

## ***Pseudomonas putida* İLE İZOÖJENOLDEN DOĞAL VANİLİN ÜRETİMİNDE BAZI ORTAM KOŞULLARININ MOLAR VERİM ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hüseyin Karakaya, Murat Yılmaztekin\***

İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye

Geliş / Received: 29.07.2019; Kabul / Accepted: 19.11.2019; Online baskı / Published online: 24.12.2019

Karakaya, H., Yılmaztekin, M. (2020). *Pseudomonas putida* ile izoöjenolden doğal vanilin üretiminde bazı ortam koşullarının molar verim üzerine etkisi. *GIDA* (2020) 45 (1): 9-19 doi: 10.15237/gida.GD19112.

Karakaya, H., Yılmaztekin, M. (2020). Effect of culture conditions on molar yield of natural vanillin production from isoeugenol by *Pseudomonas putida*. *GIDA* (2020) 45 (1): 9-19 doi: 10.15237/gida.GD19112.

### **ÖZ**

Vanilin, dünyada en çok kullanılan aroma maddelerinden biridir. Son yıllarda, doğal vanilin üretimindeki yetersiz arz ve yüksek maliyet nedeniyle araştırmalar biyodönüşüm yolları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, *Pseudomonas putida* (HUT 8100) kültürü kullanılarak izoöjenolden doğal vanilin üretim imkânı araştırılmış; sıcaklık, pH ve havalandırma koşullarının vanilin üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan *P. putida* kültürünün tek karbon kaynağı olarak izoöjenolü kullanabildiği ve bunu vaniline dönüştürme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. En yüksek vanilin üretim kapasitesine 28°C'de, biyodönüşüm ortamının başlangıç pH'sı 6.3 olarak ayarlandığında ulaşılmıştır. Havalandırmanın kesilmesiyle biyokatalistin üretkenliğinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Üretim için en uygun şartların seçilmesiyle 120 saat sonunda %25.1 molar verimle 877.9 mg/L düzeyinde bir üretim gerçekleştirilmiştir. Yapılacak daha ileri optimizasyon çalışmaları ile birlikte üretilen vanilin miktarının artırılabilmesi ve yöntemin endüstriyel proseslere uygun hale getirilebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Vanilin, izoöjenol, biyodönüşüm, doğal aroma, *Pseudomonas putida*

## **EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON MOLAR YIELD OF NATURAL VANILLIN PRODUCTION FROM ISOEUGENOL BY *Pseudomonas putida***

### **ABSTRACT**

Vanillin is one of the most widely used aroma compounds in the world. In recent years, studies are focused on bioconversion routes due to insufficient supply and high cost of natural vanillin production. In this study, possibility of natural vanillin production by using *Pseudomonas putida* and effects of temperature, pH and aeration conditions on the production yield were investigated. Results showed that *P. putida* culture had ability to use isoeugenol as sole carbon source and convert it into vanillin. The highest production yield was reached at 28°C when setting the initial pH of bioconversion medium at 6.3. A distinct fall was observed in productivity of biocatalyst by interruption of aeration. Using optimal conditions, 877.9 mg/L vanillin production was achieved with 25.1% molar yield in 120 h. It is thought that produced vanillin may be enhanced with further optimization studies and the method can be made suitable for industrial processes.

**Keywords:** Vanillin, isoeugenol, bioconversion, natural aroma, *Pseudomonas putida*

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ murat.yilmaztekin@inonu.edu.tr

☎ (+90) 422 377 4784

☎ (+90) 422 341 0046

Hüseyin Karakaya; ORCID no: 0000-0002-6311-473X

Murat Yılmaztekin; ORCID no: 0000-0002-5667-9169

## GİRİŞ

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit) vanilya bitkisinin karakteristik aroma bileşeni olup gıda, içecek, parfümeri ve farmasötik endüstrisinde sıkça kullanılan oldukça değerli bir üründür (Gonzalez vd., 2018; Ostovar vd., 2018). Günümüzde doğal vanilin üretimi sadece vanilya bitkisi ile sınırlı kalmıştır (Wang vd., 2018). Orkidelerin düşük gelişim hızı ve tohum zarflarında az miktarlarda vanilin ihtiva etmelerinden ötürü vanilinin botanik kaynaklardan saflaştırılması oldukça zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca yıllık üretim miktarı iklim koşulları, bitki hastalıkları ve ticaret politikalarına bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir (Gallage ve Moller, 2018). Küresel ölçekte vaniline olan talep 2016 yılı için 18700 ton olarak belirlenmiştir. Tohum zarflarından elde edilen ekstrakt miktarı yıllık 40-50 ton civarında iken bu miktar ihtiyacın %1'inden daha azını karşılamaktadır (Fache vd., 2016; Wongtanyawat vd., 2018). Talebin büyük bir kısmı özellikle guaiacol ve glioksilik asit gibi petrol türevi bileşiklerden elde edilen vanilin ile giderilmektedir. Bu süreçte Riedel prosesi gibi çevre dostu olmayan ve düşük kaliteli son ürün veren kimyasal uygulamalardan faydalanılmaktadır (Ostovar vd., 2018). Pazar ihtiyacının %80-85'lik kısmını karşılayan guaiacol sentezinin yanı sıra, kalan %12-15'lik kısım da lignin içeriği yüksek atıkların sülfitle muamelesiyle elde edilen vanilin ile giderilmektedir (Wangrangsimagul vd., 2012; Fache vd., 2016). Vanilya zarflarından elde edilmiş vanilinin ticari değeri enflasyondan bağımsız olarak 1200-4000 USD/kg arasında değişmektedir (Perkins vd., 2015; Marquez-Medina vd., 2018). Ancak yapay vanilin formlarının değeri yalnızca 10 USD/kg civarındadır (Wilde vd., 2019). Kimyasal prosesler istenmeyen bazı durumları beraberinde getirmektedir. Kiral moleküller için enantiyomerik spesifikliğin olmaması, ekstrem proses uygulamaları gerektirmesi ve düşük etkinlik sıklıkla karşılaşılan sorunlardandır (Perkins vd., 2015). Ayrıca çevreye zararlı uygulamalar içermesi, tüketici sağlığına üzerine endişeler (Banerjee ve Chattopadhyay, 2019), ürün güvenliğine ilişkin şüpheler ve yüksek enerji ihtiyacı da kimyasal sentezin taşıdığı diğer

olumsuzluklar arasındadır (Wangrangsimagul vd., 2012).

