüşüm Üzerine Etkisi Hakkında İstatistik Verileri

a) Üretilen vanilin miktarı (mg/L)

Duncan

sıcaklık	N	Subset for alpha = 0.05
		1
24	3	655,7167
32	3	682,6697
28	3	718,7800
Sig.		,134

b) Kalan izoöjenol miktarı (mg/L)

Duncan

sıcaklık	N	Subset for alpha = 0.05
		1
32	3	6205,1300
24	3	6300,0900
28	3	6443,7667
Sig.		,339

EK-3. Besiyeri pH'sının Biyodönüşüm Üzerine Etkisi Hakkında İstatistik Verileri

a) Üretilen vanilin miktarı (mg/L)

Duncan

pH	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
8.3	3	613,17		
7.3	3		695,47	
5.3	3		741,69	
6.3	3			877,91
Sig.		1,000	,161	1,000

b) Kalan izoöjenol miktarı (mg/L)

Duncan

pH	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
6.3	3	6205,4	
5.3	3	6411,1	6411,1
7.3	3	6443,8	6443,8
8.3	3		6880,5
Sig.		,334	,077

EK-4. Havalandırmanın Biyodönüşüm Üzerine Etkisi Hakkında İstatistik Verileri**a) Üretilen vanilin miktarı (mg/L)**

Duncan

havalan dırma ²	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
124	3	20,2587						
148	3	42,4073						
172	3		99,5593					
196	3		102,05					
224	3		107,54					
1120	3			198,70				
248	3				248,28			
272	3					421,49		
296	3						600,87	
2120	3							877,91
Sig.		,172	,635	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

b) Kalan izoöjenol miktarı (mg/L)

Duncan

havalan dırma	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
2120	3	6205,4				
296	3		6985,1			
1120	3			7938,0		
272	3			8153,1		
196	3			8207,4		
248	3				8874,2	
172	3				8925,8	
148	3					9562,5
224	3					9612,4
124	3					9689,2
Sig.		1,000	1,000	,116	,744	,451

² Parametrenin ilk hanesi havalandırma durumunu, ardından gelen haneler ise örnekleme süresini göstermektedir. Örneğin 2120 ifadesi yarı havalandırma denemesinde 120. saate ait değerdir. (1: havalandırmazsınız, 2: yarı havalandırmalı)

EK-5. Prekursör Konsantrasyonunun Biyodönüşüm Üzerine Etkisi Hakkında İstatistik Verileri

a) Üretilen vanilin miktarı (g/L)

Duncan

konsant rasyon	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	3	,8800					
5	3		2,7633				
10	3			4,7467			
20	3				7,0567		
60	3					7,7933	
50	3					7,9733	
30	3						8,6700
40	3						9,1400
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,569	,148

b) Tüketilen izoöjenol miktarı (g/L)

Duncan

konsant rasyon	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	3	3,7967					
5	3		10,3667				
10	3		14,8400				
20	3			26,7933			
60	3				57,4500		
50	3					65,0100	
30	3					67,8067	
40	3						82,0700
Sig.		1,000	,057	1,000	1,000	,219	1,000

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Hüseyin KARAKAYA
Doğum Yeri ve Tarihi : Antalya, 1988
Adres : İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda
Mühendisliği Bölümü, MALATYA
E-Posta : huseyin.karakaya@inonu.edu.tr
Lisans : Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği
Bölümü (2007-2011)
Mesleki Deneyim
2014 - : İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda
Mühendisliği Bölümü / Araştırma Görevlisi

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Karakaya, H., Yılmaztekin, M. (2016). Biotechnological approaches in production of natural vanillin (3482-3487). *1st International Mediterranean Science and Engineering Congress*, October 26-28, Adana, Turkey.