

## **Torulaspota delbrueckii ve Trichoderma atroviride Kullanılarak Pirinadan (Zeytin Katı Atığı) Biyoaroma Üretimi**

Onur Güneşer<sup>1</sup>, Yonca Karagül Yüceer<sup>2</sup>, Sine Özmen Toğay<sup>3</sup>, Müge İşleten Hoşoğlu<sup>2</sup>, Murat Elibol<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Uşak Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 1 Eylül Kampüsü, Uşak

<sup>2</sup>Canakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Terzioğlu Kampüsü, Çanakkale

<sup>3</sup>Istanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 11.11.2014, Kabul Tarihi (Accepted): 25.12.2014

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): yoncayuceer@comu.edu.tr (Y. Karagül Yüceer)

☎ 0 286 218 00 18 / 2272 📠 0 286 218 05 41

### **ÖZET**

Bu çalışmada, *Torulaspota delbrueckii* ve *Trichoderma atroviride* kullanılarak, pirinadan mikrobiyal fermentasyon yoluyla doğal aroma maddelerinin üretilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, *Torulaspota delbrueckii* ve *Trichoderma atroviride* ile %10'luk pirina solüsyonunun hem erlen hem de biyoreaktör düzeyinde 30°C'de 120 saat fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki fermentasyon boyunca mikroorganizmaların pirinadaki gelişimleri incelenmiştir. *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* tarafından üretilen aroma maddelerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi gaz kromatografisi kütle spektrometresi ve gaz kromatografisi-olfaktometre ile yapılmıştır. *T. delbrueckii* ve *T. atroviride*'nin erlen düzeyinde maksimum hücre sayısı artışının sırasıyla 1.49 ve 1.07 log kob/mL olduğu belirlenirken, biyoreaktör düzeyindeki hücre artışları ise 2.23 ve 0.92 log kob/mL düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. 0-120 saat fermentasyon süresinde *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* için spesifik üreme hızları sırasıyla 0.079/saat ve 0.0299/saat olarak hesaplanmıştır. *T. delbrueckii*'nin pirinadan fenil etil alkol (gül) ve mentol (nane), *T. atroviride*'nin ise 1-okten-3-ol (mantar) ve 2-oktenol (yanık, kirli) ürettiği belirlenmiştir. Mikrobiyal fermentasyon sonucunda üretilen fenil etil alkol, mentol, 1-okten-3-ol ve 2-oktenol'un maksimum üretim miktarları sırasıyla 6.69±0.01 µg/kg, 3.50±0.69 µg/kg, 330.75 µg/kg ve 25.65 µg/kg olarak belirlenmiştir. En yüksek verimlilik değerinin 88.81 µg/kg.saat ile 1-okten-3-ol'e ait olduğu tespit edilmiştir. Yapılan duyuusal analizler sonucunda, fermente pirina örneklerinde ıslak bulgur, toprak, ıslak kirli havlu, fermente ve mantar aromalarının yüksek yoğunlukta olduğu belirlenmiştir. Yüksek yoğunlukta algılanan söz konusu bu aromalar, miktarı artan mentol, fenil etil alkol, 1-okten-3-ol ve 2-oktenol ile ilişkilendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Pirina, Biyoaroma, Mikrobiyal fermentasyon, Gaz kromatografisi, Duyusal analiz

### **Production of Bioflavor from Olive Pomace (Olive Mill Waste) by Using *Torulaspota delbrueckii* and *Trichoderma atroviride***

#### **ABSTRACT**

In this study, it was aimed that production of natural flavor compounds from olive pomace via microbial fermentation by using *Torulaspota delbrueckii* and *Trichoderma atroviride*. For this purpose, fermentation of olive pomace solution (10%) by *Torulaspota delbrueckii* and *Trichoderma atroviride* was carried out both shake flask and bioreactor scale at 30°C for 120 hours. Growth of microorganisms in olive pomace was investigated during fermentation at both scales. Identification and quantification of flavor compounds which are produced by *T. delbrueckii* and *T. atroviride* were determined by gas chromatography mass spectrometry and gas chromatography olfactometry. It was found that the maximum cell increases of *T. delbrueckii* and *T. atroviride* were 1.49 log cfu/mL and 1.07 log cfu/mL respectively in shake flasks, while at the bioreactor scale fermentation, the maximum cell increases were determined as 2.23 log cfu/mL and 0.92 log cfu/mL respectively.

cfu/mL and 0.092 log cfu/mL for respectively. Specific growth rate of *T. delbrueckii* and *T. atroviride* were calculated as 0.079/hour and 0.0299/hour, respectively during 120 hour fermentation. It was determined that *T. delbrueckii* produces phenyl ethyl alcohol (rose) and menthol (fresh, mint), *T. atroviride* produces 1-octen-3-ol (mushroom) and 2-octenol (burnt, dirty). The maximum amounts of phenyl ethyl alcohol, menthol, 1-octen-3-ol and 2-octenol produced by microbial fermentation were determined as 6.69±0.01 µg/kg, 3.50±0.69 µg/kg, 330.75 µg/kg and 25.65 µg/kg, respectively. The highest productivity was found as 88.81 µg/ kg.hour for 1-octen-3-ol. Based on the sensory analysis, wet bulgur, earthy, wet towel, fermented and mushroom were determine at higher intensity in fermented olive pomace. These flavors can be associated with phenyl ethyl alcohol, 1-octen-3-ol and 2-octenol.

**Keywords:** Olive pomace, Bioflavor, Microbial fermentation, Gas chromatography, Sensory analysis

## GİRİŞ

Bir gıdanın aroması; hammaddenin doğal yapısından ve o gıdanın işlenmesi ve depolanması sırasında uygulanan işlemlerden kaynaklanabildiği gibi, ilave edilen bazı aroma bileşiklerinden de kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle aroma maddeleri gıda endüstrisinde sık kullanılan gıda katkı maddeleri arasında yer almaktadır [1]. Aroma maddelerinin özellikle kullanıldığı gıda ürünlerini süt ve süt ürünleri, alkolsüz içecekler ve soslar oluşturmaktadır [2-4]. Birçok aroma maddesi, hayvansal (örn: balina yağı, balmumu) ve bitkisel (örn: vanilya bitkisi) kaynaklardan ekstraksiyon, distilasyon veya kimyasal sentez yolları ile elde edilmektedir [5]. Aroma maddelerinin bitkisel ve hayvansal kaynaklardan çok düşük miktarlarda elde edilmesi, hammaddenin çevre koşullarından etkilenmesi ve doğal aroma maddelerinin eldesinde kullanılan ekstraksiyon tekniğinin pahalı olması gibi nedenlerden dolayı piyasada bulunan birçok aroma maddesinin kimyasal sentez yoluyla üretildiği bilinmektedir [1,6]. Kimyasal sentez ile aroma maddelerinin üretimi, daha kolay ve ucuz olması ekonomik açıdan avantajlı görülebilir. Ancak istenmeyen rasemik karışımların veya safsızlıkların oluşması (her iki durumda aroma maddesinin duyuusal kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir), çevreye zararlı üretim proseslerinin var olabilmesi, insanların tükettikleri gıdalarda kimyasal veya sentetik bileşenlerin bulunmasını istememesi (*kemofobi*) kimyasal sentezin dezavantajları olarak önem arz etmektedir. Bu nedenle, söz konusu bu dezavantajlar aroma üreticilerini ve aroma konusunda çalışan bilim insanlarını doğal aroma maddelerinin üretimi için alternatif yollar aramaya yönlendirmiştir [7-9].