Biyovanilin üretimi pazar ihtiyacının karşılanması için botanik kaynağından ekstraksiyon ve kimyasal sentez yöntemlerine alternatif üçüncü bir seçenek sunmaktadır. Doğal hammadde kullanılarak biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen vanilin Avrupa Birliği mevzuatlarınca (EC 1334/2008) 'doğal aroma maddesi' olarak kabul edilmektedir. Ürünün 'doğal' olarak sınıflandırılması ürüne pazarlama açısından oldukça güçlü bir nitelik kazandırmaktadır (Wilde vd., 2019). Pek çok bakteri türünün ferulik asit, öjenol, izoöjenol ve sinamik asit türevlerini (*p*-kumarik asit gibi) kullanışlı aromatik maddelere dönüştürme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Taira vd., 2018). Doğal vanilin üretimi için yapılan çalışmalar da özellikle bu bileşikler gibi yenilenebilir kaynaklar üzerine yoğunlaşmıştır (Wangrangsimagul vd., 2012). Kullanılacak doğal ferulik asit biyodönüşüm prosesleri için pahalı ve yetersiz bir kaynak oluştururken, izoöjenol ise ucuz ve temini kolay bir hammadde olarak öne çıkmaktadır (Zhang vd., 2006).

Rekombinant *Escherichia coli* kültürleri ile yapılan çalışmalarda oldukça yüksek biyodönüşüm verimleri elde edilmiştir (Yamada vd., 2008; Zhao vd. 2018). Ancak genetik modifiye gıdaların tüketici nezdinde çoğunlukla olumsuz bir görüş oluşturduğu da bilinmektedir (Funk vd., 2015). Bu nedenle çalışmalar çoğunlukla genetik modifikasyon uygulaması içermeyen alternatifler üzerinde yoğunlaşmıştır. Zhao vd. (2005), *Bacillus fusiformis* kültürünü %60 izoöjenol içeren çift fazlı biyodönüşüm ortamında kullanarak 32.5 g/L düzeyinde vanilin üretmeyi başarmışlardır. Ancak substrat büyük oranda tüketilmeden ortamda kaldığından endüstriyel uygulamalar için verim oldukça düşük kalmıştır. *B. pumilis*'in kullanıldığı biyodönüşüm çalışmasında ise 150 saat sonunda 10 g/L izoöjenolden %40.5'lik molar verimle 3.75 g/L vanilin üretilmiştir (Hua vd., 2007). Ayrıca, *Pseudomonas* türlerinin de izoöjenolden vanilin üretme yeteneğine sahip olduğu pek çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Furukawa vd., 2003; Yamada vd., 2007; Kasana vd., 2007; Ashengroph vd., 2010; Ashengroph

vd., 2011; Vasudevan ve Bhat, 2011). *P. chlororaphis* ile 24 saatte 10 g/L izoöjenolden 1.2 g/L vanilin üretilebildiği bildirilmiştir (Kasana vd., 2007). Bu çalışmada elde edilen molar verim %13 olarak hesaplanmıştır. Biyokatalist olarak *P. aeruginosa* ile çalışıldığında ise %17.3 molar verimle 1.62 g/L düzeyinde vanilin elde edilmiştir (Ashengroph vd., 2011). Biyodönüşüm verimleri aynı cins içerisinde yer alan mikroorganizma türlerine göre değişkenlik gösterebildiği gibi ortam koşullarına bağlı olarak da farklılık arz edebilmektedir. *Psychrobacter* sp. CSW4 suşuyla başlangıçta %16.4 olan biyodönüşüm verimi çalışma koşullarının optimize edilmesiyle %36.3'e kadar artırılmıştır (Ashengroph vd., 2012; Ashengroph vd., 2013). *Pseudomonas* sp. KOB10 kültürü ortam bileşiminin optimizasyonu ile 15 g/L izoöjenolden 3.14 g/L vanilin üretimi gerçekleştirmiş olup; 88 saatte %22.5'lük molar verim değeri yakalanmıştır (Ashengroph vd., 2010). Yamada vd. (2007), *P. putida* IE27 suşunu kullanarak 24 saatte %71'lik bir molar verimle izoöjenolün vaniline biyodönüşümünü gerçekleştirmeyi başarmışlardır.

Doğal ürünlere olan ilgi her geçen gün artarken; üretimde de daha çevreci, sağlıklı, güvenilir ve ekonomik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Gıda ve içecek sanayiinde en çok kullanılan aroma maddelerinden biri olan vanilin doğal formu mevcut talebi karşılamaya yetmemektedir. Bu çalışmada, *P. putida* (HUT 8100) kültürünün biyodönüşüm ile izoöjenolden vanilin üretme potansiyeli araştırılmış; sıcaklık, ortam pH'sı ve havalandırmanın biyokatalist üretkenliği üzerine etkileri incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

*P. putida* kültürü (HUT 8100) HUT Culture Collection'dan (Hiroşima, Japonya) temin edilmiştir. Kültür +4°C'de IFO 802 besiyeri ortamında muhafaza edilmiştir. Besiyeri içeriği 10 g/L pepton, 2 g/L maya ekstraktı 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 15 g/L agar olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan bitkisel kökenli izoöjenol ve diğer tüm mikrobiyolojik bileşenler Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Ekstraksiyon için gerekli gıda kullanımına uygun etanol (%96) Tekkim (Bursa, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Asetik asit Carlo Erba (Milano, İtalya) firmasından; geri kalan tüm kromatografik saflıktaki kimyasallar ise Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Yüksek saflıktaki azot gazı (%99.9) yerel firmalardan tedarik edilmiştir.

