

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ İLE
PATATES İŞLEME ATIK SUYUNDAN
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN
ARTTIRILMASI**

Kübra ABANOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

GEBZE

2012

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ İLE
PATATES İŞLEME ATIK SUYUNDAN
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN
ARTTIRILMASI

Kübra ABANOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12.06.2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra ABANOZ'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Prof. Dr. Yavuz SEZEN

ÜYE

: Doç. Dr. Gönül YENİLMEZ ÇİFTÇİ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / /20... tarih ve / sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ (VHb) İLE PATATES İŞLEME ATIK SUYUNDAN BİYOETANOL ÜRETİMİNİN ARTTIRILMASI

YAZARIN ADI: Kübra ABANOZ

Bu tez çalışmasında, patates işleme atık suyundan biyoetanol üretiminin *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) aracılığı ile arttırılması araştırıldı. Çalışmada, *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5), bu suşlardan *pdh* (piruvat dekarboksilaz geni), *adh* (alkol dehidrogenaz geni) ile *vgh* (*Vitreoscilla* hemoglobin geni) içeren ve farklı seviyelerde VHb ekspresyonu yapacak şekilde geliştirilen TS3, TS4 ve TS5 suşlarının, farklı havalandırma koşullarında, glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı içeren besiyerlerindeki üreme, VHb ekspresyon miktarları ve etanol üretim özellikleri belirlendi. Farklı koşullarda, VHb ekspresyonunun, TS3 ve TS4 suşlarında etanol üretimini arttırdığı görüldü. Etanol üretiminin, % 8 (w/v) glukoz içeren LB besiyerinde, FBR5 kontrol suşu ile elde edilene göre, düşük seviyelerde VHb ekspresyonu yapan TS3 suşu ile % 13 arttığı ve yine aynı suş ile her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin % 24 daha fazla olduğu belirlendi. Patates işleme atık suyu hidrolizatı içeren ortamda, FBR5 kontrol suşuna göre, VHb ekspresyonu, etanol üretimini TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık % 18 artırırken, yüksek seviyelerdeki hemoglobin ekspresyonu, her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini TS4 suşu ile % 48 arttırdı. VHb'nin etanol üretimindeki mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, bu çalışmada elde edilen sonuçlar "VHb Teknolojisi'nin gıda işleme atık suyundan etanol üretiminde pratik önemi olabileceğini göstermektedir.

SUMMARY

THESIS TITLE: ENHANCEMENT BY VITREOSCILLA HEMOGLOBIN (VHb) OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM POTATO PROCESSING WASTE WATER

AURTHOR NAME: Kübra ABANOZ

In this work, the enhancement of bioethanol production from potato processing waste water through the use of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla* (VHb) was investigated. *E. coli* strains (NZN111 and FBR5) and those transformed with *pdh* (pyruvate decarboxylase gene), *adhb* (alcohol dehydrogenase gene) and *vgh* (*Vitreoscilla* hemoglobin gene), (TS3, TS4 and TS5) were utilized. The growth conditions for strains TS3, TS4, TS5 and FBR5 were varied by modulating the aeration rate of cultures as well as inclusion of glucose or potato waste hydrolyzate in the growth medium. Parameters measured included cell growth, VHb levels, and ethanol production. It was found that VHb expression in strains TS3 and TS4 enhanced their ethanol production under several conditions. The strain, expressing the lowest level of VHb, TS3, showed as much as 13 % greater ethanol production and an increase in the ratio of ethanol concentration to cell biomass of 24 % compared to the control strain, FBR5, when grown on LB enriched with 8 % (w/v) glucose. In medium supplemented with potato waste hydrolysate, VHb expression increased ethanol production about 18 % with TS3 and TS4, and the ratio of ethanol concentration to cell biomass as much as 48 % for highest VHb expressing strain, TS4, compared with strain FBR5. Although the mechanism for the VHb mediated increase in ethanol production remains to be elucidated, the results obtained in this work demonstrate that “VHb technology” may be of substantial practical importance in the production of ethanol from food processing waste water.

TEŞEKKÜRLER

Çalışmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım, sayın hocam Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan patates işleme atık suyunun teminindeki yardımlarından dolayı Kraft Gıda Sanayi Ticaret A.Ş.'ne ve Sn. Ergül GETİZMEN ile Sn. Ömür ATAMAN'a,

Tez çalışmasının tamamlanması için mali destek veren TÜBİTAK'a ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne,

Deneyleşirimin bir bölümünü gerçekleştirdiğim Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü'ndeki kendi laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan öğretim üyesi Prof. Dr. Aziz TANRISEVER'e teşekkür ederim.

Yüksek lisansa ilk başladığım günden bu yana yardımlarını esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Araş. Gör. Dr. Zehra ÖLÇER'e ve yine Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki başta Araş. Gör. Tuğrul DORUK olmak üzere bütün araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve teknisyen Özlem ASKER'e ve eğitimim süresince emeği geçen bütün bölüm hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Aileme ve müstakbel eşime her zaman ve her hususta bana inanıp, güvendikleri için minnettarım.

Kübra ABANOZ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yenilenebilir Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol	4
2.1.1. Biyoetanolun Kimyasal Yapısı	9
2.1.2. Biyoetanolun Enerjitiği	11
2.1.3. Biyoetanol Kullanım Alanları	12
2.2. Etanol Üretimi	14
2.2.1. Sentetik Etanol Üretimi	14
2.2.2. Biyolojik Etanol Üretimi	16
2.2.3. Fermantasyon Sürecinde Kullanılabilir Hammaddeler	20
2.2.3.1. Şekerli Materyaller	22
2.2.3.2. Lignoselülozik Materyaller	22
2.2.3.3. Nişastalı Materyaller	24
2.2.4. Rekombinant Soylar İle Biyoetanol Üretimini Arttırılması	26
2.3. Bakteriyel Hemoglobin	28
2.3. Biyoetanol Üretiminde Bakteriyel Hemoglobinin Rolü	34

2.4. Tezin Amacı	35
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	37
3.1. Gereçler	37
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri	37
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	38
3.2. Yöntemler	40
3.2.1. Patates İşleme Atık Suyunun Hidrolizi	40
3.2.2. Stok Kültürlerin Pasajlanması ve Muhafazası	42
3.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması	43
3.2.4. Ön Kültürlerin Hazırlanması	43
3.2.5. Aerobik Koşullar	44
3.2.6. Mikroaerobik Koşullar	44
3.2.7. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi	45
3.2.8. Toplam Hücre Sayısının (Biyokütle) Belirlenmesi	45
3.2.9. Fermentasyon Ortamındaki Biyoetanol Miktarının Ölçümü	45
3.2.10. Besiyerinde Kalan Glukoz Miktarının Ölçümü	45
3.2.11. Rekombinant Soylardaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü	46
3.2.12. Suşların Plazmid Kararlılığının Ölçümü	47
3.2.13. İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR	48
4.1. Glukoz-LB Ortamlarındaki Etanol Üretimleri	48
4.1.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kültürler	48
4.1.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler	50
4.1.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kültürler	54
4.1.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler	56

4.2. Patates İşleme Atık Suyu Hidrolizatı ile Hazırlanan Besiyerlerindeki Etanol Üretimleri	59
4.2.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kùltürler	59
4.2.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	62
4.2.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kùltürler	65
4.2.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	68
4.2.5. Rekombinant Hücrelerdeki Plazmid Kararlılığı	71
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ	78
KAYNAKLAR DİZİNİ	80
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>adhb</i>	: Alkol dehidrogenaz geni
AFDC	: Alternative Fuel Data Center
Amp	: Ampisilin
CSIR	: Council of Scientific and Industrial Research
EPDK	: Enerji piyasası düzenleme kurulu
ETBE	: Etil-terciyer-bütül eter
<i>Gm^R</i>	: Gentamisin direnç geni
LB	: Luria Bertani besiyeri
LBG	: Glukoz içeren Luria Bertani besiyeri
LBK	: Ksiloz içeren Luria Bertani besiyeri
<i>ldh</i>	: Laktat dehidrogenaz geni
MTBE	: Metil-terciyer-bütül eter
OD	: Optical density
PASH	: Patates işleme atık suyu hidrolizatı
<i>pdh</i>	: Piruvat dekarboksilaz geni
<i>pfl</i>	: Piruvat format liyaz geni
<i>Sm^R</i>	: Streptomisin direnç geni
TAME	: Terciyer-amil-metil eter
TBA	: Terciyer-bütül alkol
<i>Tc^R</i>	: Tetrasiklin direnç geni
TLC	: Thin Layer Chromatography
<i>vgh</i>	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni
VHb	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
YDK	: T.C. Yüksek Denetleme Kurulu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>	
2.1:	Etanol üretimindeki aşamalar ve CO ₂ döngüsü	4
2.2:	A:Etanın üç boyutlu gösterimi; B: Etanolun üç boyutlu gösterimi	10
2.3:	Etanolun yanma tepkimeleri ve reaksiyon enerjileri	12
2.4:	Değişik hammaddelerden biyoetanol üretiminin aşamaları	25
2.5:	<i>E. coli</i> 'de glukozdan etanol üretimi	27
2.6:	VHb'nin kristal yapısı	30
2.7:	<i>E. coli</i> FBR5 (a) ve <i>vgb</i> içeren <i>E. coli</i> TS4 (b) suşlarına ait hücre homojenatlarında VHb'nin ditiyonit ile indirgenmesi	31
2.8:	<i>vgb</i> promotor bölgesi	32
2.9:	<i>E. coli</i> ve <i>S. cerevisiae</i> 'de ksilozdan etanol üretimi	35
3.1:	Çalışmada kullanılan rekombinant suşların içerdiği plazmidlerin gösterimi	39
4.1:	Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD)	49
4.2:	Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD)	50
4.3:	Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD)	52
4.4:	Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD)	53
4.5:	LBG besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık)	54
4.6:	Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD)	55
4.7:	Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, LBG	56

- besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD)
- 4.8:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 57
- 4.9:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 58
- 4.10:** LBG besiyerinde büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin Vhb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) 59
- 4.11:** Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 60
- 4.12:** Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 61
- 4.13:** Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 63
- 4.14:** Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 64
- 4.15:** PASH besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin Vhb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) 65
- 4.16:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 66
- 4.17:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 67
- 4.18:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 69
- 4.19:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) 70
- 4.20:** PASH besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin Vhb ekspresyon değerleri(nmol/g yaş ağırlık) 71

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Güncel ve potansiyel araç yakıtları	6
2.2: Etanol ve diğer bazı yakıtların karşılaştırılması	13
2.3: Etanol üretim süreçlerinde sağlanması gereken önemli özellikler	18
2.4: Etanol üreticisi bakteri türleri	19
2.5: Etanol üreticisi bazı maya türleri ve litrede ürettikleri etanol miktarları	19
2.6: Etanol üretiminde kullanılan yabancı suşların kültür özellikleri	19
2.7: Etanolun fermentatif üretimi için başlıca kaynaklar	21
2.8: Tarımsal ve lignoselülozik atıkların kompozisyonları (% w/w)	23
2.9: Etanol üretiminde kullanılabilir substratlar ve içerikleri	26
2.10: <i>Vitreoscilla</i> 'nın taksonomik konumu	29
2.11: Vhb ve diğer hemoglobin moleküllerinin oksijenle reaksiyonlarında kinetik ve denge sabitlerinin karşılaştırılması	30
3.1: Proje çalışmasında kullanılan bakteriler, plazmidler ve özellikleri	38
3.2: Patates işleme atık suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri	40
3.3: Denemeleri yapılan patates atık suyu hidroliz yöntemleri sonucu elde edilen glukoz miktarları (% w/v)	42
3.4: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları	43
4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v)	49