Doğal aroma maddelerinin biyoteknolojik yollarla üretimi ile ilgili hem endüstriyel hem de akademik çalışmalar son yıllarda büyük bir ivme kazanmıştır [10]. Biyoteknolojik üretimlerde doğal aroma maddesi üretiminde çoğunlukla tarımsal atıkların hammadde olarak kullanılması ön plana çıkmaktadır. Tarımsal atıkların mikroorganizmalar için zengin bir besiyeri olmaları, üretimler için gerekli olan bazı bileşenleri doğal olarak içermeleri (ferrulik asit, yağ asitleri vd.) ucuz ve kolay temin edilebilmeleri gibi nedenlerle biyoproseslerde kullanılmalrı ekonomik yönden çok daha avantajlı olmaktadır [11]. Yapılan bir çok çalışmada, farklı küf ve maya çeşitleri kullanılarak üzüm küspesi, elma kabuğu, portakal kabuğu, tapyoka küspesi, şeker pancarı küspesi, buğday kepeği, soya fasulyesi küspesi, pirinç kepeği, peynir altı suyu gibi

tarımsal atıklardan biyoteknolojik olarak aroma maddesi üretimi üzerine yoğunlaşmıştır [7, 12-18].

Pirina, Marmara ve Ege bölgelerimizde önemli miktarlarda açığa çıkan tarımsal atıkların başında gelmektedir. Ülkemizde açığa çıkan yıllık pirina miktarı 829.816 ton olup, diğer atıklar için herhangi bir veriye rastlanmamıştır [19, 20]. Pirina, zeytinyağı fabrikalarının bir artığı olup, kalıntı zeytinyağı, su, zeytin çekirdeği ve zeytin pulpundan oluşmaktadır. Zeytin yağı işleme prosesine bağlı olarak 100 kg zeytinden 15-22 kg zeytinyağı, 35-45 kg pirina elde edilmektedir. Pirina ortalama % 6-8 oranında yağ içermektedir [21]. Yıllık açığa çıkan pirina miktarları göz önüne alındığında söz konusu tarımsal atığın doğal aroma maddesi üretiminde hem ucuz hammadde temini açısından hem de üretim tekniğinin kolaylığı açısından değerlendirilmesi mümkün olabilir. Bu çalışmada biyoteknolojik üretimlerde kullanım potansiyeli olan *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* kullanılarak, pirinadan mikrobiyal fermentasyon yoluyla doğal aroma maddesi üretilme potansiyelinin ortaya konması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Pirina ve Saf Kültürler

Çalışmada kullanılan pirina Edremit'te zeytinyağı üretimi yapan işletmelerden temin edilmiştir. Pirina kullanılıncaya kadar -18°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Mikrobiyal kültürler *Torulaspora delbrueckii* NRRL Y-11634 ve *Trichoderma atroviride* NRRL 31396 ARS Culture Collection (NRRL) (Peoria, Illinois, ABD)'dan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler ve mikrobiyal besiyerleri Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma Aldrich (St. Louis, MO, ABD)'den temin edilmiş olup analitik ve/veya kromatografik saflıktadırlar.

### Pirinanın Genel Bileşimi

Çalışmada kullanılan pirinanın pH, nem (%), kül (%), azot (%) ve yağ (%) miktarları AOAC [22]'e göre belirlenmiştir.

### Saf Kültürlerin Çoğaltılması ve Hücre/Spore Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan saf kültürlerden *T. delbrueckii* Malt Dextrose Yeast Agar (MDYA %4) da 30°C'de 72 saat, *T. atroviride* ise Malt Extract Agar (MEA) da 30°C'de, 7 gün

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen agarda gelişen *T. atroviride* sporları ve *T. delbruecki* hücreleri steril % 0.1 (w/v)'lik Tween 20-80 ile yıkanarak steril falkon tüplerine alınmıştır. Daha sonra tüpler 3000g'de 5 dk santrifüj edilerek mikrobiyel pelletler elde edilmiştir. Mikrobiyel pelletler %0.85'lik serum fizyolojik su (SF, %0.85 NaCl) ile yıkanmıştır (2-3 kez). Daha sonra pellet 3000g'de 5 dakika santrifüj edilerek, %0.85 SF ile seyreltilmiştir. Hazırlanan mikrobiyel süspansiyonun Thoma lamı ile mikroskopik sayımı gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikrobiyel süspansiyonların konsantrasyonu  $10^{6-7}$  spor/mL (*T. atroviride* için) veya  $10^{6-7}$  hücre/ mL (*T. delbrueckii* için) düzeyindedir [23, 24].

### Pirinanın Erlen Düzeyinde Fermentasyon İçin Hazırlanması

İşletmelerden alınan ve  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan pirina öncelikle buzdolabı koşullarında çözündürüldükten sonra içerdikleri yabancı maddeler temizlenmiş ve mikron öğütücü kullanılarak öğütülmüştür. Pirinanın %10'luk (w/v distile su) solüsyonu 1 L'lik schott şişede hazırlanmış ve 50 mL'lik kapaklı erlenlere paylaştırılmıştır. Erlenlerdeki solüsyonlar  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika steril edilmiş ve oda sıcaklığına soğutularak kültür ortamlarına önceden hazırlanan mikrobiyel süspansiyondan konsantrasyonu  $10^{6-7}$  hücre veya spor/mL besi ortamı olacak şekilde ayrı ayrı inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. Erlen düzeyinde fermentasyon denemeleri, *T. delbrueckii* için  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat 120 rpm karıştırma hızında, *T. atroviride* için  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 120 saat 120 rpm karıştırma hızında yürütülmüştür

### Pirinanın Biyoreaktör Düzeyinde Fermentasyon İçin Hazırlanması

Pirinanın erlen düzeyinde fermentasyonu sonrasında büyük hacimde üretimlerin denenmesi ve araştırılması amacıyla biyoreaktör koşullarında da üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde 5L'lik kesikli biyoreaktör (Biostat A-plus®, Sartorius, Melsungen, Almanya) 4 L çalışma hacmi ile kullanılmıştır. Pirina solüsyonu erlen düzeyindeki çalışmalarda olduğu gibi %10'luk (w/v distile su) olarak hazırlanmıştır. Biyoreaktör  $121^{\circ}\text{C}$  de 30 dakika steril edilerek üretime hazır hale getirilmiştir. Biyoreaktör üretimleri her iki mikroorganizma için  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 120 rpm karıştırma hızında

120 saat boyunca yürütülmüştür. Tüm üretimler 0.325 vvm'de gerçekleştirilmiştir.