### Mikroorganizma Kültürünün ve Biyodönüşüm Ortamının Hazırlanması

Zhao vd. (2005) tarafından önerilen bileşimde küçük modifikasyonlar yapılarak Glukoz-Maya-Pepton (GMP) besi ortamı hazırlanmıştır. Ortam 5 g glukoz, 5 g maya ekstraktı, 5 g pepton, 14 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 5.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O bir litre distile su içerisinde çözüldürülerek hazırlanmıştır. *P. putida* kültürü 50 mL steril GMP besiyeri içeren erlen içerisine inoküle edilmiştir. Kültür, 28°C'de ve 180 devir/dakika (d/d) çalkalama hızı eşliğinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon 7 gün devam ettirilmiş ve periyodik olarak ekim sonuçları alınmıştır.

Durağan faza giren hücreler besi ortamı ile birlikte santrifüj tüplerine alınarak, karışım +4°C'de 3600 g kuvvetle 15 dk santrifüj edilmiştir. Besi ortamını oluşturan supernatant kısmı uzaklaştırılarak 0.62 g yaş biyokütle (0.12 g kuru biyokütle) elde edilmiştir. Kuru biyokütle ağırlığı, 105°C'de sabit tartıma ulaşana kadar kurutulan yaş numune esas alınarak hesaplanmıştır (Ashengroph vd., 2012). Tüpte kalan pellet 20 mL steril biyodönüşüm ortamı ile sulandırılarak erlen içerisine alınmıştır. Biyodönüşüm ortamı sırasıyla pH 5.3 için 0.40 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 15.53 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6.3 için 4.84 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 16.65 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.3 için 14.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 5.2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve pH 8.3 için 21.62 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.82 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içerecek şekilde ayarlanarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Tüm denemelerde izoöjenol başlangıç konsantrasyonu %1 (w:v) olarak ayarlanmıştır.

### Sıcaklık, pH ve Havalandırma Koşulları

*P. putida* kültürü tarafından izoöjenolün vaniline biyodönüşüm sürecinde her denemede tek değişken esasında göre hareket edilmiştir. Her bir denemede hem vanilin üretimi hem de izoöjenol

tüketimi göz önünde bulundurularak en iyi sonucu veren uygulama seçilmiş ve bu uygulama bir sonraki deneme için sabit kabul edilmiştir. Tüm denemelerde 180 d/d çalkalama ile 120 saatlik bir biyodönüşüm süresi uygulanmıştır. Biyodönüşüm ortamındaki vanilin ve izoöjenol miktarlarının tespiti için periyodik olarak ortamdan örnek alınmış ve etanol ekstraksiyonunu takiben HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık denemesinde ortamın başlangıç pH'sı 7.3 olarak ayarlanmıştır (Zhao vd., 2005). 24, 28 ve 32°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde kültürün vanilin üretme kapasitesi incelenmiştir. pH'nın vanilin üretimi üzerine etkisini incelemek için ortamın K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeriği düzenlenerek pH 5.3, 6.3, 7.3 ve 8.3'te denemeler gerçekleştirilmiştir. Uygulanacak sıcaklık değeri bir önceki denemede elde edilen sonuca göre belirlenmiştir.

Havalandırmanın mikroorganizmanın üretkenliği üzerine etkisini incelemek için kültür inoküle edilmiş biyodönüşüm ortamı içeren şişelerin tepe boşluğu azot gazı ile doldurulmuştur. Kontaminantları tutmak için 0.22 µm'lik steril naylon membran filtreden geçirilen gazın 1 dk boyunca tepe boşluğuna dolması sağlanmıştır. Havalandırmasız ortamın sağlanabilmesi için şişelerin kapakları sıkı bir şekilde kapatılmış ve biyodönüşüm süresince açılmamıştır. Yarı havalandırılmalı ortam denemeleri ise ağzı sadece pamukla kapatılmış erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Havalandırma denemesinde uygulanacak sıcaklık ve pH değerleri daha önceki deneme bulgularına göre ayarlanmıştır.

### Canlılık Testi

Kültürün canlılık durumu *p*-iyodonitrotetrazolyum (INT) indikatörü kullanılarak kontrol edilmiştir. Her deneme için ayrıca hazırlanmış 2 mL biyodönüşüm ortamı içeren deney tüpleri içerisine inkübasyon süreleri sonunda 100 µl INT (0.2 mg/mL distile su) indikatörü eklenmiştir. 28°C'de 30 dk'lık ilave

inkübasyonun ardından deney tüplerinde kırmızı halka oluşumu bakteriyel canlılık ile ilişkilendirilmiştir (Al-Bayati, 2008).

### Kültür Ortamındaki Vanilin ve İzoöjenol Miktarının Belirlenmesi

Periyodik aralıklarla biyodönüşüm ortamından alınan örnekler 50 mL'lik tüplere aktarılmış, %96'lık etanol ile 1:1 (v/v) oranında seyreltilmiş ve 1 dk boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon daha sonra +4°C'de 3600 g kuvvetle 15 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Geriye kalan biyokütlede 2 kez daha 7.5 mL %96'lık etanol ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen ekstraktlar birleştirilmiş ve 0.45 µm'lik naylon membran filtrelerden geçirilerek HPLC ile analiz edilmiştir.

