

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

**BİYODÖNÜŞÜM YOLUYLA DOĞAL MUZ AROMASI ÜRETİMİNDE
“YERİNDE ÜRÜN KAZANIMI” TEKNİĞİNİN KULLANIMI**

SEVİNÇ TAY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Temmuz 2013

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

**BİYODÖNÜŞÜM YOLUYLA DOĞAL MUZ AROMASI ÜRETİMİNDE
“YERİNDE ÜRÜN KAZANIMI” TEKNİĞİNİN KULLANIMI**

SEVİNÇ TAY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Temmuz 2013

Tezin Başlığı: Biyodönüşüm Yoluyla Doğal Muz Aroması Üretiminde “Yerinde Ürün Kazanımı” Tekniğinin Kullanımı

Tezi Hazırlayan: Sevinç TAY

Sınav Tarihi: .../.../2013

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. Ali Adnan HAYALOĞLU
İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇAM
Erciyes Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Biyodönüşüm Yoluyla Doğal Muz Aroması Üretiminde “Yerinde Ürün Kazanımı” Tekniğinin Kullanımı**” 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.

Sevinç TAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYODÖNÜŞÜM YOLUYLA DOĞAL MUZ AROMASI ÜRETİMİNDE “YERİNDE ÜRÜN KAZANIMI” TEKNİĞİNİN KULLANIMI

Sevinç Tay

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

81 +ix

2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat Yılmaztekin

Bu çalışmada *Lindnera saturnus* var. *saturnus* mayası kullanılarak melas ortamında fuzel yağından biyodönüşüm yolu ile muz aroması (izoamil asetat) üretilmiş ve üretim verimini arttırmak amacıyla makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerine adsorpsiyonu gerçekleştirilerek oluşur oluşmaz ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Öncelikle farklı özelliklere sahip 9 makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin adsorpsiyon ve desorpsiyon kapasiteleri ve verimleri araştırılmıştır. Bu reçineler arasından biyodönüşüme uğrayacak maddeyi (izoamil alkolü) en düşük düzeyde, biyodönüşümle üretilen muz aromasını en yüksek düzeyde adsorplayan ve desorpsiyon verimi yüksek olan reçine (H103 nolu) tespit edilmiştir. Tespit edilen bu reçine kullanılarak izoamil asetat üretimi, erlen düzeyinde ve biyoreaktör düzeyinde kesikli ve kesikli-beslemeli biyodönüşüm yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen üretimlerde “Yerinde Ürün Kazanımı” Tekniğinin kullanımının izoamil asetat üretim verimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Erlen düzeyinde gerçekleştirilen kesikli üretimde reçineli ortamda 1204 mg/L izoamil asetat üretilirken, reçine kullanılmadan gerçekleştirilen kontrol üretiminde ise 28.5 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Reçineli ortamda üretilen izoamil asetat miktarının reçinesiz ortama göre yaklaşık 42 kat arttığı gözlemlenmiştir. Kesikli-beslemeli üretimde ise reçineli ortamda 1910 mg/L izoamil asetat üretilirken reçinesiz ortamda 64 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Reçineli ortamda izoamil asetat üretiminde yaklaşık 30 kat bir artış gözlemlenmiştir.

Biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen kesikli biyodönüşüm denemesinde üretilen izoamil asetat miktarı 308.1 mg/L iken reçinesiz ortamda 38.4 mg/L’dir. Reçineli ortamda üretilen izoamil asetat miktarı reçinesiz ortamda üretilene göre yaklaşık 8 kat artmıştır. Kesikli-beslemeli biyodönüşümde reçineli ortamda 239.9 mg/L izoamil asetat üretilirken reçinesiz ortamda ise 40 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Reçine ilavesi ile gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde i-amil asetat üretiminin yaklaşık 6 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre izoamil asetat üretiminde “Yerinde Ürün Kazanımı” Tekniğinin kullanımının üretim verimini arttırdığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biyodönüşüm, yerinde ürün kazanımı tekniği, izoamil asetat

ABSTRACT
USING THE METHOD OF “IN SITU PRODUCT REMOVAL”
WHILE PRODUCING NATURAL BANANA FLAVOR THROUGH BIOCONVERSION

Sevinç Tay

Inonu University
Institute of Natural And Applied Sciences
Department of Food Engineering

81+ix

2013

Thesis Adviser: Assist. Prof. Murat Yılmaztekin

In this study *Lindnera saturnus* var *saturnus* yeast is present. Activating *L. saturnus* yeast in the presence of sugar beet molasses, banana flavor (isoamyl acetate) is produced from fusel oil using bioconversion method and in order to improve the production quality, the macroporous adsorption resins are adsorbed once adsorption takes place. First, the adsorption and desorption capacity and efficiency of different quality nine macroporous resins are studied. Through the study the resins that are least effective in adsorbing the substance (isoamyl alcohol) that is subject to bioconversion and are most effective in adsorbing the banana flavor produced through bioconversion is identified. Using the resin that is identified, the experiment of producing Isoamyl acetate is performed in both flask and bioreactor through batch and feed-batch bioconversion method. During the experiment the effect of the method “In situ product removal” to the production efficiency of isoamyl acetate is analyzed.

The amount of isoamyl acetate that is produced using flask with batch process in the presence of resin is 1204 mg/L while the same process without using resin produced only 28.5 mg/L. It is observed that the isoamyl acetate amount increases approximately 42 times with the presence of resin. On the other hand, feed –batch process in the presence of resin produces 1910 mg/L isoamyl acetate while without resin the amount of isoamyl acetate that is produced is 64 mg/L. In the presence of resin approximately 30 times increase in the production is observed.

The amount of isoamyl acetate that is produced using bioreactor with batch process in the presence of resin is 308.1 mg/L while only 38.4 mg/L isoamyl acetate is produced without resin is present. The isoamyl acetate amount increases approximately 8 times in a process that resin is present. Also using feed- batch process with the same setting and resin being present produces 239.9 mg/L isoamyl acetate while without resin the amount of production is 40 mg/L. Including resin in the experiment of producing isoamyl acetate through bioconversion increases the production efficiency approximately 6 times.

As a consequence of results of the experiments that has been done, it can be concluded that using the method of “In situ product removal” in the process of producing isoamyl acetate increases the production efficiency.

KEY WORDS: Bioconversion, In situ product removal, isoamyl acetate

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın her aőamasında yardım, öneri ve desteklerini esirgemedeni beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN'e; tez jürisinde yer alarak tezimi değerlendiren sayın Doç. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa AM'a;

Çalıőmamda kullanılan melası sağlayan Malatya Şeker Fabrikası'na, fuzel yağının temin edilmesinde yardımcı olan MEY Suma Fabrikası'na, maya suőunu sağlayan HUT kültür koleksiyonuna, çalıőmayı 2012/177 proje numarası ile maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne TÜBİTAK'a (No: 111 O 369), ve mensubu olduğum Kilis 7 Aralık niversitesi' ne teőekkürü borç bilirim.

Ayrıca her zaman yanımda olan maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım anneme, babama, ve kardeőlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Aroma Maddelerinin Sınıflandırılması	7
2.2. Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri	8
2.3. Biyoteknolojik Yolla Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri	8
2.3.1. Fermantasyon.....	8
2.3.2. Mikrobiyal biyodönüşüm	11
2.4. Gıda Sanayi Artıklarının Biyoteknolojik Yöntemlerle Değerlendirilmesi.....	14
2.4.1. Fuzel yağı	15
2.4.2. Melas	16
2.5. Biyoteknolojik Yolla Üretilen Aroma Maddelerinden Bazıları	18
2.5.1. Esterler.....	19
2.5.1.1. İzooamilasetat ve oluşum mekanizması	19
2.6. Mikrobiyal Biyodönüşüm Yolu İle Aroma Maddesi Üretiminde Karşılaşılan Güçlükler ve Çözüm Yolları	21
2.7. Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği	22
2.7.1. Yerinde ürün kazanımı tekniğinin potansiyel faydaları	25
2.7.2. Yerinde ürün kazanımı teknikleri (YÜK).....	26
2.7.3. Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan farklı yerinde ürün kazanımı teknikleri	27
2.8. Adsorpsiyon ve Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler	29
2.9. Yerinde Ürün Adsorpsiyon.....	30
2.10. Yerinde Ürün Adsorpsiyon Tekniğinde Yaygın Olarak Kullanılan Adsorpsiyon Materyalleri	31
2.10.1. Sentetik reçineler.....	32
2.10.1.1. Makrogözenekli reçineler	33
2.11. Uygun Adsorbentin Seçim Kriterleri	35

2.12. Aroma Maddelerinin Üretiminde Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinin Uygulandığı Çalışmalar	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1 Materyal.....	38
3.1.1. Mayalar.....	38
3.1.2. Besiyerleri ve kimyasallar	38
3.1.3. Melas	38
3.1.4. Fuzel yağı	39
3.1.5. Makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri	39
3.1.6. Fermentör.....	40
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Biyodönüşüm ortamının hazırlanması.....	41
3.2.2. Aşılama kültürlerinin hazırlanması	41
3.2.3. Fuzel yağının su içeriğinin azaltılması ve damıtılması	42
3.2.4. Reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi	45
3.2.4.1. Sentetik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi	45
3.2.4.2. Biyolojik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi	46
3.2.4.2.1. Kesikli biyodönüşüm koşulları	46
3.2.4.2.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm koşulları	47
3.2.5. Fermantasyon koşulları	47
3.2.5.1. Kesikli fermantasyon.....	48
3.2.5.2. Kesikli-beslemeli fermantasyon.....	48
3.2.6. Örneklerin alınması	49
3.2.7. Örnekler üzerinde yapılan analizler	49
3.2.7.1. Maya sayımı.....	49
3.2.7.2. Yoğunluk tayini.....	49
3.2.7.3. pH.....	49
3.2.7.4. İzoamil asetat ve izoamil alkol analizi	49
3.2.7.4.(1). Cevap faktörünün hesaplanması	50
3.2.7.4.(2). Miktar tayini	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	52
4.1. Fuzel Yağının Damıtılması.....	52
4.2. Reçinelerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi	53
4.2.1. Sentetik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi	53

4.2.2. Biyolojik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi	55
4.2.2.1. Kesikli biyodönüşüm ile izoamil asetat üretimi.....	55
4.2.2.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm ile izoamil asetat üretimi.....	57
4.3. H103 Reçinesi İlavesi İle Biyoreaktör Düzeyinde Gerçekleştirilen Biyodönüşümler.....	58
4.3.1. Kesikli biyodönüşüm denemelerinde reçinenin etkisi	58
4.3.1.1. Canlı maya sayısı	59
4.3.1.2. Yoğunluk ve briks	60
4.3.1.3. pH.....	61
4.3.1.4. İzoamil asetat üretimi	63
4.3.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde reçinenin etkisi	65
4.3.2.1. Canlı maya sayısı	65
4.3.2.2. Yoğunluk ve briks	66
4.3.2.3. pH.....	67
4.3.2.4. İzoamil asetat üretimi	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
6. KAYNAKLAR.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FID	Flame Ionization Detectör (Alev İyonlaşma Dedektörü)
GC	Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
HUT	Hiroshima University Culture Collection (Hiroşima Üniversitesi Kültür Koleksiyonu, Japonya)
ISPA	<i>In Situ</i> Product Adsorption (Yerinde Ürün Adsorpsiyon)
ISPR	<i>In Situ</i> Product Removal (Yerinde Ürün Kazanımı)
MPa	Megapaskal
YPD	Yeast Patato Dextrose
YÜK	Yerinde Ürün Kazanımı
YÜA	Yerinde Ürün Adsorpsiyon
γ	Gama
δ	Delta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tarafından 2-feniletanolün L-fenilalaninden biyodönüşümle üretimi	12
Şekil 2.2. İzoamil asetatın kimyasal yapısı	20
Şekil 2.3. İzoamil asetatın Fisher esterifikasyon mekanizması ile üretimi	20
Şekil 2.4. Yerinde ürün kazanımı tekniğinde kullanılan bazı prosesler	24
Şekil 2.5. Hidrofobik makrogözenekli reçinelerin genel yapısı	34
Şekil 3.1. Fermantasyon denemelerinde kullanılan biyoreaktör	41
Şekil 3.2. Fuzel yağının su içeriğinin azaltılması	43
Şekil 3.3. Su içeriği azaltılmış fuzel yağının moleküler elekten ayrımı	44
Şekil 3.4. Fuzel yağının damıtılmasında kullanılan damıtma düzeneği	44
Şekil 4.1. Kesikli biyodönüşüm denemesinde ortamda bulunan ve reçinelerde adsorplanan izoamil asetat miktarları	56
Şekil 4.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm sonunda ortamda kalan ve reçinelerde adsorplanan izoamil asetat miktarları	57
Şekil 4.3. Kesikli biyodönüşüm süresince canlı maya sayısı	59
Şekil 4.4. Kesikli biyodönüşüm süresince yoğunluk değerleri	60
Şekil 4.5. Kesikli biyodönüşüm süresince briks değerleri	61
Şekil 4.6. Kesikli biyodönüşüm süresince pH değerleri	62
Şekil 4.7. Kesikli biyodönüşüm süresince reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları	63
Şekil 4.8. Kesikli biyodönüşüm süresince reçineli ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları	64
Şekil 4.9. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince canlı maya sayısı	65
Şekil 4.10. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince yoğunluk değerleri	66
Şekil 4.11. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince briks değerleri	67
Şekil 4.12. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince pH değerleri	68
Şekil 4.13. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları	69
Şekil 4.14 Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince reçineli ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>De novo</i> sentezi ile üretilen aroma maddelerinden bazıları.....	10
Çizelge 2.2. Mikrobiyal biyodönüşümle üretilen aroma maddelerinden bazıları	13
Çizelge 2.3. Fuzel yağının ortalama bileşimi	16
Çizelge 2.4 Şeker pancarı melasının kimyasal kompozisyonu	18
Çizelge 3.1. Biyodönüşüm denemelerinde kullanılan fuzel yağının bileşimi	39
Çizelge 3. 2 Makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin bazı özellikleri.....	40
Çizelge 4.1. Fuzel yağı ve damıtılmasıyla elde edilen fraksiyonlarının % alkol bileşimleri.....	52
Çizelge 4.2. Reçinelerin adsorpsiyon kapasitesi (Q_e), adsorpsiyon etkinliği (E) ve desorpsiyon verimleri IAs: İzoamil asetat, IAİ: İzoamil alkol	54

1. GİRİŞ

Aroma maddeleri burun yoluyla ve ürün ağızdayken geniz yoluyla algılanabilen uçucu ve koku veren özellikteki alifatik ve aromatik yapılu kimyasal bileşiklerdir (Yılmaztekin vd., 2008a). Lezzet maddeleri uçucu olan ve uçucu olmayan bileşenlerin karışımından oluşur. Uçucu olmayan bileşenler daha çok tada etki ederken uçucu bileşenler hem tada hem de kokuya etki ederler (Longo ve Sanroman, 2006). Aroma maddeleri gıdaların tüketici tarafından tercih edilmesinde önemli bileşenlerdendir. Dolayısıyla aroma maddeleri gıdadaki en önemli kalite kriterlerindedir.

Aroma maddeleri gıdalarda çok sayıda ancak düşük miktarlarda bulunurlar. Buna rağmen gıdanın kendine özgü duyuşsal özelliklerini kazanmasında rol oynarlar (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010). Gıdaların aromasına alkoller, aldehitler, esterler, ketonlar, dikarboniller, kısa ve orta zincirli serbest yağ asitleri, metil ketonlar, laktonlar, pirazinler, fenolik bileşenler ve sülfür bileşikleri gibi geniş çeşitlilikteki bileşenler etki etmektedir (Longo ve Sanroman, 2006).

Gıdaların aroması ürünün kendi doğal yapısından gelebildiği gibi ürüne sonradan uygulanan çeşitli teknolojik işlemler sonucunda veya ürüne dışarıdan ilave edilen aroma bileşiklerinden de gelebilir.

Gıdalarda arzu edilen aromanın yeterli olmaması veya uygulanan işlemler sırasında kaybolan aromayı yerine koymak, gıdaya başka bir aroma kazandırmak amacıyla gıdalara aroma maddesi ilavesi yapılmaktadır (Feron ve Wache, 2006). Aroma maddeleri özellikle gıda endüstrisinde oldukça yaygın kullanılan katkı maddeleri arasındadır. Günümüzde aroma maddeleri, gıda katkı maddelerinin dünyadaki pazarının % 25'ini temsil eder (Longo ve Sanroman, 2006). Dünyada diğer endüstri alanlarıyla birlikte kullanılan aroma maddeleri 2012 yılı itibari ile 22 milyar dolarlık (USD) bir pazar payına sahiptir (Anonim, 2012).

Aroma maddeleri genel olarak doğal aroma maddeleri ve yapay aroma maddeleri olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Ancak aroma maddelerinin elde edildikleri kaynakların çok farklı ve çeşitli olması, farklı sınıflandırmaların yapılmasına sebep olmuştur. Amerika Birleşik Devletlerinde aroma maddeleri doğal ve yapay aroma maddeleri

olarak sınıflandırılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre ise aroma maddeleri; doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, aroma karışımları, reaksiyon aromaları ve tütsü aromaları olmak üzere altı grupta sınıflandırılmaktadır (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010).

Aroma maddeleri uzun yıllardan beri bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon yolu ile elde edilmektedir (Longo ve Sanroman, 2006). Fakat aroma maddelerinin bitkilerde çok düşük düzeylerde bulunması onların ekstraksiyonunu ve saflaştırmasını zor ve maliyetli hale getirmiştir. Bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilen aroma maddelerinin yapılarının belirlenmesinin ardından, sentetik aroma maddeleri kimyasal sentez yolu ile üretilmeye başlanmıştır (Longo ve Sanroman, 2006). Günümüzde aroma maddeleri gıda katkı maddeleri dünya pazarının %25' ini oluşturur ve bu aroma maddelerinin % 80'den fazlasını kimyasal sentez yoluyla üretilen aroma maddeleri oluşturmaktadır (Yılmaztekin vd., 2008a). Kimyasal sentez genellikle çevre dostu olmayan bir üretim prosesidir ve substrat seçiciliğinden yoksundur. Dolayısıyla istenmeyen rasemik karışımların oluşumuna sebep olabilir. Bu durumda proses verimi düşer ve saflaştırma maliyeti artar (Longo ve Sanroman, 2006).

Kimyasal sentez yolu ile aroma maddeleri üretimi zayıf reaksiyon seçiciliği, istenmeyen yan ürünlerin oluşumu, düşük verim, çevre kirliliği, yüksek üretim maliyeti, son ürünün yapay olması gibi bir çok dezavantaja sahiptir (Longo ve Sanroman, 2006). Buna karşın, son zamanlarda yapılan market araştırmaları tüketicilerin "doğal" olarak etiketlenen gıda maddelerini tercih ettiğini göstermektedir. Bu durum doğal aroma maddesi üretim yöntemlerini gündeme getirmiş ve düşük maliyetle doğal aroma maddesi üretim yöntemlerinin araştırılmasına sebep olmuştur.

Doğal aroma maddesi üretim yöntemlerinden biri olan bitkisel kaynaklardan direkt ekstraksiyon yolu ile üretimi de kimyasal sentez ile aroma maddesi üretimi gibi bir çok dezavantaja sahiptir. Doğal aroma maddesinin ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği ham maddeler genelde arzu edilen aroma maddesini düşük düzeyde bulundurlar ve bu durum da ekstraksiyonu hem zahmetli hem de pahalı hale getirir.

Tüm bu dezavantajlar ve tüketicilerin doğal ürünlere olan ilgisi, doğal aroma maddelerinin üretimi için farklı stratejilerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Aroma

maddelerinin üretimi için alternatif yollardan biri de biyoteknolojik yolların kullanımındır.

Biyoteknolojik yolla aroma maddesi üretimi kimyasal yolla aroma maddesi üretimine göre daha esnek reaksiyon koşulları, yüksek ürün ve substrat spesifikliği ve çevreyi daha az kirletmesi gibi avantajlara sahiptir (Xu vd., 2007). Ayrıca biyoteknolojik yolla üretilen aroma maddelerinin ‘doğal’ olarak nitelendirilmesi ve yukarıda bahsedilen diğer önemli avantajlarından dolayı aroma maddelerinin biyoteknolojik yolla üretimi üzerindeki araştırmalar son zamanlarda artış göstermiştir.

Aroma maddelerinin biyoteknolojik yolla üretimi kendi içerisinde mikrobiyal ve enzimatik yol (enzimatik biyodönüşüm) olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Mikrobiyal yol ile aroma maddesi üretimi de kendi içinde fermentasyon (*de novo sentezi*) ve mikrobiyal biyodönüşüm olarak sınıflandırılmaktadır.

Mikrobiyal biyodönüşüm mikroorganizmaların bir bileşiği yapısal yönden kendine benzer başka bir bileşiğe dönüştürmesi olayına denir. Mikrobiyal biyodönüşüm olayında iki substrat vardır. Bunlardan birincisi mikroorganizmaların gelişimi için, bir diğeri ise hedef aromayı oluşturmak için biyodönüşüme uğrayacak substrattır (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010). Mikrobiyal biyodönüşüm yüksek substrat seçiciliği, düşük miktarda yan ürün oluşumu, oluşan ürünün kolay izole edilmesi ve saflaştırılması gibi avantajlara sahiptir (Xu vd., 2007). Ayrıca mikrobiyal biyodönüşümle üretimde verim fermentasyon yolu ile aroma maddesi üretimine göre daha yüksektir. Günümüzde mikrobiyal biyodönüşümle üretilen çok sayıda aroma maddeleri mevcuttur. Bunlardan en önemlileri arasında vanilin, benzaldehit, laktonlar, 2-feniletanol ve izoamilasetat sayılabilir.

Aroma maddeleri arasında önemli bir grubu oluşturan esterler gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan meyve aroması veren esterlerdir. Bu esterler kısa zincirli yağ asitleri ile alkoller arasında meydana gelen reaksiyonla oluşurlar. İçecek, bal, karamela ve diğer bir çok gıdada aroma bileşeni olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bira, şarap, sake gibi fermente alkollü içeceklerdeki aroma bileşenleri arasında esterler önemli yer tutmaktadır.

Düşük molekül ağırlıklı esterler arasında alkil esterler gıda endüstrisinde en çok ihtiyaç duyulan esterlerdir. Özellikle güçlü muz aromasından dolayı izoamil asetat en çok ihtiyaç duyulan esterlerin başında gelmektedir (Torres vd., 2009). İzoamil asetatın gıda sanayinde katkı maddesi olarak kullanımı oldukça fazladır ve izoamil asetatın yıllık üretiminin ABD’de 74 ton civarında olduğu belirtilmektedir. (Güvenç vd., 2002).

İzoamil asetat genellikle kimyasal sentez yolu ile Fischer Esterifikasyon mekanizmasıyla üretilir (Welsh vd., 1990). Bir başka üretim yöntemi ise bitkisel kaynaklardan ekstraksiyondur, fakat bu yöntem pahalıdır. (Liu vd., 2013). Ancak tüketicilerin çevresel ve sağlık nedenlerinden dolayı doğal aroma maddelerine artan ilgisi ile izoamil esatat üretimi için biyoteknolojik yöntem kimyasal yöntemle iyi bir alternatif olmuştur. Son zamanlarda en çok kullanılan yöntem üretilen izoamil asetatın doğal olmasından dolayı enzim ve hücrelerin biyokatalist olarak kullanıldığı fermantasyon ve biyodönüşümle üretimdir.

Mayalar özellikle izoamil asetatı ve bazı uçucu asetatları yüksek alkollerden biyodönüşümle üretebilme yeteneğine sahiptirler. Yüksek alkoller ve özellikle amil alkollerini fazla miktarda içeren fuzel yağı izoamil asetatın biyodönüşümle üretimi için önemli bir ham maddedir. Fuzel yağı, fermantasyonla etil alkol üretiminde damıtma işleminden sonra elde edilen yan ürünlerden biri olup amil alkollerini yüksek miktarda içerirler (Ortalama % 45-55). Yüksek miktarda amil alkol içermesi ve ucuz bir yan ürün olmasından dolayı fuzel yağı biyodönüşümle izoamil asetat üretimi için önemli bir hammadde niteliğindedir. *Lindnera saturnus* mayası özellikle muz aromasının karakteristik bileşiği olan izoamil asetatı ve bazı uçucu asetatları yüksek alkollerden üretebilme yeteneğine sahiptir (Janssens vd., 1989).

Melas ortamında gerçekleştirilen üretimlerde ortama fuzel yağı ilavesi ile amil alkollerin izoamil asetata biyodönüşümü başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. *Williopsis saturnus* mayası kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon ortamına %1 düzeyinde fuzel yağı ilavesi ile fuzel yağında bulunan izoamil alkolün biyodönüşümü sayesinde üretilen izoamil asetat konsantrasyonunun 3 kat arttığı tespit edilmiştir (Yılmaztekin, 2009).

Mikrobiyal biyodönüşümle aroma maddesi üretiminde karşılaşılan en önemli problemlerden biri üretilen ürünün biyokatalist tarafından sınırlandırılmasıdır.