### Mikroorganizmaların Fermentasyon Boyunca Gelişimlerinin İzlenmesi

Pirinda hem erlen düzeyinde hem de biyoreaktör düzeyinde fermentasyon boyunca mikroorganizmaların gelişimleri dökme plak kültürel ekim yöntemleriyle izlenmiştir. Bu amaçla her iki mikroorganizma türü için kullanılan besiyeri Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) dir. Petri kaplarına ekimleri yapılan mikroorganizmaların inkübasyonları saf kültürlerin çoğaltılması için kullanılan inkübasyon sıcaklık ve süreleri ile aynıdır [25]. Kullanılan her bir mikroorganizmanın biyoreaktör koşullarında büyüme davranışı maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu$ ) ve ikilenme süresiyle ( $t_d$ ) ifade edilmiştir. Maksimum üreme hızı ve ikilenme süresi Ray [26]'e göre hesaplanmıştır.

### Uçucu Bileşenlerin Analizi

Pirinda oluşan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonu için katı faz mikroekstraksiyon metodu (SPME) kullanılmıştır [27]. Uçucu bileşenlerin tanımlanması ve miktar belirlenmesinde Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Gaz Kromatografisi-olfaktometre (GCO) kullanılmıştır [25 ve 28].

### Duyusal Analizler

Fermente pirinada meydana gelen aroma değişimlerinin duyuşal olarak belirlenmesi Spectrum® analizi ile gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmeler, deneyimli 7 kişilik panel grubu tarafından yapılmıştır. Panel üyeleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyeleri ve yüksek lisans-doktora öğrencilerinden (4 erkek ve 3 bayan) oluşturulmuş olup yaşları 24-45 arasında değişmektedir. Panelistler tarafından pirinada belirlenen terimlerin yoğunlukları 15 puanlı skala ile değerlendirilmiştir (0=çok düşük, 15= çok yoğun). Fermente ürünler panelistlere 40 mL'lik kapaklı kavanozlarda  $40^{\circ}\text{C}$ 'de sunulmuştur. Fermente atıkların sıcaklıklarının sabit tutulması için kavanozlar ısıtıcı plaka üzerinde tutulmuştur. Panelistlerden atıkların bulunduğu kavanozun tepe boşluğunu koklayarak algıladıkları aroma yoğunluklarını skala üzerine işaretlemeleri istenmiştir [29]. Fermente pirinaların değerlendirilmesi için kullanılan referanslar maddeler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Duyusal değerlendirmelerde kullanılan referanslar

Duyusal Terim	Referans
Ham zeytin	Zeytin ezmesi
Islak Bulgur	Sıcak su ile ıslatılmış ve 10 dakika beklemiş bulgur veya kepek
Yağimsı	Rafine sıvı yağ
Odun/bitki	Yeşil bitki ve talaş parçaları
Tatlı/ransit	10 $\mu\text{L}$ Bütirik asit (%1'lik poli etilen glikolde hazırlanmış)
Toprak	Nemli toprak
Islak kirlı havlu	Nemli kirlı havlu
Fermente	Fermente Turşu
Tatlı aromatik	Bal, vanilin
Metalik, Mantar	1-okten-3-ol

## İstatistiksel Analizler

Çalışmada hem erlen hem de reaktör düzeyindeki fermentasyonlarda 1) uçucu bileşenlerdeki değişimleri ve 2) duyuşal özelliklerdeki değişimleri istatistiksel olarak belirlemek amacıyla tek yönlü (One-way ANOVA) tekniği kullanılmıştır. Varyans analizinin şartlarını yerine getirmeyen veriler (varyansların homojenliği ve normal dağılım) için varyans analizinin parametrik karşılığı olan WELCH testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak önemli olan değişimlerin ortaya konması amacıyla ise TUKEY çoklu karşılaştırma (TUKEY-HSD) testinden yararlanılmıştır [30]. Söz konusu istatistiksel analizler için SPSS for Windows (version 20.0), Minitab (version 16.0) ve MSTAT-C istatistik paket programları kullanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Pirinanın Genel Bileşimi

Pirinanın genel bileşimlerini belirlemek amacıyla yapılan nem (%), kül (%), toplam azot (%) ve yağ (%) tayinleri sonucunda pirinanın pH'sı  $5.43 \pm 0.01$ , nem miktarı  $53.32 \pm 0.04$ , kül miktarı  $1.39 \pm 0.01$ , toplam azot miktarı  $0.38 \pm 0.01$  ve kalıntı yağ miktarı ise  $4.02 \pm 0.34$  olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan pirinanın genel bileşimi yapılan bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir [31-34]. Örneğin; pirinanın genel bileşiminin belirtildiği bir çalışmada [34], zeytinyağı üretiminde kullanılan iki veya üç fazlı sıkma sistemine göre pirinanın kimyasal

kompozisyonunun değiştiği belirtilirken, nem miktarının %25-70, kalıntı yağ miktarının da %3-8 arasında olduğu ifade edilmiştir. Benzer şekilde, Baeta-Hall ve ark., [31] pirinanın nem miktarının ortalama %58-67, kül miktarının %2-3.4, yağ miktarının %0.98-8.12, toplam azot miktarının kurumadde de %0.95-1.17 arasında değiştiğini bulmuşlardır.

### *T. delbrueckii* ve *T. atroviride*'nin Pirinadaki Mikrobiyal Gelişimlerinin İncelenmesi

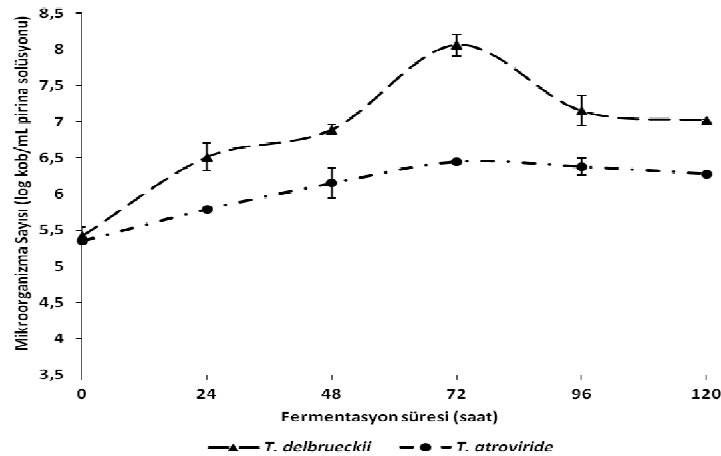
Pirinada *T. delbrueckii* ve *T. atroviride*'nin erlen düzeyinde gelişimleri Tablo 2'de verilmiştir. Fermentasyon boyunca pirinada *T. delbrueckii*'nin hücre sayısında maksimum 1.49 log kob/mL'lük, *T. atroviride*'nin hücre sayısında ise maksimum 1.07 log kob/mL'lük bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca *T. delbrueckii*'nin mikrobiyal gelişiminin fermentasyon süresince devam ettiği belirlenirken, *T. atroviride*'nin mikrobiyal gelişiminin 72 saat boyunca devam ettiği bu süre sonunda ise durağan faza geçtiği tespit edilmiştir (Tablo 2).

*T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile biyoreaktör düzeyinde gerçekleştirilen fermentasyonda gözlemlenen mikrobiyal gelişimler Şekil 1'de gösterilmiştir. Hem *T. delbrueckii*'nin hem de *T. atroviride*'nin pirinada biyoreaktör ortamında hücre sayısı artışının 72 saat fermentasyon boyunca hızlı bir şekilde arttığı, bu süre sonunda her iki mikroorganizmanın hücre sayısında azalmanın meydana geldiği ve gelişimlerinin durağan faza geçtiği görülmektedir.