- 4.2:** Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 50
- 4.3:** Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 51
- 4.4:** Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 53
- 4.5:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 55
- 4.6:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 56
- 4.7:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 57
- 4.8:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 58
- 4.9:** Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 60

- 4.10:** Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 61
- 4.11:** Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 62
- 4.12:** Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 64
- 4.13:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 66
- 4.14:** Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 67
- 4.15:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 68
- 4.16:** Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 70

1. GİRİŞ

CO₂ ve diğ er sera gazlarının atmosferdeki konsantrasyonlarında meydana gelen artış ile küresel ısınmanın neden oldu ğ u mevsim de ğ işiklikleri arasında doğ rudan bir ilişki bulunmaktadır. Endüstrinin gelişmesi ve popülasyonun artması ile birlikte dünyada enerji tüketimi artmaktadır. Bununla beraber, fosil yakıtlar gibi konvansiyonel kaynaklar var olan enerji ihtiyacını karşılayamamaktadır. Fosil kökenli enerji kaynaklarının birço ğ u hesaplanan yaklaşık bir süre sonunda tükenecektir. Bu tür kaynaklar, çevre için önemli ve geri dönüşümü olmayan tehlikeler yaratmaktadır. Bu nedenle yenilenebilir, etkin, ucuz ve çevreyle dost enerji kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Gelişmiş ülkeler enerji çeşitliliğini artırmakta, yaymakta ve belli enerji kaynağı türlerine büyük oranlarda bağımlı olmamaya çalışarak alternatif arayışlarını sürdürmektedirler. Bu amaç doğrultusunda ve yapılan araştırmalar sayesinde yeni ve/veya yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliği artmaktadır. Bunlardan bazıları ekonomik olarak avantaj sağlamasa da çevre ile dost olmaları önem kazanmalarına neden olmaktadır. Biyoyakıtlar bu açıdan en yeni ve en hızla yaygınlaşan alternatif enerji kaynaklarının başında gelenidir.

Gelişen teknolojinin ve artan dünya nüfusunun ihtiyaç duyduğu enerjiyi karşılamak, ülke ekonomisine katkıda bulunmak ve ulusal kaynakların korunması ve değerlendirilmesini sağlamak için fermentasyonla biyoetanol üretimi güncellik kazanmıştır.

Doksanlı yıllarda piyasaya sunulan biyoyakıtlar çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Biyoyakıtlar, fosil kökenli yakıt rezervlerinin (petrol, kömür, doğalgaz v.b.) dünyanın belirli bölgelerinde bulunması, tükenme riski ve yaygın kullanımın çevreye olan olumsuz etkilerinin gündeme geldiği dönemlerde, daha çok tarımsal ürünlerden, de ğ işik kimyasal yöntemler yardımıyla üretilen benzin ve motorinle karışım halinde kullanılan, temiz bir enerji kaynağına ihtiyaç duyulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Biyoyakıtların bu denli hızla gelişmesinde çevreyle dost olmaları, egzoz emisyonlarının sağlık açısından riskinin az olması, enerji güvenliğinin sağlanması, dışa bağımlılığın azaltılması ve kırsal kalkınmanın

gerçekleştirilmesi gibi nedenlerin önemi büyüktür. Araştırmalar petrol gibi fosil yakıtlar ile karşılaştırıldığında bir litre biyoetanolün % 50-70 arasında sera gazı emisyonunu azaltmak için bir litre benzinin yerine kullanılabileceğini göstermiştir.

Etanol, hem etilenin hidrasyonu sonucu petrokimyasal olarak, hem de şekerin maya ile fermente edilmesi suretiyle üretilebilir. Biyoetanol, tarım ürünlerinde var olan polisakkaritlerin şekere dönüşümünden sonra uygulanan fermantasyon işlemi sonucu ortaya çıkar ve fermentasyon ortamından uzaklaştırıldığı takdirde benzinle doğrudan karıştırılabilir. Biyoetanol üretilebilecek başlıca bitkiler: Buğday, seker pancarı, mısır ve patatestir. Ülkemizde biyoetanol, ağırlıklı olarak şeker fabrikalarında melastan üretilmektedir.

Biyoetanol üretiminin artırılabilmesi için hammadde üretim miktarlarının artırılması gerekir. Bu durum ise tarım alanlarının gıda üretimi yerine biyoetanol için hammadde yetiştirilmesi amacı ile kullanılmasına neden olduğundan dünya genelinde tartışmalara yol açmıştır. Bu hassas konuya yönelmenin bir yolu alternatif ve yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak biyo-atıkların biyo-enerji olarak değerlendirilmesidir. Biyoetanol üretiminde kullanılabilecek hammadde alternatifleri ise evsel ya da endüstriyel tarımsal atıkların kullanılmasıdır. Bu sayede hem atıkların değerlendirilmesi sağlanacak hem de enerji üretilebilecektir.

Fermentasyon teknolojisinde, kullanılan ana materyallerden biri de mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalar fermentasyon sürecinde biyokatalizör olarak kullanılırlar. Ancak fermentasyon sonucu ortamdaki oksijen hızla tükenmekte, bununla birlikte özellikle alkol gibi fermentasyon ürünleri ortam pH'sını önemli ölçüde etkilemektedir. Hem oksijenin düşük konsantrasyonlarda dahi etkin kullanılmasını sağladığı hem de pH değişimlerine karşı bir tampon görevi gördüğü için *Vitreoscilla* hemoglobininin (VHb) bu gibi durumların aşılması ve fermentasyonun daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi açısından önemli avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Endüstriyel biyoetanol üretiminin çevreyle dost bir yaklaşım olabilmesi için atıkların değerlendirilmesi şarttır. Özellikle gıda üretim tesislerinin nişasta temelli işleme atıkları ve bu atıkların hidrolizi ile oluşan glukozun çok çeşitli etanolojenik

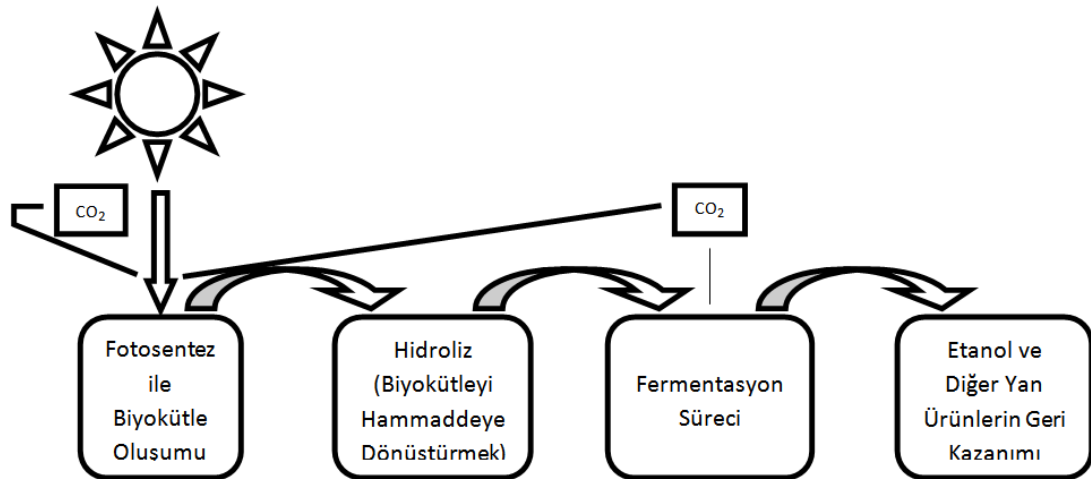
mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir olması nedeniyle bu atıklar biyoetanol üretimine yönelik doğru bir hammadde seçimi olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yenilenebilir Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol

Biyoetanol üretiminin birkaç değişik şekli olmasına rağmen üretim yöntemleri temelde fermentasyon ile olmaktadır. Biyokütleyi biyoetanola dönüştürmede dört temel adım vardır (Şekil 2.1):

1. Güneş enerjisini fotosentez yoluyla kimyasal enerjiye dönüştürerek depolanması sonucu biyokütle eldesi.
2. Oluşan bu biyokütlenin farklı proseslerde kullanılabilen bir hammaddeye dönüştürülmesi (Sakkarafikasyon).
3. Biyoetanol üretimi için katalizör olarak mikroorganizmaların kullanılması ile biyokütlenin fermente edilmesi.
4. Farklı amaçlar için kullanılabilen biyoetanolun ve yan ürünlerinin (CO_2 , fermente edilmemiş karbon kaynağı vb.) geri kazanılması.



Şekil 2.1: Etanol üretimindeki aşamalar ve CO_2 döngüsü.

Biyoetanolun bu yöntemle üretilmesi sonucu çevreye zararlı maddeler açığa çıkmamaktadır. Oluşan karbondioksit ise sıvılaştırılarak soda üreticilerine satılmaktadır. Fermentasyon sonrası atık olarak kalan buğday, mısır veya şeker pancarı posası ise oldukça fazla miktarda protein içeren bir karışım olduğundan hayvan yemi olarak kullanılmak üzere satılmaktadır.

Biyolojik yöntemler ile üretilen etanol, enerji ihtiyacının karşılanması sırasında fosil yakıtlar gibi doğaya zarar vermez. Bu nedenle hem yanma hem de fermentasyon son ürünleri bakımından döngüsel nitelik taşıdığından yenilenebilir olarak değerlendirilmektedir. Biyolojik yolla etanol üretimi, daha çok tarımsal esaslı ürünlerden yapıldığı için, atmosferik karbon döngüsünü de arttırmaktadır.

Fosil yakıtların kullanımı ile taşımacılık sektörü % 30 CO₂, % 67 CO, % 41 nitrojen oksitler, % 51 reaktif hidrokarbon ve % 23 partiküler madde emisyonuna neden olur (MacKenzie, 2003). A.B.D Enerji Bakanlığı, benzin ile % 95 oranında karıştırıldığında, biyoetanol katkısının sülfür dioksit emisyonlarını % 60-80 ve uçucu organik bileşen salınımını % 13-15 değerlerine kadar azaltacağını tahmin etmektedir. (Himmel et al., 1997). Taşımacılık sektörü petrol ürünlerinin birincil alıcısı olduğundan temiz-yakıt olan biyoetanolün fosil yakıtların yerini alması ile temiz bir çevre sağlanacaktır.

Taşıt yakıtları üç grupta sınıflandırılabilir: (a) geleneksel yakıtlar, (b) oksijenlenmiş yakıtlar ve (c) alternatif yakıtlar (AFDC, 1997). En önemli yakıt türleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Benzin, yüzlerce tip hidrokarbonun kompleks bir karışımıdır. Oksijenlenmiş benzin, eter ya da alkol oksijenatlarının ilavesi ile oluşturulur. Eter oksijenatları metil-terciyer-bütül eter (MTBE), etil-terciyer-bütül eter (ETBE) ve terciyer-amil-metil eter (TAME)'dir. Alkol oksijenatları ise etanol, metanol and terciyer-bütül alkol (TBA)'dür (Williams et al., 2003).