Ortamda biriken ürünün belirli konsantrasyonların üzerine çıkması biyokatalist üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Bu durumda ise biyokatalist aktivitesini kaybeder veya hücreler canlılıklarını yitirir (Woodley vd., 2008). Dolayısıyla, bu durum oluşacak ürünün verimini olumsuz yönde etkileyerek verimin düşmesine sebep olmaktadır. Düşük verimden dolayı da üretimler endüstriye uygulanamamaktadır. Ürün konsantrasyonunun reaktör içinde belirli seviyelerde tutulması ile bu inhibisyon etkisi önlenabilmektedir. ‘‘Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği’’ bu olumsuzlukları bertaraf etmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu teknikte biyokatalist etrafındaki ürün konsantrasyonu, oluşan ürünün ortamdaki sürekli alınması ile inhibisyon seviyesinin altında tutulması yöntemin en önemli avantajıdır. YÜK tekniğinin kullanıldığı proseslerden bazıları; vakum fermantasyon, ekstraktif fermantasyon, flaş fermantasyon, diyaliz fermantasyon, iyon değişim ve adsorpsiyon reçinelerinin kullanımınıdır (Roffler vd., 1984). Özellikle oluşan ürünün makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri ile ortamdaki uzaklaştırılması sağladığı etkinlikten dolayı, en çok tercih edilen yöntemlerden biridir.

Makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri farklı gözenek çapına, yüzey alanına ve polariteye sahip polimerik materyallerdir. Yüzeyinde bulunan gözeneklerinden dolayı adsorbe edeceği mayeryali sulu çözeltiden alarak kendi yüzeyinde tutundurur. Adsorplanan bu moleküller daha sonra, uygun bir solvent ile desorbe edilerek reçineden geri alınır ve reçine tekrar tekrar kullanılabilir. Literatürde makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin kullanımı ile fermantasyon ve biyodönüşüm yolu ile üretilen aroma maddeleri konusunda çalışmalar kısıtlıdır. Literatürde izoamil asetatın biyodönüşümü ile üretimi sırasında YÜK tekniğinin kullanıldığı çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *Lindnera saturnus* var. *saturnus* mayası kullanılarak melas ortamında fuzel yağından biyodönüşüm yolu ile muz aroması olarak bilinen izoamil asetat üretilmiş ve üretilen izoamil asetatın makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerine adsorpsiyonu gerçekleştirilerek ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bunun için öncelikle farklı polariteye, yüzey alanına ve gözenek çapına sahip makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin adsorpsiyon ve desorpsiyon kapasiteleri ve verimleri araştırılmıştır. Bu reçineler arasından biyodönüşüme uğrayacak maddeyi (izoamil alkolü) en düşük düzeyde, biyodönüşümle üretilen aroma maddesini (izoamil asetatı) en yüksek düzeyde adsorplayan ve desorpsiyon verimi yüksek olan reçine tespit

edilmiştir. Tespit edilen bu reçine kullanılarak izoamil asetat üretimi erlen düzeyinde ve biyoreaktör düzeyinde kesikli ve kesikli-beslemeli biyodönüşüm yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Aroma Maddelerinin Sınıflandırılması

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre aroma maddeleri; doğal aroma maddeleri, doğala özdeş aroma maddeleri, yapay aroma maddeleri, aroma karışımları, reaksiyon aromaları ve tütsü aromaları olarak sınıflandırılmaktadır.

Yapay aroma maddesi, kimyasal yol ile sentezlenen ancak kimyasal yapısı doğal aromalardan farklı olan maddelerdir. Doğala özdeş aroma maddesi, kimyasal yollarla sentezlenen veya izole edilen kimyasal yapı olarak doğal aromalar ile aynı olan maddelerdir. Doğal aroma maddesi ise bitkisel ve hayvansal kaynaklardan uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla elde edilen aroma verici madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır. Reaksiyon aromaları, sıcaklığı 180 °C'yi ve süresi 15 dakikayı geçmeyen işlemlerle elde edilen başlangıçta aroma verici özelliği olmayan, en az bir bileşeni azot ve diğer bileşeni indirgen şeker içeren iki maddenin birlikte reaksiyona girmesi sonucu oluşan aroma verici karışımlardır. Tütsü aromaları dendiğinde ise bazı gıdaların tütüsüleme işlemlerinde kullanılan tütsü ekstraktları aklı gelmektedir. Aroma karışımları ise doğal aroma vericiler dışında uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik metodlarla bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen ürünlerdir (Anonim, 2013a).

Doğal bir aroma maddesinin adı "Doğal Çilek Aroması" ifadesinde olduğu gibi bir gıda maddesine veya bir aroma kaynağına referans oluşturuyorsa bu aromanın tamamının uygun fiziksel, enzimatik veya mikrobiyolojik yollarla bu gıdadan veya kaynaktan elde edilmesi zorunludur. Aksi durumda "doğal" ifadesi kullanılmaz (Anonim, 2013a). Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğindeki tanımlardan da anlaşıldığı gibi biyoteknolojik yollar ile üretilen aroma maddeleri doğal olarak kabul edilmektedir.

2.2. Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri

Bir aroma maddesinin doğal olarak nitelendirilmesi için o aroma maddesinin kaynağından fiziksel yol ile doğrudan ekstraksiyonu gerçekleştirilmeli veya biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretimi gerçekleştirilmelidir. Biyoteknolojik üretimlerde aroma maddesinin doğal olarak adlandırılması için ise bu aroma maddesinin elde edilmesinde kullanılan ham maddenin yani substrat olarak kullanılan materyalin ve biyodönüşüme uğrayacak öncül bileşenin de kaynağının doğal olması gerekmektedir. Doğal aroma maddesi üretim yöntemlerini aşağıdaki gibi katagorize edilebilir.

- ✓ Fiziksel Yolla Üretim
- ✓ Biyoteknolojik Yolla Üretim
 - Mikrobiyal Yol İle Üretim
 - Fermantasyon
 - Mikrobiyal Biyodönüşüm
 - Enzimatik Yol İle Üretim
 - Enzimatik Biyodönüşüm İle Üretim

2.3. Biyoteknolojik Yolla Doğal Aroma Maddesi Üretim Yöntemleri

Biyoteknolojik yolla doğal aroma maddesi üretimi iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlardan birincisi mikroorganizmaların kullanıldığı mikrobiyal yol, diğeri ise enzimlerin kullanıldığı enzimatik yolla üretimdir. Mikrobiyal yol ile aroma maddesi üretimi de kendi içinde iki sınıfa ayrılır. Bunlar; fermentasyon ve mikrobiyal biyodönüşümdür.

2.3.1. Fermantasyon

Fermantasyonda ortamda bulunan karbonhidrat, protein, yağ gibi maddeler mikroorganizmalar tarafından fermentasyona uğratılmakta ve yıkıma uğrayan bu bileşiklerden aroma maddeleri üretilmektedir. Bu yöntem ‘*de novo*’ sentezi olarak bilinmektedir. Aslında bu yöntem uzun yıllardan beri fermente ürünlerde aroma oluşumunda etkili yöntemdir. Mikroorganizmalar tarafından ham maddede meydana gelen biyokimyasal değişiklikler sonucu açığa çıkan bileşenler son ürünün aromasına

etki etmektedir. Böylece fermentasyon prosesi esnasında oluşan ürünler son ürünün duyuşsal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Şarap, bira, yoğurt, ekmek gibi bir çok gıdanın spesifik özellikleri ve aroması mikroorganizmaların faaliyeti sonucunda meydana gelmektedir. Fermentasyon esnasında aroma oluşumunda karbonhidrat metabolizması, lipit metabolizması ve protein metabolizması etkili olmaktadır (Feron ve Wache, 2006).

Fermentasyon yolu ile aroma maddesi üretiminde derin kültür yöntemi ve yüzey kültür yöntemi olmak üzere iki yöntem mevcuttur. Derin kültür yönteminde mikroorganizmalar substratın içinde geliştirilir. Mikroorganizmaların gelişimi için gerek duyulan hava-gaz karışımı uygun bir düzenekle fermentörün içine verilir. Yüzey kültür yönteminde ise mikroorganizmalar sıvı, katı, yarı katı substratların yüzeyinde geliştirilir. Yüzey kültür yöntemi özellikle ucuz tarımsal atıklardan aroma maddesi eldesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde ucuz karbon ve azot kaynakları kullanılmakta ve istenilen ürün mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu açığa çıkmaktadır. Bu iki yöntem karşılaştırılacak olursa yüzey kültür yöntemi derin kültür yöntemine göre daha düşük maliyet ve yüksek verimle daha iyi ürün eldesi sağlar (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010).

Mikroorganizmaların fermentasyonu sırasında oluşturdukları başlıca aroma maddeleri yüksek alkoller, esterler, karbonil bileşikleri, terpenler, laktonlar, pirazinler, kükürtlü bileşikler, uçucu asitlerdir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010).

De novo sentezi ile üretilen aroma maddeleri ve üretimde kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *De novo* sentezi ile üretilen aroma maddelerinden bazıları (Feron ve Wache, 2006).

Küfler	Aroma Sınıfı
<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>Hansenula</i>	Esterler, Alkoller
<i>Kluyveromyces</i>	Terpenler, Esterler, Alkoller
<i>Sporobolomyces</i>	Laktonlar
<i>Saccharomyces</i>	Terpenler, Laktonlar, Esterler, Alkoller
Bakteriler	
<i>Clostridium</i>	Esterler, Alkoller, Asitler
<i>Corynebacterium</i>	Pirazinler
<i>Pseudomonas</i>	Esterler, Pirazinler
<i>Streptomyces</i>	Terpenler, Pirazinler

De novo sentezi ile aroma maddesi üreten mikroorganizmaların çoğu küf ve mayalardan oluşmaktadır. Bu durum funguslar arasındaki daha geniş biyoçeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra kültür ortamındaki karbon ve azot kaynağı gibi basit bileşenler değiştirilerek üretilen aroma maddelerinin çeşitliliği artırılabilir. Geniş çeşitlilikteki aroma bileşeni üretme kabiliyetine sahip *Ceretocystis* türü bu

duruma örnek olarak verilebilir. Meyve aroması veya muz aroması (izoamil asetat) zayıf patates aroması veya şeftali aroması (γ -dekalakton) bu türün ortam kompozisyonu değiştikçe üretebildiği aroma maddeleri arasında yer alır. (Feron ve Wache, 2006).

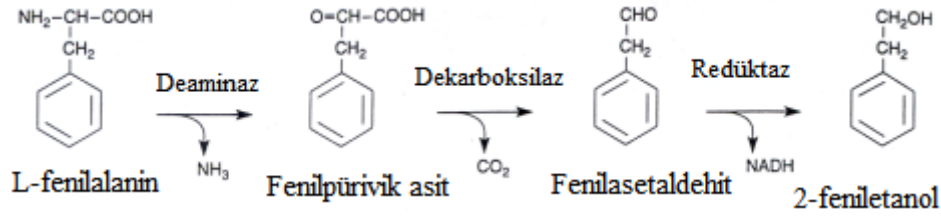
Mayalar da aynı zamanda *de novo* sentezi ile aroma bileşenleri üretme kabiliyetine sahiptir. En iyi bilinen örneklerinden biri *Sporidiobolus salmonicolor*' dır. γ -Dekalakton ve δ -laktonlar gibi geniş çeşitlilikteki laktonları üretebilme yeteneğine sahiptirler. *Kluyveromyces lactis* ve *Willopsis saturnus* gibi diğer türleri de fazla miktarlarda terpenler veya meyve esterleri üretebilme kabiliyetine sahiptir (Feron ve Wache, 2006).

Sınırlı türlerinden dolayı bakteriler, aroma maddeleri üretiminde mayalar ve küfler gibi yetenekli değildir. Buna karşın son çalışmalarda bulunan örnekler göre; *Bacillus cereus* türü 2,5-dimetilpirazin, 2,6-dimetilpirazin veya trimetilpirazin gibi farklı pirazin çeşitlerini üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu durum, bakteri türüne, sıcaklık ve kültür ortamına bağlıdır (Feron ve Wache, 2006).

De novo sentezi aroma maddelerinin biyolojik yollar ile üretiminde iyi bir yöntem olmasına rağmen, üretim verimi çok düşüktür ve bu yüzden endüstriyel uygulamalarda kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle biyoteknolojistler daha ekonomik avantajlar sunan biyodönüşüm prosesi üzerine yoğunlaşmışlardır.

2.3.2. Mikrobiyal biyodönüşüm

Biyodönüşüm, mikroorganizmaların bir bileşiği yapısal yönden kendisine benzer başka bir bileşiğe dönüştürmesi olayıdır. Çoğu mikrobiyal biyodönüşüm olayında iki substrat gereklidir. Bunlardan biri mikroorganizmaların gelişimi için gerekliyken diğeri biyodönüşüme uğrayacak öncül maddedir. Mikrobiyal biyodönüşümde öncül bileşende meydana gelen oksidasyon, redüksiyon, dehidrasyon, hidroliz gibi reaksiyonlar ile aroma maddeleri üretilmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* tarafından L-fenilalaninden 2-feniletanol (gül aroması) üretimi mikrobiyal biyodönüşüme örnek olarak verilebilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* tarafından 2-feniletanolün L-fenilalanininden biyodönüşümle üretimi (Vandamme, 2003).

Biyodönüşümde verim genellikle daha yüksektir. Verimi etkileyen faktörler ise biyodönüşümde kullanılan mikroorganizmanın türü ortam sıcaklığı, ortam pH'sı, hücre zarı geçirgenliği, ürün inhibisyonu, substratların ortamdaki çözünürlükleri gibi faktörlerdir (Yılmaztekin vd., 2008a). Günümüzde mikrobiyal biyodönüşümle üretilen aroma maddeleri mevcuttur ve bunların çoğu araştırma düzeyindedir. Mikrobiyal biyodönüşümde mikroorganizmaların gelişimi için gereken substrat doğal kaynaklardan karşılanabileceğinden üretim maliyeti düşürülmüş olunur.

Mikrobiyal biyodönüşüm;

- Yüksek substrat seçiciliği,
- Az miktarda yan ürün oluşumu,
- Asıl ürünün kolay izole edilmesi ve saflaştırılması
- Oluşan ürünün "doğal" olması gibi birçok avantaja sahiptir. Bu yüzden daha çok tercih edilen bir yöntemdir.

Mikrobiyal biyodönüşüm yoluyla endüstriyel ölçekte üretilen aroma maddelerinin bazıları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Mikrobiyal biyodönüşümle üretilen aroma maddelerinden bazıları
(Feron ve Wache, 2006; Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010)

Bileşen	Verdiği Aroma	Öncül bileşen	Biyokatalist
Vanilin	Vanilya	Ferulik asit	<i>Amycolatopsis sp.</i> <i>Pycnopus sp.</i>
γ-dekalakton	Meyve/Şeftali	Risinoleik asit	<i>Yarrowia lypolitica</i> <i>Sporidiobolus sp.</i>
γ-oktalakton	Hindistancevizi	Oktanoik asit esterleri	<i>Mucor sp.</i>
2-Feniletanol	Gül, bal	Fenilalanin	<i>S.cerevisiae,</i> <i>Kluyveromyces sp.</i>
Benzaldehit	Badem	Fenilalanin	<i>Bjerkandera adusta</i> <i>Pycnopus cinabarini</i>
İzoamil Asetat	Muz	Amil alkol	<i>Williopsis saturnus</i>
Pirazin	Kavrulmuş	Treonin	<i>Bacillus subtilis</i>

Mikrobiyal biyodönüşüm aroma maddelerinin yanı sıra diğer katkı maddelerinin de endüstriyel ölçekli üretimlerinde kullanılabilir. Mikrobiyal biyodönüşümde üretilen moleküllerin konsantrasyonu de novo sentezine göre daha yüksektir ve dolayısıyla endüstriyel uygulamalara olanak tanımaktadır. Uygulamaların henüz beklenildiği kadar olmamasına rağmen, mikrobiyal biyodönüşüm potansiyel bir metod olarak görülmektedir.

2.4. Gıda Sanayi Artıklarının Biyoteknolojik Yöntemlerle Değerlendirilmesi

1985-90 yılları arasında başlayan endüstriyel ekonomiye geçiş dönemi nedeniyle, hızlı bir şekilde artan üretim, miktar ve çeşitliliğine paralel olarak endüstriyel atıklarda da büyük ölçüde artış görülmüştür (Şener ve Ünal, 2008). Bu artıkların direkt olarak çevreye verilmesi ise çevre kirliliğine ve atıklarda bulanabilecek değerli bileşenlerin kaybına sebep olmaktadır.

Türkiye’de yaklaşık olarak 24 000 civarında gıda işletmesi bulunmaktadır. Türkiye’de gıda sanayi artıkları diğer sanayi artıklarının %20’sini oluşturmaktadır (Şener ve Ünal, 2008). Gıda sanayinin meyve ve sebze işleme endüstrisi, zeytinyağı endüstrisi, şeker endüstrisi, tahıl endüstrisi, süt endüstrisi ve su ürünleri endüstrisi gibi farklı kollarından elde edilen gıda artıkları kullanılarak endüstriyel açıdan öneme sahip bileşenler üretilebilmektedir. Örneğin zeytin kekinden *Moniliella suaveolens*, *Trichoderma harzianum*, *Pityrosporum oval* ve *Ceratocytis moniliformis* mikroorganizmaları kullanılarak δ - ve γ - dekalakton (şeftali aroması) gibi aroma bileşeni üretilebilmektedir (Laufenberg vd., 2003) .

Gıda artıklarının çoğunu meyve ve sebzelerin kabukları ve çekirdekleri, hayvan ve balık artıkları, karbonhidratça zengin hububat artıkları, tarımsal artıklar (buğday, mısır, şeker kamışı, melas, peynir altı suyu, patates v.b.) ve fermantasyon endüstrisi artıkları oluşturmaktadır. Bu artıklar içerik bakımından büyük bir enerji potansiyeli oluşturmaktadır (Yılmaztekin, 2009).

Bu endüstriyel artıklardaki bileşenler biyodönüşüme uğratarak endüstriyel açıdan öneme sahip enzim, etil alkol, sitrik asit, antifungal bileşenler, tek hücre proteini ve özellikle aroma maddeleri gibi değerli bileşenleri biyoteknolojik yöntemlerle üretmek mümkündür. Dolayısıyla endüstriyel artıklara katma değer kazandırılabilen, çevre kirliliği önlenemekte aynı zamanda biyoteknolojik üretimler daha da ekonomik hale getirilebilmektedir. Çünkü biyoteknolojik üretimlerde önemli olan üretimin endüstriyel boyutta uygulanıp uygulanamamasıdır. Üretimlerin endüstriyel boyutta uygulanması için üretimin maliyeti dikkate alınacak hususlardan biridir. Diğerleri ise ürünün konsantrasyonu ve saflaştırma maliyetidir. Tüm bunlar göz önüne alındığında biyoteknolojik yolla yapılan üretimlerin endüstriye uygulanabilmesini sağlamak için maliyetin ilk basamağını oluşturan

hammadde temininin endüstriyel artıkların substrat olarak kullanımı ile daha ekonomik hale getirilmesi mümkündür.

2.4.1. Fuzel yağı

Fuzel yağı melasın fermantasyonu ile etil alkol üretiminde, etil alkolün damıtılması sonucu açığa çıkan bir yan üründür. Yaklaşık olarak 1000 L etil alkolün damıtılmasıyla 5 L fuzel yağı açığa çıkmaktadır. C3, C4, C5 gibi birçok alifatik alkollerin karışımından oluşur (Küçük ve Ceylan, 1998). Bu yan ürün rengi sarıdan koyu kahverengiye değişebilen çok keskin, hoş olmayan ve öksürten kokuya sahiptir ve sıvıdır (Güvenç vd., 2007). Fuzel yağı başlıca düşük molekül ağırlıklı alkoller (izoamil alkol başta olmak üzere, izobütil alkol, n-propil, n-bütil alkol, etil alkol ve n-amil alkol) az miktarda su ve eser miktarda aldehitler, serbest asitler ve onların esterleri, yüksek alkoller ve terpenlerden oluşur (Güvenç vd., 2007). Fuzel yağının ortalama bileşimi Çizelge 2.3'de gösterilmiştir. Fuzel yağı içeriğinde diğer alkollere nazaran izoamil alkol miktarı çok daha yüksektir. Bu yüzden amil alkollerin doğal kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Fuzel yağının bileşimi fermantasyonla etil alkol üretimi esnasında kullanılan ham maddeye, fermantasyon şartlarına, distilasyon ve fuzel yağının çöktürme prosesine bağlı olduğu bilinmektedir (Azania vd., 2011).

Fuzel yağı içerisindeki düşük molekül ağırlıklı alkoller ve bunların esterleri endüstriyel öneme sahip bileşenlerdir. Özellikle bu bileşenlerin asetat ve bütirat esterleri tat ve koku bileşenleri olarak gıda, ilaç, kozmetik endüstrilerinde katkı maddesi olarak ekonomik değere sahiptirler. Örneğin etil bütirat ve izoamil asetat sırasıyla çilek, ananas ve muzda bulunan aromalardır (Güvenç vd., 2007; Küçük ve Ceylan, 1998). Gerek enzimler (genellikle lipaz katalizörlüğünde) kullanılarak gerekse mikroorganizmalar kullanılarak bu alkoller esterleştirilmekte (asetat ve bütirat esterleri) tat ve koku bileşenleri üretilmektedir.

Fuzel yağı içerisinde bulunan bu değerli bileşenlerden ötürü aroma maddesi üretiminde kullanılan ve kolayca temin edilebilen ucuz bir kaynaktır.

Mayalar özellikle izoamil asetatı ve bazı uçucu asetatları yüksek alkollerden üretebilmektedir (Yılmaztekin, 2009). Dolayısıyla ucuz ve kolay temin edilebilen

fuzel yağı izoamil asetat üretiminde kullanılabilen önemli bir hammadde özelliği taşımaktadır.

Fuzel yağının biyodönüşümde kullanıldığı bir çok çalışma mevcuttur. Bunlardan Yılmaztekin (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada melas ortamında fuzel yağı ilavesi ile amil alkollerin izoamil asetata biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir. *Williopsis saturnus* mayası kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon ortamına %1 düzeyinde fuzel yağı ilavesi ile fuzel yağında bulunan izoamil alkolün biyodönüşümü sayesinde üretilen izoamil asetat konsantrasyonunun 3 kat arttığı tespit edilmiştir. Quilter vd. (2003) tarafından *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmada ise melas içeren fermantasyon ortamına fuzel yağı ilavesinin izoamil asetat üretiminde 4.4 kat artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2.3. Fuzel yağının genel bileşimi (Azania vd., 2011)

Bileşenler	Fuzel Yağı (%)
Etanol	14.46
n-propanol	1.69
izobutanol	10.30
n-butanol	0.67
İzoamil alkol	61.60
n-amil alkol	0.49

2.4.2. Melas

Melas terimi ilk olarak sükrozun hazırlanması sırasında şeker kamışı veya şeker pancarından elde edilen sıvının evaporasyonu, kristalizasyonu ve santrifüjlenmesi sonucu elde edilen artık olarak bilinmekteydi. Günümüzde ise şeker içeriği % 43'den fazla olan herhangi bir sıvı, melas olarak adlandırılmaktadır (Curtin, 1983).

Melas şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahverenkli kolloidal bir artık maddedir (Kahyaoğlu ve Konar, 2006). Şeker üretimi sırasında kristalleşmeyen şuruplar melası oluşturur (Şener ve Ünal, 2008). Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarından 4 kg kadar melas oluşmaktadır (Kahyaoğlu ve Konar, 2006). Melasın içeriğinde kompleks

polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, koyu renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, sitrik asit, laktik asit, asetik asit, propiyonik asitler gibi organik asitler bulunmaktadır (Kahyaoğlu ve Kıvanç, 2007). Melasın kimyasal kompozisyonu şeker pancarının yetiştiği toprağın tipi, iklim, nem, sıcaklık, şeker pancarının türü, depolama şartları, melasın üretim prosesi gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte melasın genel bileşimi Çizelge 2.4' de gösterilmiştir.

Melas ispiroto ve maya üretiminde aynı zamanda kepek, saman ve kuru küselere eklenerek hayvan yemlerinde, etanol, ekmek mayası ve tek hücre proteini üretimi, özellikle aroma maddeleri üretimi gibi biyoteknolojik üretimlerde kullanılmaktadır (Kahyaoğlu ve Konar, 2006; Şener ve Ünal, 2008; Yılmaztekin, 2009).

Melas şeker fabrikalarının artık maddelerindedir. Şeker içeriğinin yüksek oluşu nedeniyle biyoteknolojik üretimlerde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla çevre kirliliğinin önlenmesi ayrıca bileşimi zengin olan artık maddelerin değerlendirilerek endüstriyel açıdan değerli ürünlerin üretilmesi mümkün olmaktadır.