Tablo 2. Pirinada *T. delbrueckii* ve *T. atroviride*'nin erlen düzeyinde gelişimleri

Fermentasyon süresi (saat)	Ortalama Hücre Sayısı $\pm$ SH (log kob/mL pirina solüsyonu)	
	<i>T. delbrueckii</i>	<i>T. atroviride</i>
0	$5.15 \pm 0.01$	$6.62 \pm 0.04$
24	$6.22 \pm 0.04$	$6.38 \pm 0.08$
48	$6.25 \pm 0.01$	$6.47 \pm 0.01$
72	$6.64 \pm 0.04$	$7.69 \pm 0.01$
120	-	$7.30 \pm 0.29$

SH: standart hata, -Mikrobiyal sayım alınmamıştır.



Şekil 1. Pirinada biyoreaktör koşullarında *T. delbrueckii* ve *T. atroviride*'nin gelişimleri

Biyoreaktör ortamında, *T. delbrueckii*'nin maksimum hücre sayısı artışının 2.23 log kob/mL düzeyinde, *T. atroviride*'nin hücre sayısı artışının ise 0.92 log kob/mL düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Her iki mikroorganizmanın mikrobiyal üreme kinetiği, spesifik üreme hızı ( $\mu$ ) ve ikilenme süresi ( $t_d$ ) açısından incelendiğinde, 0-120 saat fermentasyon süresince *T. delbrueckii* için  $\mu$  değeri 0.079/saat, ikilenme süresi ( $t_d$ ) 8.76 saat; *T. atroviride* için  $\mu$  değeri 0.0299/saat,  $t_d$  değeri ise 23.17 saat olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda *T. delbrueckii*'nin için tespit ettiğimiz maksimum hücre sayısı artışının yapılan diğer çalışmalarda saptanan değerlerle uyumlu olduğu ancak spesifik üreme hızının ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. *T. atroviride* için belirlenen maksimum hücre sayısı ve spesifik üreme hızının ise *Trichoderma* türleri için belirlenen maksimum hücre sayısı ve spesifik üreme değerleri ile genel olarak uyumlu olduğu saptanmıştır [35-37]. Örneğin, şarap fermentasyonu için *S. cerevisiae* ve *T. delbrueckii* karışık maya kültürü kullanımının araştırıldığı diğer bir çalışmada [38], 25 °C ve 120 rpm karıştırma hızında modifiye YPD (Yeast Pepton Dextrose) sıvı besiyerinde hücre sayısı artışının *T. delbrueckii* için 2-2.5 log kob/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Alves-Araujo ve ark., [35] yaptıkları bir çalışmada glikoz, sakkaroz ve maltoz gibi farklı şeker türlerini içeren YP sıvı besiyerlerinde, 160 rpm karıştırma hızında ve 30°C'de gerçekleştirilen inkübasyon koşullarında *T. delbrueckii*'nin spesifik üreme hızını sırasıyla 0.56/ saat., 0.59/saat ve 0.48/saat olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde yapılan diğer bir çalışmada ev yapımı mısır ve pirinç ekmeği hamurundan izole edilmiş farklı *T. delbrueckii* suşlarının YPS (Yeast Pepton Sucrose) sıvı besiyerinde spesifik üreme hızının 0.53/saat ile 0.62/saat arasında değiştiği belirlenmiştir [39]. Buna karşın, yapılan diğer bir çalışmada [36] ise aneareobik koşullarda Tween 80, Ergosterol ve kompleks mineral içeren sentetik besiyerinde 25°C'de *T. delbrueckii* CBS 1146 için maksimum spesifik üreme hızının 0.03/saat olduğu bildirilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, şeker pancarı küspesi ve pirinç atığında geliştirilen *Trichoderma reesei* için spesifik üreme hızı sırasıyla 0.120/saat ve 0.100/saat olarak belirlenmiştir [40]. Felse ve Panda [37] kitinden *Trichoderma harzanium* ile kitinaz üretimini inceledikleri bir çalışmada, söz konusu mikroorganizma için spesifik büyüme hızının fermentasyon ortamının karıştırılma hızına bağlı olarak 0.02/saat ile 0.05/saat arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

### ***T. delbrueckii* ve *T. atroviride* Tarafından Pirinada Üretilen Aroma Maddeleri**

Çalışmada erlen düzeyinde *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile fermente edilmiş pirinada belirlenen aroma aktif bileşenler Tablo 3'te sunulmuştur. Genel olarak, pirinada yoğunlukları yüksek aroma aktif bileşenler; izovalerik asit (ekşi, meyvemsi), stiren (kirli), o-kresol (ıslak kirli havlu), guaiakol (yanık şeker), (E), 2-nonenal (saman), (E,Z)-2,6-nonadienol (saman), 2,4 nonedienal

(kızarmış yağ), (E,E)-2,4-decadienal (yanık, kızarmış yağ), bilinmeyen 1 (kirli, asit) ve bilinmeyen 2 (metallik), olarak belirlenmiştir.

*T. delbrueckii* ile fermente edilmiş pirina örneklerinde sadece iki aroma aktif bileşenin yoğunluğunun kontrol grubu pirina örneklerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu bu aroma aktif bileşenler fenil etil alkol ve mentoldür. Kontrol grubu (kontrol 1) örneklerinde belirlenen diğer aroma maddelerinin yoğunluklarının *T. delbrueckii* ile fermente olmuş pirina örneklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *T. atroviride* ile fermente edilmiş pirina örneklerinde ise sadece bir adet aroma aktif bileşenin yoğunluğu kontrol grubu pirina örneklerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yoğunluğu artan bu aroma maddesi 1-okten-3-ol (mantar) olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan kontrol grubunda (kontrol 2) yüksek yoğunlukta belirlenen diasetil (tereyağı), pentanon (yağ benzeri), bilinmeyen 1 (kirli asit), izovalerik asit (kirli asit), metiyonal (haşlanmış patates), o-kresol (ıslak kirli havlu), fenil etil alkol (gül), karveol (nane) ve (E,E)-2-4-dekadienal fermente örneklerde tespit edilememiştir (Tablo 3).