Etanol, biyoyakıt olarak petrolün yerini alabilecek önemli bir endüstriyel üründür. Ayrıca çevreye olan zararlı etkisi çok az olduğundan, büyük önem taşımaktadır ve oksijenli yakıtların üretiminde katkı maddesi olarak da kullanılabilir.

Etanol, şeker kamışı, şeker pancarı, gine mısırı, dallı darı, arpa, kenevir, kenaf, (tatlı) patates, manyok, ayçiçeği, meyveler, melas, kesik süt, mısır, mısır koçanı, hububat, buğday, tahta, kâğıt, saman, pamuk ve diğer biyokütleler ile çeşitli selüloz atıkları gibi pek çok farklı besin kaynağından elde edilebilir. Artan etanol tüketiminin sonucu olarak, şeker kamışı ve mısır gibi besin kaynaklarına olan talep de artmıştır. Büyük ölçekte yakıt amaçlı zirai alkol üretimi, aynı zamanda geniş ve verimli ekilebilir alanlar ile suya olan talebi de arttırmaktadır.

Çizelge 2.1: Güncel ve potansiyel araç yakıtları. (AFDC, 1997)

Geleneksel yakıtlar	Oksijenlenmiş yakıtlar	Alternatif yakıtlar
Benzin	Metil tersiyer bütül eter (MTBE)	Likit petrol gazı (LPG)
Dizel	Etil tersiyer bütül eter (ETBE)	Sıkıştırılmış doğal gaz
	Tersiyer amil metil eter (TAME)	Etanol, % 85 (E85)
	Etanol, % 10 (E10)	Etanol, % 95 (E95)
	Metanol	Metanol, % 85 (M85)
	Tersiyer bütül alkol (TBA)	Metanol (saf) (M100)
		Elektrik
		Hidrojen
		Biyodizel

Ülkemizde Enerji Piyasası Düzenleme Kurulunun (EPDK) 19 Eylül 2011 tarihinde aldığı bir karar ile 2013 yılından itibaren, akaryakıtta her yıl artan oranlarda, yerli tarım ürünlerinden elde edilen etanol ve biyodizel katılmasını zorunlu hale getirilmektedir (5015 sayılı Petrol Piyasası Kanunu, EPDK, 2011). Bu oran biyoetanol için 1 Ocak 2013'de % 2, 1 Ocak 2014 tarihinde ise % 3 olarak belirlenmiştir. Piyasaya akaryakıt olarak arz edilen motorin türlerinin, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş yağ asidi metil esteri içeriğinin 1 Ocak 2014 tarihi itibarıyla en az % 1, 1 Ocak 2015 tarihi itibarıyla en az % 2, 1 Ocak 2016 tarihi itibarıyla en az % 3 olması zorunluluğu getirilmiştir. Bu alınan karar ile biyoyakıt üretim tesisi sayısı artırılacak, üretim daha istikrarlı devam edebilecektir. Böylelikle petrol ithalatına ödenen döviz miktarı azalacaktır.

Bu kararın tarım sektörü üzerindeki olası etkilerini de dikkatle incelemek gerekmektedir. Türkiye Ziraat Odaları Birliği, tarım ürünlerinden biyoyakıt üretiminin, Türkiye'deki tarım üreticilerini rahatlatacağını, ülkemiz için önemli bir gelir kaynağı ve istihdam yaratacağını düşünülmektedir. Biyoyakıtlar, başta petrolde dışa bağımlılığın azaltılması olmak üzere, tarımsal üretimde çeşitliliğin artırılması, kırsal kalkınmayı desteklemesi ve yem sanayisine hammadde sağlaması gibi sebeplerle Türkiye için büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde etil alkol üretim iznine sahip 9 adet üretici firma ve bu firmalara ait toplam 12 adet tesis bulunmaktadır. Bu firmalardan yalnızca 3 tanesi, etil alkolün

dehidrasyonu ile elde edilen biyoetanol için, Türkiye Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu'ndan üretim izin belgesi almıştır. Biyoetanol üretim izni alma tarihine göre bu firmalar sırasıyla; Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş. (Tarkim), Tezkim Tarımsal Kimya İnş. San. ve Tic. A.Ş. (Tezkim) ve Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.' dir. Söz konusu bu firmalar aynı zamanda üretmiş oldukları biyoetanolu piyasaya sunabilmek için Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurulu'ndan dağıtım yetki belgesi de almışlardır.

Ülkemizde biyoetanol üretimi ilk defa Tarkim tarafından gerçekleştirilmiştir. Söz konusu firma, 2001 yılında Bursa'da başlatmış olduğu biyoetanol üretim tesisi yatırımını 2004 yılında tamamlayarak faaliyetlerine başlamıştır. Biyoetanol üretim sürecinde hammadde olarak buğday ve mısırın kullanıldığı tesisin yıllık üretim kapasitesi yaklaşık 40 milyon litre civarındadır (Tarkim, 2009). Türkiye'de kurulan ikinci biyoetanol tesisi ise 2007 yılında Adana'da faaliyete geçen Tezkim firmasına ait üretim tesisidir. Biyoetanol üretimini ağırlıklı mısır kullanarak gerçekleştiren Tezkim'in yıllık biyoetanol üretim kapasitesi yaklaşık 35 milyon litredir (100 bin litre/gün). Bunun yanında, tesisin, üretim kapasitesini yıllık 40 milyon litreye çıkarabilecek altyapısı da mevcuttur (Tezkim, 2009). Tarkim ve Tezkim firmalarının üretim teknolojisi, hem mısırı hem de buğdayı hammadde kullanarak biyoetanol elde etmeye elverişli durumdadır. Bu açıdan, firmalar bu tarım ürünlerinin arz, talep, fiyat ve biyoyakıt dönüşüm verimlerini kıyaslayarak ekonomik açıdan verimli olan ürünü biyoetanol üretim sürecinde hammadde olarak kullanmaktadırlar. Tarkim ve Tezkim, ülke şartlarını da göz önüne alarak, biyoetanol üretimlerinin neredeyse tamamını şu an için mısır kullanarak gerçekleştirmektedirler. Biyoetanol üretimi için üretim izni alan son tesis, Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.'nin Konya ilinin Çumra ilçesinde kurmuş olduğu Çumra Şeker Fabrikası'dır. 2007 yılı içerisinde faaliyete geçen ve 2008 yılı Nisan ayında almış olduğu üretim izni ile şu an için ülkemizdeki en büyük biyoetanol üretim tesisi olan Çumra Şeker Fabrikası, yıllık 84 milyon litre üretim kapasitesine sahiptir (280 bin litre/gün). Tarkim ve Tezkim'den farklı bir şekilde şeker pancarının hammadde olarak kullanıldığı tesiste, biyoetanol üretim sürecinde yan ürün olarak elde edilen koyu şilempenin hayvan yemi ve gübre olarak kullanılması da sağlanmıştır (Konya Şeker, 2009). Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.'ye bağlı Eskişehir Şeker Fabrikası da biyoetanol tesis yatırımlarını tamamlamış bulunmaktadır. Yıllık yaklaşık 20 milyon litre üretim kapasitesine (65

bin litre/gün) sahip olan fabrika, Çumra Şeker Fabrikası'nda olduğu gibi hammadde olarak şeker pancarı kullanarak biyoetanol elde etmektedir (YDK, 2008).

Tüm bu firmaların üretim kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde biyoetanol için yıllık yaklaşık 180 milyon litrelik kurulu kapasitenin olduğu görülmektedir. Bu rakam göstermektedir ki, ülkemizde biyoetanolün benzinle yüzde 6 harmanlanması durumunda bile biyoetanol sektörünün mevcut kurulu kapasitesi bu oranı karşılamaya yeterli düzeydedir (Petder, 2009). Diğer yandan, bu güne kadar akaryakıt dağıtım firmalarının benzine biyoetanol karıştırılması konusunda herhangi bir zorunluluklarının bulunmaması, biyoetanolün olan ilginin son derece düşük olmasına yol açmıştır. Üretmiş olduğu ürünü pazarlamada sorun yaşayan biyoetanol sektörü, % 10'un altında bir üretim kapasitesiyle çalışmaktadır. Ancak yapılan son düzenleme ile yıllık biyoetanol miktarının kademeli olarak artması kaçınılmazdır. Bu nedenle kullanılabilir hammadde kaynaklarının artırılması ile ilgili de çalışmalar başlatılmıştır.

Biyoetanol ve biyodizel üretimi için gerekli olan hammaddelere bakıldığında oldukça geniş tarımsal ürünleri kapsamına aldığı görülmektedir. Dünyada biyoetanol üretiminde en fazla mısır, şeker pancarı, şeker kamışı, buğday, arpa kullanılırken, biyodizel üretiminde kanola, soya fasulyesi, palm yağı, ayçiçeği, aspir kullanılmaktadır.

Dünyada öncelikli olan gıda amaçlı tarımsal üretimdir. Ancak, gıda temel ihtiyaç maddesi olmakla birlikte artan enerji fiyatları ülkeleri biyoyakıt üretimine yönlendirmektedir. Ülkeler biyoyakıt üretimini her geçen yıl artırırken, Türkiye bu gelişmelerden uzak kalmamalıdır, gıda güvenliğini sağladıktan sonra, dünyadaki gelişmeleri de takip ederek tarımsal politikalarına biyoyakıt üretimine yönelik hedeflerini de eklemesi gerekmektedir. Kota ile engellenen şeker pancarı üretiminin, kullanım alanının biyoetanolü yönlendirilmesiyle, özellikle İç Anadolu Bölgesi çiftçileri kota sıkıntısını aşarak rahat nefes alacaktır. Şeker pancarı üretiminin yoğun olarak gerçekleştirildiği bölgelerde kurulacak biyoetanol üretim tesisleri ile şeker pancarı değerlendirilirken aynı zamanda bölgedeki istihdamın artırılmasına da katkı sağlanacaktır (Bayraktar, 2011).

Bu güne kadar, Brezilya, Kolombiya, ABD ve Çin'de ciddi bir etanol yakıt programı oluşturulmuştur. Örneğin, Brezilya'da, etanol üreten kurumların bağımsız olarak karlı olabilmeleri için, hükümet tarafından, etanol endüstrisine ciddi yatırım yapılmaktadır.

Fermentasyon yöntemi ile üretilen etanol sonucunda suda çözülmüş etanol elde edilmektedir. Etanolun bir yakıt olarak kullanılabilmesi için suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. En eski yöntem damıtma yöntemidir. Ancak bu yöntemle, su ve etanol karışımı azeotrop oluşturduğu için, damıtmanın sürdürülmesi ile % 95-96'dan daha saf etanol elde edilmesi mümkün olmamaktadır. Etanolun benzin ile karıştırılabilmesi için, en az % 95.5 ile % 99.9 arasında bir saflığa ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle kullanılan en yaygın saflaştırma yöntemi, moleküler elek kullanarak fiziksel absorblama metodudur.