Vanilin ve izoöjenol miktarlarının belirlenmesinde Shimadzu marka HPLC (Shimadzu, Japonya) sistemi kullanılmıştır. Sistem UV-görünür bölge dedektörü, gaz giderici ve otomatik örnekleme ünitelerinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım Licospher RP18 (0.25 m, 6.35x4.60 mm, 5.5 µm partikül boyutu) kolonda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak %0.01 asetik asit içeren su ve hareketli faz B olarak ise kromatografik saflıkta (%99.9) metanol kullanılmıştır. Akış profili için Li vd. (2004) tarafından belirtilmiş prosedürler esas alınmış olup; metotta analiz süresini kısaltacak küçük modifikasyonlar yapılmıştır. Buna göre akış 0-3 dk arası %60 B, 3-5 dk arası %60-50 B, 5-9 dk arası %50-100 B, 9-13 dk arası %100 B, 13-15 dk arası %100-60 B ve bir sonraki enjeksiyona hazırlık için 15-18 dk arası %60 B olacak şekilde programlanmıştır. Eluat sürekli olarak 270 nm'de UV dedektör ile görüntülenmiştir. Tanımlama, izoöjenol ve vaniline ait doğal standartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Molar verim, aşağıda verilen [1] no'lu denklige göre hesaplanmıştır:

$$\text{Molar verim (\%)} = \frac{\text{Üretilen vanilin (g)} \times \text{İzoöjenolün molar ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Tüketilen izoöjenol (g)} \times \text{Vanilin molar ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \times 100 \quad [1]$$

### İstatistiksel Analizler

Analizler 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 16.0 yazılımı kullanılmış ve veriler tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir. Denemeler arasındaki farkları karşılaştırmak amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Sonuçlar  $P < 0.05$  önem seviyesinde değerlendirilmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Mikroorganizmanın Gelişme Durumu

GMP broth ortamına inoküle edilen başlangıç mikroorganizma sayısı yaklaşık  $1.9 \times 10^6$  kob/mL olarak hesaplanmıştır. Popülasyon en yüksek değerine ( $6.8 \times 10^8$  kob/mL) 48. saatte ulaşmıştır. Mikroorganizma sayısı 36 ve 48. saatler arasında artış göstermekle birlikte logaritmik artış ivmesini kaybettiği görülmüştür. 48. saatten itibaren kalan 5 günlük inkübasyon boyunca popülasyonda önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ).

Yapılan çalışmalar, substrat ile besleme zamanının mikrobiyal vanilin üretiminde oldukça önemli olduğunu ifade etmektedir (Ashengroph vd., 2010). Geç logaritmik evre veya durağan fazdaki hücreler biyodönüşüm çalışmaları için daha elverişli olmaktadır. Kullanılan substrat henüz olgunluğa erişmemiş genç hücreler üzerinde toksik etki gösterebilmektedir (Hua vd., 2007; Ashengroph vd., 2011). Bu nedenle 48. saatte durağan faz başlangıcındaki hücreler biyodönüşüm ortamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Olgun hücrelerden oluşan ve gelişmeyi sürdüren popülasyonlarda enerjinin büyük kısmı biyokütleyi arttırmak ve çoğalmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu durum özellikle biyodönüşüm çalışmalarında verimin düşmesine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, statik hücreler (nicelik olarak artış göstermeyen ancak metabolik aktivitelerine devam eden) yüksek spesifik aktivite ve ürün verimi gerektiren biyokatalitik süreçlerde daha etkin bir performans ortaya koymaktadır (Julsing vd., 2012). Bu hücrelerin kullanımı sadece

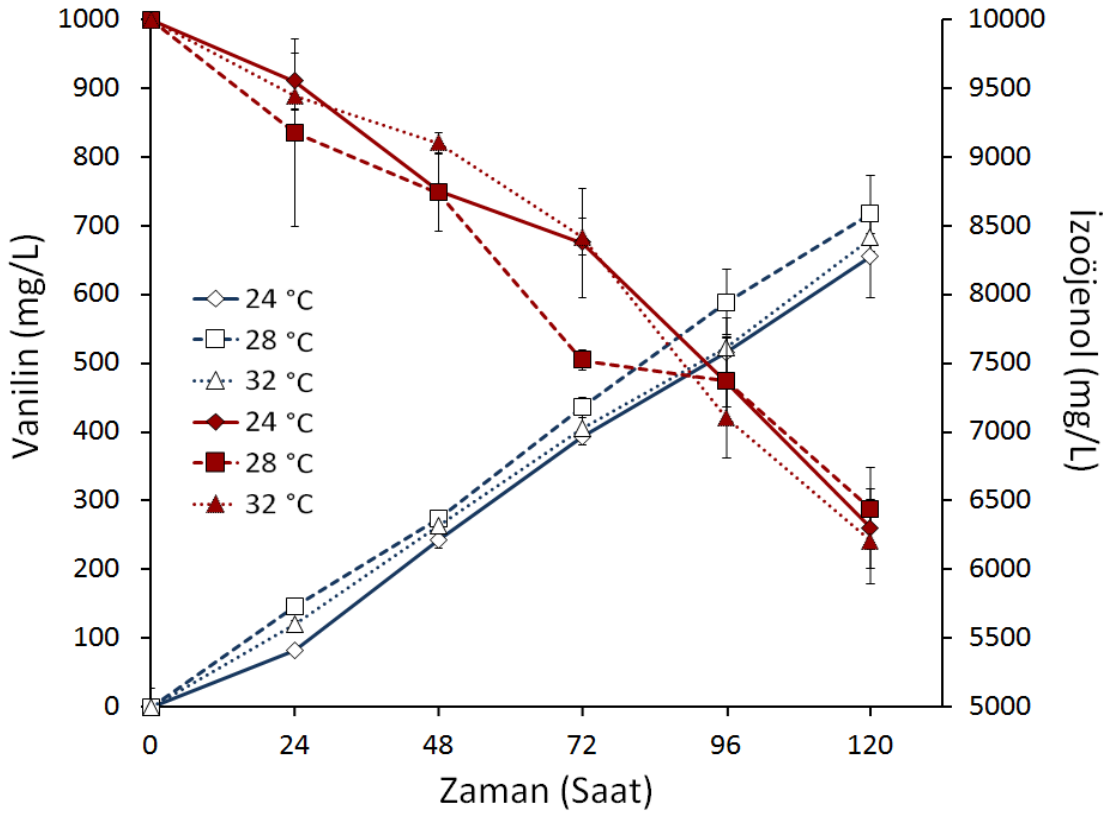
vanilin üretimini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda reaksiyon süresini kısaltmaktadır (Ashengroph vd., 2012). Biyodönüşüm süresince hücrelerin statik şekilde kalabilmelerini sağlamak amacıyla biyodönüşüm ortamında substrat dışında yalnızca  $K_2HPO_4$  ve  $KH_2PO_4$  tuzları kullanılmıştır.