Erlen düzeyinde *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile fermente olmuş pirinada belirlenen aroma bileşenlerinden miktarı artanlar Tablo 4'te gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda fenil etil alkol ve mentol miktarları açısından kontrol grubu pirina örnekleri ile *T. delbrueckii* ile fermente olmuş pirina örnekleri arasında önemli fark olduğu bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Buna göre, her iki aroma maddesinin miktarının fermente edilmiş pirina örneklerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Fenil etil alkol ve mentolün fermente olmuş pirina örneklerinde yüksek olması, *T. delbrueckii*'nin pirinada bu iki aroma maddesini ürettiğini göstermektedir. Nitekim, yapılan GCO analizleriyle de her iki aroma maddesinin yoğunluğunun fermentasyon sonucunda arttığı tespit edilmiştir. *T. atroviride* ile fermente olmuş pirina örneklerinde belirlenmemesine rağmen 2-oktenol'un (yanmış, kirli) miktarının fermentasyon süresince arttığı GC-MS analizi ile belirlenmiştir. Diğer taraftan hem 1-okten-3-ol hem de 2-oktenol kontrol grubu pirina örneklerinde belirlenmezken, *T. atroviride* ile fermente olmuş örneklerde sırasıyla 330.75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve 25.65  $\mu\text{g}/\text{kg}$  düzeyinde saptanmıştır. Bu durumda, *T. atroviride*'nin pirinada her iki aroma maddesini ürettiğini göstermektedir. 2-oktenol'un GCO analizi ile belirlenmemesine rağmen GC-MS ile belirlenmesi durumu aroma maddesinin eşik değeri ile ilgili olduğu söylenebilir. Çünkü bir aroma maddesinin GCO ile belirlenbilmesi için hem "aroma eşik değeri"nin üzerinde hem de "aroma tanıma eşik değeri"nin üzerine olması gerekmektedir. Bir aromanın "aroma eşik değeri" söz konusu aromanın tepkiye neden olması için gerekli en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanırken, "aroma tanıma eşik değeri" ise o bileşiğin tanınması için gerekli olan en düşük konsantrasyon olarak ifade edilmektedir [41].

**Tablo 3.** *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile femente edilmiş pirinada belirlenen aroma aktif bileşenler

RI*	Aroma	Aroma Tanımı	Belirleme yöntemi	Aroma yoğunluğu (Ortalama±SH)			
				Kontrol	<i>T. delbrueckii</i> <sup>P</sup>	Kontrol	<i>T. atroviride</i> <sup>P</sup>
524	Dimetil sülfid	Sülfür	RI,O	0.25±0.25	0.25±0.25	T.E	T.E
598	Diasetil	Tereyağı	RI,O	2.0±0.01	T.E	2.75±0.25	T.E
734	Pentanon	Yağ benzeri	RI,MS,O	T.E	T.E	1.0±0.10	T.E
802	Hekzenal	Çimen	RI,MS,O	0.5±0.50	0.25±	2.75±0.25	1.25±0.75
856	Bilinmeyen 1	Kirli, asit	RI,O	4.25±0.25	3.75±0.75	3.75±0.75	T.E
862	Izovalerik asit	Ekşi,meyvemsi	RI,O	3.75±3.75	4.0±1.0	3.0±0.10	T.E
869	Stiren	Asit, kirli	RI,MS,O	5.25±2.25	4.75±0.75	T.E	T.E
898	Metiyonal	Haşlanmış patates	RI,O	1.0±0.01	T.E	3.5±0.50	3.75±1.75
928	2-asetil-1-pirolin	Patlamış mısır	RI,O	T.E	T.E	0.50±0.50	2.0±0.10
975	Bilinmeyen 1	Metalik	RI,MS,O	5.75±0.75	4.0±1.0	8.0±0.50	8.5±0.50
984	1-okten-3-ol	Mantar	RI,MS,O	T.E	T.E	T.E	10.5±0.50
999	Hekzil asetat	Kolonya	RI,O	2.50±0.50	1.0±1.0	4.0±0.10	1.5±1.50
1040	Limonen	Sitrus, ferah	RI,MS,O	1.0±0.10	T.E	1.0±0.10	T.E
1050	Benzenasetaldehit	Pudra/gül	RI,MS,O	3.0±0.01	0.9±0.10	3.75±1.25	3.5±1.50
1058	Bilinmeyen 1	Yağ	RI,O	2.50±0.50	2.50±2.50	2.50±0.50	2.0±2.0
1077	o-kresol	Kirli ıslak havlu	RI,MS,O	3.0±0.01	3.5±0.50	3.50±0.50	T.E
1095	Guaiakol	Yanık şeker	RI,MS,O	2.75±0.25	3.0±0.01	6.0±0.10	6.5±0.10
1120	Bilinmeyen 2	Ekşi	RI,O	T.E	T.E	1.25±1.25	2.0±1.0
1144	Fenil etil alkol	Gül	RI,MS,O	2.0±0.01	4.50±0.50	6.0±0.10	T.E
1157	(Z)-2-nonenal	Salatalık	RI,MS,O	1.50±0.50	T.E	6.0±0.10	4.0±0.50
1158	(E,Z)-2,6-nonadienol	Saman	RI,O	4.50±0.50	3.0±1.0	6.0±0.10	4.5±0.50
1191	Karveol	Nane	RI,MS,O	T.E	T.E	3.5±0.10	T.E
1186	Naftalin	Katran	RI,MS,O	1.0±0.01	T.E	1.5±0.50	0.5±0.50
1190	Mentol	Nane	RI,MS,O	T.E	2.0±0.01	T.E	T.E
1216	2,4-nonadienol	Kızamış yağ	RI,MS,O	4.50±0.50	1.0±0.01	4.0±0.01	2.0±0.10
1250	Karveon	Lakton/tatlı	RI,O	2.50±0.50	3.0±0.01	2.5±0.50	2.0±0.10
1268	Geraniol	Tatlı	RI,O	1.75±0.25	1.5±0.01	2.5±0.50	1.0±0.10
1322	(E,E)-2,4-dekadienol	Yanık kızarmış yağ	RI,MS,O	4.50±0.50	1.50±0.50	4.75±0.25	T.E
1372	α-kubeben	Tatlı	RI,MS,O	1.0±0.01	1.5±0.01	1.40±0.60	2.0±0.10
1382	Bilinmeyen 3	Sülfür	RI,O	1.75±0.25	T.E	T.E	T.E

\*RI: Alikonma indeksi HP-5 MS kolonda hesaplanmıştır. <sup>P</sup>120 saat fermentasyon sonunda belirlenen aroma yoğunluğu, SH: standart hata, T.E: Tespit edilmedi, MS:kütle spektrometresi, O: Koku,

**Tablo 4.** *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile femente edilmiş pirinada GC-MS ile belirlenen bazı aroma maddeleri

Aroma Maddesi	Aroma Tanımı	Ortalama Miktar±SH (µg/kg pirina solüsyonu) <sup>a</sup>	
		Kontrol	<i>T. delbrueckii</i>
Fenil etil alkol	Gül	0.29±0.06 <sup>B</sup>	6.69±0.01 <sup>A</sup>
Mentol	Nane	0.13±0.01 <sup>B</sup>	3.50±0.69 <sup>A</sup>
			<i>T. atroviride</i>
1-okten-3-ol	Mantar	T.E	330.75±22.54
2-oktenol	Yanmış kirli	T.E	25.65±0.96

<sup>a</sup>72 saat fermentasyon sonunda belirlenen aroma maddelerinin oransal bolluğu, <sup>b</sup>120 saat fermentasyon sonunda belirlenen aroma maddelerinin oransal bolluğu, T.E: tespit edilemedi. SH: standart hata

Hacim artırım amacıyla yapılan çalışmalarda erlen düzeyinde üretimi gerçekleştirilen aroma maddelerinin biyoreaktör düzeyindeki değişimleri Tablo 5'de verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda her

mikroorganizma tarafından üretilen aroma maddelerinin miktarlarının fermentasyon süresine bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir (P<0.05).