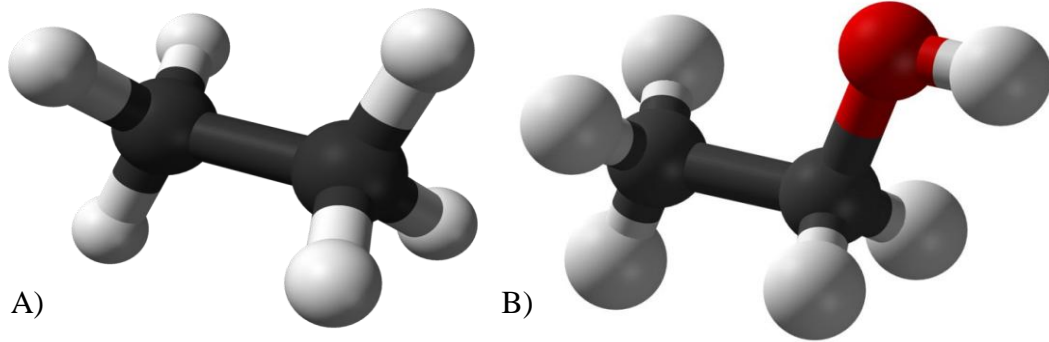
Günümüzde yüksek oranda saflaştırılmış etanol, E10 ve E85 şeklinde adlandırılan benzin-etanol karışımları halinde motorlu taşıtlarda kullanılmaktadır. Genel olarak, bir benzin karışımındaki etanol miktarı yükseldikçe, standart araba motorları için uygunluğu azalmaktadır. Etanol ile çalışan motorlar, 13 °C'nin altındaki sıcaklıklarda yanmayı arttırmak ve yanmamış etanolü en aza indirebilmek için, soğuk ortamda çalıştırma sistemine ihtiyaç duyarlar. Etanolün %10 ile % 30 arasında bir karışımda kullanılması durumunda, hiçbir motor tadilatına ihtiyaç duyulmamaktadır (Bullen et al., 2006). Bu nedenle, pek çok yeni araç, bu oranlardaki karışımlarda güvenle çalışabilirler.

Daha önceleri % 70 gibi yüksek etanol içeriği olan yakıtların kullanılabilmesi için motor tadilatına ihtiyaç duyulmasına rağmen (Von Blotnitz et al., 2006), 1999 yılından başlayarak, dünyada artan sayıda pek çok araç, tadilat gerektirmeksizin, % 0 etanoldan % 85 etanola kadar çalışabilecek şekilde üretilmişlerdir.

2.1.1. Biyoetanolün Kimyasal Yapısı

Etanol, vücutta metabolize edilen tek alkoldür. Etil alkol olarak da isimlendirilir. Moleküler formülü ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ya da $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) göz önüne

alındığında, doymuş bir hidrokarbon olan etanın (C_2H_6) altı hidrojeninden birinin yerine bir hidroksil grubunun (OH) geçmiş şekli olarak tanımlanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: A. Etanın üç boyutlu gösterimi; B. Etanolun üç boyutlu gösterimi.

Etanol tarih öncesinden bu yana kadar insanlar tarafından, alkollü içkilerin içerisinde sarhoş edici katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Kuzey Çin’de, içerisinde kurumuş etanol bulunan 9000 yıl öncesinden kalma toprak kaplar, etanolun neolitik dönemde alkollü içki olarak kullanıldığının bir göstergesidir. İlk defa, saf bir bileşik olarak ayrıştırılması, damıtma tekniğini de geliştiren bir İslam kimyageri olan El-Kindi tarafından gerçekleştirilmiştir.

Etanolun suyla birleşerek azeotrop oluşturması nedeniyle, sudan damıtılması sonucunda, % 94 etanol içeren bir ürün elde edilebilir. Saf etanol, 1796 yılında Johann Tobias Lowitz tarafından, damıtılmış etanolun mangal kömürü ile filtre edilmesi sonucu elde edilmiştir. Nicolas-Theodore de Saussure ise 1808 yılında etanolun kimyasal formülünü tespit etmiştir. 1858 yılında Archibald Scott Couper, etanolun kimyasal formülünü yayınlamıştır. Bu yayın, etanolu kimyasal yapılar içerisinde duyurulmuş ilk kimyasal bileşikler arasına sokmuştur (Couper, 1858).

Biyoeanolün ise kimyasal yapı bakımından etanoldan hiçbir farkı yoktur. Aralarındaki tek fark üretim aşamasında kullanılan teknikten gelmektedir. Kimyasal üretimden farklı olarak, biyoeanol, canlı sistemlerin katalizi sonucu organik biyokütlenin fermentasyonu ile üretilir.

Saf etil alkol berrak, renksiz, karakteristik kokulu bir sıvıdır. Renksiz bir şekilde yanmaktadır. $78,37^{\circ}C$ ($351,6$ K)’de kaynamakta ve $-114,3^{\circ}C$ ($158,8$ K)’de

donmaktadır. Özgül ağırlığı 20°C' de 0,78924 g/cm³'tür. Molekül ağırlığı ise 46,06844 g/mol' dür. 20 °C'deki buhar basıncı 5,95 kPa, viskozitesi ise 1,2x10⁻³ Pa.s'dir. Bileşiminde % 52.18 karbon (C), % 34.78 oksijen (O) ve % 13.04 hidrojen (H) bulunur. Zayıf asit özelliği gösterir, asitlik sabiti (pKa) 15,9'dur (Ballinger ve Long, 1960).

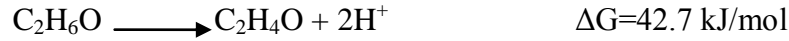
Endüstriyel etil alkolün çoğu denatüredir. Yani içilmemesi için, içine piridin ve metanol gibi zehir etkisi yapan maddeler konmuştur. Bunların uzaklaştırılması pek kolay değildir. Endüstride üretilen alkol denatüre olmasa bile saf değildir. Çünkü reaksiyon sonunda meydana gelen ürün damıtılırken etanol sudan tamamen ayrılmaz. Basit damıtma ile en fazla % 96'lık saflıkta etanol elde edilir. Bu kompozisyondaki sulu alkol saf bir maddeymiş gibi kaynar. Bu azeotropu bozmak için, genellikle benzen katılır. Su-alkol-benzen üçlüsü damıtıldığında, su bitinceye kadar su-benzen-alkol karışımı önce geçmektedir. Daha sonra da benzen bitinceye kadar alkol-benzen karışımı geçmektedir. En son olarak da geriye saf alkol kalmaktadır. Laboratuvar ölçeğindeki saflaştırmalarda, suyu uzaklaştırmak amacıyla, kalsiyum oksit, kalsiyum ve magnezyum kullanılmaktadır.

2.1.2. Biyoetanolün Enerjitiği

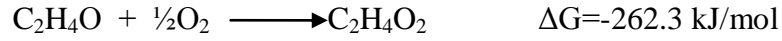
Etanol reaktiflere ve koşullara bağlı olarak asetaldehite oksitlenebilir ve daha ileri oksitlenme sonucu oluşan ürün asetik asittir (Streitweiser ve Heathcock, 1976). Bu oksitlenme olayının endüstriyel açıdan bir önemi olmamakla birlikte, insan metabolizması için önemlidir. Reaksiyonu katalizleyen enzim karaciğer alkol dehidrogenaz enzimidir. Etanol oksidasyonu sonucu oluşan asetik asit insan vücudu için önemli bir kaynaktır ve asetil-CoA'nın öncül maddesidir (Şekil 2.3 A).

Etanolun tutuşma sıcaklığı altında oksijenle verdiği tepkime ise yanma tepkimesi olarak adlandırılır ve etanolun yanması olayı ekzotermik bir reaksiyondur (Şekil 2.3 B). Etil alkol, aynı miktarda su ile karışık olduğunda bile soluk, mavimsi bir alevle yanar. Etanolun yanma enerjisi 1 gram başına 7.09 kcal verecek şekildedir (Streitweiser ve Heathcock, 1976). Bu reaksiyonda 1 mol etanolun yanması için 3 mol oksijene ihtiyaç vardır ve sonuç olarak 2 mol karbondioksit ve 3 mol su oluşur.

A) Etanol – Asetaldehit:

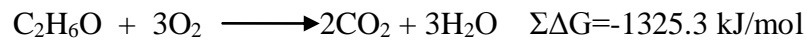


Asetaldehit – Asetik Asit:



$$\Sigma\Delta\text{G}=-215.1 \text{ kJ/mol}$$

B) Etanol – Karbondioksit ve Su:



Şekil 2.3: Etanolün yanma tepkimeleri ve reaksiyon enerjileri.

2.1.3. Biyoetanol Kullanım Alanları

Etil alkol, bütün alkollü içkilerde bulunmaktadır. İyi bir çözücü olduğu için, esansların yapımında, parfümeride, boyaların yapımında, sirke içerisinde, eter üretiminde, lak yapımında ve donmayı geciktirici olarak kullanılmaktadır. Sıcaklıkla hacim büyümesi nispeten düzenli olduğundan, hava sıcaklığını ölçen termometrelerde sıvı seviyesinin rahat görülmesi için bir boya maddesi ilavesiyle termometre sıvısı olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca etanol medikal alanda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Islak temizleme mendillerinde ve el temizleme jellerinde, yaklaşık % 62 hacimsel konsantrasyonda, antiseptik ajan olarak yer alır. Bunların yanı sıra özellikle metil alkol ve etilen glikol gibi çok daha toksik olan alkol zehirlenmelerinde panzehir olarak da kullanılmaktadır.

Etanol, kimya endüstrisinde birçok organik bileşiğin (asetaldehit, asetik asit, etilasetat, etilklorür ve butadien gibi) üretiminde başlangıç materyalidir. Ayrıca, petrolün çok pahalı olduğu bazı ülkelerde, bir motor yakıtı bileşeni olarak kullanılmaktadır. Sanayide üretilmiş olan ilk arabaların çalışmasında etil alkol kullanılmıştır ve petrol krizi gibi enerji ihtiyacını karşılamamanın zora girdiği günümüzde de yeni üretilen çevreci araçlarda geçmişteki gibi etanolün yakıt olarak kullanılması mümkün olmaktadır.

Önceleri, orijinal Ford Model T otomobillerde etanol 1908'e kadar yakıt olarak kullanılmıştır (DiPardo, 2007). Etanolun tekrar motorlu taşıtlarda yakıt ve yakıt katkı maddesi olarak kullanılması fikri 1920'li yıllarda ortaya atılmıştır. Biyoetanol, benzin ile harmanlandığında; donmayı engellemekte, motorun daha serin ve enjektörlerin daha temiz kalmasını sağlamaktadır. Bilindiği gibi, oktan sayısı otomobil yakıtlarının önemli bir özelliğidir. Etanol, yakıtın süper benzinden daha yüksek oktan sayısına sahip olmasını sağlayarak benzine kurşun bileşiklerinin ilavesini gerektirmeyecektir (Çizelge 2.2). Ayrıca biyoetanol yakıtlarda oktan artırmak amacı ile kullanılan benzen, MTBE gibi kanserojen maddelerin çevreci alternatifi olarak da değerlendirilmektedir. Biyoetanol, ulaştırma sektörünün yanı sıra, ısı ve elektrik üretim tesislerinde, kojenerasyon uygulamalarında, kimyasal madde üretiminde de kullanılmaktadır (Grassi, 2000). Biyoetanol ve benzinin karıştırılması ile emisyonu azaltmak ve tam bir yanma sağlamak da mümkündür (Farrel, 2006).

Çizelge 2.2: Etanol ve diğer bazı yakıtların karşılaştırılması (2011).