#### İzoöjenol Varlığında Mikroorganizmanın Canlılığı

*P. putida* kültürünün kullanıldığı tüm denemelerde vanilin oluşumu gözlenirken; kültür inoküle edilmemiş kontrol erlenlerinde vanilin oluşumuna rastlanmamıştır. Bu durum, izoöjenolün vaniline abiyotik olarak dönüşemediğinin bir kanıtı olarak gösterilebilir. Oluşabilecek substrat toksisitesine bağlı olarak kültürün canlılığını koruyup korumadığı INT indikatörü ile incelenmiştir. Renksiz görünümde bir elektron alıcısı olan tetrazolyum tuzu indirgenğinde kırmızı renkli formazan oluşturmaktadır. Meydana gelen renk değişimi biyolojik aktivitenin bir sonucu kabul edilmektedir (Al-Bayati, 2008). Kültür içermeyen kontrol ortamlarında indikatöre bağlı renk değişimi gözlenmemiştir. Ancak biyodönüşümüne konu olan deneme ünitelerinin tamamında kırmızı renk oluşumu gözlenmiş olup; kültürün canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında *P. putida* (HUT 8100) suşunun tek karbon kaynağı olarak izoöjenolu kullanabildiği ve vanilin üretme yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

#### Sıcaklığın Vanilin Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyodönüşüm denemelerine ilişkin sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir. 120 saat sonunda en yüksek vanilin üretimi  $718.8 \pm 43.7$  mg/L ile  $28^\circ C$ 'de gerçekleşmiştir. Bu şartlarda tüketilen izoöjenol miktarı  $3556.2 \pm 298.1$  mg/L olarak belirlenmiştir.  $24$ ,  $28$  ve  $32^\circ C$ 'de elde edilen biyodönüşüm molar verimleri sırasıyla %19.1, %22.0 ve %19.5 olarak hesaplanmıştır. Uygulanan sıcaklık değerleri arasında gerek vanilin üretimi gerekse izoöjenol tüketimi açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $P > 0.05$ ).



Şekil 1. *P. putida* kültürünün farklı sıcaklıklardaki biyodönüşüm verimi (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 1. Bioconversion yield of *P. putida* culture at different temperatures (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoeugenol in medium)

Sıcaklık bakteri gelişimi, biyodönüşüm ortamının reolojik özellikleri ve ürün verimi üzerine etkili bir parametredir. Bilindiği üzere fermentasyon proseslerinde mezofilik sıcaklık değerleri daha az ısıtma ve soğutma ihtiyacı gerektirdiğinden enerji tasarrufu sağlamakta; ayrıca substrat stabilitesine de katkıda bulunmaktadır (Yan vd., 2016). Düşük sıcaklık değerleri bakteri gelişimi ve metabolizmasını olumsuz etkilemektedir. 20°C'nin altındaki sıcaklıklarda vanilin üretimin oldukça azaldığı belirtilmiştir (Yamada vd., 2007). Sıcaklık artışı metabolik salgıları arttırabileceği gibi substratın dispersiyonunu da kolaylaştırmaktadır. Yüksek sıcaklığa bağlı düşük viskozite kütle transferini ve yağ fazının difüzyon hızını arttırmaktadır (Yan vd., 2016). 120 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek vanilin üretimi 28°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumluluk

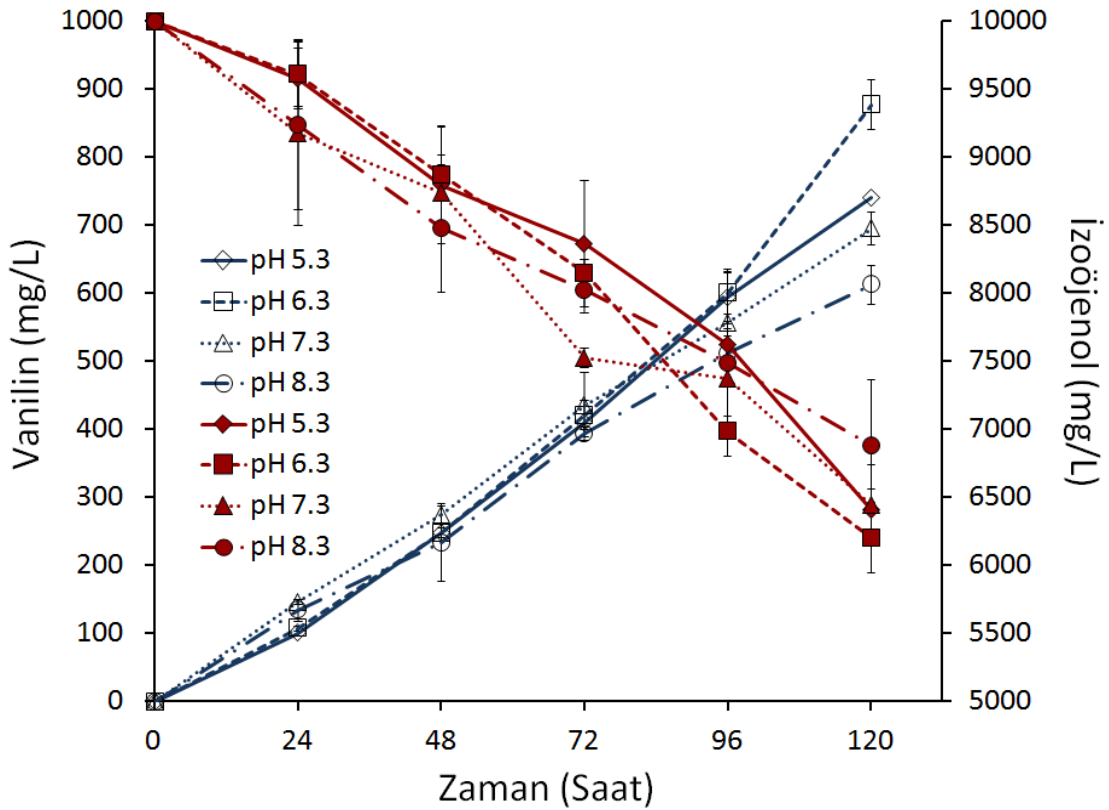
göstermektedir. *P. putida* kültürü kullanılarak gerçekleştirilen izoöjenolden vaniline biyodönüşüm çalışmasında 30°C'lik sıcaklığın vanilin birikimini azalttığı bildirilmiştir. Sıcaklığın 40 ve 50°C'ye çıkarılmasıyla hücrelerin vanilin üretim kapasitesinde sırasıyla %30 ve %100'lük kayıplar meydana gelmiştir. (Yamada vd., 2007). Sıcaklık artışına bağlı olarak vanilin üretiminde gözlenen bu düşüşün, izoöjenolü indirgeyen enzim(ler)in termal olarak stabil olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### Ortam pH'sının Vanilin Üretimine Etkisi