**Tablo 5.** Biyoreaktör koşullarında *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile femente edilmiş pirinada GC-MS ile belirlenen bazı aroma maddeleri

Aroma Maddesi	Aroma Tanımı	Ortalama miktar±SH (µg/kg pirina solüsyonu) <sup>a</sup>						Verimlilik <sup>b</sup> Ortalama±S.H
		<i>T. delbrueckii</i> ile fermentasyon süresi (saat)						
		0	24	48	72	96	120	
Fenil etil alkol	Çiçek, Gül	4.48±0.29 <sup>B</sup>	19.83±1.32 <sup>AB</sup>	21.76±4.80 <sup>AB</sup>	27.35±1.83 <sup>AB</sup>	29.63±1.73 <sup>A</sup>	27.91±1.27 <sup>AB</sup>	0.30±0.01
Mentol	Nane	2.59±0.12 <sup>C</sup>	2.80±0.24 <sup>C</sup>	4.67±0.22 <sup>BC</sup>	8.18±0.89 <sup>A</sup>	5.95±0.25 <sup>AB</sup>	6.0±0.12 <sup>AB</sup>	0.11±0.01
		<i>T. atroviride</i> ile fermentasyon süresi (saat)						
		0	24	48	72	96	120	Verimlilik <sup>b</sup> Ortalama±SH
1-okten-3-ol	Mantar	T.E	80.84±6.47 <sup>D</sup>	423.10±15.06 <sup>A</sup>	308.03±5.55 <sup>CD</sup>	358.45±1.37 <sup>AB</sup>	333.40±2.49 <sup>BC</sup>	8.81±0.31
2-oktenol	Yanık, kirli	T.E	4.33±0.42 <sup>C</sup>	42.45±0.33 <sup>A</sup>	30.57±1.10 <sup>BC</sup>	37.95±1.31 <sup>AB</sup>	30.76±1.79 <sup>BC</sup>	0.88±0.01

<sup>A-D</sup>Fermentasyon süresince farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05). <sup>a</sup>120 saat fermentasyon boyunca belirlenen aroma maddelerinin oransal bolluğu, <sup>b</sup>Aroma maddesinin maksimum miktarının belirlendiği fermentasyon süresine göre hesaplanmış olup birimi µg/kg pirina solüsyonu.saat'dir, T.E: tespit edilemedi. SH: standart hata

*T. delbrueckii* tarafından pirinda üretilen aroma maddelerinin biyoreaktör düzeyindeki değişimleri incelendiğinde, fenil etil alkolün 72 saat fermentasyon süresince mikrobiyal üretiminin olduğu ve bu fermentasyon süresinden sonra miktarında önemli bir değişimin olmadığı bulunmuştur. Kültür ortamında üretilen mentolün ise 72 saat fermentasyon süresince üretildiği ve bu fermentasyon süresinden sonra miktarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ( $P \leq 0.05$ , Tablo 5). *T. atroviride* tarafından pirinada üretilen aroma maddelerinin biyoreaktör düzeyinde değişimi incelendiğinde (Tablo 5), hem 1-okten-3-ol'ün hem de 2-oktenol'un kültür ortamındaki miktarlarının 48 saat fermentasyon süresince arttığı belirlenmiştir. 48 saat fermentasyon süresinden sonra her iki aroma maddesinin miktarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ( $P \leq 0.05$ ). Biyoreaktör ortamında hem *T. delbrueckii* and hemde *T. atroviride* tarafından üretilen aroma maddelerinin konsantrasyonlarının belli bir fermentasyon süresi sonunda azalmasının, havalandırılmalı biyoreaktör ortamlarında üretilen uçucu maddelerin kültür ortamından kaçmasından kaynaklandığı (stripping effect) düşünülmektedir. Bu nedenle bu tür sistemlerde ileri kinetik modellerle üretimlerin gerçekleştirilmesi yapılmaktadır [18].

Bir aroma maddesinin verimlilik değeri esas olarak, aroma maddesinin maksimum değerinde olduğu fermentasyon süresi baz alınarak birim kültür ortamında birim saatte üretilen miktarını ifade etmektedir. Buna göre, *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* tarafından üretilen aroma maddelerinin verimlilik değerleri incelendiğinde (Tablo 5) en yüksek verimlilik değerine 1-okten-3-ol (88.81  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{saat}$ )'un sahip olduğu görülmektedir. Bu durum 1-okten-3-ol'un pirinada *T. atroviride* fermentasyonu ile belirlenen diğer aroma maddelerin daha hızlı ve daha yüksek miktarda üretildiğini göstermektedir. Ayrıca, *T. delbrueckii* fermentasyonunda ise fenil etil alkolün verimlilik değerinin mentolün verimlilik değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

*T. delbrueckii* ve *T. atroviride* kullanılarak doğrudan tarımsal atıklardan aroma maddesi üretiminin incelendiği çalışmalara literatürde rastlanmamasına rağmen, her iki mikroorganizma türünün aroma üretiminin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur [42-44]. Bununla birlikte bitkisel materyallerde bulunan monoterpenoid türevli bileşikler *T. delbrueckii* tarafından mikrobiyal oksidasyona uğratılarak farklı özellikte aroma maddelerinin üretildiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *T. delbrueckii*'nin nerol (çiçek, tatlı) ve linalool (sitrus)'u biyotransformasyona uğratarak  $\alpha$ -terpineol (çiçek, sitrus) ürettiği, yine nerol'den geraniol (çiçek, gül) üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir [43].

*Trichoderma* türüne ait olan *T. viride* ve *T. harzianum* suşlarının hindistan cevizi aroması veren 6-pentil-piron ve şeftali aroması veren  $\gamma$ -dekalakton üretimlerinin olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [45-47]. Bonnarne ve ark., [48] tarafından yapılan çalışmada farklı *Trichoderma* spp. türlerinin %5 oranında hint yağı, fındık yağı, üzüm çekirdeği yağı ve keten tohumu yağlarının ilavesi ile yapılmış sentetik besi ortamında 6-

pentil- $\alpha$ -piron üretimi incelenmiştir. *T. viride* TSP2 suşunun kullanılan tüm yağlarda 6-pentil- $\alpha$ -piron (6-PP) üretimini iyi bir şekilde gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. 6-pentil- $\alpha$ -piron'un üretim miktarının en yüksek miktardan en düşük miktara doğru hint yağı, keten tohumu, üzüm çekirdeği yağı ve fındık yağında olduğu bulunmuştur.

*T. delbrueckii* tarafından üretilen mentol'ün kültür ortamında bulunan çeşitli monoterpenoidleri mikrobiyal oksidasyona uğratarak, fenil etil alkol üretimi ise alkol asetiltransferaz enziminin reaksiyonları veya pirinada bulunan dallanmış amino asitlerin Ehrlich metabolik yoluna (Ehrlich Pathway) girmesiyle üretildiği düşünülmektedir. Nitekim, yapılan çalışmalarda ester türevli bileşiklerin mayalar tarafından üretilen asetil koenzimA ve asetiltransferaz enzimleriyle, alkol türevli bileşiklerin ise Ehrlich metabolik yoluyla dallanmış amino asitlerin transaminasyonu, dekarboksilasyonu, oksidasyonu ve indirgemesi ile biyokimyasal olarak üretildiği bildirilmektedir [49-51]. Pirinanın *T. atroviride* ile fermente edilmesiyle yüksek miktarda oluşan 1-okten-3-ol ve 2-oktenol'unün ise özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu ve/veya enzimatik oksidasyonu ile üretildiği bilinmektedir. Özellikle lipoksigenaz enziminin linoleik asidi okside etmesiyle oluşan bileşiklerin hidroperoksit liyaz ve alkol oksidoredüktaz enzimlerinin parçalanması veya halkalı yapıya getirilmesiyle oluşmaktadır. Ancak, mikrobiyal olarak üretilen ve mantar aroması veren 8 karbonlu bileşiklerin özellikle linoleik asidin lipoksigenaz enzimi yerine heam dioksigenaz enzimi ile oksidasyonu ve daha sonrasında oluşan bileşiklerin 10 hidroksiperoksit enzimi ile parçalanması ile oluştuğu ifade edilmektedir [42,52].