Fermente edilebilir şeker kaynağı olarak kullanılan melasın fermantasyonu sırasında içerisinde doğal olarak bulunan amino asitlerin deaminasyonu sonucu fuzel yağları olarak da bilinen yüksek alkoller oluşur. Aroma endüstrisi için önemli doğal hammaddeleri oluşturan bu yüksek alkoller arasında 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol ve feniletanol gelir. Bu yüksek alkoller kısmi distilasyonla ayrılabilirdiği gibi, fermantasyon sırasında kendi asitlerine de dönüşebilmektedir. Örnek olarak 2-metil-1-butanolun, aynı zamanda önemli bir aroma maddesi olan 2-metil-1-bütirik asite dönüşümü verilebilir. Bu dönüşümler sırasında meydana gelen ara ürünlerden biri de aldehitlerdir ve bu bileşikler de yine önemli aroma maddelerini oluştururlar. Meydana gelen asitlerin yüksek alkollerle esterifikasyonu sonucu ise aroma aktif esterler oluşur (Yılmaztekin, 2009).

Çizelge 2.4. Şeker pancarı melasının kimyasal kompozisyonu (Curtin, 1983; Yılmaztekin, 2009)

Parametre	Bileşim (%)
Briks	79.5
İndirgen Şeker	0.1-2.7
Toplam Şeker	48
Ham Protein	6
Toplam Yağ	-
Kül	8.7
Toplam Lif	-
Kalsiyum	0.2
Fosfor	0.03
Potasyum	4.7
Sülfür	0.5
Sodyum	1.0
pH	5-7
Özgül Ağırlık	1.40

2.5. Biyoteknolojik Yolla Üretilen Aroma Maddelerinden Bazıları

Mikroorganizmalar tarafından üretilip gıdalarda yaygın olarak kullanılan aroma bileşenleri aşağıdaki gibidir;

- Vanilin
- Benzaldehit
- Laktonlar (Özellikle γ ve δ -laktonlar)
- Esterler (Özellikle etil asetat ve izoamil asetat)
- Diasetil
- Terpenler
- Pirazinler
- Alkoller (2-feniletanol)

➤ Metil ketonlar

Bunlardan gıda endüstrisinde en yaygın olarak kullanılanları aşağıda açıklanmıştır.

2.5.1. Esterler

Esterler vermiş oldukları meyve aromasından dolayı gıdalarda yaygın olarak kullanılan aroma maddelerindedir (Longo ve Sanroman, 2006). Uzun zincirli asitlerle alkoller arasında meydana gelen reaksiyonlar sonucu oluşan esterler gıda, deterjan, kozmetik ve farmakoloji endüstrilerinde katkı maddesi olarak kullanılmakta, kısa zincirli asitlerle alkollerin ürünleri ise önemli aroma maddelerini oluşturmaktadır (Yılmaztekin, 2009).

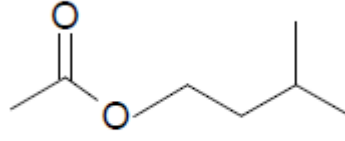
Esterler doğada birkaç yollar ile üretilmektedir. Bunlardan en çok çalışılan genellikle amino asit deşragasyonu sonucu oluşan alkollerin lipaz veya esterazlar ile esterifikasyonudur. Bu reaksiyonun sağlamış olduğu avantajlardan dolayı kısa zincirli esterlerin bu hidrolitik enzimlerle sentezi uzun yıllardan beri araştırılmaktadır. (Macedo vd., 2003; Akoh vd., 2004; Adachi ve Kobayashi 2005; Joseph vd., 2008). Ester sentezinde bilinen diğer yol ise alkol açıl transferazlarla esterlerin sentezidir.

Esterler reçeller, içecekler gibi meyve aromalı gıdalarda, süt ürünlerinde (tereyağı, ekşi krema, peynir gibi) kullanılmaktadır. Etil asetat, izoamilasetat, 2-fenilasetat gibi asetat esterleri şarap ve diğer üzüm türevli bir çok içekte önemli aroma bileşenleri olarak bilinmektedirler (Longo ve Sanroman, 2006).

Aroma esterleri arasında düşük molekül ağırlıklı olan alkil esterler gıda endüstrisinde en çok ihtiyaç duyulan esterlerdir. Özellikle de izoamil asetat güçlü muz aroması vermesinden dolayı gıda endüstrisinde ihtiyaç duyulan en önemli esterdir (Torres vd., 2009). Birçok maya ester oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bunlara örnek olarak *Picchia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Willopsis* türleri verilebilir.

2.5.1.1. İzoamilasetat ve oluşum mekanizması

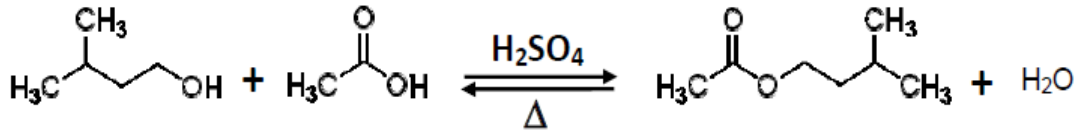
İzoamil asetat (3-metilbütilasetat) güçlü muz aroması veren gıda endüstrisinde en çok ihtiyaç duyulan esterdir (Torres vd., 2009). İzoamil asetatın kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



İzoamil asetat

Şekil 2.2. İzoamil asetatın kimyasal yapısı (Yılmaztekin, 2009).

İzoamil asetat bal, karemel, içecekler gibi bir çok gıdada aroma verici ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yıllık izoamil asetat ihtiyacı sadece Amerika Birleşik Devletlerinde 74 000 kg'dır (Welsh vd., 1990). İzoamil asetatın mevcut üretimi Şekil 2.3' de görüldüğü gibi konsantre sülfirik asitin katalist olarak kullanıldığı Fisher esterifikasyon mekanizmasıyla sentetik olarak üretimidir (Şekil 2.3) (Welsh vd., 1990). Bu şekilde üretilen izoamil asetat ucuz ancak doğal değildir.



Şekil 2.3. İzoamil asetatın Fisher esterifikasyon mekanizması ile üretimi

Diğer bir yandan izoamil asetatın bitkisel kaynağından direkt olarak ekstraksiyonu izoamilasetatın doğal olarak eldesini sağlarken tüm pazarın ihtiyacını karşılayamamakta ve çok pahalı olmaktadır.

Hem çevre dostu olan hemde doğal olarak izoamil asetat üretimine olanak tanıyan yöntem biyoteknolojik yöntemlerle izoamil asetatın üretimidir. Bu yöntem kendi içerisinde enzimatik biyodönüşümle izoamil asetat üretimi, fermantasyon yolu ve mikrobiyal biyodönüşümle üretimi içermektedir. İzoamil asetatın enzimatik biyodönüşümünde farklı kaynaklardan elde edilen serbest veya immobilize lipazlar ve karboksil esterazlar kullanılmaktadır. İzoamil asetatın fermantasyon ve mikrobiyal

biyodönüşümünde ise çoğunlukla mayalar ve bazı küf türleri (*Ceratocystis moniliformis* gibi) yer almaktadır.

Mayalar izoamil asetatı yüksek alkollerden oluşturmaktadır. Yüksek alkoller de (izoamil alkol gibi) fermantasyon esnasında katabolik (Erlc) ve anabolik yollarla oluşturmaktadırlar. Katabolik yolda mayalar tarafından hücre içine alınan dallanmış zincirli valin, lösin ve izolösin amino asitlerinden aminotransferaz enzimi aracılığıyla gerçekleşen transaminasyon reaksiyonu sonucu izoamil alkolün öncül bileşeni olan keto asit oluşur. Sonrasında keto asitler dekarboksile olarak aldehitlere ve aldehitler de NAD'a bağlı dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla alkollere indirgenir. Katabolik reaksiyonda valin aminoasitinin indirgenmesiyle izobütanol, lösin amino asitinin indirgenmesiyle 3-metilbütanol (izoamil alkol), izolösin amino asitinin indirgenmesiyle ise 2-metil bütanol oluşmaktadır. Maya hücresi tarafından oluşturulan yüksek alkollerden 3-metilbütanol (izoamilalkol) ve asetil-CoA arasında alkol asetil transferaz enzimi vasıtasıyla 3-metilbütüilasetat (izoamil asetat, muz aroması) oluşmaktadır (Vandamme, 2003; Chen, 1978; Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010).

2.6. Mikrobiyal Biyodönüşüm Yolu İle Aroma Maddesi Üretiminde Karşılaşılan Güçlükler ve Çözüm Yolları

Mikrobiyal biyodönüşüm yolu ile üretilen aroma maddeleri düşük konsantrasyonlarda üretildiğinden, çoğu üretimlerini ekonomik yapacak düzeyden daha düşüktür. Bu durum genellikle üretilen çoğu aroma bileşenlerinin ve onun öncül bileşenlerinin mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisindedir (Perez, 2001).

Mikrobiyal biyodönüşümle aroma maddesi üretiminde karşılaşılan en önemli problemlerden biri üretilen ürünün biyokatalist tarafından sınırlandırılmasıdır. Oluşturulan ürünün belirli konsantrasyonların üzerine çıkması biyokatalist üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Bu durumda ise biyokatalist aktivitesini kaybeder veya hücreler canlılıklarını yitirir (Woodley vd., 2008). Dolayısıyla bu durum oluşacak ürünün verimini olumsuz yönde etkileyerek üretilen ürünün düşük düzeylerde üretilmesine sebebiyet vermektedir. Bu durum da üretimlerin endüstriye uygulanabilirliğini azaltmaktadır.

Bu güçlüklerin üstesinden gelebilmek, dolayısıyla ürün ve proses verimini arttırmak için farklı yaklaşımlar uygulanabilir. Bunlardan biri daha yüksek konsantrasyonlarda ürün üretilebilen yeni suşların araştırılmasıdır. Diğer bir yaklaşım genetik mühendisliği metotları kullanılarak arzu edilen özelliğin kazandırıldığı, üretilen ürünün inhibisyonundan etkilenmeyen genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Her yeni ürün için yapılması gerektiğinden bu yaklaşım beraberinde bir takım zorlukları da getirmektedir. Ayrıca genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanımı konusunda spesifik bir düzenleme mevcut değildir ve bu tekniklerin gıda maddelerinde kullanımı konusundaki halk algısı henüz pozitif değildir (Perez, 2001).

Son olarak da proses mühendisliği tekniklerinin kullanımı alternatif veya tamamlayıcı yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem farklı suşlara ve biyodönüşüm sistemlerine genel olarak uygulanabildiği için diğer yöntemlere göre bir takım avantajlara sahiptir (Perez, 2001). Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği (YÜK) içerisinde farklı teknikleri barındıran proses mühendisliği yaklaşımlarındandır.

2.7. Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği

Proses mühendisliği çözümlerinden olan Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği reaksiyon ortamından mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ürünün oluşur oluşmaz ayrıldığı, genellikle kimya mühendisliği alanında kullanılan ayırma tekniklerinden meydana gelir. Bu teknik sadece hücre dışı üretimler için uygulanabilir. Dolayısıyla oluşan ürünün hücre etrafında birikimi önlenmiş olur (Perez, 2001).

Bir çok biyoteknolojik proses, ürün inhibisyonu (sitotoksitesisi) veya toksik yan ürünlerin oluşumu ile kısıtlanır. Bu engelleri bertaraf etmek için ürünün reaksiyon ortamından sürekli olarak alımı olan Yerinde Ürün Kazanımı Teknikleri geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Hua ve Xu, 2011). Bu teknik sayesinde biyokatalist etrafındaki ürün konsantrasyonu, oluşan ürün ortamdan sürekli alınarak inhibisyon seviyesinin altında tutulmuş olur ve dolayısıyla hücreler hedeflenen ürünü üretmeye devam edebilirler. Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği (In Situ Product Removal) şu şekilde tanımlanabilir;

Katalist tarafından oluşturulan ürünün, biyoreaktör ortamından ürün oluşur oluşmaz uzaklaştırıldığı tekniktir. Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği'nin amacı ürün toksisitesi veya degravasyonunu önlemek için reaktör ortamından ürün oluşur oluşmaz ürünün alınmasıdır. Dolayısıyla fermenter verimini arttırmaktır. Ayrıca saflaştırma ve ayırma proseslerinin daha kolay ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlayan tekniktir.

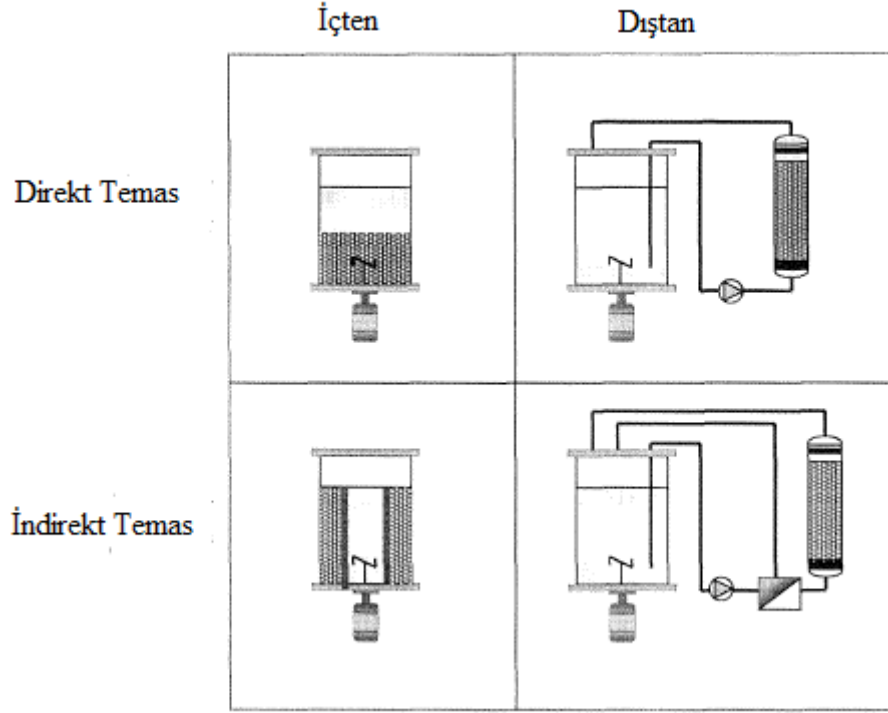
Saflaştırma ve ayırma prosesleri pahalı ve teknik olarak uğraştırıcı biyoproseslerdir (Carstensen vd., 2012). Biyoteknolojik proseslerde üretim maliyetinin %50-70'i ayırma ve saflaştırma proseslerinden ileri gelmektedir (Berg, 2010). Fermantasyon ürünlerinin daha etkili bir biçimde ayrılması ve saflaştırılması için uygun proseslerin tasarlanması ve geliştirilmesi önemlidir. Birleştirilmiş prosesler etkinliği, ürün verimini, kalitesini arttıran bir çözümdür. Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği ürün oluşmu ve ayırımının tek bir reaktörde gerçekleştirildiği birleştirilmiş prosesler benzeri prosestir.

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği reaktörde ürün birikiminin sebep olduğu verimdeki azalışın görüldüğü klasik kesikli proseslere alternatif bir yöntemdir (Carstensen vd., 2012). Bu teknik endüstriyel kimyasalların (özellikle organik solventlerin ve organik asitlerin), farmakolojinin, gıda ingredientlerinin, steroidlerin, aroma bileşenlerinin, sekonder metabolitlerin ve çeşitli enzimlerin ekonomik mikrobiyal üretimlerinde kullanılmaktadır (Woodley vd., 2008; Perez, 2001).

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği mevcut proseslerin geliştirilmesinde kullanılan bir teknik olarak düşünülse de, ürün hücre girişiminin yoğun olduğu durumlarda istenilen prosesin uygulanabilmesi için bir gerekliliktir (Serrano, 2003).

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği için proses şekilleri Şekil 2.4'de görülmektedir. Ayırma işlemi biyokatalizin gerçekleştiği reaktörün iç kısmında (içten) veya dış kısmında (dıştan) gerçekleşebilir. Bazı durumlarda şekildeki direkt temasta olduğu gibi ayırma işlemi mikroorganizmalar ile direkt temasta olup tüm biyosüspansiyondan gerçekleşirken diğer temasta ise birtakım hücre ayırma sistemleri kullanılarak hücrelerin biyosüspansiyonundan ayrılması ile elde edilen süpernatanttan bir ayırım yapılmaktadır (İndirekt temas). Bu durumu etkileyen

faktörler ayırmak istediğimiz bileşenin uçuculuk, moleküler ağırlığı, boyutları, çözünürlüğü ve hidrofobitesi gibi özelliklere bağlıdır (Heerema vd., 2011).



Şekil 2.4. Yerinde ürün kazanımı tekniğinde kullanılan bazı prosesler (Perez, 2001)

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniğinde proses şekillerinin yanı sıra önemli olan diğer bir değişken prosesin biçimidir. Yani prosesin uygulanma şekillerinden olan kesikli, kesikli-beslemeli, sürekli oluşudur. Bunların uygulanabilirliği ise seçilen ayırma metoduna ve proses şekline bağlıdır.

Biyoteknolojik üretimler için uygun Yerinde Ürün Kazanım Tekniğine karar vermek için prosese uygun doğru ayırma tekniğini, en uygun proses şeklini (direkt temas, indirekt temas) ve bu prosesin en iyi uygulanma şeklini (kesikli, kesikli-beslemeli, sürekli sistem) tespit etmek gerekir.

2.7.1. Yerinde ürün kazanımı tekniğinin potansiyel faydaları

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği'nin potansiyel faydaları şu şekilde sıralanabilir;

- Ürün tarafından oluşan inhibisyon veya toksisitenin azaltılması veya uzaklaştırılması dolayısıyla ürün veriminin artırılması (Hua ve Xu, 2011)
- Ürün stabilizasyonu (Hua ve Xu, 2011)
- Saflaştırma proseslerinin kolaylaştırılması (Hua ve Xu, 2011)
- Ürünün geri kazanımının kolaylaşması
- Ekonomik oluşu
- Sürekli sistemlere olanak tanınması (Cartensen vd., 2012)

Yerinde Ürün Kazanımı tekniği ile ürün oluşur oluşmaz ortamdan alındığı için ürünün biyoreaktör ortamında belirli konsantrasyonların üzerine çıkması durumunda mikroorganizma üzerindeki inhibisyon etkisi azaltılmış olur.

Ürün oluşur oluşmaz ortamdan alınarak ürünün daha ileri bileşenlere dönüşümü veya ürünün degradasyonu önlenmiş olur. Dolayısıyla ürün stabilizasyonu sağlanmış olur.

Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği ile oluşan ürün bir taraftan da uygun teknik kullanılarak (adsorpsiyon, ekstraksiyon, membran teknikleri gibi...) alındığı için ürünün geri kazanımı kolaylaştırılmış olur ve dolayısıyla saflaştırma basamakları azalmış olur. Bu durum da üretimin maliyetine yansır yani üretimin daha ekonomik olmasını sağlar. Çünkü biyoteknolojik üretimlerde üretim maliyetinin %50-70 'ini saflaştırma basamakları oluşturmaktadır (Berg, 2010).

Ayrıca bu teknik sayesinde hücrelerin ortamda kalması ile daha yüksek hücre yoğunluğu oluşmaktadır. Ürünün ortamdan alınmasını ve hücrelerin ortamda kalarak yoğunluğunun artmasını göz önüne aldığımızda Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği daha yüksek üretime ve verimliliğe sebep olmaktadır. Bu teknik aynı zamanda sürekli sistemi mümkün kılmaktadır. Sürekli proseslerin kullanılmasıyla da işçilik maliyeti de azalmaktadır (Carstensen vd., 2012). Dolayısıyla üretimler daha ekonomik hale gelmektedir.

2.7.2. Yerinde ürün kazanımı teknikleri (YÜK)

Son 20 yıl içinde farklı ürün kazanım tekniklerini araştırmak ve geliştirmek üzere geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. YÜK yöntemlerini sınıflandırmada farklı kriterler (teknolojik uygulamalar, son ürünün özellikleri gibi...) göz önüne alınarak farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Freeman vd. teknolojik uygulamalara göre YÜK yöntemlerini 5 katagoriye ayırmıştır. Bunlar;

- Evaporasyon
- Ekstraksiyon
- Boyut Seçici Permeasyon
- Reversible Kompleks Oluşum
- Ürün İmmobilizasyonu (Freeman vd., 1993)

Diğer bir bakış açısı Schügerl vd. tarafından ortaya koyulmuştur. Bu sınıflandırmaya göre Yerinde Ürün Kazanım Teknikleri son ürünün moleküler ağırlığına göre katagorize edilmiştir (Schügerl ve Hubbuch, 2005).

Düşük Molekül Ağırlıklı (Primer ve Sekonder metabolitler)

Yüksek Molekül Ağırlıklı (DNA, Proteinler, Antikorlar)

Düşük molekül ağırlıklı bileşenler için;

- Birleştirilmiş ekstraksiyon ve enzimatik dönüşüm
- Yerinde Ürün Ekstraksiyon
- Yerinde Ürün Adsorpsyon
- İyon değişim mümkün olan ayırma teknikleridir (Schügerl ve Hubbuch, 2005).

Yüksek molekül ağırlıklı bileşenler için ;

- Expanded Bed Adsorpsyon (EBA)
- Membran Dayalı Adsorpsyon

- İki Fazlı Sıvı-Sıvı Sistemler (Ekstraktif Fermantasyon)
- Yüksek Gradient Magnetik Alan (HGMA) ise adsorpsiyon teknikleri olarak kategorize edilmiştir (Schügerl ve Hubbucch, 2005).

Schügerl aynı zamanda son ürünü sınıflandırma kriteri olarak bir sınıflandırma yapmıştır. Biyoteknolojik olarak üretilen ürünlerden alkoller, karboksilik asitler ve amino asitler, proteinler, antibiyotik ve diğer sekonder metabolitler için bir sınıflandırma yapmıştır (Schügerl, 2000). Bu sınıflandırmadan biri olan antibiyotik ve diğer sekonder metabolitlerin ayırımında YÜK tekniği olarak adsorpsiyon, solvent ekstraksiyon, kristalizasyon sınıflandırmasını yapmıştır.

YÜK teknikleri için yapılan daha genel bir sınıflandırma ise şu şekildedir;

Diğer Bir Faza Ekstraksiyon

- ✓ Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (Ekstraktif Fermantasyon, İki fazlı sistemler)
- ✓ Katı Faz Ekstraksiyon (Adsorpsiyon, İyon exchange)
- ✓ Gaz Ekstraksiyon (Süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyon)

Membran Ayırma Teknikleri

- ✓ Hollow-Fiber Membranlar
- ✓ Pervaporasyon (Serrano, 2003).

2.7.3. Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan farklı yerinde ürün kazanımı teknikleri

Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan farklı YÜK teknikleri mevcuttur. Bunlar sıvı-sıvı ekstraksiyon (iki fazlı ekstraksiyon, ekstraktif fermantasyon) oldukça basit, ucuz ve kolay bir şekilde uygulanabilir tekniktir (Hua ve Xu, 2011). Bir diğeri ise süper kritik akışkanların özellikle de karbondioksitin kullanıldığı süperkritik karbondioksit ekstraksiyonudur.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun uygulama alanlarının %38'ini gıda endüstrisi oluşturur. Gıda endüstrisinde uygulanan süperkritik akışkan ekstraksiyonunun %40'ı aroma bileşenlerine uygulanır. Biyoteknolojik üretimlerde üretilen ürünün ortamda birikmesi durumunda oluşturduğu inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için sürekli ve yerinde ürün ekstraksiyon yöntemi olarak süperkritik CO₂ ekstraksiyonunun kullanılması bu olumsuzlukları ortadan kaldıracak alternatif yöntemler arasında görülmektedir (Yılmaztekin, 2005).

Bazı aroma maddelerinin fermantasyonla üretiminden sonra sulu çözeltilerinden süperkritik akışkan ile geri kazanımı konusundaki uygulamalar mevcuttur. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces rouxii* tarafından üretilen etanolün fermantasyon çözeltisinden süperkritik CO₂ ile ekstraksiyonudur. Yüksek hücre konsantrasyonu kullanılarak 7 MPa CO₂ basıncı altında 10,9 g/L/h hacimsel verimliliği sağlamak mümkün olmuştur (Serrano, 2003). *Kluyveromyces marxianus* kültüründen üretilen 2-feniletanol'ün mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için direkt süperkritik CO₂ ekstraksiyonu düzeneği sisteme adapte edilerek oluşan 2-feniletanol'ün (gül aroması) anında ekstrakte edilmesi sağlanmıştır. Oluşturulan aroma bileşenlerinin % 97'si % 91 saflıkta elde edilmiştir (Serrano, 2003).

Membran ayırma tekniklerinden aroma bileşenlerinin saflaştırılmasında ve yerinde kazanımında kullanılan tipik membran prosesleri hollow-fiber membranlar (içi boş lif modülü) ve pervaporasyondur (Serrano, 2003). Adler vd. *Kluyveromyces marxianus* CBS 600 mayası tarafından 2-feniletanol (gül aroması) ve 2-fenilasetat üretiminde YÜK tekniği olarak membran ayırma tekniğini kullanarak model geliştirme çalışmaları yapmışlardır. Membran ekstraksiyonunu Hollow Fiber (içi boş lif modülü) kullanarak gerçekleştirmişlerdir (Adler vd., 2011).