Enzimatik reaksiyon temelli proseslerde pH kilit rol oynamaktadır (Zhao vd., 2006; Yan vd., 2016). Başlangıç pH'sına bağlı olarak biyodönüşüm ortamındaki izoöjenol ve vanilin miktarlarındaki değişim Şekil 2'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hafif asidik ortam koşullarında

vanilin üretiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. pH 6.3'te  $877.9 \pm 36.1$  mg/L vanilin birikimi varken pH 8.3'te bu değer yalnızca  $613.2 \pm 28.9$  mg/L'dir. pH 6.3'te elde edilen vanilin miktarı ile diğer deneme üniteleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). Ayrıca asitliğin azalması ile kullanılan izoöjenol miktarında bir düşüş meydana gelmiş; dolayısıyla vanilin üretimi de azalış göstermiştir. Ancak tüketilen izoöjenol miktarları arasındaki fark önemli seviyede bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). pH 5.3, 6.3, 7.3 ve 8.3'te elde edilen molar verimler sırasıyla %22.4, %25.1, %21.2 ve %21.4 olarak

hesaplanmıştır. pH'daki değişim enzim ve substratın iyonik durumlarını etkilemekte ve buna bağlı olarak hücrede gerçekleşen biyokimyasal süreçler de etkilenmektedir (Yan vd., 2016). Ortam pH'sının 6.3'ün altına düşürülmesiyle birlikte molar verimin azalması da yine aynı sebeptendir. Ayrıca başlangıç pH'sından bağımsız olarak biyodönüşüm ortamlarının 120 saat sonunda ulaştıkları son pH değerlerinin pH 6.3-7.3 arasında seyrettiği görülmüştür. Bu duruma inkübasyon boyunca başta vanilin olmak üzere ortama bırakılan hücresel metabolitlerin sebep olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2. Biyodönüşüm ortamının başlangıç pH'sına bağlı olarak gerçekleşen vanilin üretimleri (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 2. Vanillin production affected by initial pH value of bioconversion medium (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoeugenol in medium)

### Havalandırma Koşullarının Vanilin Üretimine Etkisi

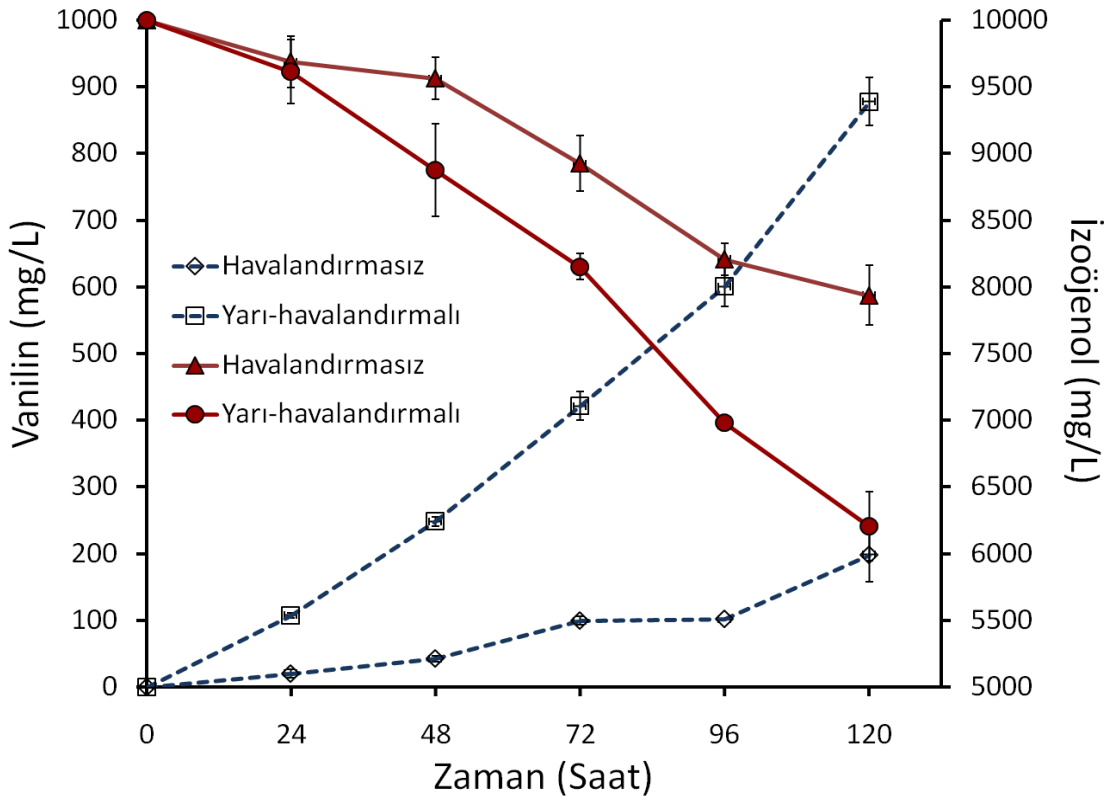
İstenmeyen koşulların ortaya çıkmasıyla mikroorganizmalar yüksek enerji girdili biyosentez mekanizmalarını devreye sokarlar.