Yakıt tipi	MJ/L	MJ/kg	Oktan numarası
Kuru Odun (% 20 nemli)		~ 19.5	
Metanol	17.9	19.9	108.7
Etanol	21.2	26.8	108.6
E85 (% 85 EtOH - % 15 Benzin)	25.2	33.2	105
Sıvılaştırılmış Doğal Gaz	25.3	~55	
LPG (% 60 Propan - % 40 Bütan)	26.8	50	
Uçak Yakıtı	33.5	46.8	100-130
Gazol (% 90 Benzin - % 10 EtOH)	33.7	47.1	93-94
Sıradan Benzin	34.8	44.4	Min. 91
Kaliteli Benzin			Max. 104
Dizel	38.6	45.4	25
Mangal Kömürü	50	23	

2.2. Etanol Üretimi

Etanol petrokimyasal olarak etilenin doğrudan hidrasyonu ile üretilebileceği gibi şekerlerin fermente edilmesi sonucu mikroorganizmalarca da üretilebilmektedir (Mills ve Ecklund, 1987). Hangi yöntemin daha ekonomik olduğu ise petrol ve şeker kaynağı olabilecek hammaddelerin fiyatlarına bağlı olduğu gibi elde edilebilen verime ve üretim sırasında ortaya çıkan maliyete de bağlı olmaktadır.

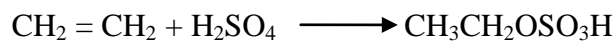
2.2.1. Sentetik Etanol Üretimi

Etanol, ilk defa 1826 yılında, birbirlerinden bağımsız olarak İngiltere’de Henry Hennel ve Fransa’da S.G. Serullas tarafından sentetik olarak üretilmiştir. Michael Faraday, bugün endüstriyel etanolun sentezlenmesine benzer şekilde, 1828 yılında etilenin asit katalize hidrasyonu sonucu etanol elde etmiştir (Hennel, 1828).

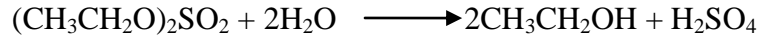
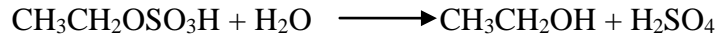
Endüstriyel amaçlı etanol, petrol ürünlerinin, çoğunlukla etilenin, sülfürik asit ile katalitik hidrasyonundan elde edilmektedir. Bu proses, geleneksel fermantasyon yönteminden daha ekonomiktir. Aynı zamanda, etanol, kalsiyum karbit, kömür, doğal gaz ve diğer kaynaklardan da elde edilebilir. Fakat günümüzde bu fosil kökenli başlangıç maddeleri sürdürülebilir olmadığından, alternatif kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır.

Etilenin dolaylı hidrasyonu; yüzyıldan uzun bir süre önce başlayan en eski sentetik etanol üretim yöntemlerinden biridir. Etanol, etilenden, sülfürik asidin kullanılmasıyla üç adımlı bir süreç sonunda elde edilmektedir (John, 1969).

İlk adımda % 35-95 etilen içeren hidrokarbon hammadde mono- ve dietil sülfat oluşturmak üzere % 95-98’lik sülfürik aside maruz bırakılmaktadır:

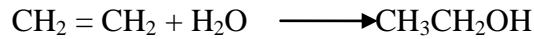


Bu karışım daha sonra % 50-60 sulu sülfürik asit solüsyonu vermesi için yeterli miktarda su ile hidrolize edilmektedir:



Etanol daha sonra bir ayırıcı kolon yardımıyla seyreltik sülfürik asitten ayrılmaktadır. Sürecin son adımı sülfürik asidi konsantre ederek tekrar ilk basamağa hazırlamaktır.

Etilenin doğrudan hidrasyonu; 1947 yılında ticari hale gelmiştir. Bu süreçte etilence zengin bir gaz su ile karıştırılarak sabit yataklı katalist reaktöründen geçirilmektedir. Bu sayede aşağıdaki reaksiyonun gerçekleşmesiyle etanol elde edilmektedir (Nelson ve Courter, 1954; Streitweiser ve Heathcock, 1976). Bu aşamadan sonra etanol, bir damıtma sistemi içerisinde ortamdan ayrılmaktadır.



Doğrudan ve dolaylı etilen hidrasyonunun her ikisi de, etanol kalitesini düşüren yüksek miktarda istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır.

En yaygın etanol eldesi yöntemlerinden birinde, bir katalist olan fosforik asit, diatomize toprak ya da mangal kömürü gibi gözenekli bir yüzeye emdirilmektedir. Bu katalist ilk defa, 1947 yılında, geniş çaplı etanol üretimi amacıyla, Shell Oil Company tarafından kullanılmıştır (Lodgson, 1994).

Etanol eldesindeki diğer bir yöntem ise, asetaldehitin (CH_3CHO) indirgenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Asetilen kullanılarak elde edilen asetaldehit, 100-130 °C sıcaklıkta nikel katalizörlüğünde hidrojenlenerek etanole indirgenmektedir.

Sentetik olarak etilenden etanol üretimi mümkün olmasına rağmen özellikle gıda ve ilaç sanayinde fermentasyon ürünü alkol kullanma zorunluluğu vardır. Çünkü sentetik alkolde insan sağlığına zararlı yan ürünler, reaksiyona girmemiş çıkış maddeleri ve içerdiği safsızlıklar bulunabilmektedir.

2.2.2. Biyolojik Etanol Üretimi

Etanol fermantasyonu, üzerinde en çok çalışılan biyoteknolojik uygulamalardan biridir. Antik devirlerde ve hatta ilk kültür çağlarında bile insanların dikkatini çekmiştir. Bu olay, ilk olarak Lavoisier'in 18. yüzyılın sonlarına doğru, şekerin fermantasyonu sırasında etanol ve karbondioksitin oluştuğunu ve Gay-Lussac'ın (1815) ilk defa $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ şeklindeki fermantasyon formülünü ortaya koymasıyla anlaşılmaya başlanmıştır.

Yukarıdaki genel formüle göre 100 kg glukozdan 51.142 kg (~64.444 litre), 100 kg sakkarozdan hidrolizle oluşan 2 molekül glukozdan 53.833 kg (~67.834 litre) ve 100 kg nişastadan 56.824 kg (~71.604 litre) % 100' lük etanol oluştuğu teorik olarak hesaplanmıştır (Güven, 2007). Ancak, kullanılan mikroorganizmanın, hammaddenin bileşiminin ve fermantasyon koşullarının, fermantasyon sırasında oluşan yan ürünlerin çeşidi ve miktarı üzerinde rol oynadığı anlaşılmıştır.

Patatesin sahip olduğu zengin içerik sayesinde, patates işleme atık suyu hidrolizatı ile hazırlanmış besiyerinin, etanol üretimi açısından verimli olabilecek bir kaynaktır. Her 100 g patates yumrusu 76-82 kalori içerir. Bunun yanı sıra patates; protein, yağ, lif, kül, karbonhidrat ve yüksek oranda su içermektedir. Karbonhidratlar, toplam ağırlığın % 17-19'u kadardır. Patatesin karbonhidrat içeriği çok çeşitli olmakla birlikte önemli bir kısmını glukoz, sükroz, fruktoz ve galaktoz oluşturmaktadır. Patates ayrıca çok çeşitli mineralleri de (Ca, P, Fe, Na, K, Mg, Cu, S, Cl, Mn, Zn) barındırmaktadır. Patateste bulunan vitaminler ise β -karoten, tiamin, riboflavin, niasin, vitamin C ve askorbik asittir. Patatesin amino asit kompozisyonu (arjinin, histidin, lizin, triptofan, fenilalanin vb.) ise oldukça çeşitlidir. Diğer bazı azot kaynakları allantion, hipoksantin, kadaverin vb.'dir. Patates ayrıca fenol oksidaz denen bir fenolaz taşımaktadır. Bu sayede fenolleri okside etmektedir. Tüm bunların yanı sıra patates, birçok çeşit organik asidi de (oleik, linoleik, folik, palmitik vb. asitler) bünyesinde bulundurmaktadır. Tanninler ise süberize olmuş patates dokusunda yüksek miktarda bulunmaktadırlar (CSIR, 1948–1976).

Mikroorganizmalardan etanol üretiminde, kesikli, yarı-kesikli ve sürekli olmak üzere 3 yöntem kullanılmaktadır. Kesikli yöntemde, fermentör besin ortamı ile doldurulup uygun mikroorganizmalar ile inoküle edildikten sonra, uygun koşullarda

tutularak fermantasyon tamamlanınca fermentör boşaltılıp, temizlenmekte ve sterilize edilerek yeni bir fermantasyon işlemi için hazır duruma getirilmektedir. Kesikli yöntemde, mikroorganizmaların gelişmesi, lag faz, logaritmik faz, duraklama fazı ve ölme fazı adı verilen 4 aşamada izlenmektedir. Yarı kesikli yöntemde, fermantasyon ortamına yavaş yavaş taze besiyeri ilave edilerek oluşan ürünler belirli aralıklarla fermentörden alınmaktadır. Sürekli yöntemde ise, kültür koşulları ve substrat konsantrasyonu sabit tutularak, mikroorganizmanın sürekli olarak logaritmik fazda bulunmasına çalışılmaktadır. Kısa aralıklarla mikroorganizmanın yeni bir besiyerine aktarılması ve öte tarafta da aynı miktarda mikroorganizma süspansiyonunun alınması ile bu koşulların sağlandığı bilinmektedir.

Karbon içeren besin maddeleri, mikroorganizmalar tarafından hem karbon hem de enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Anaerobik mikroorganizmalar karbon kaynağının % 10'unu, aerobik mikroorganizmalar ise karbon kaynağının % 50-55'ini çoğalmak için kullanırlar. Endüstride alkolik fermantasyonda başlangıç maddesi olarak saf glukoz kullanılmaz. Bunun yerine melas (şeker rafinasyonu artığı) veya nişastalı ürünler (patates, çavdar, buğday, arpa) kullanılmaktadır.

Fermentasyon teknolojisinde, daha yüksek verim elde edilmesi, fermentasyon işleminin daha ekonomik olması ve çevre kirliliğine neden olmaması için kullanılacak mikroorganizmaların belli özelliklere sahip olması gerekmektedir (Çizelge 2.3). Bu mikroorganizmalar, çok sayıda substrat üzerinden alkolik fermentasyon yapabilmeli, yüksek oranda etanol verimi sağlamalı, etanol toleransı yüksek olmalı, ortamdaki inhibitörlere karşı dirençli olmalı, oksijen gereksinimi olmamalı, kontaminasyondan arınmış olmalı, fermentasyon ortamından kolayca ayrılabilmesi, genetik değişikliğe dirençli olmalı, yüksek karbon-biyokütle dönüşümü sağlamalı, geniş pH aralığında üreyebilmeli, oluşturduğu son ürünler zehirleyici olmamalı, bitki, hayvan ve insanlar üzerinde patojen etkisinin bulunmalıdır. Ayrıca bir suшта istenen diğer özellikler ise, yüksek şeker tüketim oranı ve üretkenliğe sahip olması, düşük besin maddesi gereksinimi, yüksek tuz toleransı, ısı direçliliği ve spor oluşturmamasıdır (Picataggio et al., 1996).

Değişik organizmalardan, etanol üretimi için yeni suşlar geliştirme yöntemi sıklıkla denenmektedir. Çeşitli denemeler yapılmasına rağmen, tüm bu özelliklere sahip olan tek bir mikroorganizma henüz geliştirilememiştir.