Bengtson vd. 6-pentil- α -pirano'nun hücreden yoksun sıvı ortamdan hidrofobik membranlar kullanılarak pervaporasyon ile geri kazanımını araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda membran kısmında sekiz kat zenginleştirmeye ulaşmışlardır. Buna karşın molekülün düşük üretim veriminden dolayı fermantasyon ve pervaporasyon birleştirildiğinde sadece ılımlı sonuçlar elde edilmiştir (Bengtson vd., 1992). Hücre geri kazanımlı pervaporasyon sistemi ile fermantasyonun birleştirilmesi durumunda *S. cerevisiae* tarafından etanol üretiminde artış gözlemlenmiştir. Sürekli

konsantrasyon ve membran biyoreaktörden etanolün geri kazanımı ile fermantasyon sıvısındaki etanol konsantrasyonu 20 g/L civarında tutulmuştur. Bu şartlar altında etanol verimliliği 72 saat sonunda 1.74 g/L 'den 3.25 g/L/h olarak artmıştır. Sürekli fermantasyon/membran pervaporasyon sistemi kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Sürekli pervaporasyon modül operasyonu (polidimetil siloksan membranlar ile) esnasında fermantasyon sıvısı hücre yoğunluğu 15 g/L'den 23 g/L'ye etanol verimliliği de 4.9 g/L'den 7.8 g/L/h'e ulaşmıştır (Serrano, 2003).

Benzaldehitin *Bjerkandera adusta* tarafından üretimi esnasında fermantasyon/pervaporasyon sisteminde polidimetil siloksan membran kullanımı ile artış göstermiştir. Sürekli geri kazanım ile fermentördeki benzaldehit konsantrasyonu inhibisyon konsantrasyonunun altında kalmıştır. Pervaporat içerisindeki benzaldehit konsantrasyonu 3,2 ve 6,2 g/L arasındaki konsantrasyonlarda kalmıştır (Serrano, 2003).

Biyoteknolojik yolla aroma maddesi üretimi esnasında YÜK tekniklerinden en yaygın olarak kullanılanı Katı Faz Ekstraksiyonu veya diğer bir ifade ile Yerinde Ürün Adsorpsiyonudur.

2.8. Adsorpsiyon ve Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler

Adsorpsiyon tanım olarak, atom, iyon ya da moleküllerin bir fazdan diğer katı fazın yüzeyine tutunması olarak bilinmektedir. Adsorpsiyonun gerçekleştiği katı yüzeye "Adsorban", adsorbe olan maddeye ise "Adsorbat" denilir (Guyer vd., 2003). Adsorpsiyon, adsorbent ve adsorbat arasında gerçekleşen etkileşime göre fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Fiziksel adsorpsiyonda adsorbent ve adsorbat arasında zayıf Van der Waals çekim kuvvetleri etkilidir ve aynı zamanda tersinirdir. Eğer adsorbent ile adsorbat molekülleri arasındaki etkileşim Van der Waals etkileşimlerinden daha kuvvetli ise yani, kovalent bağ oluşumu gibi kuvvetli etkileşimlerle gerçekleşiyorsa bu tür adsorpsiyona kimyasal adsorpsiyon denir. Kimyasal adsorpsiyon genellikle tersinir değildir (Bilir, 2009).

Adsorpsiyonu etkileyen faktörler;

- Adsorbe olan maddenin (Adsorbat) konsantrasyonu, moleküler ağırlığı, moleküler boyutu, moleküler yapısı, moleküler polaritesi
- Adsorpsiyonu gerçekleştiren materyalin (Adsorbent) yüzey alanı, yüzeyin fizikokimyasal yapısı, mevcut yüzeye, partiküllerin boyutları
- Solüsyonun sıcaklığı, pH ve solüsyon içindeki adsorbat ile yarışma içinde olan diğer bileşenler (Guyer vd., 2003).

Biyoteknoloji alanında adsorpsiyon prosesi proteinler, aroma bileşenleri, ikincil metabolitler gibi çeşitli biyoürünlerin saflaştırma proseslerinde bu ürünlerin ayrımı ve konsantrasyonu için geniş bir şekilde uygulanmaktadır (Perez, 2001).

2.9. Yerinde Ürün Adsorpsiyon

Bu proses, bir ürünün organik veya inorganik polimerik katıya adsorpsiyonu olarak tanımlanır.

YÜK tekniklerinden, Yerinde Ürün Adsorpsiyon Tekniği doğal aromalar ve antibiyotiklerin biyodönüşümünde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Bu teknik mikroorganizmalar tarafından üretilen ürünün toksisitesini veya inhibisyonunu azaltmak veya uzaklaştırmakta ürünün daha ileri saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmaktadır (Mei vd., 2009).

Sentetik reçineleri veya diğer adsorpsiyon ortamlarını kullanan YÜK tekniklerinden biri olan Yerinde Ürün Adsorpsiyon (YÜA), biyoteknolojik üretim proseslerinde ürün geri kazanımını kolaylaştırmak veya ürün ve/veya substrat inhibisyonunu durdurmak için geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Hua ve Xu, 2011). Bunun yanı sıra yapılan son çalışmalarda YÜA tekniğinin daha çok ürün inhibisyonunu engellemek ve dolayısıyla ürün verimini arttırmak amaçlı olarak kullanımı karşımıza çıkmaktadır. YÜA birçok çeşitlilikteki ürün tipleri için kullanılan bir yöntemdir. Bunlara örnek olarak etanol, aseton, bütanol gibi solventlerin üretimi, organik asitlerin, aroma bileşenlerinin, kimyasalların, steroidlerin, proteinlerin üretimi verilebilir.

YÜA yönteminde yöntemin etkinliğini etkileyen etmenler uygun adsorbent materyalinin seçimi ve adsorbentin uygulanma şekli (direkt veya indirekt uygulama) veya diğer bir ifade ile prosesin konfigürasyonudur.

2.10. Yerinde Ürün Adsorpsiyon Tekniğinde Yaygın Olarak Kullanılan Adsorpsiyon Materyalleri

Gıdalarda adsorpsiyon materyali olarak kullanımına izin verilen adsorbent ve iyon değişim materyalleri FDA ve Council of Europe gibi ulusal mevzuatlarla düzenlenmektedir (Kammerer vd., 2011). Bu kapsamda en yaygın kullanılan ve en yaygın uygulanan adsorpsiyon materyalleri;

- Aktif Karbon
- Zeolit
- Silika jeller
- Sentetik Reçineler (Amberlite XAD-16, HZ818, DM11, strien divinil benzen...)
- Sentetik İyon Exchange Materyaller (Kammerer vd., 2011).

Adsorbent ve iyon değişim materyalleri sadece matriksin kompozisyonu, polarite, kimyasal ve fiziksel dirençlerine göre değil aynı zamanda partikül boyut dağılımı, iç ve dış yüzey alanı, yoğunluk, por yarıçap dağılımı, porozite ve por boyut dağılımı gibi kriterlere göre de kategorize edilir (Kammerer vd., 2011).

Aroma üretimi esnasında Yerinde Ürün Kazanımı Tekniği'nde adsorbentlerin kullanımı geniş bir şekilde çalışılmıştır. Fermantasyon ortamından aroma bileşenlerini toplamak amacıyla Krings vd. (1993) 31 farklı adsorbenti ve bunların adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmişlerdir. En iyi adsorbent materyali bileşenlerin % 86'sından daha fazlasını adsorbe edebilen aktif karbon seçilmiştir. Ancak aktif karbon yaygın organik solventlerin desorbent olarak kullanımında daha zayıf desorpsiyon özelliği göstermiştir. En uygun adsorbent olarak strien-divinil benzen reçinesi ve zeolit seçilmiştir. Bu materyaller aktif karbona benzer adsorpsiyon oranı sergilerken aktif karbondan daha iyi desorpsiyon özelliği göstermiştir. Bunun

yanısıra yeni sentetik reçinelerin geliştirilmesi ile daha yüksek seçicilik, daha fazla yükleme ve uzun süre performans özelliklerine sahip reçineler elde edilmiştir (Serrano, 2003).

Aroma maddelerinin Yerinde Ürün Adsorpsiyonunda çoğunlukla ticari adsorbent materyalleri (sentetik reçineler) tercih edilmektedir. Bunun en önemli sebebi ticari adsorbentlerin diğer adsorbentlere kıyasla düşük fiyat ve esneklik gibi birtakım üstünlüklere sahip olmasıdır.

2.10.1. Sentetik reçineler

Sentetik reçineler geniş iç yüzey alanına sahip, saflaştırma proseslerinde kullanılan organik polimerik adsorbentlerdir. Polimerizasyon ve polikondensasyon reaksiyonu sonucu oluşturulurlar (Kammer vd., 2011; Serrano, 2003). Sentetik polimerik adsorbentler polistrien-divinil benzen kopolimerleri, divinilbenzen-etilvinillbenzen kopolimerleri ve vinilpiridin gibi hidrofilik veya hidrofobik doğaya sahip maddeleri içerir (Soto vd., 2011). Polimerik adsorbentler iç yüzeyinde çokça gözenek içeren yapılar olarak düşünülebilir ve kullanıldığı çevreye bağlı olarak geniş çeşitlilikteki farklı türleri adsorplayabilirler. Örneğin su gibi polar çözeltilerde polimerik adsorbentler apolar veya hidrofobik davranış sergileyebilirler. Dolayısıyla az çözünen organik türleri adsorplayabilirler. Bu davranışı sergileyen adsorbentler çoğunlukla hidrofobik yapıya sahip strienik adsorbentlerdir. Hidrokarbonlar gibi apolar solventlerden polar veya hidrofilik özellik göstererek kendisiyle benzer polariteye sahip bileşenleri (polar) adsorplayan sentetik reçine türleri çoğunlukla akrilik ve fenolik adsorbentlerdir. Adsorpsiyon olayında sentetik reçine solusyondan kendine benzer bileşeni yapısına adsorbe eder. Yani polar reçineler polar bileşenleri, apolar reçineler apolar bileşenleri adsorbe ederler (Anonim, 2013b).

Biyoteknoloji alanında laboratuvar ölçekliden endüstriyel üretime kadar doğal üretim izolasyonu için geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Serrano, 2003). Sentetik reçinelerin yüzey alanının aktif karbona kıyasla daha küçük olmasına rağmen, polimerik adsorbentler uzun ömürlü, kimyasal olarak inert ve stabil, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Daha düşük fiyat ve sınırlı toksisite ile etkili, seçici

bir şekilde bileşenlerin adsorpsiyonu gerçekleştirilebilmekte ve rejenerasyon kolaylığı sağlamaktadır (Soto vd., 2011).

Sentetik adsorbentlerin kullanımı geleneksel solvent-ekstraksiyon prosesine nispeten bir çok avantajlara sahiptir (Serrano, 2003).

Bu avantajlar;

- ✓ Hücreler için toksik değildir.
- ✓ Sentetik adsorbentler por yapılarından dolayı moleküler eleme fonksiyonuna sahiptir.
- ✓ Adsorbentler ya sürekli formda (kolonda) ya da kesikli formda (süspansiyon içinde) kullanılabilirler.
- ✓ Adsorbentler, adsorbe edilen bileşenlerin elue edilmesi ile tekrar tekrar kullanılabilme özelliğine sahiptir (Serrano, 2003).
- ✓ Son ürünün kalitesini onun organoleptik özelliklerini olumsuz etkilemez (Hua ve Xu, 2011).
- ✓ Çözünen maddenin geri kazanımı ve rejenerasyonu genellikle tek prostestir. Bu açıdan da ekonomiktir (Zang vd., 2008).
- ✓ Adsorbentin hızlı bir şekilde rejenerasyonu adsorbentin geri kazanım prosesini kolaylaştırır (Zang vd., 2008). Dolayısıyla şaflştırma basamakları azaltılmış ve kolaylaştırılmış olur.

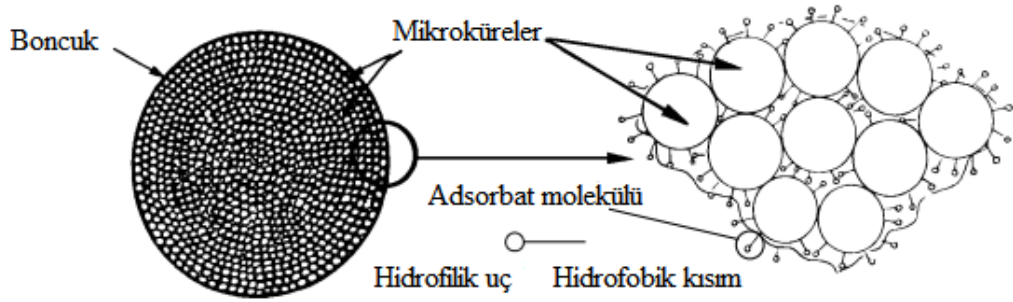
Sentetik reçineler jel tipi form, makroağ formu (makrogözenekli reçineler bu formdadırlar) veya hiper çapraz bağı form gibi farklı mekanizmalarda oluşturulurlar.

2.10.1.1. Makrogözenekli reçineler

Makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri yüksek derecede çapraz bağı, iyonik olmayan, geniş yüzey alanına dağılmış çok sayıdaki sabit gözenekleri içeren yapılarıdır (örneğin gözenek çapları 50 Å'dan büyüktür) (Li ve Chase, 2010). Makrogözenekli reçineler farklı yüzey alanına, polariteye, gözenek çapına bağı

olarak farklı ticari isimlerle anılırlar. Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-16, H103, X5, AB-8 farklı özelliklerdeki makrogözenekli reçinelere örnek olarak verilebilir.

Hidrofobik makrogözenekli bir reçinenin genel yapısı yapısı Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Hidrofobik makrogözenekli reçinelerin genel yapısı (Anonim, 2013c)

Makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri ile adsorpsiyon şu şekilde gerçekleşir; adsorbat molekülünün hidrofobik kısmı makrogözenekli reçinenin hidrofobik dış yüzeyine tutulurken hidrofilik kısmı sulu faza doğru yönelir. Adsorbe olan bileşenler mikroküreciklere tamamen nüfuz etmezler. Mikroküreciklerin dış yüzeyine zayıf Van der Waals bağları ile tutunurlar. Dolayısıyla adsorpsiyon fiziksel bir adsorpsiyon olduğundan makrogözenekli reçinelerin dış yüzeyine tutunan bileşenler uygun organik solvent kullanılarak ayrılabilir. Organik solvent bu işlemi her bir boncuktaki gözenekli yapılara hızlı bir şekilde difüzyon ile gerçekleştirir. Dolayısıyla boncukların iç ve dış yüzeyine tutunmuş olan bileşenler hızlı bir şekilde solvante desorbe edilerek ayrılmış olurlar. Makrogözenekli reçineler ile adsorpsiyon yüksek adsorpsiyon kapasitesi, uygulama kolaylığı, reçinelerin ve ürünün geri kazanımı kolaylığı, ucuz olması gibi basit ve etkili bir yöntem olduğundan diğer adsorpsiyon materyallerine göre birçok üstünlüğe sahiptir. Dolayısıyla bu faktörler makrogözenekli reçinelerin adsorpsiyonda tercih edilme sebepleri arasındadır.

2.11. Uygun Adsorbentin Seçim Kriterleri

Yerinde Ürün Adsorpsiyon Yöntemini uygulamada yöntemin etkinliğini etkileyen en önemli aşamalardan biri adsorpsiyon materyalinin seçimidir.

Adsorbent seçim kriterleri adsorbe olan bileşenin ve solventin karakteristik özelliklerine bağlıdır (Guyer vd., 2003). Reçine seçiminde adsorpsiyon kapasitesi, adsorpsiyon etkinliği, desorpsiyon kapasitesi, desorpsiyon etkinliği ve ürüne özgü olması gibi kriterler göz önüne alınmaktadır. Adsorpsiyon kapasitesi ise adsorbentin gözenekliliği, yüzey alanı, partikül boyutları ve adsorbatın yapısı, suda çözünürlüğü, iyonik yükü, fonksiyonel grupları, moleküler ağırlığı ve boyutlarına, solusyonun şartlarına (pH, sıcaklık, iyonik direnç, solusyon konsantrasyonu ve solüsyondaki bileşenlerin yarışı) bağlıdır (Soto vd., 2011). Dolayısıyla uygun adsorbentin seçimi için bu faktörler göz önünde bulundurularak değerlendirilerek bir seçim yapılmalıdır.

2.12. Aroma Maddelerinin Üretiminde Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinin Uygulandığı Çalışmalar

Stark vd. (2002) L-fenilalaninin 2-feniletanole *S. cerevisiae* tarafından biyodönüşümü esnasında oluşan 2-feniletanolün maya üzerindeki toksisitesini önlemek amacıyla Yerinde Ürün Kazanımı Teknikleri'nden ekstraktif fermantasyonu kullanmışlardır. Ekstraktant olarak oleik asit kullanılarak gerçekleştirilen kesikli-beslemeli üretim sonucunda 12.6 g/L 2-feniletanol konsantrasyonuna ulaşmışlardır.

Etschmann vd. (2003) *K. marxianus* CBS600 tarafından 2-feniletanol üretiminde Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinden sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Ekstraktant olarak oleil alkol kullandıklarında 3 g/L 2-feniletanol elde etmişlerdir.

Serp vd. (2003) *S.cerevisiae* Giv2009 tarafından 2-feniletanol üretiminde üretim verimini arttırmak amacıyla Yerinde Ürün Kazanımı Teknikleri'nden solvent immobilizasyonu kullanmışlardır. Kesikli beslemeli olarak gerçekleştirmiş oldukları üretim sonucunda üretilen ürünü polietilenden oluşmuş polimerik matriks içerisindeki

solvente adsorbe etmişlerdir. Bu işlemin sonucunda 2-feniletanolün hacimsel verimliliğinin arttığını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu işlemin saflaştırma basamaklarını da kolaylaştırdığını belirtmişlerdir.

Etschmann vd. (2005) *K. marxianus* CBS600 tarafından L-fenilalaninin 2-feniletanol ve 2-fenilasetata biyodönüşümünde oluşan ürünün inhibisyonunu önlemek için Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinden pervaporasyonu kullanmışlardır. 5.2 g/L 2-feniletanol ve 5.9 g/L 2-fenilasetat elde etmişlerdir.

Etschmann ve Schrader (2006) *K. marxianus* CBS600 tarafından 2-feniletanol ve 2-fenilasetat üretiminde oluşan ürünün inhibisyonundan dolayı Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinden Yerinde Ürün Ekstraktantı kullanmışlardır. Ekstraktant olarak PPG1200 (Propilen glikol 1200) kullanarak gerçekleştirmiş oldukları kesikli-beslemeli üretim sonucunda organik fazda 26.5 g/L 2-feniletanol ve 6.1 g/L 2-fenilasetat elde etmişlerdir.

Hua vd. (2007) Ferulik asit'in *Streptomyces sp.* tarafından vaniline biyodönüşümü esnasındaki vanilinin toksisitesi ve ürün inhibisyonunu önlemek dolayısıyla üretim verimini arttırmak amacıyla yapmış oldukları çalışmaya göre; farklı makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri arasından biyodönüşüm ortamından vanilini en iyi ve ferulik asiti en düşük düzeyde adsorplama özelliğine sahip DM11 reçinesi seçilmiştir. Biyodönüşüm ortamına % 8 oranında DM11 reçinesi ilave ettiklerinde 45 g/L ferulik asitten 55 saat süresince gerçekleşen üretim sonucunda 19.2 g/L vanilin elde etmişlerdir.

Lu ve Zang (2008) *S. cerevisiae* kullanarak gerçekleştirdiği 2-feniletanol üretiminde ekstraktant olarak oleik asit kullanmışlardır. Bu şekilde gerçekleştirmiş oldukları üretimde 3 g/L 2-feniletanol elde etmişlerdir. Tek fazlı biyodönüşüme göre %50 artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Wang vd. (2008) *S. cerevisiae* kullanarak gerçekleştirilen 2-feniletanol üretiminde Yerinde Ürün Kazanımı Tekniklerinden İki fazlı Sistemler ile Ekstraksiyonu kullanmışlardır. Bunun için ekstraktant olarak oleik asit ve Propilenglikol 1500 (PPG1500) kullandıklarında 2-feniletanol üretiminin 2.2 g/L'ye ulaştıklarını ve bu değeri tek fazlı biyodönüşümle karşılaştırdıklarında üretimin % 8.6 oranında arttığını tespit etmişlerdir.

Guan vd. (2009) *S.cerevisiae* kullanarak L-fenilalanin'den biyodönüşüm yolu ile 2-feniletanol üretiminde makrogözenekli FD0816 reçinesi kullanarak biyodönüşüm yolu ile üretilen 2-feniletanol konsantrasyonunun saatte ortalama 0.4 g/L üretim oranı ile 12.8 g/L'ye ulaştığını belirtmişlerdir. Reçine ilave edilmeksizin yapmış oldukları üretimle karşılaştırdıklarında 2-feniletanol üretim veriminin % 35.7 oranında arttığını tespit etmişlerdir.

Mei vd. (2009) *S.cerevisiae* kullanarak L-fenilalanin'den 2-feniletanol üretimi için erlen düzeyinde yapmış oldukları denemelerde 30 ml'lik biyodönüşüm ortamına nonpolar, makrogözenekli D101 reçinesinden 2 g ilave ederek toplam 2-Feniletanol üretim konsantrasyonu 6.17 g/L olarak bulmuşlardır. Bunun 3.15 g/L'si sıvı fazda kalırken 3.02 g/L'sinin reçineye adsorbe olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu değerleri reçine ilave etmeksizin yapmış oldukları denemelerle karşılaştırdıklarında (4.65 g/L) üretimin daha yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir

Hua vd. (2010) yapmış oldukları çalışmaya göre L-fenilalanin'in *S.cerevisiae* tarafından 2-feniletanol'e biyodönüşümü esnasında oluşan ürün sitotoksitesini azaltmak, 2-feniletanol üretim verimini arttırmak için "Yerinde Ürün Adsorpsiyon Tekniğini" kullanmışlardır. Bunun için bir çok makrogözenekli adsorpsiyon reçinesi arasından 2-feniletanolü en iyi adsorplayan ancak L-fenilalanini en düşük düzeyde adsorplayan HZ818 kodlu adsorpsiyon reçinesini seçerek biyodönüşüm ortamına % 7 oranında ilave ettiklerinde 12 g/L L-fenilalanin'den % 74.4 molar verimle 6.6 g/L 2-feniletanol elde etmişlerdir. Bu üretimi adsorpsiyon reçinesi ilave etmeksizin gerçekleştirdikleri biyodönüşümle karşılaştırdıklarında ürün konsantrasyonunun % 66.2 oranında arttığını gözlemlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Mayalar

Denemelerde, *Lindnera saturnus* var. *saturnus* HUT7087 kodlu maya kültürleri kullanılmış olup HUT (Hiroshima, Japonya) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Maya kültürleri gliserol içeren YPD (yeast potato dextrose) ortamında -70°C'de muhafaza edilmiş ve ardından YPD içeren petrilere tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılarak 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu yöntemle elde edilen saf kültürler bir sonraki denemelerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca elde edilen bu saf maya kültürleri aynı besiyerini içeren yatık agarlarda ayda bir tazelenmek üzere stoklanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve kimyasallar

Mayaları aktif hale getirmek, çoğaltmak ve muhafaza etmek için YPD (Merck, Dormstadt, Almanya) kullanılmıştır. Biyodönüşüm ortamında kullanılan melasın temizlenmesi için kullanılan H₂SO₄ ve NaOH, fuzel yağının su içeriğini azaltmakta kullanılan moleküler elek, reçinelerin desorpsiyonunda kullanılan etil alkol ve gaz kromatografisi analizlerinde kullanılan 1-butanol, 3-pentanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, izoamil alkol ve izoamil asetat standartları Sigma (Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Melas

Yapılan denemelerde biyodönüşüm ortamında kullanılan melas Malatya Şeker Fabrikasından (Malatya) temin edilmiştir.