Hücrede, besin eksikliği gibi pek çok stres faktöründen sakınmak için sekonder metabolitlerin üretimi başlatılır (Magan ve Aldred, 2007). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin aerobik koşullara fazlasıyla bağımlı olduğu bilinen bir

gerçekdir (Molina vd., 2013). Bicas vd. (2010) durağan fazdaki *P. fluorescens* hücrelerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada ayçiçek yağı kullanarak biyodönüşüm yüzeyinin atmosferik hava ile temasını kesmiştir. Oksidatif stres, limonenden  $\alpha$ -terpineol üretiminde önemli düzeyde bir artışa sebep olmuş ve literatürdeki en yüksek üretim değerine ulaşılmıştır.

Bu çalışmada biyodönüşüm ortam atmosferi azot gazı ile doldurularak kültürün yalnızca sıvı besi ortamındaki çözülmüş oksijenden faydalanması

sağlanmıştır. Oksijen miktarının kısıtlanmasıyla izoöjenol tüketiminde dikkate değer bir azalma görülmüştür. Yarı havalandırma koşullarında izoöjenol tüketimi  $3764.6 \pm 256$  mg/L iken havalandırmanın kesildiği koşullarda bu miktar  $2062.0 \pm 225$  mg/L olarak kalmıştır. Buna paralel olarak vanilin üretiminde de keskin bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 3). 120 saat sonunda üretilen vanilin miktarı yalnızca  $198.7 \pm 28.7$  mg/L olarak bulunmuştur. Daha önce yarı havalandırma koşullarında %25.1 olarak kaydedilen molar verim havalandırmasız koşullarda %10.6'ya gerilemiştir.



Şekil 3. Havalandırma koşullarının vanilin üretimine etkisi (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 3. Effect of aeration conditions on vanillin production (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoegenol in medium)

Daha önceki çalışmalarda çözülmüş oksijen konsantrasyonunun bakteri gelişimi ve substrat tüketim oranı üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Şeker vd., 1997). Aerobik proseslerde oksijen miktarı transkripsiyon ve enzim sentez süreçlerini etkilemektedir. Dolayısıyla ortamdaki oksijen miktarına bağlı

olarak hücre metabolizması ve üretkenliğinde de farklılıklar meydana gelebilmektedir (Yan vd., 2016). *P. putida* kültürü oksijene bağımlı olduğundan anaerobik koşullarda izoöjenolden vanilin oluşturmadığı belirtilmiştir (Furukawa vd., 2003). Literatürde oksijen miktarının kısıtlandığı durumlarda vanilin üretimine ilişkin yeterli bilgi



bulunmamaktadır. Araştırma sonuçları, biyodönüşüm ortamının hava ile teması kesildiğinde vanilin üretiminin çarpıcı biçimde düştüğünü ortaya koymuştur. *P. putida*'nın kullanıldığı vanilin biyodönüşüm çalışmalarında etkin bir üretim için normal atmosfer koşullarının sağlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## SONUÇ

Aroma pazarında ihtiyaç duyulan doğal vanilin üretimi için son yıllarda alternatif yöntem arayışları devam etmektedir. Bu çalışmada, *P. putida* ile biyodönüşüm yoluyla izoöjenolden vanilin üretimi gerçekleştirilmiş ve molar verim üzerine sıcaklık, başlangıç pH'sı ve havalandırma koşullarının etkisi incelenmiştir. Üretilen vanilin doğal bir öncül madde olan izoöjenolden mikrobiyal dönüşüm ile elde edildiği için Avrupa Birliği mevzuatları açısından da 'doğal aroma maddesi' kapsamında değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek vanilin üretimi 28°C'de, 6.3 başlangıç ortam pH'sında ve yarı havalandırma koşullarında gerçekleşmiştir. 120 saatlik biyodönüşümün ardından %25.1 molar verimle 877.9 mg/L vanilin elde edilmiştir. Çalışmanın endüstriyel uygulamalar için kayda değer sonuçlar ortaya koyduğu ve yapılacak ileri optimizasyon çalışmaları ile vanilin miktar ve veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir. Yüzey yanıt yöntemi ile farklı değişkenler arası etkileşim incelenerek üretim veriminin daha yüksek bir seviyeye çıkarılabileceği öngörülmektedir. Biyodönüşüm süresinin uzatılması, izoöjenol konsantrasyonu ve çalkalama hızının arttırılarak disperse olan substrat miktarının yükseltilmesi de üzerinde durulması gereken başlıca konulardır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2015-17) ve mikroorganizma kültürünü sağlayan HUT Kültür Koleksiyonu'na teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J*

*Ethnopharmacol*, 116: 403-406, doi: 10.1016/j.jep.2007.12.003.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Amini, J. (2013). Application of Taguchi design and response surface methodology for improving conversion of isoeugenol into vanillin by resting cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. *Iran J Pharm Res*, 12(3): 411-421.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2010). Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. *Biocatal Biotransformation*, 28(5-6): 339-347, doi: 10.3109/10242422.2010.530660.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2011). Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. *Iran J Pharm Res*, 10(4): 749-757.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2012). Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Appl Biochem Biotechnol*, 166: 1-12, doi: 10.1007/s12010-011-9397-6.

Banerjee, G., Chattopadhyay, P. (2019). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *J Sci Food Agric*, 99: 499-506, doi: 10.1002/jsfa.9303.

Bicas, J.L., Fontanille, P., Pastore, G.M., Larroche, C. (2010). A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)-a-terpineol from R-(+)-limonene. *Process Biochem*, 45: 481-486, doi: 10.1016/j.procbio.2009.11.007.

Fache, M., Boutevin, B., Caillol, S. (2016). Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS Sustain Chem Eng*, 4: 35-46, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01344.