Aroma maddeleri konusunda yapılan çalışmaların birçoğu genel olarak sadece uçucu bileşenlerin saptanmasına yöneliktir. Her aroma maddesinin uçucu olduğu, ancak her uçucu bileşenin aroma olmadığı düşünülürse yapılan aroma çalışmalarının duyu analizlerle de desteklenmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır [29, 53]. *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile fermente edilmiş pirinanın duyu özellikleri sırasıyla 10 ve 12 adet duyu tanımlayıcı terim ile ortaya konmuştur. Fermente pirinalara ait duyu özellikler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Islak bulgur, toprak, kirli havlu kokusu ve fermente aroma bakımından *T. delbrueckii* ile fermente edilmiş pirina örnekleri ve kontrol 1 grubu pirina örnekleri arasında önemli farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Buna göre, panelistler tarafından *T. delbrueckii* ile fermente edilmiş pirina örneklerinde fermente, ıslak kirli havlu ve toprak aromaları kontrol grubu pirina örneklerine göre daha yüksek yoğunlukta algılanmıştır. Islak bulgur aromasının ise kontrol 1 grubu pirina örneklerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *T. atroviride* ile fermente edilmiş pirina örneklerinde ise fermente ve mantar aromaları kontrol örneklerine göre (kontrol 2) daha yüksek yoğunlukta algılanmıştır ( $P \leq 0.05$ ). Duyusal değerlendirme sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, *T. delbrueckii* ile fermente olmuş pirina örneklerinde fermente ve kirli havlu aromaları

üretilen mentol ve fenil etil alkolün üretilmesiyle, benzer şekilde *T. atroviride* ile fermente olmuş pirinada mantar ve fermente aromaların yüksek yoğunlukta algılanması

1-okten-3-ol ve 2-oktenol'un miktarının artmasıyla ilişkilendirilebilir.

Tablo 6. *T. delbrueckii* ve *T. atroviride* ile fermente edilmiş pirinanın duyuşal özellikleri

Aromatik özellik	Duyusal Puan <sup>a</sup> (Ortalama±SH)			
	Kontrol 1 <sup>b</sup>	<i>T. delbrueckii</i>	Kontrol 2 <sup>c</sup>	<i>T. atroviride</i>
Ham Zeytin	1.32±0.20	0.9±0.15	1.05±0.11	2.60±1.40
Islak Bulgur	2.25±0.18 <sup>A</sup>	1.57±0.20 <sup>B</sup>	1.50±0.30	1.40±0.10
Yağmsı	0.50±0.05	0.70±0.0	1.50±0.70	0.80±0.10
Odun/bitki	0.70±0.10	0.70±0.10	1.0±0.04	1.20±0.10
Tatlı/ransit	0.35±0.16	0.60±0.20	0.90±0.03	0.80±0.07
Toprak	0.70±0.15 <sup>B</sup>	1.03±0.05 <sup>A</sup>	0.70±0.15	1.03±0.10
Kirli havlu	0.60±0.10 <sup>B</sup>	1.28±0.25 <sup>A</sup>	0.70±0.15	0.70±0.03
Fermente	0.80±0.40 <sup>B</sup>	2.03±0.20 <sup>A</sup>	0.71±0.28 <sup>B</sup>	2.21±0.15 <sup>A</sup>
Tatlı aromatik	0.80±0.20	1.17±0.20	1.20±0.20	1.75±0.25
Metalik	0.40±0.20	0.40±0.15	0.65±0.0	0.70±0.15
Mantar	TE	TE	0.20±0.20 <sup>B</sup>	1.80±0.10 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Aynı aromatik özellikte farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05). <sup>a</sup>120 saat fermentasyon sonunda belirlenmiştir, <sup>b</sup>120 saat fermentasyon boyunca *T. delbrueckii* ilave edilmeden inkübe edilen pirina örneği, <sup>c</sup>120 saat fermentasyon boyunca *T. atroviride* ilave edilmeden inkübe edilen pirina örneği, T.E: Tespit edilmedi, SH: standart hata.

## SONUÇ

Yapılan bu çalışmada zeytinyağı endüstrisi atığı olan pirinadan biyoteknolojik yollarla doğal aroma maddelerinin üretimi araştırılmıştır. Sonuç olarak, pirinadan *T. delbrueckii* kullanılarak fenil etil alkol (gül) ve mentol (ferah, nane) üretiminin, *T. atroviride* kullanılarak 1-okten-3-ol (mantar) ve 2-oktenol (yanık, kirli) üretilebileceği belirlenmiştir. Söz konusu aroma maddelerinin, biyoreaktör düzeyindeki maksimum üretim miktarları sırasıyla 6.69±0.01 µg/kg, 3.50±0.69 µg/kg, 330.75 µg/kg 1-okten-3-ol ve 25.65 µg/kg olarak bulunmuştur. Üretilen aroma maddelerinin içersinde en yüksek verimlilik değeri 88.81 µg/kg.saat ile 1-okten-3-ol'e aittir. Fermente pirina örneklerinde ıslak bulgur, toprak, ıslak kirli havlu, fermente ve mantar aromalarının yüksek yoğunlukta olduğu yapılan duyuşal analizler sonucunda belirlenmiştir. Yüksek yoğunlukta algılanan söz konusu bu aromaların fermentasyon boyunca üretilen mentol, fenil etil alkol, 1-okten-3-ol ve 2-oktenol'un artan miktarları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İleride, spesifik mikroorganizma türleri seçilerek tarımsal atıklardan belirli aroma maddelerinin elde edilmesi ve üretim metodlarının optimize edilmesi üzerine biyoteknolojik çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Hazırlanan bu çalışma, TÜBİTAK-COST (Proje No:110O903) İkili İşbirlikleri tarafından "COST FA0907-Yeast Flavour Production-New Biocatalysts and Novel Molecular Mechanisms (Bioflavor) Action" kapsamında desteklenmiştir. Çalışmaya maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve duyuşal analizlere katılan panel üyelerine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Cabaroğlu, T., Yılmaztekin, T., 2010. Aroma Biyoteknolojisi. In: Gıda Biyoteknolojisi, Edited by Necla A., Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd.Şti., Ankara, s: 375-390.
- [2] Anonim, 2013. An Overview of the Global Flavours and Fragrances Market, 6th Edition, IAL Consultant Market Report, <http://www.ialconsultants.com/website/press2009.a> sp. Erişim tarihi: 10/02/2013.
- [3] Anonim, 2012. <http://www.leffingwell.com/chirality/limonene.htm>, Erişim tarihi: 10/05 2012.
- [4] Ziegel, H., 2007. A dynamic business with taste-the flavour industry. In: Flavourings: Production, Composition, Applications, Regulations, Edited by Ziegler, H., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Almanya, p:1-15.
- [5] Vandamme, E.J., Soetaer, W., 2002. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal Chemical Technology and Biotechnology* 77:1323-1332.
- [6] Gounaris, Y., 2010. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile Isolates. a review. *Flavour and Fragrance Journal* 25:367-386.
- [7] Dastager, G.S., 2009. Aroma Compounds, In: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Edited by Singh nee Nigam, P., Pandey, A., A. Springer Science +Business Media, p.105-127.
- [8] Longo, M.A., Sanroman, M.A., 2006. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology* 44 (3): 335-353.
- [9] Reineccius, G., 1994. The flavor chemistry, In: Source Book of Flavors. Edited by Reineccius, G., Aspen Publisher, Maryland, ABD, p: 61-115.