3.1.4. Fuzel yağı

Biyodönüşüm ortamında kullanılan fuzel yağı Mey A.Ş. Suma Fabrikasından (Tarsus) temin edilmiştir. Biyodönüşüm denemelerinde kullanılan fuzel yağının bileşimi Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Biyodönüşüm denemelerinde kullanılan fuzel yağının bileşimi

Bileşen	Bileşim (%)
1-propanol	0.36
2-metil-1-propanol	2.93
1-bütanol	0.16
İzoamil alkol	56.66
Etil alkol	14.89
Su	25

3.1.5. Makrogözenekli adsorpsiyon reçineleri

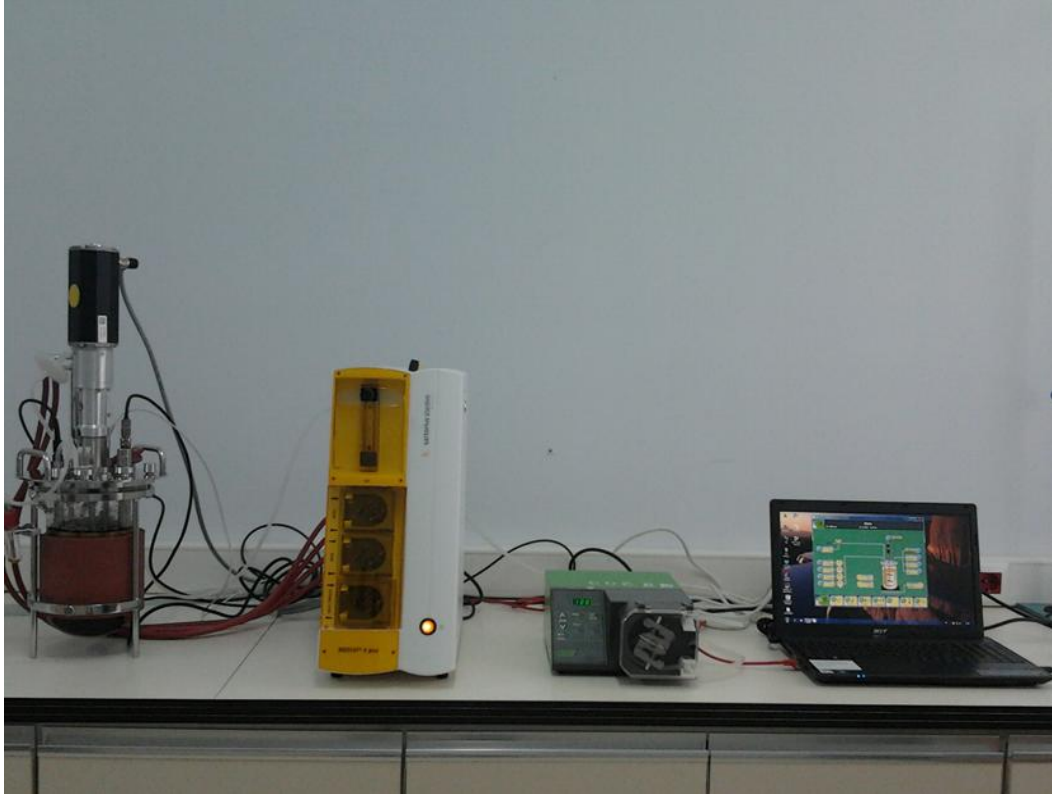
Biyodönüşüm ortamına oluşan izoamil asetatı, adsorbe etmek için ilave edilen makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinden H103, AB-8, NKA-2 ve NKA-9 Nankai Üniversitesi Kimya Fabrikasından (Tianjin, Çin) temin edilmiş olup, Amberlite XAD-1180N, Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite XAD-7HP ve Diaion HP2MG ise Supelco (Bellefonte, PA, USA) firmasından temin edilmiştir. Biyodönüşüm denemelerinde adsorpsiyon amacıyla kullanılmak üzere test edilen makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin bazı özellikleri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2 Makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin bazı özellikleri

Reçine	Yüzey alanı (m ² /g)	Polarite	Gözenek Çapı (Å°)
Amberlite XAD-1180N	≥450	Nonpolar	400
Amberlite XAD-4	≥750	Nonpolar	55-80
H103	1000-1100	Nonpolar	85-95
Supelite DAX-8	160	Yarıpolar	225
Amberlite XAD-7HP	≥380	Yarıpolar	90
AB-8	480-520	Yarıpolar	130-140
Diaion HP2MG	500	Polar	200
NKA-2	160-200	Polar	145-155
NKA-9	250-290	Polar	155-165

3.1.6. Fermentör

Fermantasyon denemelerinde 2 litre hacimli kesikli, karıştırılmalı, sıcaklık ve havalandırma kontrollü fermentör (Sartorius, BioStat A Plus, Almanya) kullanılmıştır. Fermantasyon denemelerinde kullanılan fermentör Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fermantasyon denemelerinde kullanılan fermentör

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyodönüşüm ortamının hazırlanması

Biyodönüşüm ortamı olarak kullanılacak melas önce 10 °Briks olacak şekilde saf suyla seyreltilmiştir. Melasın içerisinde bulunabilecek mikroorganizmalar için toksik etki yapabilecek ağır metal iyonlarını ve yabancı maddeleri uzaklaştırmak amacıyla melas çözeltisinin pH'sı 10 N H₂SO₄ kullanılarak 3'e düşürülmüş ve 24 saat bekletilmiştir. Bekletilen melas çözeltisi kaba filtre kağıdı ile süzölmüş ve çöken yabancı maddeler uzaklaştırılmıştır (Çalık vd., 2001). Elde edilen melas çözeltisinin pH'sı 10 N NaOH ile 5'e ayarlanmış ve biyodönüşüm denemelerinde kullanılmıştır.

3.2.2. Aşılama kültürlerinin hazırlanması

YPD agar içerisinde tek koloni yöntemi ile geliştirilmiş mayalar 500 mL'lik steril erlenmayerler içerisinde bulunan 100 mL'lik biyodönüşüm ortamına aşılansmış ve

25°C’de, 160 d/d’da, 48 saat süreyle çoğaltılmıştır. Erlenmayerlerdeki kültür sıvısı steril tüpler içerisinde +4°C’de, 4000 d/d’da, 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen maya pelleti +4°C’deki steril suyla 2 defa yıkanmıştır. Maya hücrelerinin oluşturduğu pellet 5 mL steril biyodönüşüm ortamına aktarılıp mikroskop ile sayım yapılarak 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde biyodönüşüm ortamına aşılmıştır (Yılmaztekin vd., 2008b).

3.2.3. Fuzel yağının su içeriğinin azaltılması ve damıtılması

Fuzel yağının içerisinde yüksek miktarda bulunan izoamil alkolü ayırıp biyodönüşüm denemelerinde kullanmak amacıyla fraksiyonel damıtma yöntemi kullanılmıştır (Güvenç vd., 2007). Damıtma işleminden önce fuzel yağı 5000 devir/dakika (d/d)’da santrifüj edilerek yabancı maddelerden uzaklaştırılmıştır. Yabancı maddelerinden uzaklaştırılan fuzel yağı su içeriğini azaltmak amacıyla moleküler elek ile muamele edilmiştir. Bu işlem için 250 mL’lik erlenlere 100’er mL fuzel yağı ve 60’ar gram moleküler elek ilave edilmiştir. Erlenler 25°C’de, 175 d/d karıştırma hızında 20 saat süreyle orbital karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu işlem Şekil 3.2.’de gösterilmiştir. Ardından fuzel yağı süzülerek moleküler elekten ayrılmış ve damıtma işlemine geçilmiştir. Bu işlem Şekil 3.3.’de gösterilmiştir.

Fuzel yağının damıtılması işleminde ürünler, alkollerin kaynama noktalarına göre Vigreux damıtma kolonu kullanarak 6 farklı fraksiyon halinde alınmıştır. Bu fraksiyonlar damıtma işlemi esnasında ayrı ayrı alınmış ve izoamil alkolce zengin olan son iki fraksiyon (5 ve 6 nolu fraksiyonlar) birleştirilerek tekrar damıtılmıştır. Damıtma işleminin yapıldığı düzenek Şekil 3.4.’de gösterilmiştir. Her bir fraksiyon ayrı ayrı depolanmış, gaz kromatografisi analizleri yapılmış ve % alkol içerikleri belirlenmiştir. İzoamil alkolce zengin 5 ve 6 nolu fraksiyonları kullanarak her damıtma için fuzel yağından izoamil alkol ayırma verimleri aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ayırma verimi} = \frac{(Y_6 \times V_6) + (Y_5 \times V_5)}{V_T \times Y_F} \times 100$$

Y₆= 6 nolu fraksiyonun izoamil alkol yüzdesi

V₆= 6 nolu fraksiyonun hacmi

Y5= 5 nolu fraksiyonun izoamil alkol yüzdesi

V5= 5 nolu fraksiyonun hacmi

VT=Damıtılan fuzel yağı hacmi

YF= Damıtılan fuzel yağının izoamil alkol yüzdesi

Son damıtma sonucu elde edilen izoamil alkolce zengin, %98.81 düzeyinde izoamil alkol içeren 6 nolu fraksiyon reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesinde ve biyodönüşüm denemelerinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Fuzel yağının su içeriğinin azaltılması



Şekil 3.3. Su içeriği azaltılmış fuzel yağının moleküler elekten ayrımı



Şekil 3.4. Fuzel yağının damıtılmasında kullanılan damıtma düzeneği

3.2.4. Reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi

Reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi için üretimler sentetik ortamda ve biyolojik ortamda, erlen düzeyinde kesikli ve kesikli-beslemeli üretim olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak en verimli reçineyi tespit etmek amacıyla reçinelerin adsorpsiyon kapasiteleri, adsorpsiyon etkinlikleri ve desorpsiyon verimleri belirlenmiştir (Hua vd., 2010).

3.2.4.1. Sentetik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi

Reçineler kullanılmadan önce üretici firma talimatlarına göre safsızlıkların giderilmesi ve aktif hale getirilmesi amacıyla sırasıyla etil alkol ve suyla muamele edilmiş daha sonra nemli bir şekilde ağzı kapalı kutularda buzdolabında saklanmıştır. Biyodönüşümde substrat olarak kullanılacak olan izoamil alkolün ve izoamil asetatın reçinelere olan afinitesini ölçmek amacıyla; 50 mL melas çözeltisi (10°Briks, pH 5) içeren 250 mL'lik erlenlerin içerisine bilinen konsantrasyonlarda izoamil alkol ve izoamil asetat ilave edilmiştir. Daha sonra erlenlerin içerisine 1'er g (yaş ağırlık) test edilecek 9 farklı makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinden (H103, AB-8, NKA-2 ve NKA-9, Amberlite XAD-1180N, Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite XAD-7HP ve Diaion HP2MG) ilave edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılarak 25 °C'de ve 100 d/d'da 2 saat çalkalanmıştır. Bu süre sonunda ortamdan filtrasyonla alınan reçineler önce saf suyla yıkanmış ve 50 mL etil alkolle 25 °C'de ve 100 d/d'da 2 saat desorbe edilmiştir.

Adsorpsiyon ve desorpsiyon çözeltilerinde bulunan izoamil alkolün ve izoamil asetatın konsantrasyonları gaz kromatografisi ile belirlenmiş ve elde edilen konsantrasyon değerlerinden reçinelerin adsorpsiyon kapasitesi, adsorpsiyon etkinliği ve desorpsiyon verimi aşağıdaki formüller vasıtasıyla hesaplanmıştır.

Adsorpsiyon Kapasitesi:

$$Q = \frac{(C_b - C_a)}{A} \times V_a$$

Adsorpsiyon Etkinliği:

$$E (\%) = \frac{(C_b - C_a)}{C_b} \times 100$$

Desorpsiyon Verimi:

$$D (\%) = \frac{C_d \cdot V_d}{(C_a - C_b) \cdot V_a} \times 100$$

Q: Adsorpsiyon kapasitesi (g adsorbat/g reçine)

Ca: İzoamil alkol veya izoamil asetatın adsorpsiyondan önceki konsantrasyonu (g/L)

Cb: İzoamil alkol veya izoamil asetatın adsorpsiyondan sonraki konsantrasyonu (g/L)

Cd: İzoamil alkol veya izoamil asetatın desorpsiyon çözeltilisindeki konsantrasyonu
(g/L)

A: Reçine ağırlığı (g)

Va: Adsorpsiyon çözeltilisinin hacmi (L)

Vd: Desorpsiyon çözeltilisinin hacmi (L)

E: Adsorpsiyon etkinliği

D: Desorpsiyon verimi

3.2.4.2. Biyolojik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.2.1. Kesikli biyodönüşüm koşulları

250 mL'lik erlenlerde biyodönüşüm ortamı olarak kullanılan 50 mL melas çözeltilisine (10 °Briks, pH 5) adsorpsiyon özellikleri test edilecek 9 farklı makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinden 1'er gr (yaş ağırlık) ilave edilmiştir. Ardından 121 °C'de 15 dk. steril edilmiş, soğutulmuş ve daha sonra mL'de 1×10^7 adet hücre içerecek şekilde maya kültürü aşılanmıştır. Erlenler 25°C 100 d/d'da inkübasyona bırakılmıştır. Kesikli biyodönüşüm denemelerinde mayalar aşıldıktan 48 saat sonra ortama 50 µL fuzel yağının damıtılmasıyla elde edilen izoamil alkol

ilave edilmiştir (Yılmaztekin vd., 2009). 72 saatlik biyodönüşüm sonunda reçineler ortamdan filtrasyonla ayrılmış, suyla yıkandıktan sonra aynı miktardaki etil alkolle 25°C 100 d/d'da 2 saat süresince desorpsiyona tabi tutulmuştur. Desorpsiyondan önce biyodönüşüm ortamında bulunan ve desorpsiyondan sonra etil alkole geçen izoamil asetat miktarları gaz kromatografisi (GC koşulları 3.2.7.4'de belirtilmiştir) ile belirlenmiştir. Toplamda üretilen izoamil asetat miktarları üzerinden reçinelerin biyodönüşüm ortamındaki verimleri karşılaştırılmıştır.

3.2.4.2.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm koşulları

250 mL'lik erlenlerde biyodönüşüm ortamı olarak kullanılan 50 mL melas çözeltilisine (10 °Briks, pH 5) adsorpsiyon özellikleri test edilecek 9 farklı makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinden 1'er gr (yaş ağırlık) ilave edilmiştir. Ardından 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir, soğutulmuştur ve daha sonra mL'de 1×10^7 hücre içerecek şekilde maya kültürü aşılanmıştır. Erlenler 25°C 100 d/d'da 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde 48. saatten itibaren biyodönüşüm ortamına 50 µL izoamil alkol ilave edilmeye başlanmış ve biyodönüşüm sonuna kadar her 24 saatte bir aynı miktarda izoamil alkol ilavesine devam edilmiştir. Biyodönüşüm sonunda reçineler ortamdan filtrasyonla ayrılmış, suyla yıkandıktan sonra aynı miktardaki etil alkolle 25°C'de 100 d/d'da 2 saat süresince desorpsiyona tabi tutulmuştur. Desorpsiyondan önce biyodönüşüm ortamında bulunan ve desorpsiyondan sonra etil alkole geçen izoamil asetat miktarları gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Toplamda üretilen izoamil asetat miktarları üzerinden reçinelerin biyodönüşüm ortamındaki verimleri karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Fermantasyon koşulları

Fermantasyon denemeleri anaerobik şartlarda, 25°C sabit sıcaklık ve 150 d/d' sabit karıştırma hızında Kesikli ve Kesikli-Beslemeli üretim ve kontrol üretimleri olmak üzere Sartorius marka BioStat A Plus model biyorektörde gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktöre biyodönüşüm ortamı olarak kullanılacak olan temizlenmiş melas çözeltilisinden (10 °Briks, pH 5) 2 L konulmuştur. Fermantasyon

ve biyodönüşüm esnasında üretilen izoamilasetatın adsorpsiyonu için H103 kodlu makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinden 50 gram ilave edilerek biyoreaktörle birlikte 121°C’de 15 dk. steril edilmiştir. Sonrasında soğutularak ortama mL’de 1×10^7 sayıda maya olacak şekilde çoğaltılmış kültürlerden aşılansmıştır. Karıştırma 150 d/d olacak şekilde ayarlanarak biyoreaktör çalıştırılmıştır. Biyodönüşüm sonunda reçineler ortamdan filtrasyonla ayrılmış, suyla yıkandıktan sonra etil alkolle desorpsiyona tabi tutulmuştur. Biyodönüşüm süresince her 24 saatte bir ortamdan örnekler alınmış ve bu örnekler üzerinde canlı maya sayısı, yoğunluk, briks, pH ve aroma maddesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Kesikli fermantasyon

Kesikli fermantasyon denemeleri için biyoreaktöre biyodönüşüm ortamı olarak kullanılacak olan temizlenmiş melas çözeltisinden (10 °Briks, pH 5) 2 L konulmuştur. Fermantasyon ve biyodönüşüm esnasında üretilen izoamil asetatın adsorpsiyonu için H103 kodlu makrogözenekli adsorpsiyon reçinesinden 50 gram ilave edilerek biyoreaktörle birlikte 121°C’de 15 dk. steril edilmiştir. Sonrasında soğutularak ortama mL’de 1×10^7 sayıda maya olacak şekilde çoğaltılmış kültürlerden aşılansmıştır. Karıştırma 150 d/d olacak şekilde ayarlanarak biyoreaktör çalıştırılmıştır. Mayalar durgun faza geçmeye başladıktan sonra (72. saatte) biyodönüşüm için fuzel yağının damıtılmasıyla elde edilen izoamil alkolden steril şartlarda 2 mL alınarak biyoreaktörün enjeksiyon portundan biyodönüşüm ortamına enjekte edilmiştir. Fermantasyon ve biyodönüşüm 9 gün (216 saat) süresince gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Kesikli-beslemeli fermantasyon

Kesikli-beslemeli fermantasyon aynı şekilde biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Mayalar durgun faza geçmeye başladıktan sonra (72. saat) biyodönüşüm ortamına fuzel yağının damıtılmasıyla elde edilen izoamil alkolden steril şartlar altında 2 mL alınarak biyoreaktörün enjeksiyon portundan enjekte edilmiştir. 24 saat aralıklarla fermantasyon sonuna kadar aynı miktarda izoamil alkol ortama ilave edilmiştir.

3.2.6. Örneklerin alınması

Fermentasyon ve biyodönüşüm süresince biyoreaktörden 24 saat aralıklarla 15 mL'lik örnekler alınmıştır. Alınan bu örneğin 1 mL'si maya sayımı için kullanılmıştır. Geriye kalan kısmı ise mayaları ve reçineyi uzaklaştırmak amacıyla +4°C'de, 4000 d/d'da 10 dk. santrifüj edilmiştir (Hettich, Universal 320 R, Tufflingen, Almanya). Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantta yoğunluk ve briks ölçümleri yapılmıştır ve bu süpernatanttan 1 mL viallere konularak aroma maddeleri analizleri için -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Örnekler üzerinde yapılan analizler

3.2.7.1. Maya sayımı

Maya sayımı için alınan örnekler metilen mavisi kullanarak Thoma lamı ile mikroskop altında gerçekleştirilmiştir (Anonim, 1997).

3.2.7.2. Yoğunluk tayini

Yoğunluk tayini Mettler Toledo Densito 30PX marka (İsviçre) dijital yoğunluk ölçer ile 20°C'de gerçekleştirilmiştir (Yılmaztekin, 2009).

3.2.7.3. pH

pH ölçümünde biyoreaktör içerisinde bulunan pH probuyla ölçülen değerler dikkate alınmıştır.

3.2.7.4. İzoamil asetat ve izoamil alkol analizi

Fuzel yağında bulunan ve biyodönüşüm ortamında üretilen maddelerin miktar tayininde, "Shimadzu QP2010" marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjektör

sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı ise 60°C’de 3 dakika beklemeden sonra, dakikada 2 °C artarak 220 °C’ye ve daha sonra dakikada 3°C artarak 245 °C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Cihaza enjekte edilen örnek miktarı 1 µL’dir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmış ve akış hızı 1.5 ml/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bileşiklerin miktarlarının hesaplanmasında iç standart olarak 3-pentanol kullanılmıştır. Aşağıdaki formül yardımıyla her bir bileşiğin cevap faktörü dikkate alınarak miktar hesaplamaları yapılmıştır (Kelly vd., 1999).

Bileşiklerin tanımlanması için ise yine “Shimadzu QP2010” marka gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı ise 40°C’de 3 dakika beklemeden sonra, dakikada 3°C artarak 220 °C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Tanımlama DB-WAX kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyumun hızı 1.5 ml/dk’dır. Kütle spektrometresinin iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250°C, kuadropol sıcaklığı ise 120 °C’de tutularak, 1 saniye aralıklarla 29-350 kütle/yük (m/e) arasında tarama yapılmıştır. Piklerin tanısı, standart çözeltiler (n-butanol, 3-pentanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, izoamil alkol ve izoamil asetat standartları) enjekte edilerek ve kütle spektrumunun bilgisayar hafızasındaki kütle spektrumlarıyla karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır.

3.2.7.4.(1). Cevap faktörünün hesaplanması

Aroma maddeleri için cevap faktörü aşağıdaki formül yolu ile hesaplanmıştır (Anonim, 2002).

$$RF = (A_{st}/A_i) \times (C_i/C_{st})$$

C_i : Bileşiğin konsantrasyonu (mg/L)

A_i : Bileşiğin pik alanı

A_{st} : İç standardın pik alanı

C_{st} : İç Standardın konsantrasyonu (mg/L)

RF : Cevap faktörü

3.2.7.4.(2). Miktar tayini

Aroma maddelerinin miktar tayini aşağıdaki formül kullanarak miktarlar mg/L cinsinden hesaplanmıştır (Kelly vd., 1999).

$$C_i = (A_i / A_{st}) \times C_{st} \times RF$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Fuzel Yağının Damıtılması

Reçinelerin test edilmesinde ve biyodönüşüm denemelerinde kullanılmak üzere izoamil alkolce zengin olan fuzel yağının, moleküler elekten geçirilen fuzel yağının ve damıtma sonucunda elde edilen fuzel yağının fraksiyonları ve bu fraksiyonların % alkol bileşimleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fuzel yağı ve damıtılmasıyla elde edilen fraksiyonlarının % alkol bileşimleri

Bileşen	Su %	Etanol %	1- propanol %	2-metil-1- propanol %	1-butanol %	İzoamil alkol %
F0	25.00	14.89	0.36	2.93	0.16	56.66
F1	-	15.37	0.42	3.79	0.22	80.20
F2-1	-	51.23	0.92	5.80	0.22	41.83
F2-2	-	36.81	1.02	7.01	0.29	54.87
F2-3	-	24.24	0.89	6.97	0.33	67.58
F2-4	-	14.87	0.70	6.52	0.34	77.56
F2-5	-	3.58	0.29	3.92	0.29	91.92
F2-6	-	0.29	0.03	0.91	0.13	98.64
F3-5	-	2.37	0.24	3.47	0.27	93.65
F3-6	-	0.21	0.03	0.83	0.12	98.81

F0: Ham fuzel yağı, F1: Moleküler elekten geçirilen fuzel yağı, F2-1: F1'in damıtılmasından elde edilen 1. fraksiyon, F2-2: F1'in damıtılmasından elde edilen 2. fraksiyon, F2-3: F1'in damıtılmasından elde edilen 3. fraksiyon, F2-4: F1'in damıtılmasından elde edilen 4. fraksiyon, F2-5: F1'in damıtılmasından elde edilen 5. fraksiyon, F2-6: F1'in damıtılmasından elde edilen 6. fraksiyon, F3-5: F1'in damıtılmasından elde edilen 5. ve 6. fraksiyonların birleştirilip tekrar damıtılmasından elde edilen 5. fraksiyon, F3-6: F1'in damıtılmasından elde edilen 5. ve 6. fraksiyonların birleştirilip tekrar damıtılmasından elde edilen 6. fraksiyon

Fuzel yağı bileşimindeki izoamil alkolü ayırmak için damıtılmıştır. Damıtma işleminde izoamil alkol ayırma verimini arttırmak amacıyla izoamil alkolce zengin olan son iki fraksiyon birleştirilip tekrardan damıtılmıştır..

Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi fuzel yağının ilk kez damıtılmasıyla elde edilen 5 nolu fraksiyon (F2-5) % 91.92, 6 nolu fraksiyon (F2-6) ise % 98.64 izoamil alkol içermektedir. Damıtma işlemi sonucunda, 5 nolu fraksiyondan 53 mL, 6 nolu fraksiyondan da 44 mL elde edilmiştir. Bu iki fraksiyona ait ayırma verimi % 57.43 bulunmuştur. İlk damıtmadan elde edilen 5 ve 6 nolu fraksiyonların birleştirilip tekrar damıtılmasıyla elde edilen 5 ve 6 nolu fraksiyonların (F3-5 ve F3-6) hacimce izoamil alkol yüzdeleri ise sırasıyla % 93.65 ve % 98.81'dir. İkinci kez damıtma işlemi sonucunda 5 nolu fraksiyondan 56 ml, 6 nolu fraksiyondan 29 ml elde edilmiştir. Bu iki fraksiyona ait ayırma verimi ise % 89,89 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla ilk damıtma sonucu elde edilen 5 ve 6 nolu fraksiyonların birleştirilip tekrardan damıtılmasıyla izoamil alkol ayırma veriminin arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen izoamil alkolce zengin olan son fraksiyon (F3-6) biyodönüşüm denemelerinde kullanılmıştır.