Funk, C., Rainie, L., Page, D. (2015). Public and scientists' views on science and society. [www.pewinternet.org/wp-content/uploads/sites/9/2015/01/PI\\_ScienceandSociety\\_Report\\_012915.pdf](http://www.pewinternet.org/wp-content/uploads/sites/9/2015/01/PI_ScienceandSociety_Report_012915.pdf) (Accessed 24 June 2019).

Furukawa, H., Morita, H., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2003). Conversion of isoeugenol into vanillic

- acid by *Pseudomonas putida* 158 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. *J Biosci Bioeng*, 96(4): 401-403, doi: 10.1016/S1389-1723(03)90145-9.
- Gallage, N.J., Moller, B.L. (2018). Vanilla: the most popular flavor. In: *Biotechnology of Natural Products*, Schwab, W., Lange, B.M., Wüst, M. (editors). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 3-24, doi: 10.1007/978-3-319-67903-7.
- Gonzalez, C.G., Mustafa, N.R., Wilson, E.G., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the 'green' extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour Fragr J*, 33: 91-96, doi: 10.1002/ffj.3425.
- Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B., Xu, P. (2007). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites. *J Biotechnol*, 130: 463-470, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.003.
- Julsing, M.K., Kuhn, D., Schmid, A., Bühler, B. (2012). Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnol Bioeng*, 109(5): 1109-1119, doi: 10.1002/bit.24404.
- Kasana, R.C., Sharma, U.K., Sharma, N., Sinha, A.K. (2007). Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Curr Microbiol*, 54: 457-461, doi: 10.1007/s00284-006-0627-z.
- Li, Y.H., Sun, Z.H., Zheng, P. (2004). Determination of vanillin, eugenol and isoeugenol by RP-HPLC. *Chromatographia*, 60: 709-713, doi: 10.1365/s10337-004-0440-4.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins? In: *Food Mycology: a multifaceted approach to fungi and food*, Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (editors), Volume 25, CRC Press, the USA, pp. 121-133.
- Marquez-Medina, M.D., Prinsen, P., Li, H., Shih, K., Romero, A.A., Luque, R. (2018). Continuous-flow synthesis of supported magnetic iron oxide nanoparticles for efficient isoeugenol conversion into vanillin. *ChemSusChem*, 11: 389-396, doi: 10.1002/cssc.201701884.
- Molina, G., Pimentel, M.R., Pastore, G.M. (2013). *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 1851-1864, doi: 10.1007/s00253-013-4701-8.
- Ostovar, S., Franco, A., Puente-Santiago, A.R., Pinilla-de Dios, M., Rodriguez-Padron, D., Shaterian, H.R., Luque, R. (2018). Efficient mechanochemical bifunctional nanocatalysts for the conversion of isoeugenol to vanillin. *Front Chem*, 6:77, doi: 10.3389/fchem.2018.00077.
- Perkins, C., Siddiqui, S., Puri, M., Demain, A.L. (2015). Biotechnological applications of microbial conversions. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6): 1050-1065, doi: 10.3109/07388551.2015.1083943.
- Şeker, Ş., Beyenal, H., Salih, B., Tanyolaç, A. (1997). Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47: 610-614, doi: 10.1007/s002530050982.
- Taira, J., Toyoshima, R., Ameku, N., Iguchi, A., Tamaki, Y. (2018). Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. *AMB Express*, 8: 40, doi: 10.1186/s13568-018-0569-4.
- Vasudevan, S., Bhat, S.V. (2011). Biotransformation of isoeugenol catalyzed by growing cells of *Pseudomonas putida*. *Biocatal Biotransformation*, 29(4): 147-150, doi: 10.3109/10242422.2011.589898.
- Wang, Y., Sun, S., Li, F., Cao, X., Sun, R. (2018). Production of vanillin from lignin: the relationship between  $\beta$ -O-4 linkages and vanillin yield. *Ind Crops Prod*, 116: 116-121, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.043.
- Wangrangsimgul, N., Klinsakul, K., Vangnai, A.S., Wongkongkatep, J., Inprakhon, P., Honda, K., Ohtake, H., Kato, J., Pongtharangkul, T. (2012). Bioproduction of vanillin using an organic solvent-tolerant *Brevibacillus agri* 13. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 555-563, doi: 10.1007/s00253-011-3510-1.
- Wilde, A.S., Frandsen, H.L., Fromberg, A., Smedsgaard, J., Greule, M. (2019). Isotopic characterization of vanillin ex glucose by GC-

- IRMS - new challenge for natural vanilla flavour authentication? *Food Control*, 106: 106735, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106735.
- Wongtanyawat, N., Lusanandana, P., Khwanjaisakun, N., Kongpanna, P., Phromprasit, J., Simasatitkul, L., Amornraksa, S., Assabumrungrat, S. (2018). Comparison of different kraft lignin-based vanillin production processes. *Comput Chem Eng*, 117: 159-170, doi: 10.1016/j.compchemeng.2018.05.020.
- Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2007). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 1025-1030, doi: 10.1007/s00253-006-0569-1.
- Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2008). Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett*, 30: 665-670, doi: 10.1007/s10529-007-9602-4.
- Yan, L., Chen, P., Zhang, S., Li, S., Yan, X., Wang, N., Liang, N., Li, H. (2016). Biotransformation of ferulic acid to vanillin in packed bed-stirred fermentors. *Sci Rep*, 6: 1-12, doi: 10.1038/srep34644.
- Zhang, Y., Xu, P., Han, S., Yan, H., Ma, C. (2006). Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 771-779, doi: 10.1007/s00253-006-0544-x.
- Zhao, L., Xie, Y., Chen, L., Xuefeng, X., Zhao, C.X., Cheng, F. (2018). Efficient biotransformation of isoeugenol to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli* by using engineered isoeugenol monooxygenase and sol-gel chitosan membrane. *Process Biochem*, 71: 76-81, doi: 10.1016/j.procbio.2018.05.013.
- Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., He, J.Y. (2006). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. *Process Biochem*, 41: 1673-1676, doi: 10.1016/j.procbio.2006.02.007.
- Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., Zhu, L.L. (2005). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. *Biotechnol Lett*, 27: 1505-1509, doi: 10.1007/s10529-005-1466-x.