Çizelge 2.3: Etanol üretim süreçlerinde sağlanması gereken önemli özellikler (Dien et al., 2003).

Özellik	Gereksinim
Etanol verimi	> % 90 (teorik olarak)
Etanol toleransı	> 40 g l ⁻¹
Etanol üretimi	> 1 g l ⁻¹ h ⁻¹
Basit büyüme gereksinimleri	Ucuz büyüme ortamı formülasyonu
Seyreltilmemiş hidrolizat da büyüyebilme	İnhibitörlere direçlilik
Kültür büyüme koşullarının kontaminasyonu engellemesi	Asidik pH ya da yüksek sıcaklık

Bakteriler (Çizelge 2.4), funguslar ve mayalar (Çizelge 2.5) fermentasyon sürecinde kullanılabilir olmasına rağmen en yaygın kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Çeşitli tarımsal atıkların farklı mayalar ile etanole biyodönüşümü gerçekleştirilmekle birlikte (Chandel et al., 2007) *Saccharomyces* insan sağlığı için güvenli olarak tanımlandığından, alkollü içkilerin üretiminde ve ekmek yapımında kullanılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* fermentasyon sıvısında en fazla % 18 konsantrasyona kadar etanol üretebilir, bu nedenle etanol üretiminde sıklıkla ilk tercihtir. Teorik olarak 100 gram glukozdan 51.11 gram etanol ve 48.89 gram karbondioksit elde edilebilir olarak görülmektedir. Ancak pratikte mikroorganizma glukoz kaynağını büyüme için kullanılmakta ve gerçek verim % 100'den daha az olmaktadır.

Saccharomyces cerevisiae, fermentasyon için bilinen, temel ve istenen özelliklere sahiptir. Fakat esas dezavantajı sınırlı substrat kullanım yelpazesine sahip olması özellikle de ksilozu fermente edememesidir (Çizelge 2.6). Bu durum odunsuların fermente edilmesinde ciddi bir olumsuzluk olarak görülmektedir. Ksiloz fermente edebilen mikroorganizmalar *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* mayaları ve rekombinasyon uygulamalarında sıklıkla kullanılan *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Zymomonas mobilis* bakterileridir (Himmel et al., 1997; Krishnan ve ark, 1997).

Çizelge 2.4: Etanol üreticisi bakteri türleri (Miyamoto, 1997; Ingram et al., 1999; Dien et al., 2003; Matthew et al., 2005).

Etanol fermentasyonu yapan mikroorganizmalar	Litrede 180 gr şeker varlığındaki etanol verimi (g/L)
<i>Clostridium sporogenes</i>	45-50
<i>Clostridium idioli</i>	85
<i>Clostridium spenoidis</i>	80
<i>Clostridium soredelli</i>	75
<i>Zymomonas mobilis</i>	82
<i>Zymomonas mobilis subsps. pomaceas</i>	75
<i>Spirochaeta aurantia</i>	65
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	37
<i>Spirochaeta litoralis</i>	42
<i>Erwinia amylovora</i>	50
<i>Escherichia coli KO11</i>	35
<i>Escherichia coli LY01</i>	40-50
<i>Leuconostoc mesentroides</i>	40
<i>Streptococcus lactis</i>	44
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40
<i>Klebsiella aerogenes</i>	24

Çizelge 2.5: Etanol üreticisi bazı maya türleri ve litrede ürettikleri etanol miktarları. (Janssens et al., 1983; Ghaly ve El-Taweel, 1997; Canbas, 2003; Silveira et al., 2005).

Etanol fermentasyonu yapan mikroorganizmalar	Ürettikleri etanol miktarı (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	103
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	72-86
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	75-80
<i>Candida pseudotropicalis</i>	58

Çizelge 2.6: Etanol üretiminde kullanılan yabancı suşların kültür özellikleri. *Ara*, arabinoz; *Gal*, galaktoz; *Glc*, glukoz; *Man*, mannoz; *Xyl*, xylose (Dien et al., 2003).

Host	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	T (°C) ^a	pH ^a
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	35	6.5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	+	30	5.5
<i>Zymomonas mobilis</i>	+	-	+	-	+	30	5.5

^aTek şeker fermente edici kültürün büyüme koşulları.

En iyi yabancı etanol üreticisi bakterinin *Zymomonas mobilis* olduğu, yüksek derişimlerdeki glukozu hem kesikli hem de sürekli fermentasyonla etanola dönüştürebildiği açıklanmıştır. *Z. mobilis*'in, etanolun yanında, düşük oranlarda gliserin, süksinat, laktat, aseton ve bütandiol de ürettiği belirlenmiştir (Güven ve Güneser, 2007). *Zymomonas mobilis* Gram-negatif bir mikroorganizmadır. Homoetanol fermentasyon yolizine sahiptir ve litrede 120 grama kadar etanol toleransına sahiptir. *Saccharomyces* türlerine kıyasla daha yüksek etanol verimine (fermente edilen glukoz başına % 5-10 daha fazla) ve çok daha fazla etanol üretkenliğine (2,5 kat) sahiptir (Sprenger, 1996). Ayrıca, *Z. mobilis* insan sağlığı için uygun olmakla birlikte basit besin maddelerine gereksinim duyar. Bu avantajlarına rağmen, etanol üreticisi olarak *Z. mobilis* sadece glukoz, fruktoz ve sükrozu fermente edebildiği için tüm biyokütle kaynaklarının dönüşümünde uygun değildir (Swings ve DeLey, 1977).

Fermentasyon yapan mikroorganizmaların iyileştirme çalışmaları yapılmaktadır. Genetik mühendisliği ile heksozlar kadar pentozları da aynı anda etanola dönüştürebilen mikroorganizmaların geliştirilmesi etanol üretim etkinliğini arttırabileceği gibi üretim maliyetlerini de düşürebilmektedir (Sun ve Cheng, 2002). Ayrıca, mayalar (*Saccharomyces* and *Pichia* türleri gibi) ve bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella* ve *Zymomonas* gibi) glukoz, fruktoz ve arabinozu aynı anda fermente edebilecek şekilde genetik olarak düzenlenmişler (Ingram et al., 1999; Nigam, 2001). Yeni teknolojiler, biyoetanol üretimini geliştirmesine rağmen, henüz aydınlatılmamış birçok problem bulunmaktadır. Temel problem recombinant mikroorganizmaların ticari ölçekteki fermentasyon süreci boyunca etanol üretim performanslarının sabit kalmamasıdır (Chan et al., 2004).

2.2.3. Fermantasyon Sürecinde Kullanılabilir Hammaddeler

Yakıt tüketiminde etanol kullanımının yaygınlaşmasındaki başlıca engel, benzin ile arasındaki fiyat farkıdır. Toplam üretim maliyetlerinin büyük bir bölümü hammadde maliyeti olduğundan, ucuz hammadde seçimi etanolun toplam üretim masraflarının oldukça düşmesini sağlayacaktır (Wyman, 1996; Andersso et al., 2006). Etanolun selülozik hammaddeden üretilmesine yönelik büyük bir ilgi vardır.

Ancak, bu gibi düşük maliyetli hammaddeler yüksek maliyette ön işleme gereksinim duyarlar. Bu nedenle hammaddeye uygulanacak olan ön işlemin de geliştirilip daha ucuz bir hale getirilmesi gerekmektedir.

Etanol fermentasyonunda kullanılabilir hammaddeler üç kategoride sınıflandırılabilirler: Şekerli olanlar, nişasta temelliler ve selülozik biyokütleler (Çizelge 2.7). Bazı şekerler doğrudan etanol üretiminde kullanılabilceği gibi, diğer bazıları fermentasyon sürecinde kullanılacak mikroorganizmanın türüne göre ön işlem gerektirebilmektedir.

Çizelge 2.7: Etanolun fermentatif üretimi için başlıca kaynaklar.

Şekerler	Nişastalı ürünler	Selülozik ürünler
Şeker kamışı	Tahıllar	Odun
Şeker pancarı	Patates	Tarımsal atıklar
Melas	Köklü sebzeler	Kentsel atıklar
Meyveler		Atık kağıtlar
		Tahıl atıkları

Hammadde seçimini etkileyen faktörler şunlardır (Cowling ve Kirk, 1976):

- Ucuz ve bir yıl boyunca ulaşılabilir tutarlı kalitede olmalı,
- Taşıma ve depolama maliyetleri uygun olmalı,
- Sterilizasyonu kolay olmalı ve denaturasyon problemine yol açmamalı,
- Oluşan ürünün kalitesi ve ürün dönüşüm oranı yüksek olmalı,
- Safsızlıkların miktarı ve çeşidi mümkün olduğunca az olmalı,
- Genel olarak sağlıklı olmalı ve güvenlik sorunu yaratmamalıdır.

Etanol üretim maliyeti, kullanılan hammaddenin maliyetine ve işletme ölçeğine bağlıdır. Lignoselülozik çok yıllık otsu bitkiler, yüksek verimleri, ucuzluğu, verimsiz arazilere uygun olmaları nedeniyle umut vaat edici hammadde kaynaklarıdır.

2.2.3.1. Şekerli Materyaller

Fermentasyon süreci, karbon kaynağı olarak fermente edilebilir şekerlerin kullanılması ve bu sayede mikroorganizmaların katalizi sonucu etanol ve diğer yan ürünlerin elde edilmesine dayanmaktadır. Bu mikroorganizmalar tipik olarak 6-karbonlu şekerleri -özellikle de glukozu- kullanabilirler. Bu nedenle, glukozu veya glukoz öncülerini yüksek oranda içeren biyokütle materyalinin etanole dönüştürülmesi, en kolay süreçtir. Böyle hammadde örneklerinden biri şeker kamışı (melas)'dır. Şekerler (sakkaritler) açısından zengin başka bir hammadde ise şeker pancarı, tatlı manyok ve bazı meyvelerdir. Ancak tüm bu kaynaklar, aynı zamanda insanın besin zincirinin öğeleri olduğundan etanol üretimi amacıyla kullanılmaları çok pahalıdır. Gıda maddeleri yerine onların işleme atıklarının etanol üretimi için kullanılması ise, oldukça umut vaat edici bir potansiyele sahiptir.

Yaygın olarak kullanılan diğer şeker kaynaklarından birisi de sakkaroz bazlı, yenilenebilir, doğal ve bol miktarda bulunan melastır. Melas, şeker üretiminde şuruplardan kristal şeker alındıktan sonra geriye kalan ana şuruptur. Melasın % 45-50'sini toplam şeker (sakkaroz) oluşturur. Ancak, etanol üretiminde kullanılan melasta bulunan ve mikroorganizma gelişimi için gerekli olan metal iyonlarının (Na^+ , Zn^{++} , Mn^{++}) ortamda gereğinden fazla bulunması, zaman zaman mikroorganizma üzerinde toksik etki yaratmaktadır (Soares et al., 2003).

2.2.3.2. Lignoselülozik Materyaller

Lignoselülozik materyaller, güneş enerjisi ile karbondioksitin fotosentetik reaksiyonu sonucu, sürekli yenilenen ve bol miktarda bulunan karbon kaynaklarıdır (Parikka, 2004). Bu materyaller enerji, gıda ve kimyasalların üretimi için gelecek vaat eden hammaddelerdir (Solomon et al., 1999; Kim ve Dale, 2004). Çünkü tarımsal atıkların, hatta tüm lignoselülozik materyallerin, örneğin etanol, sirke ve tek hücre proteini gibi, ticari ilgi odağı ürünlere dönüşümü gerçekleştirilebilir (Hood, 2004; Das ve Singh, 2004).