4.2. Reçinelerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. Sentetik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi

Sentetik ortamda erlen düzeyinde 9 farklı reçine ile gerçekleştirilen denemeler sonucunda reçinelere ait adsorpsiyon kapasitesi, adsorpsiyon etkinliği, desorpsiyon verimleri Çizelge 4.2' de gösterilmiştir. Reçinelerin performansları biyodönüşüm ortamında bulunan izoamil asetat ve onun substratı olan izoamil alkolü adsorplama kapasiteleri ve adsorplama etkinlikleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Reçinelerin adsorpsiyon kapasitesi, adsorpsiyon etkinliği ve desorpsiyon verimleri

Reçine	Q_e IAs (mg/g resin)	Q_e IAl (mg/g resin)	E IAs (%)	E IAl (%)	D IAs (%)
XAD-1180N	129.3 ± 1.5	29.4 ± 2.0	97.7 ± 1.6	30.9 ± 1.9	27.3 ± 1.1
XAD-4	127.4 ± 1.7	10.3 ± 1.4	95.6 ± 1.3	10.8 ± 1.4	24.3 ± 1.7
H103	132.2 ± 0.9	46.3 ± 1.7	99.1 ± 1.7	48.6 ± 1.5	27.3 ± 1.6
DAX-8	121.8 ± 2.1	14.9 ± 1.2	91.3 ± 1.2	15.7 ± 1.7	16.3 ± 1.1
XAD-7HP	125.5 ± 0.6	17.4 ± 0.8	94.1 ± 1.8	18.2 ± 1.6	24.3 ± 1.2
AB-8	121.3 ± 1.1	11.2 ± 1.0	91.0 ± 2.2	11.8 ± 1.3	16.0 ± 0.9
HP2MG	111.5 ± 1.9	10.1 ± 0.4	83.6 ± 0.9	10.6 ± 0.6	19.0 ± 0.8
NKA-2	131.5 ± 0.7	47.5 ± 0.9	98.6 ± 2.1	49.9 ± 0.9	29.6 ± 1.8
NKA-9	118.0 ± 1.3	5.4 ± 0.3	88.4 ± 0.7	5.7 ± 0.5	12.9 ± 0.6

Reçinelerin adsorpsiyon kapasitesi (Q_e), adsorpsiyon etkinliği (E) ve desorpsiyon verimleri (D); IAs: İzoamil asetat, IAl: İzoamil alkol

Çizelge 4.2’ de görüldüğü gibi izoamil asetatı en yüksek düzeyde adsorplayan ve adsorpsiyon verimi en yüksek olan reçinenin H103 kodlu reçine olduğu, en düşük düzeyde adsorplayan reçinenin ise HP2MG kodlu reçine olduğu görülmektedir. Bu durumun sebebi H103 kodlu reçinenin nonpolar bir yapıya sahip olması ve aynı şekilde nonpolar yapıya sahip izoamil asetata karşı daha fazla etkileşime girmesi gösterilebilir. Bunun yanı sıra H103 kodlu reçinenin diğer reçineler arasından en fazla yüzey alanına sahip olması sebebiyle daha fazla izoamil asetat adsorpladığı düşünülmektedir. Reçinelerin izoamil alkolü adsorplama kapasitelerine ve etkinliğine bakıldığında ise izoamil asetatı en fazla adsorplayan iki reçine arasından H103 reçinesinin NKA-2 reçinesinden sonra 2. sırada olduğu görülmüştür. Desorpsiyon

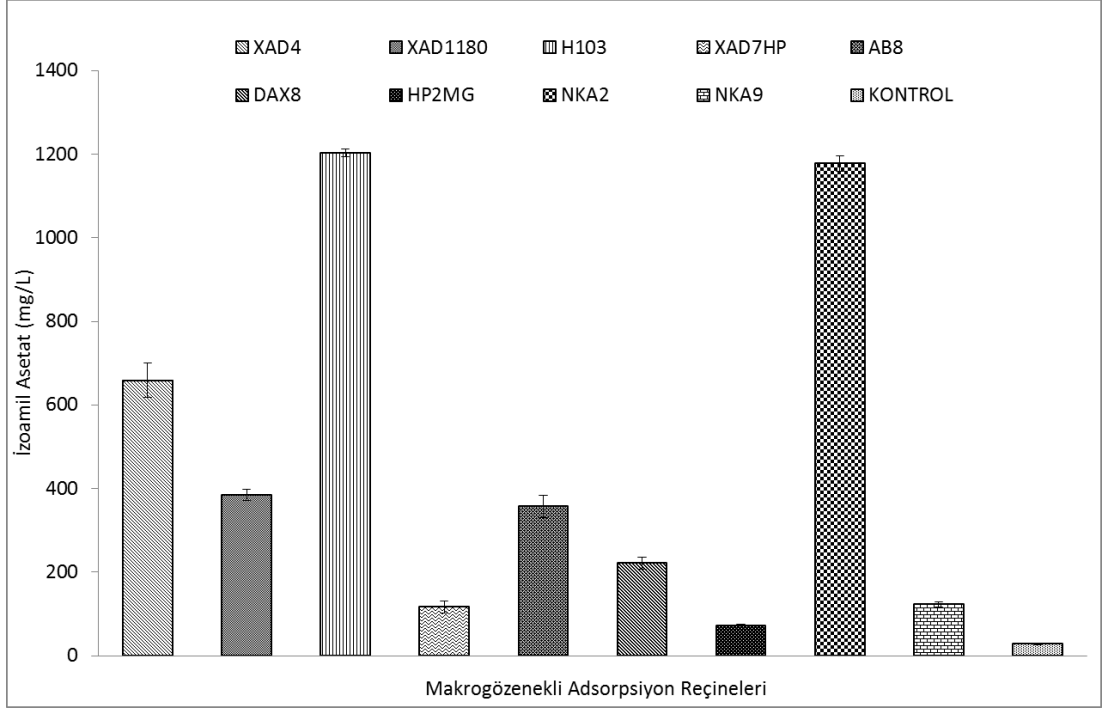
verimi açısından reçineler kıyaslandığında ise H103 reçinesi NKA-2 reçinesinden sonra 2. sırada yer almaktadır.

Bütün reçinelerin adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon etkinliği birlikte değerlendirildiğinde H103>NKA-2>XAD-1180>XAD-4>XAD-7HP>DAX-8>AB-8>NKA-9>HP2MG şeklinde bir sıralama yapmak mümkündür. Desorpsiyon verimi açısından değerlendirildiğinde ise NKA-2>H103>XAD-1180>XAD-4>XAD-7HP>HP2MG>DAX-8>AB-8>NKA-9 şeklinde sıralama yapabiliriz. Reçinede adsorbe olan bileşenin desorpsiyonunda kullanılan çözünenin türü desorpsiyon verimini doğrudan etkilediği için reçine performansı desorpsiyon verimi parametresi doğrultusunda değerlendirilmemiştir. Dolayısıyla sentetik ortamda gerçekleştirilmiş olunan denemelerdeki adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon etkinliği göz önüne alındığında H103 reçinesinin en etkin adsorbent materyali olarak kullanımına karar verilmiştir.

4.2.2. Biyolojik ortamda reçinelerin adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi

4.2.2.1. Kesikli biyodönüşüm ile izoamil asetat üretimi

Sentetik ortamda denenmiş olan tüm reçineler biyolojik ortamda da (*Lindnera saturnus* var. *saturnus* mayası ile) denenerek üretilen izoamil asetatı en yüksek düzeyde adsorplayan reçine seçilmiştir. İzoamil alkolün 48. saatte ortama ilave edilmesiyle gerçekleştirilen kesikli biyodönüşüm denemelerinde reçinelerin adsorbe ettikleri izoamil asetat miktarları Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Kesikli biyodönüşüm denemesinde ortamda bulunan ve reçinelerde adsorplanan izoamil asetat miktarları

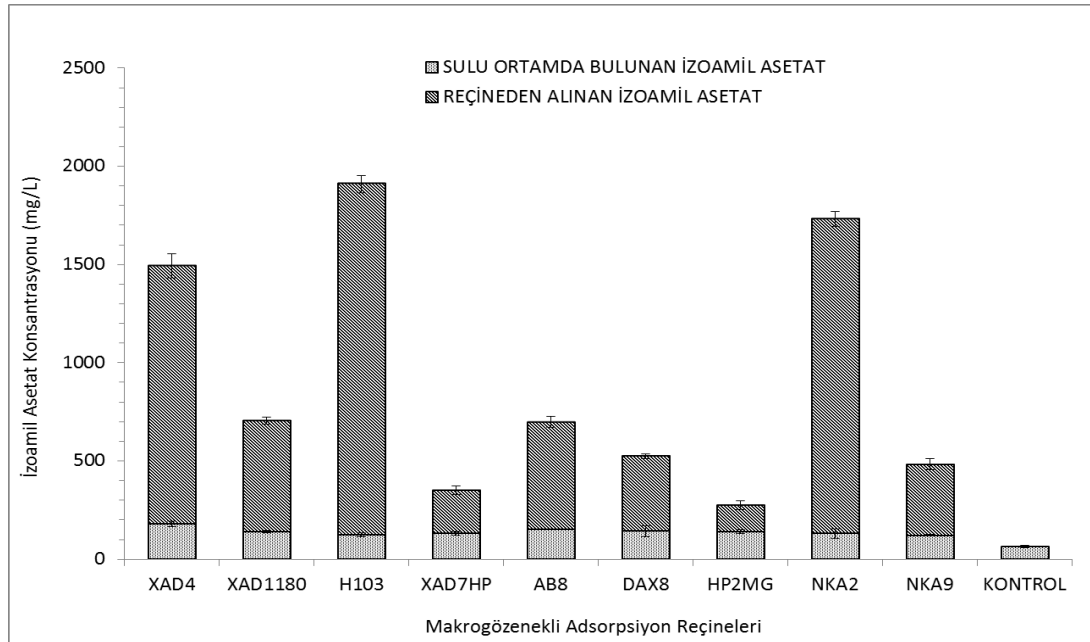
Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi kesikli biyodönüşüm sonunda üretilen izoamilasetatın hepsinin reçineler tarafından adsorplandığı görülmüştür. Biyodönüşüm sonunda reçinelerden desorpsiyon ile elde edilen en yüksek izoamil asetat miktarı 1204 mg/L ile H103 reçinesinin kullanıldığı denemeden elde edilmiştir. Reçinenin kullanılmadığı kontrol denemesinde ise üretilen izoamil asetat miktarı 28.5 mg/L'dir. H103 reçinesinin kullanıldığı denemede üretilen izoamil asetat miktarı reçinesiz gerçekleştirilen kontrol denemesine göre yaklaşık 42 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Reçinenin varlığında reçine ortamda oluşan izoamil asetatı oluşur oluşmaz adsorbe etmiştir. Dolayısıyla ortamda biriken izoamil asetatın doğacak inhibisyon önlenerek mayaların izoamil asetat üretmeye devam etmelerine imkan verilmiştir. Reçinesiz ortamda ise üretilen izoamil asetatın belirli düzeye ulaşması ve ortamda birikmesi durumunda izoamil asetat mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu sebepten dolayı üretilen izoamil asetat miktarının daha düşük düzeyde kaldığı düşünülmüştür.

Biyodönüşüm sonunda gerçekleştirilen GC analizleri sonucuna göre ortama ilave edilen izoamil alkolün tamamının biyodönüşümde kullanıldığı ve adsorpsiyondan sonra ortamda izoamil asetat bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum ise üretilen izoamil asetat miktarının reçinelerin adsorbe edebileceği maksimum adsorpsiyon limitinin altında kaldığını göstermektedir.

Biyolojik ortamda gerçekleştirilen kesikli biyodönüşüm denemesinde izoamil asetatı adsorplama düzeyi en yüksek olan reçinenin H103 kodlu reçine olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm ile izoamil asetat üretimi

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemesinde ortama 48. saatte izoamil alkol ilave edilmeye başlanmış ve her 24 saatte bir biyodönüşüm sonuna kadar izoamil alkol ilave edilerek üretilen izoamil asetatın adsorpsiyon reçineleri tarafından adsorpsiyonu değerlendirilmiştir. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde 72 saatlik biyodönüşüm sonunda ortamda bulunan ve desorpsiyonla ortamdan alınan izoamil asetat miktarları Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm sonunda ortamda kalan ve reçinelerde adsorplanan izoamil asetat miktarları

Biyodönüşüm sonunda ortamda bulunan ve reçineye adsorplanan izoamil asetat miktarına baktığımızda en yüksek düzeyde izoamil asetat 1910 mg/L ile H103 nolu reçinesinin kullanıldığı denemede gerçekleşmiştir. Kontrol denemesinde elde edilen izoamil asetat miktarı ise 64 mg/L'dir. H103 reçinesi ilavesi ile gerçekleştirilen deneme kontrol denemesi ile kıyaslandığında üretilen izoamil asetat miktarında yaklaşık 30 katlık bir artış görülmektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi üretilen izoamil asetatı ve ortamda kalan izoamil asetatı göz önüne alarak hesaplanan adsorpsiyon etkinliği değerlendirildiğinde H103 nolu reçinenin adsorpsiyon etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Ortamda reçinelerin adsorplayamadığı izoamil asetatın bulunması ise reçinelerin adsorpsiyon kapasitelerini doldurduklarının bir göstergesidir. Bu problemin kullanılacak olan reçine miktarının arttırılmasıyla çözüleceği düşünülmektedir.

Hem sentetik ortamda hem de *Lindnera saturnus* var. *saturnus* mayasının kullanıldığı biyolojik ortamda kesikli ve kesikli-beslemeli olarak gerçekleştirilen biyodönüşümler sonucunda H103 kodlu reçinenin izoamil asetatı adsorplama kapasitesi açısından en etkin reçine olduğu kanaatine varılmıştır. Biyoreaktör düzeyindeki üretimlerde H103 kodlu reçinenin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3. H103 Reçinesi İlavesi İle Biyoreaktör Düzeyinde Gerçekleştirilen Biyodönüşümler

Biyoreaktör düzeyinde H103 reçinesi kullanılarak kesikli ve kesikli-beslemeli üretimler ve bu üretimlerin kontrol üretimleri gerçekleştirilerek reçinenin biyodönüşümler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kontrol üretimleri diğer şartlar aynı kalmak koşulu ile ortama reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen üretimlerdir.

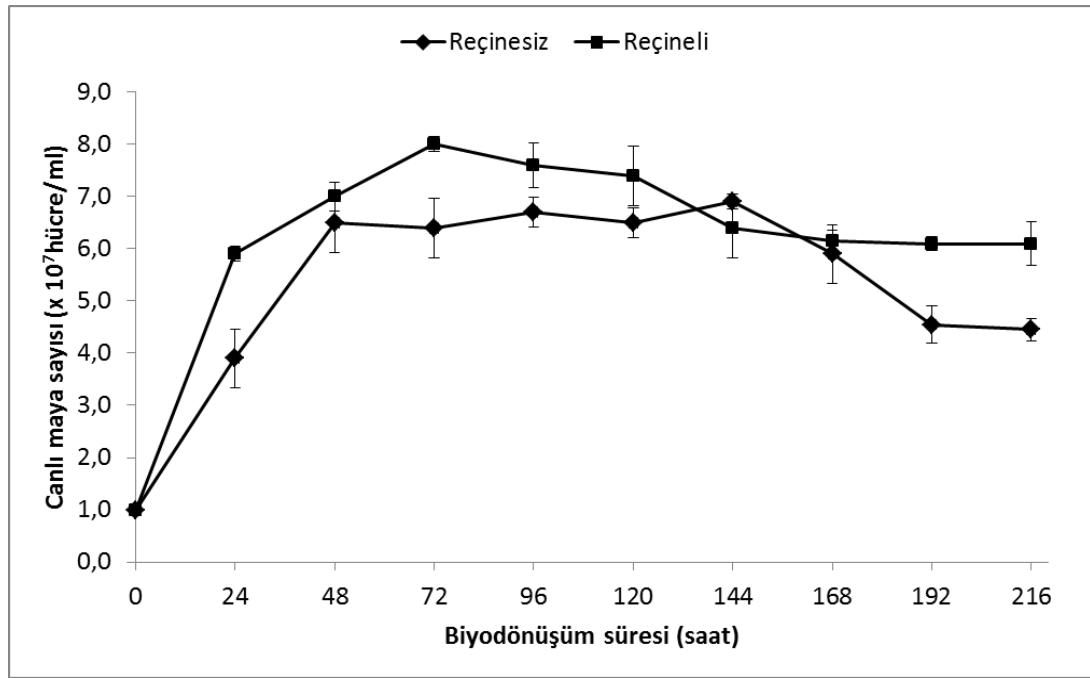
4.3.1. Kesikli biyodönüşüm denemelerinde reçinenin etkisi

H103 reçinesi kullanılarak biyoreaktör ortamında yürütülen kesikli biyodönüşüm denemelerinde ortama 72. saatte fuzel yağının damıtılmasıyla elde edilen izoamil alkolden 2 mL ilave edilerek biyodönüşüm 216 saat süresince devam ettirilmiştir.

Kontrol denemesi ise aynı şekilde ortama reçine ilave edilmeden gerçekleştirilmiştir. Denemelerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.3.1.1. Canlı maya sayısı

Kesikli biyodönüşüm denemeleri ve kontrol denemelerinde (reçinesiz) elde edilen canlı maya sayıları Şekil 4.3' de gösterilmiştir.



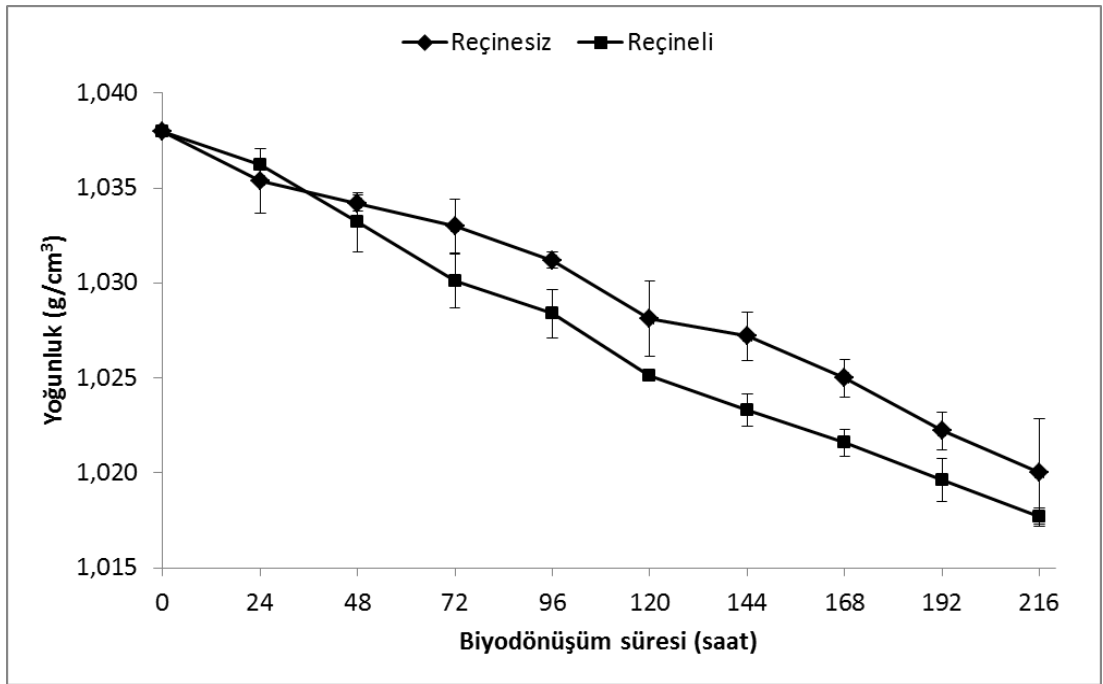
Şekil 4.3. Kesikli biyodönüşüm süresince canlı maya sayısı

216 saat süreyle gerçekleştirilen biyodönüşüm süresince en yüksek canlı maya sayısına 72. saatte 8×10^7 hücre/mL maya sayısı ile reçineli ortamda gerçekleştirilen denemede ulaşılmıştır. Reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen üretimde ise en yüksek maya sayısına 6.9×10^7 hücre/mL ile 144. saatte ölçülmüştür. Özellikle izoamil alkolün ilave edildiği 72. saatte maya sayısı reçine bulunan denemede kontrol denemesinden 5×10^6 hücre/mL daha fazla olduğu görülmüştür. Şekil 4.3'den de görüldüğü gibi ortama ilave edilen reçinenin maya gelişimini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Bu durum ortama ilave edilen reçinenin mayanın gelişimi sırasında üretilen ve mayaların gelişimini olumsuz yönde etkileyebilecek bazı bileşikler adsorplamasıyla maya gelişiminin daha hızlı olmasına dayandırılabilir.

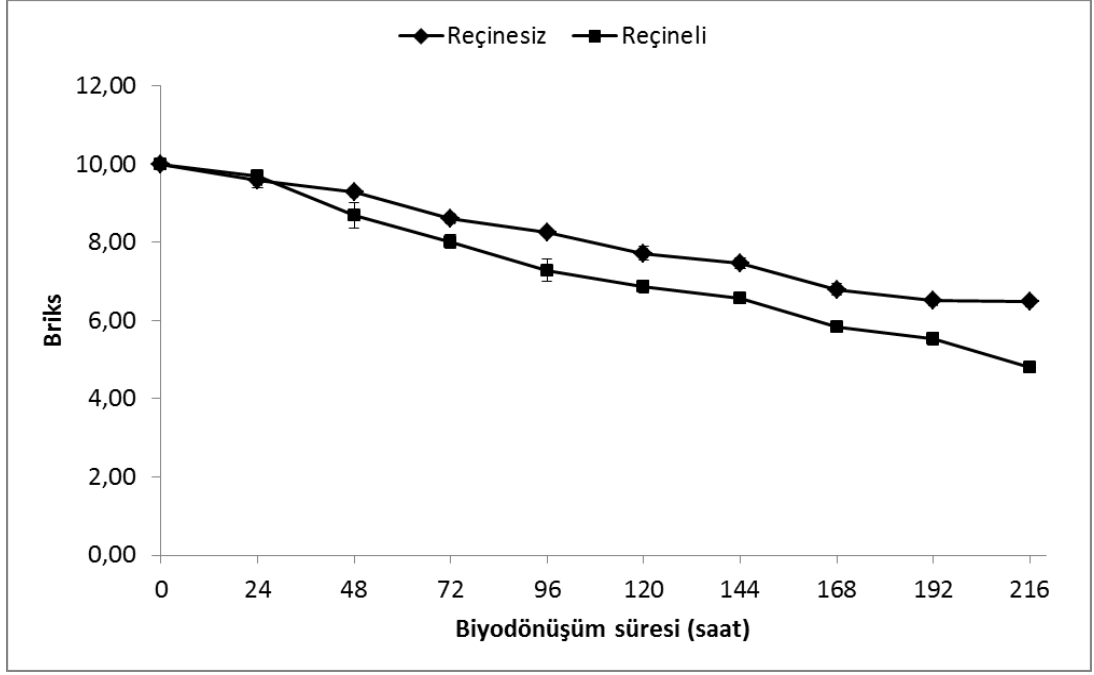
Hem reçineli hem de kontrol üretimlerinin logaritmik gelişme evreleri kıyaslandığında reçinenin bulunduğu denemede maya gelişiminin daha hızlı olduğu görülmektedir. Bu durumun aynı zamanda üretilen izoamil asetat miktarını da etkilediği düşünülmektedir.

4.3.1.2. Yoğunluk ve briks

Kesikli biyodönüşüm süresince ortam yoğunluğu ve briks değerlerinde görülen değişimler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de görülmektedir.



Şekil 4.4. Kesikli biyodönüşüm süresince yoğunluk değerleri

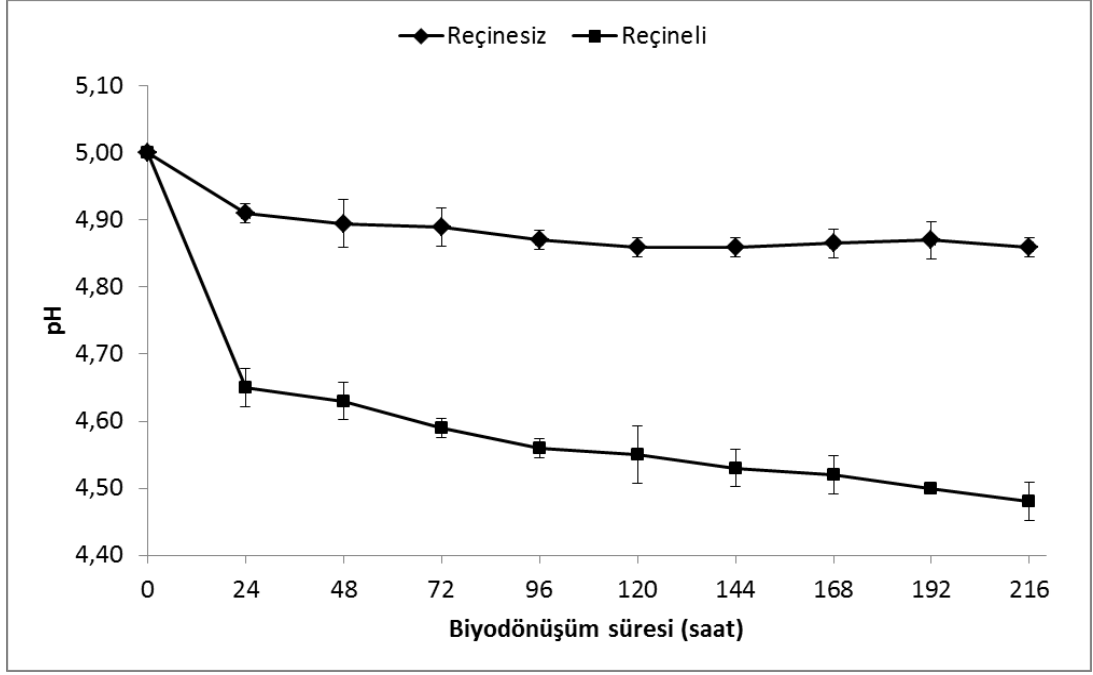


Şekil 4.5. Kesikli biyodönüşüm süresince briks değerleri

Kesikli biyodönüşüm denemelerinde biyodönüşümün gidişatı ortam sıvısının yoğunluk ve briks değerleri ölçülerek takip edilmiştir. Biyodönüşüm sonucunda reçine ilavesi ile gerçekleştirilen kesikli biyodönüşümde yoğunluk 1.018 g/cm^3 reçine ilave edilmeksizin gerçekleştirilen denemede ise 1.020 g/cm^3 'e kadar düşmüştür. Briks değerleri ise reçine ilavesi ile gerçekleştirilen denemede 4.87'ye düşerken reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen denemede ise 6.48'de kalmıştır. Görüldüğü gibi reçine ilavesi ile gerçekleştirilen denemede yoğunluk ve briksin düşüşü reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen kontrol denemesine göre daha hızlı olmuştur. Bu durumun nedeni canlı maya sayısı grafiğinden de görüldüğü gibi reçineli ortamda maya gelişiminin daha hızlı olmasına dayandırılmıştır.