- [10] Xu, P., Hua, D., Ma, C., 2007. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology* 25: 571-576.
- [11] Vandamme, E.J., 2009. Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products. In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Edited by Singh nee Nigam, P., Pandey, A., A. Springer Science +Business Media, p. 3-13.
- [12] Araujo, A.A., Pastore, M.G., Berger, G.R., 2002. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98: 747-751.
- [13] Besson, I., Creuly, C., Gros, J.B., Larroche, C., 1997. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid state fermentation on soybeans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47:489-495.
- [14] Christen, P., Meza, J.C., Revah, S., 1997. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: Influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycological Research* 101(8): 911-919.
- [15] Lalou, S., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Bugarski, B., Levic, S., Nedovic, V., 2013. Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(21):9397-9407.
- [16] Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
- [17] Rossi, S.C., Vandenberghe, L.P.S., Pereira, B.M.P., Gago, F.D., Rizzolo, J.A., Pandey, A., Soccol, C.R., Medeiros, A.B.P., 2009. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International* 42: 484-486.
- [18] Urit, T., Loser, C., Wunderlich, M., Bley, T., 2011. Formation of ethyl Acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioprocess and Biosystem Engineering* 34:547-559.
- [19] Başçetinçelik, A., Öztürk, H.H., Karaca, C., 2009. Türkiye'de tarımsal biyokütleden enerji üretimi olanakları. *Tesisat Mühendisliği* 109, 7-13.
- [20] Elibol, M., Yaşa, I., Karaçancı, S., Özsoy, G., 2008. Zeytinyağı işletmelerin katı (pirina) ve sıvı (karasu) atıklardan mikrobiyal lipaz üretimi. TÜBİTAK projesi no:106M464, Ankara-Turkey.
- [21] Nas S., Gökalp H.Y., Ünsal M., 2001. *Bitkisel Yağ Teknolojisi*, Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik-Fakültesi, Ders Kitapları Yayın No: 005 Denizli. s: 329.
- [22] AOAC 2000. International Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn. AOAC International, Gaithersburg.
- [23] Atlas, M.R., 2004. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, USA.
- [24] Temiz, A., 2008. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, s: 291.
- [25] Güneşer, O., 2014. Tarımsal atıklardan biyoaroma üretimi ve optimizasyonu, Çanakkale Onsekiz mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora tezi, Çanakkale, 175 syf.
- [26] Ray, B., 2004. Microbial growth characteristics. In: *Fundamental Food Microbiology*. Edited by Ray B., CRC Press, Boca Raton, Florida, p 57-67.
- [27] Pawliszyn, J., 2012. Theory of solid phase microextraction. In: *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Edited by Pawliszyn J., Waltham, Elsevier Inc, MA, USA, p.13-57.
- [28] Avsar, Y.K., Karagül-Yuceer, Y., Drake, M.A., Singh, T.K., Yoon, Y., Cadwallader, K.R., 2004. Characterization of nutty flavor in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 87:1999-2010.
- [29] Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T., 1999. *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Pres, Inc. Boca Raton, FL.p. 448.
- [30] Sheskin, D.J., 2004. *Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. Chapman & Hall/CRC, New York, USA.
- [31] Baeta-Hall, L., Saagua, M.C., Bartolom, M.L., Anselmo, A.M., Rose, M.F., 2005. Biodegradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Biosource Technology* 96(1):69-78.
- [32] Georgieva, T.I., Ahring, K., 2007. Potential of agroindustrial waste from olive oil industry for fuel ethanol production. *Biotechnology Journal* 2(12):1547-1555.
- [33] Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production* 12:603-611.
- [34] Anonim 2003. Impel olive oil project. <http://europa.eu.int/comm/environment/impel>. Erişim tarihi: 02/10/2013.
- [35] Alves-Araujo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, I., Leao, C., Sousa, M.J., 2007. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology* 153: 898-904.
- [36] Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., van Dijken, J.P., 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 56(12):3785-3792.
- [37] Felse, P.A., Panda, T., 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors- the influence of agitator speed. *Biochemical Engineering Journal* 4(2):115-120.
- [38] Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20:331-341.
- [39] Almeida M.J., Pais C., 1996. Leaving ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4401-4404.
- [40] Muthuvelayudham, R., Viruthagiri, T., 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. *African Journal of Biotechnology* 5 (20):1873-1881.

- [41] Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., 2009. Food Chemistry. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- [42] Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D.C., 2006. Eight-carbon volatiles in mushroom and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience* 47: 317-326.
- [43] King, A., Dickinson, J.R., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluveromyces lactis*. *Yeast* 16:499-506.
- [44] Plata, C., Millan Mauricio, J.C. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeast. *Food Microbiology* 20(2):217-224.
- [45] Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castaneda, G., Roussos, S., 2000. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry* 36:103-109.
- [46] Carreon-Serrano, L., Flores, C., Galindo, E., 1997.  $\gamma$ -Decalactone Production by *Trichoderma harzianum* in Stirred Bioreactors. *Biotechnology Progress* 13 (2):205-208.
- [47] Rito-Palomares, M., Negrete, A., Miranda, L., Flores, C., Galindo, E., Serrano-Carreon, L., 2001. The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl-  $\alpha$  -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology* 28(7-8):625-631.
- [48] Bonnarme, P., Latrasse, A.D., Feron, G., Ginies, C., Durand, A., Le Quere, J.L., 1997. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *Journal of Biotechnology* 56:143 –150.
- [49] Hazelwood, L.L., Daran, J.M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R., 2008. The Erlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8):2259-3920.
- [50] Mason, A.B., Dufour, J.P., 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16:1287-1298.
- [51] Yilmaztekin, M., Erten, H., Cabaroğlu, T., 2009. Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Food Chemistry* 112: 290–294.
- [52] Wnuk, S., Kinastowski, S., Kaminski, E., 1983. Synthesis and analysis of 1-octen-3-ol, the main flavour component of mushrooms. *Nahrung* 27: 479-486.
- [53] Güneşer, O., Karagül-Yüceer, Y., 2010. Gıdalarda aroma maddelerinin belirlenmesinde gaz kromatografisi-olfaktometri (GCO) tekniklerinin kullanılması. *Gıda* 35(5): 371-378.
- 
-