Lignoselülozik materyaller çeşitli oranlardaki üç ana polimerik bileşikten oluşmuşlardır; bunlar selüloz, hemiselüloz ve lignindir (Lynd et al., 2005) (Çizelge

2.8). Selülozik biyokütlenin kuru ağırlığının ortalama % 45'i selüloz, % 30'u hemiselüloz ve % 25'i lignindir. Fermentasyon için genellikle selülozik biyokütle seyreltik sülfürik asitle muamele edilerek şekerleri içeren bir likör yapılmaktadır. Bu şekilde, içindeki şekerlerin ortaya çıkması ve biyoetanol üretimi için daha iyi bir verim elde edilmesi sağlanmaktadır. Selüloz, glukoz monomerlerinden oluşmaktadır. Hemiselüloz ise şekerlerin heterojen zincirlerinden oluşmaktadır. Hemiselülozdan elde edilen likörün şeker kompozisyonu, % 13 glukoz, % 62 ksiloz, % 11 arabinoz ve eşit miktarda sellobioz, galaktoz ve mannozdu (Mohagheghi et al., 2006). Ligninin hidrolizinden meydana gelen lignol ise fermente edilemez. Glukoz, genellikle mikroorganizmalar için tercih edilen karbon kaynağıdır. Diğer şekerler ise daha yavaşça fermente edilmektedir. Ayrıca birçok mikroorganizma, ksiloz ve arabinoz gibi pentoz şekerleri fermente edemez. Lignoselülozik materyallerin biyodönüşümleri son yıllarda büyük ilgi çekmektedir (Ragauskas et al., 2006). Küresel bitki biyokütlesi üretiminin % 90'ı lignoselülozdu ve yaklaşık 200×10^9 ton/yıl ile potansiyel olarak erişilebilir birincil biyokütledir (Berndesa et al., 2003).

Çizelge 2.8: Tarımsal ve lignoselülozik atıkların kompozisyonları (% w/w) (Cheung ve Anderson, 1997; Boopathy et al., 1998; Dewes ve Hunsche, 1998).

Substratlar	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin
Küspe	33	30	29
Arpa samanı	40	20	15
Mısır kocaı	42	39	14
Mısır sapı	35	15	19
Yulaf samanı	41	16	11
Çam	41	10	27
Pirinç samanı	32	24	13
Pirinç kabuğu	36	15	19
Manyok samanı	33	18	15
Buğday samanı	30	24	18
Sert ağaç gövdesi	40-55	34-40	18-25
Otsu bitki gövdesi	45-50	25-35	25-35
Çimenler	25-40	35-50	10-30
Atık kağıt	85-99	0	0-15
Gazete	40-55	25-40	18-30
Katı sığır gübresi	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Dallı darı	45	31.4	12.0

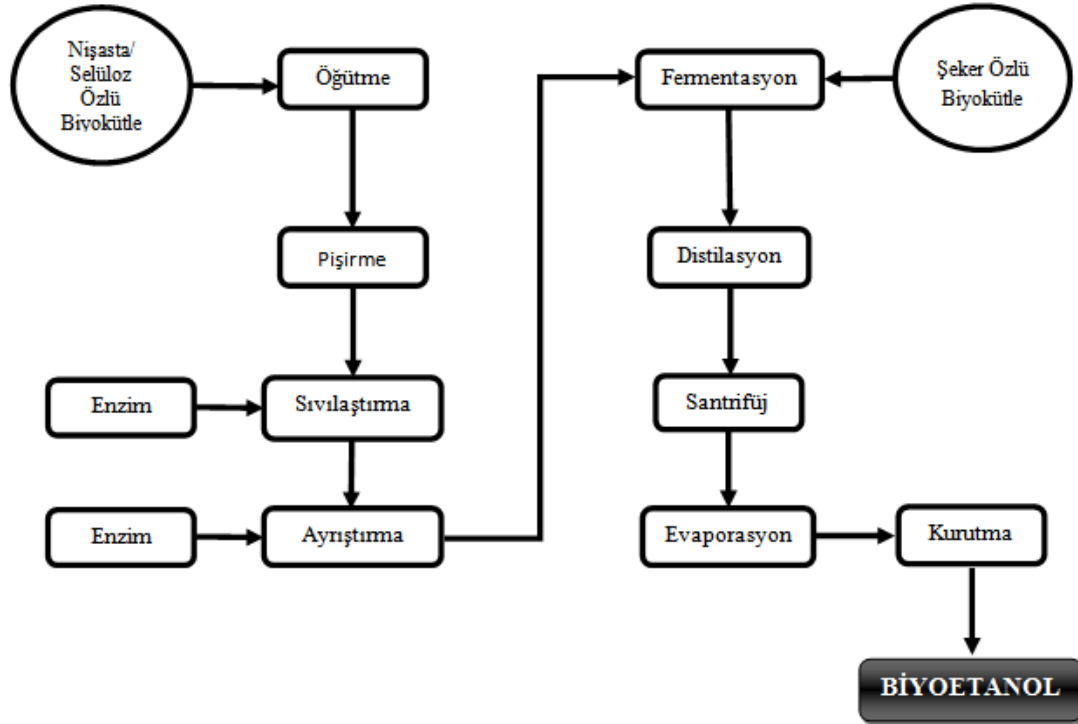
Günümüzdeki çalışmalar genellikle doğal, ucuz ve bol olarak bulunan bir polimer olan lignoselüloz içeren atıklardan etanol üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte atıklarda en önemli nokta tüm karbonhidrat bileşiklerinin kullanılması ve sonuçta yüksek verimde glukoz ve hemiselülozik şekerlerin elde edilmesidir.

D-ksiloz doğada en çok rastlanan pentoz şekerlerinden birisidir. Sert odunlar ve tarımsal atıkların sahip olduğu hemisellüloz şekerler arasında en önemli olanıdır ve bazı bitkilerin kuru biyokütle ağırlığının % 25'ine kadar ulaşmaktadır (Kadam ve Newman, 1997). Bitki dokularında D-ksiloz genellikle ksilan formunda bulunur ve kimyasal veya enzimatik işlemlerle lignin kısmından kolaylıkla ayrılarak monomerik birimlerine dönüşebilir. D-ksilozun doğada bulunurluğu ve saflaştırılmasındaki kolaylık, ona diğer yararlı kimyasalların üretiminde kullanılmasında önemli bir potansiyel kazandırmaktadır. D-ksilozu etanole çevirebilen mayaların daha önceleri atık olarak görülen hemisellüloz hidrolizatlarının etanol üretiminde kullanılmasını sağlamıştır (Maleszka et al., 1982; Slilinger et al., 1982; Gong et al., 1983; Schneider et al., 1983; Delgenes et al., 1996).

2.2.3.3. Nişastalı Materyaller

Diğer bir etanol hammaddesi potansiyelindeki bitkisel materyal ise nişastadır. Nişasta molekülleri uzun zincirli glukoz monomerlerinden oluşmuştur. Etanol üretimi için dünyada yaygın olarak kullanılan nişastalı hammaddelere örnek olarak tahıllar, patates, tatlı patates ve manyok verilebilir. Etanol üretiminde kullanılan başlıca tahıl çeşitleri ise manyok, darı, arpa ve buğdaydır.

Nişastalı hammaddeler fermente edilebilir şekerlerin arasındaki bağların kırılması için hidrolizleme işlemine gereksinim duymaktadırlar (sakkarafikasyon) (Şekil 2.4). Nişastanın su ile bulamaç haline getirilmesi ardından ısıtılıp karıştırılması ile hidroliz süreci başlamaktadır. Nişasta hidrolizinde kullanılan özgül enzim olan amilaz ısıtma sürecinin değişik evrelerinde şekerler arasındaki kimyasal bağı kırmaktadır.



Şekil 2.4: Değişik hammaddelerden biyoetanol üretiminin aşamaları (Anonim, 2010).

Toplam etanol üretim maliyetinin % 50'sinden fazlasını hammadde masrafları oluşturduğu için, günümüzde ucuz ve bol bulunabilen hammadde kaynaklarından daha verimli alkol elde edilmesine yönelik çabalar artarak devam etmektedir. Değişik formlarda biyokütle kaynağı olmakla birlikte, selülozik biyokütle dünyada bol ve yaygın biçimde bulunmaktadır. Tarım atıkları, kentsel katı atıklar, kağıt hamuru atıkları, dallı darı, kesilmiş çimenler ve diğer bahçe atıkları (Çizelge 2.9) bu amaçla kullanılabilir lignoselülozik maddelerdendir (Pasha et al.; 2007).

Mevcut teknoloji ile 1 litre biyoetanol için 2.5 kg buğday kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle biyoetanol üretiminin artırılabilmesi için hammadde üretim miktarlarının artırılması gerekmektedir. Dünya etanol üretiminin büyük bölümü mısır, şeker kamışı ya da şeker pancarı kökenli şekerden elde edilmekle birlikte, etanol üretiminde kullanılan tarım ürünleri, ülkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, Brezilya'da şeker kamışı kullanılırken, ABD'de mısır, Çin'de mısır ve buğday, Hindistan'da şeker kamışı, Fransa'da şeker pancarı, mısır ve buğday, Tayland'da ise kasava ve pirinç kullanılmaktadır.

Çizelge 2.9: Etanol üretiminde kullanılabilir substratlar ve içerikleri (Güven ve Güneser, 2007).

Karbonhidrat	Hammadde	Hidroliz Ürünleri
Selüloz	Tarımsal atıklar	Glukoz
	Şehirsal atıklar	Mannoz
	Odun	Galaktoz
	Odun atıkları	Arabinoz, ksiloz
Laktoz	Peynir altı suyu	Glukoz
	Kesik süt	Galaktoz
Nişasta	Kasava	Glukoz
	Mısır	Maltoz
	Patates	Dekstrin
	Sago	
Sakkaroz	Şeker pancarı	Glukoz
	Şeker kamışı	Fruktoz
	Melas	

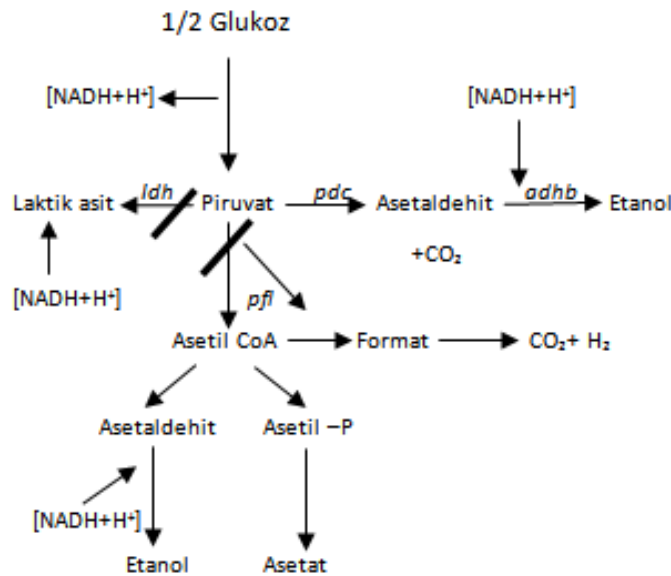
Etanol fermentasyonunda, Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı ülkeler hammadde olarak çoğunlukla nişastalı tarım ürünleri ve selülozlu artıklardan yararlanırken ülkemizde bu amaçla genellikle melas ve kuru üzüm kullanılmaktadır. Bunların dışında pancar, sülfite şurubu ve çeşitli meyveler de alkol üretiminde kullanılabilen önemli hammaddeler arasında yer almaktadır. Endüstriyel etanol üretimi açısından pancar ve kamış melaslarının bol bulunması ve ucuz hammaddeler olmaları nedeniyle daha avantajlı olduğu ve bu nedenle yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Güven, 2007).