4.3.1.3. pH

Biyodönüşüm süresince ortam pH'sında meydana gelen değişimler Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.6. Kesikli biyodönüşüm süresince pH değerleri

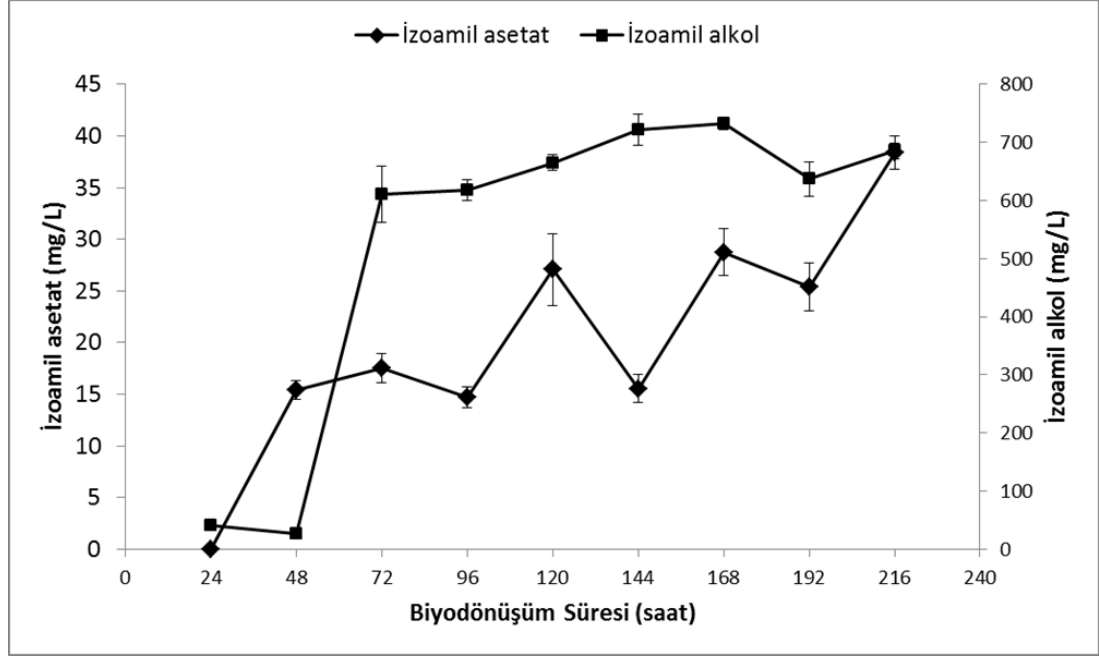
Şekil 4.6' dan da görüldüğü gibi reçine ilave edilen biyodönüşüm denemesinde ilk 24 saatte pH hızlı bir düşüş göstererek 4.65 değerine ulaşmış sonrasında düşme hızında azalmalar göstererek düşüşüne devam etmiş ve 216 saat sonunda 4.48'e kadar gerilemiştir. Reçine ilave edilmeyen denemede ise ilk 24 saatte pH 4.92 değerine düşmüş ve düşüşü daha yavaş bir şekilde devam ederek biyodönüşüm sonunda 4.89 değerine ulaşmıştır.

Şekilden de görüldüğü gibi reçine ilave edilen denemede pH düşüşü reçine ilave edilmeyen denemeye göre hem daha hızlı hem de daha fazla olmuştur.

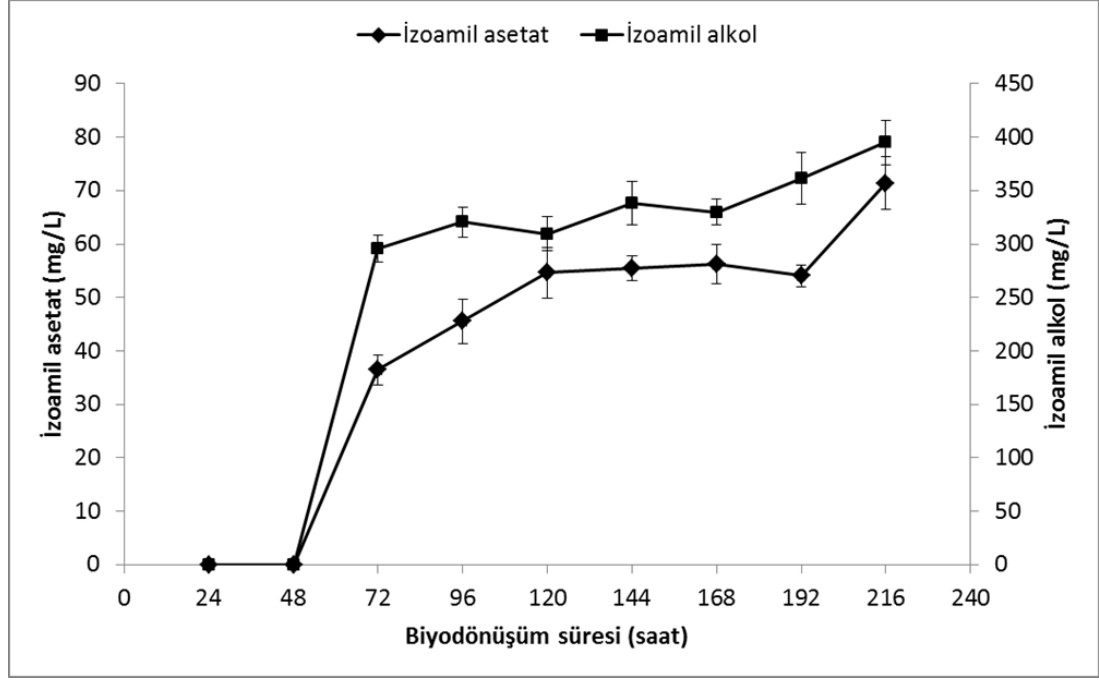
Normal bir fermantasyonun başlangıcında pH, ortamda oluşan yağ asitleri, amino asitler ve organik asitlerden dolayı hızlı bir düşüş gösterir. Oluşan bu asitler daha sonra maya tarafından metabolik olaylarda kullanılmakta dolayısıyla miktarları azaldığından ortam pH'sı tekrar yükselmekte veya düşüş hızı yavaşlamaktadır (Boulton ve Quain, 2001). Bu çalışmada reçine ilave edilen denemede pH düşüşün daha hızlı ve fazla oluşu, ortamda oluşan yağ asitleri, amino asitler ve organik asitlerin reçine tarafından adsorplanmadığı ve dolayısıyla maya hücresinin bu asitleri metabolize edemediği ihtimalini karşımıza çıkarmaktadır.

4.3.1.4. İzoamil asetat üretimi

Kesikli biyodönüşüm denemeleri süresince reçineli ve reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Kesikli biyodönüşüm süresince reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları



Şekil 4.8. Kesikli biyodönüşüm süresince reçineli ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları

Şekil 5 ve Şekil 6'dan görüldüğü gibi reçinesiz ortamda biyodönüşümün 24. saatinden sonra ortamda izoamil asetat görülmeye başlanırken reçineli ortamda gerçekleştirilen denemelerde ise 72. saatten itibaren ortamda izoamil asetat bulunmaya başlamıştır. Bunun nedeni reçineli ortamda reçinenin üretilen izoamil asetatı üretilir üretilmez adsorplamış olmasıdır. Ayrıca reçinesiz ortamda üretilen izoamil asetat miktarında iniş çıkışlar gözlemlenmektedir. Reçineli biyodönüşüm denemelerinde ise böyle bir durum gözlemlenmemiştir. Reçinesiz ortamda üretilen izoamil asetat miktarındaki iniş çıkışların olması mayalar tarafından üretilen izoamil asetatın ortamda birikmesi ve biriken ürününün maya gelişimini olumsuz etkilemesi dolayısıyla bu durumun üretilen izoamil asetatı da etkilemesi olarak düşünülebilir. Reçineli ortamda ise oluşan izoamil asetatın oluşur oluşmaz ortamdan reçineler ile adsorpsiyonu sağlandığından, izoamil asetatın ortamda birikimi önlenilmekte ve dolayısıyla izoamil asetat birikiminden dolayı oluşabilecek maya inhibisyonu önlenerek izoamil asetat üretimi normal seyrinde devam etmektedir.

Kesikli biyodönüşüm sonucunda reçineli ortamda bulunan izoamil asetat miktarı 71.4 mg/L iken reçinesiz ortamda üretilen izoamil asetat miktarı 38.4 mg/L'dir. Reçineli ortamdan reçineye adsorbe olan izoamil asetatın desorpsiyonla alınması sonucunda ise elde edilen izoamil asetat miktarı 236.7 mg/L olarak bulunmuştur.

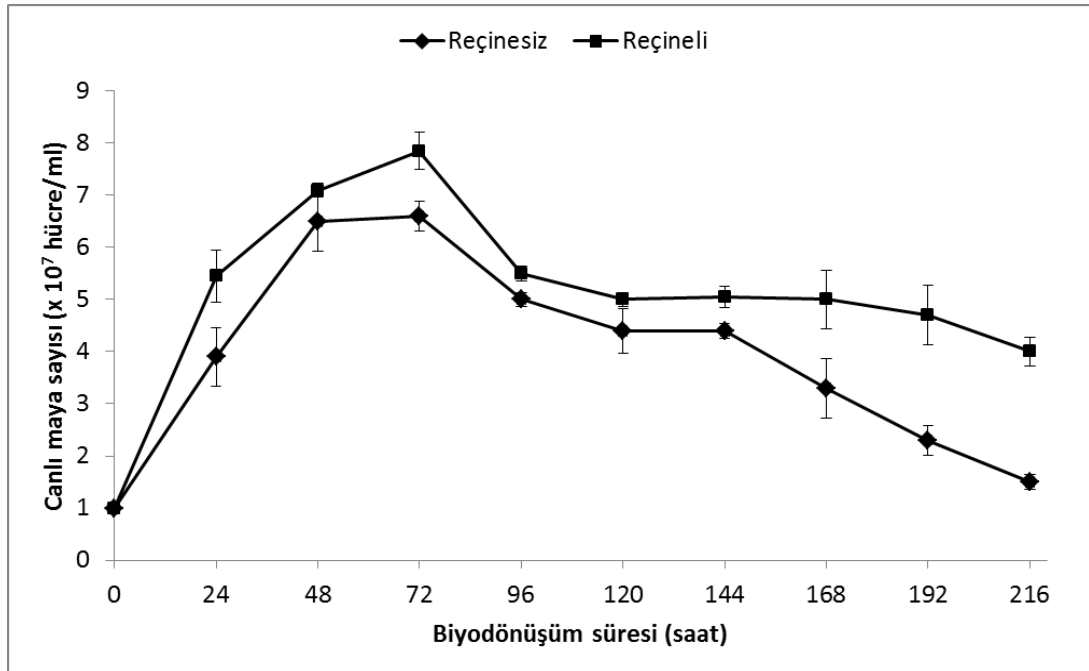
Dolayısıyla toplamda üretilen izoamil asetat miktarı reçineli ortamda 308.1 mg/L'dir. Bu sonuçlara göre ortama reçine ilave edildiği zaman gerçekleştirilen biyodönüşümde üretilen izoamil asetat miktarının reçine ilavesi olmadan gerçekleştirilen üretime göre yaklaşık 8 kat arttığı tespit edilmiştir.

4.3.2. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde reçinenin etkisi

H103 reçinesi kullanılarak biyoreaktör ortamında yürütülen kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde ortama 72. saatte fuzel yağının damıtılmasıyla elde edilen izoamil alkolden 2 mL ilave edilmeye başlanmış ve her 24 saatte bir izoamil alkol ilave edilerek 216 saat süresince biyodönüşüm gerçekleştirilmiştir. Kontrol denemesi ise aynı şekilde ortama reçine ilave edilmeden gerçekleştirilmiştir. Denemelerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.3.2.1. Canlı maya sayısı

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemeleri ve kontrol denemelerinde (reçinesiz) elde edilen canlı maya sayıları Şekil 4.9' da gösterilmiştir.

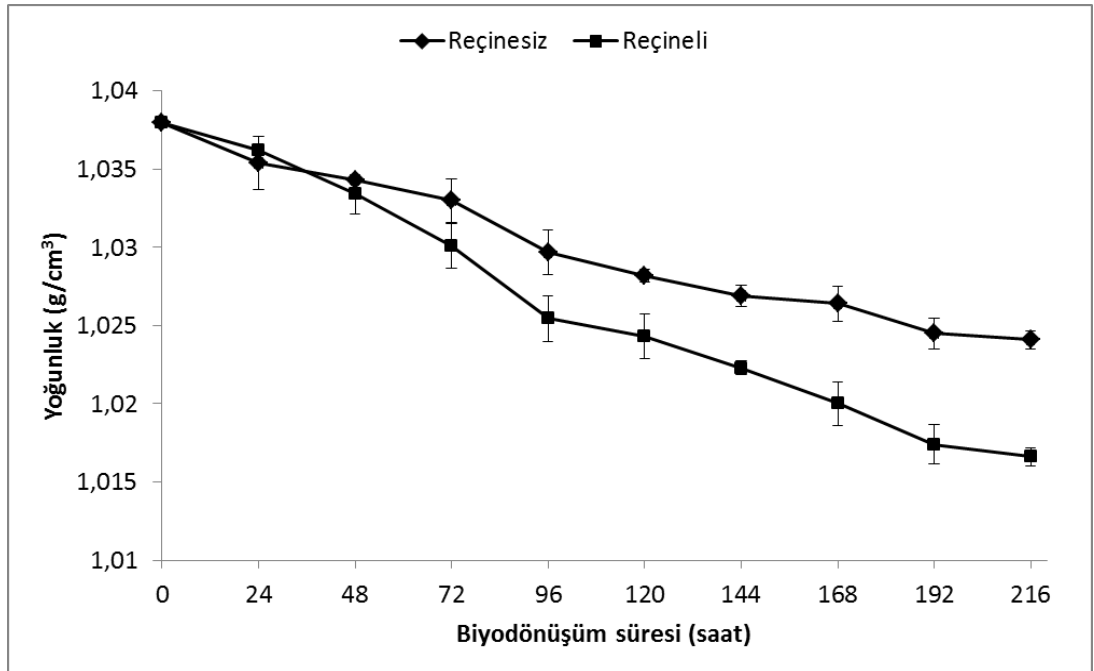


Şekil 4.9. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince canlı maya sayısı

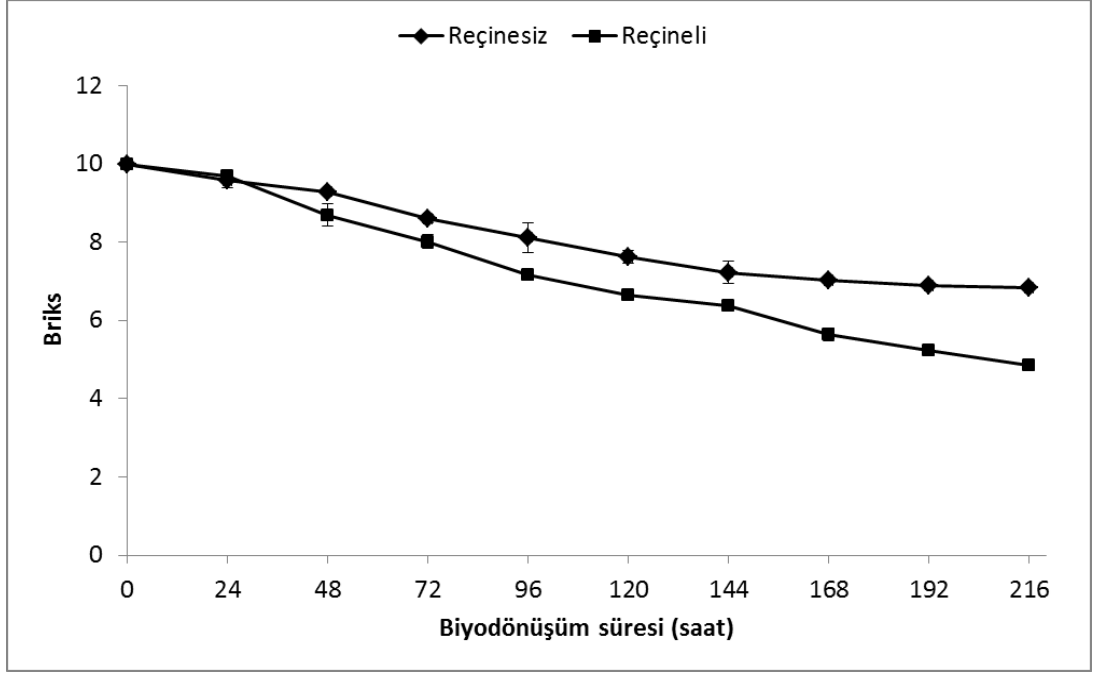
Şekil 4.9'dan da görüldüğü gibi reçine ilavesi ile gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde en yüksek maya sayısına 7.9×10^7 hücre/mL ile 72. saatte ulaşılrken reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde ise 6.6×10^7 hücre/mL ile yine 72 saatte ulaşılmıştır. 9 gün (216 saat) sonunda ortamdaki maya sayısına baktığımızda reçinesiz ortamda bulunan maya sayısının reçineli ortamdaki maya sayısından daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum reçinesiz ortamda üretilen izoamil asetatın ortamda birikmesiyle mayaların canlılığı üzerinde göstermiş olduğu inhibisyon etkisi ile ilişkilendirebiliriz. 72. saatte izoamil alkol ilavesinden sonra maya sayısında her iki üretimde de hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Düşüş hızının reçine ilave edilen denemede reçine ilave edilmeyen denemedeğine nazaran daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Her iki denemede de 72. saatten itibaren ilave edilen izoamil alkolün maya gelişimini doğrudan etkilediği görülmüştür.

4.3.2.2. Yoğunluk ve briks

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince ortam yoğunluğu ve briks değerlerinde görülen değişimler Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de görülmektedir.



Şekil 4.10. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince yoğunluk değerleri

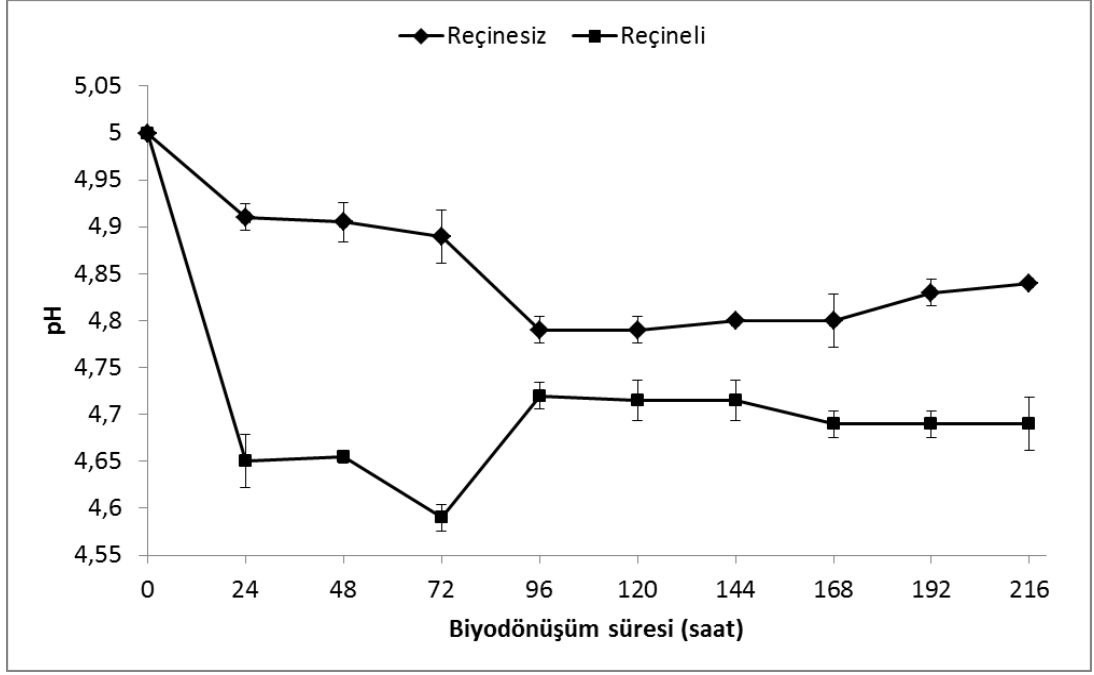


Şekil 4.11. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince briks değerleri

Yoğunluk ve briks değerleri biyodönüşümün gidişatını değerlendirmemize yarayan parametrelerdir. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm sonucunda reçine ilavesi ile gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyodönüşümde yoğunluk 1.017 g/cm^3 reçine ilave edilmeksizin gerçekleştirilen denemede ise 1.024 g/cm^3 'e kadar düşmüştür. Briks değerleri ise reçine ilavesi ile gerçekleştirilen denemede 4.83'e düşerken reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen kontrol denemesinde ise 6.84'de kalmıştır. Görüldüğü gibi reçine ilavesi ile gerçekleştirilen denemede yoğunluk ve briksin düşüşü reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen kontrol denemesine göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Bu durumun nedeni canlı maya sayısı grafiğinden de görüldüğü gibi reçineli ortamda maya gelişiminin daha hızlı olmasına dayandırılmıştır.

4.3.2.3. pH

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde gözlemlenen pH değişimleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



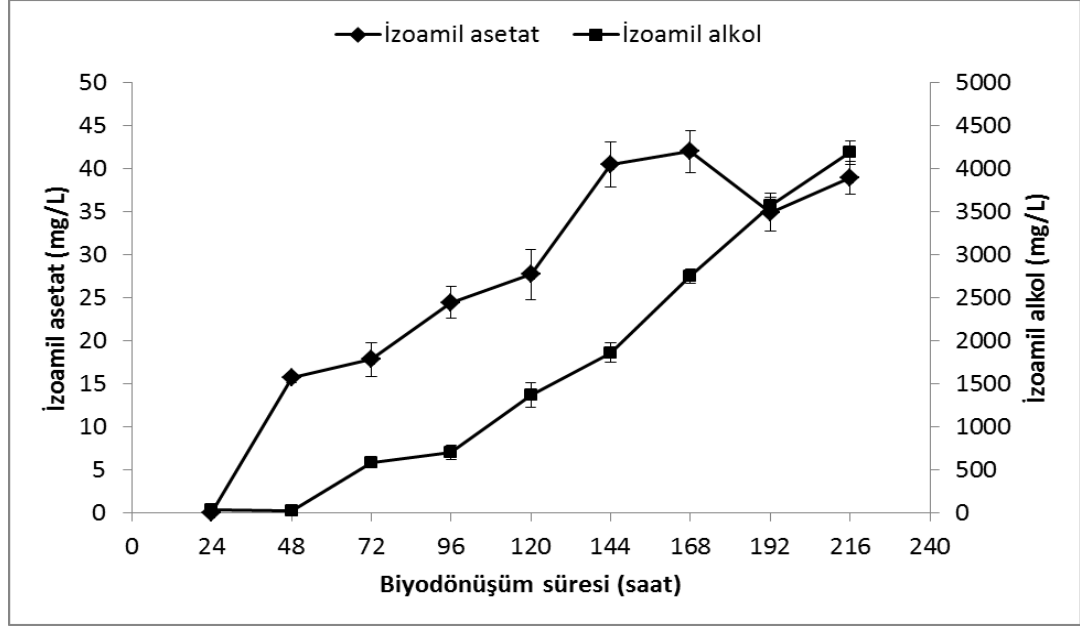
Şekil 4.12. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince pH değerleri

Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi reçine ilave edilerek gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde ortamın pH'sı ilk 24 saat içinde 5'den 4,65'e hızlı bir şekilde düşüş göstermiştir. Reçine ilave edilmeksizin gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde ise pH ilk 24 saat içinde daha yavaş bir şekilde düşüş göstererek 4,93'e kadar düşmüştür. Reçine ilave edilen denemede ortamın pH'sı 72. saate kadar 4,6'ya kadar düşüşüne devam etmiş, kontrol denemesinde ise 96. saate kadar 4,8'e kadar bir düşüş göstermiştir.

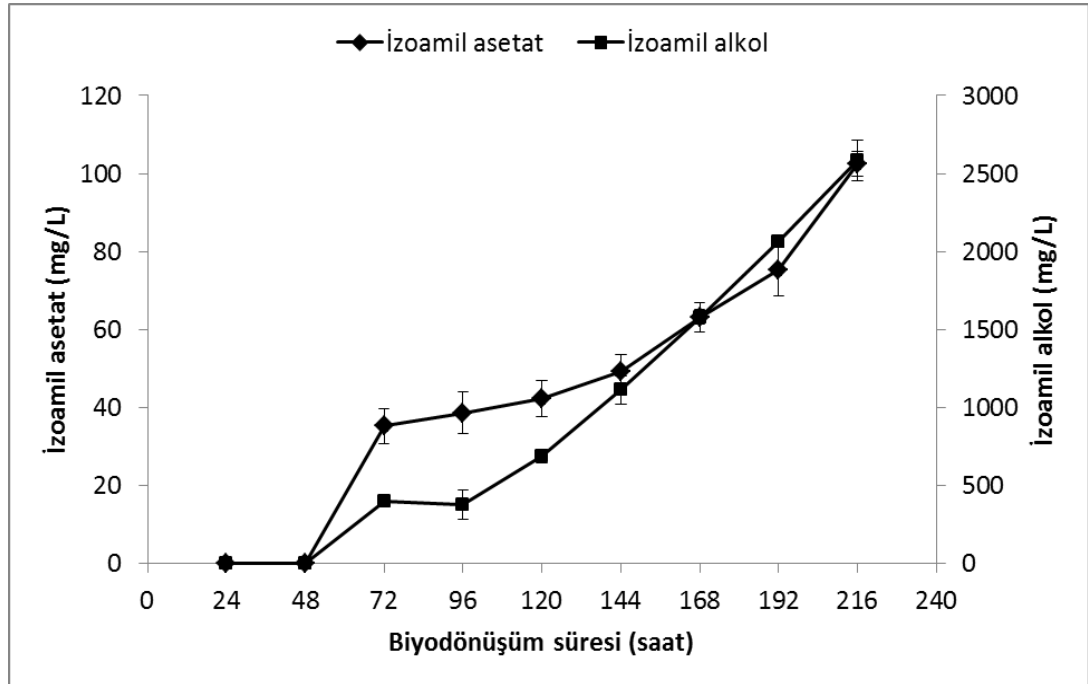
Reçine ilave edilen biyodönüşüm denemesinde izoamil alkolün 72. saatte ilave edilmesinden sonra 96. saatte, pH 4,7 seviyelerine yükselmiştir. Reçine ilave edilen denemede biyodönüşüm sonunda ortamın pH'sı 4,69 olurken, reçine ilave edilmeyen kontrol denemesinde bu değer 4,84 olmuştur. Hem reçineli biyodönüşüm denemesinde hem reçine ilave edilmeyen kontrol denemesinde ortama izoamil alkol ilave edilmesinden sonra izoamil alkolün etkisinden dolayı ortam pH'sında yükselmeler görülmüştür. Reçine ilave edilen biyodönüşüm denemesinde bu yükselme 72. saatten itibaren görülmeye başlanırken reçine ilave edilmeden gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde 96. saatten sonra yükselmeler görülmüştür.

4.3.2.4. İzoamil asetat üretimi

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemeleri süresince reçineli ve reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince reçinesiz ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları



Şekil 4.14. Kesikli-beslemeli biyodönüşüm süresince reçineli ortamda bulunan izoamil asetat ve izoamil alkol miktarları

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de görüldüğü gibi reçinesiz ortamda biyodönüşümün 48. saatinde izoamil asetata rastlanırken reçine kullanılarak gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde 72. saatte izoamil asetat görülmeye başlanmıştır. Reçineli ortamda izoamil asetatın 72. saatte görülmesi ortamda bulunan reçinenin oluşan izoamil asetatı oluşur oluşmaz adsorplamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kesikli biyodönüşüm denemelerinde olduğu gibi reçinesiz ortamda gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemelerinde de ortamda bulunan izoamil asetat miktarında iniş çıkışlar gözlemlenmektedir. Reçinesiz ortamda üretilen izoamil asetat miktarındaki iniş çıkışların olması mayalar tarafından üretilen izoamil asetatın ortamda birikmesi ve biriken ürününün maya gelişimini olumsuz etkilemesi dolayısıyla bu durumun üretilen izoamil asetatı da etkilemesi olarak düşünülebilir.

Reçineli ortamda bulunan izoamil asetat miktarında ise genelde biyodönüşüm sonuna kadar bir artış gözlemlenmektedir. Bu durum belirli bir süre sonra reçinelerin maksimum adsorbe ettiği kapasiteye ulaştığını dolayısıyla izoamil asetat adsorplamasında azalmalar görülerek üretilen izoamil asetatın ortamda birikmesiyle ilişkilendirilebilir.

Kesikli-beslemeli biyodönüşüm sonunda reçineli ortamda bulunan izoamil asetat miktarı 102.5 mg/L olurken reçinesiz olarak gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde ise üretilen izoamil asetat miktarı 40 mg/L’de kalmıştır. Reçineli ortamda üretilen izoamil asetatın reçinelere adsorpsiyonu sonucunda adsorbe olan izoamilasetatın desorpsiyonu ile 137.4 mg/L izoamil asetat elde edilmiştir. Dolayısıyla reçineli ortamda gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyodönüşüm sonunda toplam 239.9 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Bu sonuçlara göre reçine ilavesi ile gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemesinde kontrol denemesine göre izoamil asetat üretiminde yaklaşık 6 kat artış gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Lindnera saturnus* var. *saturnus* mayası kullanılarak melas ortamında fuzel yağından biyodönüşüm yolu ile muz aroması olarak bilinen izoamil asetat üretilmiştir. Üretilen izoamil asetatın belirli bir süre sonra ortamda birikimini önlemek ve mayalar üzerindeki inhibisyon etkisini uzaklaştırarak izoamil asetat üretim verimini arttırmak amacıyla, üretilen izoamil asetatın YÜK tekniklerinden biri olan Yerinde Ürün Adsorpsiyon metodunun kullanımı ile makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerine adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen izoamil asetatın oluşur oluşmaz ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bunun için öncelikle farklı polariteye, yüzey alanına ve gözenek çapına sahip 9 farklı makrogözenekli adsorpsiyon reçinelerinin adsorpsiyon kapasiteleri, adsorpsiyon etkinlikleri ve desorpsiyon verimleri araştırılmıştır. En uygun reçinenin tespiti için denelemler hem sentetik ortamda hem de biyolojik ortamda kesikli ve kesikli-beslemeli üretimler olmak üzere erlen düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Bu üretimler sonucunda reçineler arasından biyodönüşüme uğrayacak maddeyi (izoamil alkolü) en düşük düzeyde, biyodönüşümle üretilen muz aromasını (izoamil asetatı) en yüksek düzeyde adsorplayan, adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon verimi en yüksek olan H103 nolu reçine en uygun reçine olarak tespit edilmiş ve tespit edilen bu reçine kullanılarak izoamil asetat üretimi biyoreaktör düzeyinde anaerobik şartlarda kesikli ve kesikli-beslemeli biyodönüşüm ve kontrol üretimleri olarak üzere gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar gerçekleştirilen üretimlerde reçinenin etkisi ve izoamil asetat üretim verimi açısından değerlendirilmiştir. Reçinenin etkisi açısından hem erlen hem de biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen kesikli ve kesikli- beslemeli biyodönüşümler karşılaştırılarak bu üretimlerde reçinenin etkisi araştırılmıştır. Üretim verimleri açısından ise erlen denemeleri ve biyoreaktör denemeleri kıyaslanarak, biyoreaktör düzeyinde ise gerçekleştirilen kesikli ve kesikli-beslemeli üretimler karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

İzoamil asetat üretim verimi açısından kesikli ve kesikli-beslemeli üretimler karşılaştırıldığında;

Erlen denemelerinde H103 reçinesi ilavesi ile gerçekleştirilen kesikli üretimde üretilen izoamil asetat miktarı 1204 mg/L olarak bulunmuştur. Kesikli-beslemeli üretimde ise 1910 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Erlen düzeyinde gerçekleştirilen

kesikli-beslemeli biyodönüşümlerde verimin kesikli üretime göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Biyoreaktör denemelerinde ise H103 reçinesi ilavesi ile gerçekleştirilen kesikli üretimde 308.1 mg/L izoamil asetat üretilirken kesikli-beslemeli üretimde ise 239.9 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Biyoreaktör denemesinde kesikli biyodönüşümle üretilen izoamil asetat miktarı daha fazla bulunmuştur. Biyoreaktörde gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemesinde üretilen izoamil asetat miktarının düşük olmasının nedeni kesikli-beslemeli biyodönüşüm denemesinde ortama 24 saat aralıklarla ilave edilen izoamil alkolün yeterli sayıya ulaşmayan maya hücreleri tarafından metabolize edilememesi ve toksik etki göstermesidir.

Verim açısından her iki denemeyi yani hem erlen düzeyinde gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesini hem de biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesini karşılaştırdığımızda erlen denemesinde gerçekleştirilen her iki üretimde de üretilen izoamil asetat miktarı biyoreaktör denemesinde üretilenden daha fazladır. Bu durumun sebebi erlen denemelerindeki havalandırma koşullarının biyoreaktör ortamına uygulanamamasıdır. Erlen denemeleri ağızları selüloz filtrelerle kapatılmış erlenlerde gerçekleştiğinden biyodönüşüm ortamına dışarıdan sürekli hava transferi gerçekleşmiş ve ortamdaki maya sayısını yeterli düzeyde teşvik edecek çözünmüş oksijen sağlanabilmiştir. Erlen denemelerinde biyodönüşüm sırasında ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarı ölçülemediğinden biyoreaktör denemelerinde ortama verilecek hava miktarı belirlenememiştir. Çözünmüş oksijen miktarının belirlenip biyoreaktörde ortama verilecek hava miktarı ayarlandığında üretim veriminin daha da artacağı düşünülmektedir.

Reçinenin etkisi açısından değerlendirildiğinde;

Erlen denemelerinde kesikli üretimde reçineli ortamda 1204 mg/L izoamil asetat üretilirken, reçine kullanılmadan gerçekleştirilen kontrol üretiminde ise 28.5 mg/L üretilmiştir. Reçineli ortamda üretilen izoamil asetat miktarı reçinesiz ortama göre yaklaşık 42 kat artış göstermiştir. Kesikli-beslemeli olarak gerçekleştirilen üretimde ise reçineli ortamda 1910 mg/L izoamil asetat üretilirken, reçinesiz ortamda 64 mg/L üretilmiştir. Reçineli ortamda izoamil asetat üretiminde yaklaşık 30 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Erlen denemelerinde görüldüğü gibi biyodönüşüm denemelerinde reçinelerin kullanımı üretilen izoamil asetat verimini arttırmıştır.

Biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen kesikli biyodönüşüm denemesinde üretilen izoamil asetat miktarı 308.1 mg/L iken reçinesiz ortamda 38.4 mg/L'dir. Reçineli ortamda üretilen izoamil asetat miktarı reçinesiz ortamda üretilene göre yaklaşık 8 kat artmıştır. Kesikli-beslemeli biyodönüşümde reçineli ortamda 239.9 mg/L izoamil asetat üretilirken reçinesiz ortamda ise 40 mg/L izoamil asetat üretilmiştir. Reçine ilavesi ile gerçekleştirilen biyodönüşüm denemesinde i-amil asetat üretimi yaklaşık 6 kat artış göstermiştir. Erlen denemelerinde olduğu gibi biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen biyodönüşüm denemelerinde de reçine ilavesi ile izoamil asetat üretim veriminde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, karşılaşılan problemler ve öneriler aşağıda belirtilmiştir;

- Makrogözenekli H103 reçinesinin kullanımının izoamil asetat üretim verimini arttırdığı görülmüştür. Dolayısıyla oluşan izoamil asetatın ortamda birikimi önlenerek mayalar üzerindeki inhibisyon etkisi azaltılmış ve mayanın izoamil asetat üretmesine olanak sağlanmıştır. Böylece izoamil asetat üretim verimi artmıştır.
- Ayrıca YÜK tekniğinin kullanımı hem üretim veriminin artmasına hem de elde edilen ürünün kolay bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılmasına imkan tanımıştır.
- Erlen düzeyinde gerçekleştirilen üretimlerde izoamil asetat üretim verimi biyoreaktördeki göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Erlen denemelerinde biyodönüşüm sırasında ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarı ölçülemediğinden biyoreaktör denemelerinde oksijen transferi sağlanamamıştır. Çözünmüş oksijen miktarının belirlenip biyoreaktörde ortama verilecek oksijen miktarı ayarlandığında izoamil asetat üretim veriminin daha da artacağı düşünülmektedir.
- Erlenlerde ve biyoreaktörde gerçekleşen üretimlerde ortamda bulunan reçinenin izoamil asetat ile beraber aynı zamanda özellikle kesikli-beslemeli üretimde izoamil alkolün de bir kısmını adsorpladığı gözlemlenmiştir. Bu durum reçinenin izoamil asetat adsorplama kapasitesini etkilemiş aynı zamanda ortama verilen izoamil alkolün adsorplanması sonucunda izoamil

asetata biyodönüşümünü de etkileyerek izoamil asetat veriminin beklenenden daha düşük düzeyde olmasına neden olmuştur. Bu durumun reçinelerin biyodönüşüm ortamıyla direkt temasının olmadığı indirekt temas yönteminin kullanılmasıyla giderilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adachi, S., Kobayashi, T. (2005). Synthesis of esters by immobilized lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 87–94.

Adler, P., Thorsten, H., Wiewiora, M., Kunz, B. (2011). Modelling of an integrated fermentation/membrane extraction process for the production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate. *Enzyme Microb. Tech.* **48**, 285-292.

Akoh, C.C., Lee, G.C., Shaw J.F. (2004). Protein engineering and applications of *Candidarugosa* lipase isoforms. *Lipids.* **39**, 513–526.

Azania, A., Azania, C., Marques, M.O., Pavani, M.D.C.M.D. (2011). Herbicidal potentiality of fusel oil (735-746). Kortekamp, A. (Ed.), *Herbicides and Environment*. In Tech, Rijeka.

Anonim. (1997). *Methods of Analysis*. The Institute of Brewing, London

Anonim, 2002. Reference Methods for the Analysis of Spirit Drinks. Official Journal of the European Communities, Council regulation (EEC) No:2870/2000, 47s.

Anonim. (2012). http://www.leffingwell.com/top_10.htm (Erişim tarihi: 28 Mayıs, 2013).

Anonim. (2013a). <http://www.mevzuat.adalet.gov.tr/html/20994.html>. (Erişim tarihi: 3 Mayıs, 2013).

Anonim.(2013b). http://www.advancedbiosciences.com/Bioprocessing_doc/english/AmberliteXAD_brochure.PDF (Erişim tarihi: 16 Mart, 2013).

Anonim.(2013c). http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4802.Par.0001.File.tmp/4802.pdf (Erişim tarihi: 16 Mart, 2013).

Bengston, G., Bøddeker, K.W., Hanssen, H.P., Urbasch, I. (1992). Recovery of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervaporation. *Biotechnol. Techniques.* **6**, 23-26.

Berg C. (2010). *In-situ product recovery from fermentation broths, The application of solvent-impregnated resins as a product recovery tool*. Doktora tezi, Technische Universiteit Delft, Geboren te Bennekom.

Bilir M.H. (2009). *Yer Fıstığı Kabuğundan Üretilen Poliüretan Tipi Köpük İle Safranin ve Remazol Brilliant Blue R'nin Adsorpsyonunun İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis.

Boulton, C., Quain, D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science, Great Britain, pp: 644.

- Cabaroğlu, T., Yılmaztekin, M. (2010). Aroma biyoteknolojisi (375-392). Aran, N. (Ed.), *Gıda Biyoteknolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.,
- Cartensen, F., Apel, A., Wessling, M. (2012). In situ product recovery: Submerged membranes vs. external loop membranes. *J. Membrane. Sci.* **394**, 1-36
- Chen, E.C.H. (1978). The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **36**, 39-43.
- Curtin, L.V. (1983). Molasses-General Consideration. Molasses in Animal Nutrition, National Feed Ingredients Association, West Des Moines, Iowa, 11s.
- Çalık, G., Berk, M., Boyacı, F.G., Çalık, P., Takaç, S., Özdamar, T.H. (2001). Engineering and Manufacturing for Biotechnology (21-28). Hofman, M., Thonart, P. (Ed.), *Pretreatment Processes of Molasses for the Utilization in Fermentation Processes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. (2003). Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett.* **25**, 531–536.
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. (2005). Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng* **92**, 624–634.
- Etschmann, M.M.W., Schrader, J. (2006). An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Appl. Microbiol Biot.* **71**, 440–443.
- Feron, G., Waché, 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.
- Freeman, A., Woodley, M.J., Lilly, D.M. (1993). In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Nat. Biotechnol.* **11**, 1007-1012.
- Guan, A., Wang, H., Meng, C., Shi, XA., Guo, YH. (2009). Biosynthesis of 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain with ISPR technology. *Chinese J. Process Eng.* **9**, 128–132.
- Guyer, D.E., Saengcharoentrat, C., Lira, T.C. (2003). Onion recovery in the process of adsorption and supercritical carbon dioxide desorption. *J. Food Process Eng.* **28**, 205-218.
- Güvenç, A., Kapucu, N., Mehmetoğlu, Ü. (2002). The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochem.* **38**, 379-386.
- Güvenç, A., Aydoğan, Ö., Kapucu, N., Mehmetoğlu, Ü. (2007). Fuzel yağından izoamil asetat üretimi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi.* **22**, 801-808.

Heerema, L., Roelands, M. (2011). In-situ product removal from fermentations by membrane extraction: conceptual process design and economics. *Ind. Eng. Chem. Res.* A-L.

Hua, D., Ma, C., Song, L., Lin, S., Zhang, Z., Deng, Z., Xu, P. (2007). Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. *Appl. Microbiol Biot.* **74**, 783-790.

Hua, D., Lin, S., Li, Y., Chen, H., Zhang, Z., Du, Y., Zhang, X., Xu, P. (2010). Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption. *Biocatal Biotransfor.* **28**, 259-266.

Hua, D., Xu, P. (2011). Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnol. Adv.* **29**, 654-660.

Janssens, L., De Pooter, H.L., De Mey, L., Vadamme, E.J., Schamp, N.M. (1989). Fusel oil as a precursor for the microbial production of fruity flavours. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit, Gent* **54**, 1387-1391.

Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv.* **26**, 457-470.

Kahyaoğlu, M., Konar, V. (2006). Şeker fabrikası atık maddeleri kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesi. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi.* **18**, 493-498.

Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M. (2007). Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi.* **17**, 61-66.

Kammerer, J., Carle, R., Kammerer, R.D. (2011). Adsorption and ion exchange: basic principles and their application in food processing. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 22-42.

Kelly, J., Chapman, S., Brereton, P. (1999). Gas Chromatographic Determination of Volatile Congeners in Spirit Drinks: Interlaboratory Study. *J. Aoac. Int.* **82**, 1375-1388.

Krings, U., Kelch, M., and Berger, R.G. (1993). Adsorbents for the recovery of aroma compounds in fermentation processes. *J. Chem. Technol Biot.* **58**, 293-299.

Küçük, Z., Ceylan, K. (1997). Potential utilization of fusel oil: A kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. *Turk. J. Chem.* **22**, 289-300.

Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technol.* **87**, 167-198.

Liu, Q.S., Lee, Y.H., Yu, B., Curran, P., Sun, J. (2013). Bioproduction of natural isoamyl esters from coconut cream as catalysed by lipases. *J. Food Res.* **2**, 157-166.

- Li, J., Chase, A.H. (2010). Development of adsorbative (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 1493-1510.
- Longo, M.A., Sanroman, M.A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotech.* **44**, 335-353.
- Lu, J., Zhang, W.G. (2008). Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by bioconversion in biphasic system. *Chem. Ind. Eng. Progr.* **27**, 417-420.
- Macedo, G.A., Pastore G.M., Rodrigues M.I. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of isoamylacetate in free-solvent media optimization using a central composite design. *J. Food. Agric. Environ.* **1**, 59-63.
- Mei, J., Min, H., Lü, Z. (2009). Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. *Process Biochem.* **44**, 886-890.
- Perez, A.A. (2001). *Enhanced microbial production of natural flavors via in-situ product adsorption*. Doktora tezi, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich.
- Quilter, M.G., Hurley, J.C., Lynch, F.J., Murphy, M.G. (2003). The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. I. Brewing.* **109**, 34-40.
- Roffler, S.R., Blanch, H.W., Wilke, C.R. (1984). In situ recovery of fermentation products. *Trends Biotechnol.* **2**, 129-136.
- Serp, D., Von Stockar U., Marison, I.W. (2003). Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentation using solvent immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 103-110.
- Serrano, L. (2003). Improving biogenesis of aroma compounds by in situ product removal (229-242). Lopez, G.F., Canovas, G.V. (Ed), *Food Science and Food Biotechnology*. CRC press, U.S.A.
- Schügerl, K. (2000). Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnol Adv.* **18**, 581-599.
- Schügerl, K., Hubbuch, J. (2005). Integrated bioprocess. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 294-300.
- Soto, L.M., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J.C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption. *J. Food Eng.* **105**, 1-27.
- Stark, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., Von Stockar, U. (2002). Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Progr.* **18**, 514-523.

- Şener, A., Ünal, M.Ü. (2008). Gıda sanayii atıklarının biyoteknolojik yöntemlerle değerlendirilmesi (1035-1038). *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Atatürk Üniversitesi, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Torres, S., Baigori, M.D., Swathy, S.L., Pandey, A., Castro, G.R. (2009). Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Res. Int.* **42**, 454-460.
- Xu, P., Hua, D., Ma, C. (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends Biotechnol.* **25**, 571-576.
- Vandamme, E.J. (2003). Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Divers.* **13**, 153-166.
- Wang, C.T., Sun, B.G., Cao, Y.P., Wang, J. Zhang, H. (2008). Biosynthesis of natural 2-phenylethanol by yeast cells. *Modern Chem. Ind.* **28**, 38-43.
- Welsh, F.W., Williams, R.E., Dawson, K.H. (1990). Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. *J. Food Sci.* **55**, 1979-1682.
- Woodley, M.J., Bisschops, M., Straathof, J.J.A., Ottens, M. (2008). Perspective future directions for in- situ product removal. *J. Chem Technol. Biot.* **83**, 121-123.
- Yılmaztekin, M., Erten, H., Cabaroğlu, T. (2005). Gıda biyoteknolojisinde aroma maddelerinin süperkritik akışkan yöntemiyle ekstraksiyonu. *Gıda.* **30**, 269-274.
- Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T., Erten, H. (2008a). Biyoteknolojik yollarla aroma maddelerinin üretimi. *Gıda.* **33**, 35-41.
- Yılmaztekin, M., Erten, H., Cabaroğlu, T. (2008b). Production of isoamyl acetate from sugar beet molasses by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *J. I. Brewing.* **114**, 34-38.
- Yılmaztekin M. (2009). *Biyoteknolojik yoldan doğal izoamil asetat ve etilasetat aromalarının üretimi üzerinde araştırmalar*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yılmaztekin, M., Erten, H., Cabaroglu, T. (2009). Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Food Chem.* **112**, 290-294.
- Zang, Q.F., Jiang, Z.T., Gao, H.J. (2008). Recovery of vanilin from aqueous solutions using macroporous adsorption resins. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 377-383.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sevinç Tay

Doğum Yeri ve Tarihi: Erzincan, 25.08.1988

Adres: Kilis 7 Aralık Üniversitesi -Mühendislik-Mimarlık Fakültesi-Gıda Mühendisliği Bölümü, KİLİS

E-posta: sevinctay@kilis.edu.tr

Lisans: İnönü Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi- Gıda Mühendisliği Bölümü (2007-2011)

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

2011-2013 İnönü Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi- Gıda Mühendisliği Proje Asistanı (TUBİTAK COST projesi)

2012-Halen Kilis 7 Aralık Üniversitesi -Mühendislik-Mimarlık Fakültesi-Gıda Mühendisliği Bölümünde Araştırma Görevlisi

Ödüller:

2011 İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fakülte Birinciliği

2011 İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Birinciliği

2006 Malatya Atatürk Kız Lisesi Lise Birinciliği

Yayın Listesi:

- Alpaslan M., **Tay S.**, 2012. Koruyucu Sağlık Rehberi, 64.Bölüm “Gıda Katkı Maddeleri”, Ed: Prof. Dr. Cengiz Yakıncı, Prof. Dr. Erdem Yeşilada, Türk Eczacılar Birliği, Eczacılık Akademisi Yayını.
- Hayaloğlu A., Sarımeşeli A., **Tay S.**, Zencir M., Elek M., Bilcanoğlu B., Memiş D., Uslu O.
“Yağsız Yoğurt Üretiminde İnülin Kullanımının Yoğurdun Reolojisi, Duyusal Özellikleri ve Aromasına Etkileri”, 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 24-26 Kasım, Ankara, 2011.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- Yilmaztekin, M. and **Tay S.**, 2013. The use of fed-batch and in situ product removal techniques for efficient biotransformation of isoamyl alcohol into isoamyl acetate by *Lindnera saturnus*, 9th European Congress of Chemical Engineering and 2nd European Congress of Applied Biotechnology, 21-25 Nisan, The Hague, Hollanda.
- Yilmaztekin, M. and **Tay S.**, 2013. Enhanced production of isoamyl acetate via biotransformation with *Lindnera saturnus* by in situ product removal with macroporous adsorption resins, 4th European Yeast Flavour Workshop, 22-23 Temmuz, Frising, Almanya.