Gıda olarak tüketilen tarımsal biyokütlelerin yanı sıra, biyoetanol üretimi için değişik kaynaklar da kullanılabilir; çöpler, şehir atıkları, kullanılmış kağıtlar, tarımsal ve orman atıkları gibi kaynaklar örnek verilebilir. Bunlar arasında tarımsal atıklar miktar ve ucuzluk açısından günümüzde üzerinde en çok çalışma yapılan biyolojik kaynaklardır.

2.2.4. Rekombinant Soylar İle Biyoetanol Üretiminin Arttırılması

Biyoetanol üretimi için, tarımsal biyokütlenin içerdiği şekerlerin karışımını fermente edebilen bir mikroorganizma gereklidir. Mikroorganizmalar arasında *E. coli*

geniş spektrumlu şekerleri metabolize edebilmesine rağmen, diğer şekerlere göre glukozu tercih etmektedir. Etanol üretiminde, *E. coli*'nin metabolik mühendisliği için çabalar, etanol üretimi için karbon kaybına neden olan doğal fermentasyon yollarının susturulması yönündedir. Böyle yollarından birinde piruvat laktata, laktat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla çevirilmektedir. Bir çalışmada, *E. coli* NZN111 suşu, *Idh* (laktat dehidrogenaz) ve *pfl* (piruvat format liaz) genlerinin içine homolog rekombinasyonla antibiyotik direnç genlerinin eklenerek susturulması ile elde edilmiştir (Dien et al., 2000). Bu suş, glikolizisten oluşan NADH dengesi için, piruvattan NAD^+ 'yi elde edemediği ve bunun sonucu olarak da anaerobik üremeyi sürdüremediği görülmüştür (Şekil 2.5). Anaerobik olarak NZN111 suşu'nun üreyebilmesi, bu suşun *lac* promotorunun kontrol ettiği *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli *pdC* (piruvat dekarboksilaz) ve *adhB* (alkol dehidrogenaz II) genlerini taşıyan pLOI297 plazmidi ile transformasyonu sonucu sağlanmıştır. *E. coli* NZN111:pLOI297 suşu FBR5 suşu olarak ifade edilmiştir (Dien et al., 2000).



Şekil 2.5. *E. coli*'de glukozdan etanol üretimi.

Lignoselülozik materyallerden etanol üretiminin ticari boyutlarda sürdürülmesindeki en büyük teknik engel hidrolizatta yer alan pentoz şekerlerin sıklıkla yabancı mikroorganizmalarca (örneğin *Saccharomyces cerevisiae* ve

Zymomonas mobilis) fermente edilerek etanole dönüştürülemezdir. Geçtiğimiz birkaç yılda, araştırmacılar etkin bir şekilde pentoz şekerleri fermente edebilen, böylelikle biyokütleden etanol üretebilecek rekombinant bakteri ve mayaları geliştirmek için çalışmaktadırlar (Bothast et al., 1996; McMillan, 1996). Geliştirilen bu mikroorganizmaların en önemlilerinden biri karışık şekerler üzerinde etanol fermentasyonu yapabilen *Escherichia coli* K011 etanolojenik suşudur (Ohta, et al., 1991). Bu suş glukoz, ksiloz ve arabinozu iyi bir verim ve üretkenlik ile etanole dönüştürebilmektedir (Hahn-Hagerdal et al., 1994). Ayrıca hidrolizatta bulunan inhibitörlere toleransı da yüksektir (Dien et al., 1996). Tüm bunların yanında büyük hacimli fermentör (kesikli ya da sürekli) koşullarında fenotipik olarak kararsız olması bu suşun dezavantajı olarak öne çıkmaktadır (Lawford et al., 1995; Lawford et al., 1996).

2.3. Bakteriyel Hemoglobin

Uzun yıllar sadece ökaryotik organizmalara ait olduğu düşünülen oksijen bağlama ve taşıma özelliğindeki hemoglobin ve miyoglobin gibi proteinlerin ilk defa 1986 yılında Webster ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucunda prokaryotik organizmalarda da olduğu gösterilmiştir (Wakabayashi et al., 1986). Bu çalışmadan önce, aerobik solunumda yer alan bu protein, sitokrom *o*-terminal oksidaz olarak isimlendirilmiş fakat daha sonra periplazmik bölgede eriyik halde bulunması ayrıca, ökaryotik hemoglobinler ile spektral yapısı, oksijen bağlama kinetiği ve aminoasit dizilimindeki % 25'e varan benzerlik ile hemoglobin olduğu kanıtlanmıştır (Wakabayashi et al., 1986). Daha sonraki çalışmalarda ise bu protein “bakteriyel hemoglobin” ya da “*Vitreoscilla* hemoglobini” olarak anılmıştır.

Vitreoscilla hemoglobini (VHb) ilk keşfedilen hemoglobin olmasının yanı sıra karakterizasyonu en iyi yapılmış bakteriyel hemoglobindir. Bu protein, mor fotosentetik bir bakteri olan *Vitreoscilla* tarafından doğal olarak sentezlenmektedir. *Vitreoscilla* Gram-negatif, zorunlu aerob bir bakteri olmasına rağmen, hipoksik koşullardaki yaşama adapte olmuştur (Çizelge 2.10) (Pringsheim, 1951). Yapılan çalışmalarda, atmosferik oksijen seviyesindeki bir ortamdan hipoksik ortama alınan

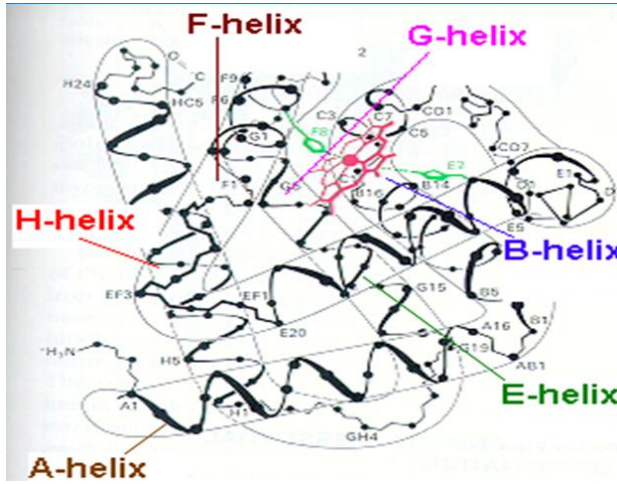
Vitreoscilla ve *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin geni) taşıyan *E. coli* hücrelerindeki VHb ekspresyonununun 50 kat arttığı belirlenmiştir (Khosla ve Bailey, 1988).

Vitreoscilla'da hemoglobin geninin tek bir kopya halinde bulunduğu, regülatör ve kodlama yapmayan bölgelerinin ise 600 baz çifti uzunluğunda olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Khosla ve Bailey, 1988). VHb sitoplazmik ve periplazmik bölgede yoğunlaşan, homodimer (iki özdeş alt ünite) yapısı gösteren bir proteindir ve her bir alt ünite 146 aminoasitten oluşmuştur (Wakabayashi et al., 1986). Her alt ünite bir adet hem grubu (Fe^{2+}) içermektedir. Hem grubundaki demir ökaryotik hemoglobinlerde olduğu gibi ferrus (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) olmak üzere iki farklı formda bulunabilmektedir. Bu iki formdan sadece ferrus (Fe^{2+}) oksijen bağlama yetkinliğindedir (Kroneck et al., 1991).

Çizelge 2.10: *Vitreoscilla*'nın taksonomik konumu (Woese et al., 1984).

Domain	Bacteria
Şube	Proteobakteria
Sınıf	Betaproteobacteria
Ordo	Neisseriales
Aile	Neisseriaceae
Grup	Chromobacterium
Cins	<i>Vitreoscilla</i>

Evrimsel olarak bütün hemoglobinlerde, hem demirine bağlı proksimal histidin (F8) ve distal histidin (E7) korunmuştur. Ancak VHb'de distal hem cebinde distal histidin yerine glutamin yer alır. Kristal yapı çalışmalarında (Şekil 2.6) bu glutaminin hem cebinin dışında yer aldığı ve bu distal hem cebinin içerisinde bağlı oksijeni stabilize edemediği görülmüştür (Lee et al., 2004). Bu da VHb'nin oksijen bağlama sabitesinin (K_{on}) öteki hemoglobinler ile benzer olmasına rağmen, oksijen ayrıştırma sabitesinin (K_{off}) diğer hemoglobinlerden çok daha yüksek olmasına neden olmuştur (Çizelge 2.11).



Şekil 2.6: Vhb'nin kristal yapısı (Lee et al., 2004).

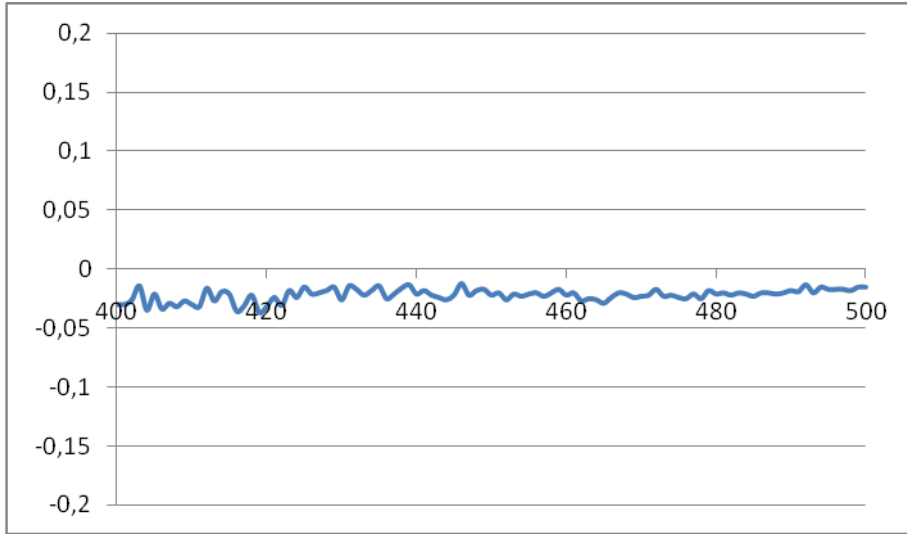
Çizelge 2.11: Vhb ve diğer hemoglobin moleküllerinin oksijenle reaksiyonlarında kinetik ve denge sabitlerinin karşılaştırılması, K_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), K_{off} (s^{-1}).

Protein	K_{on}	K_{off}	K_D (nM)
Balina miyoglobini	19	10	526
<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini (Vhb)	78	5600	6000
Soya fasülyesi Leg hemoglobin a	120	5.6	47
Çavdar hemoglobini	9.5	0.027	2.86
<i>Arabidopsis</i> AHb1	75	0.12	1.6
<i>Arabidopsis</i> AHb2	1.07	0.14	130

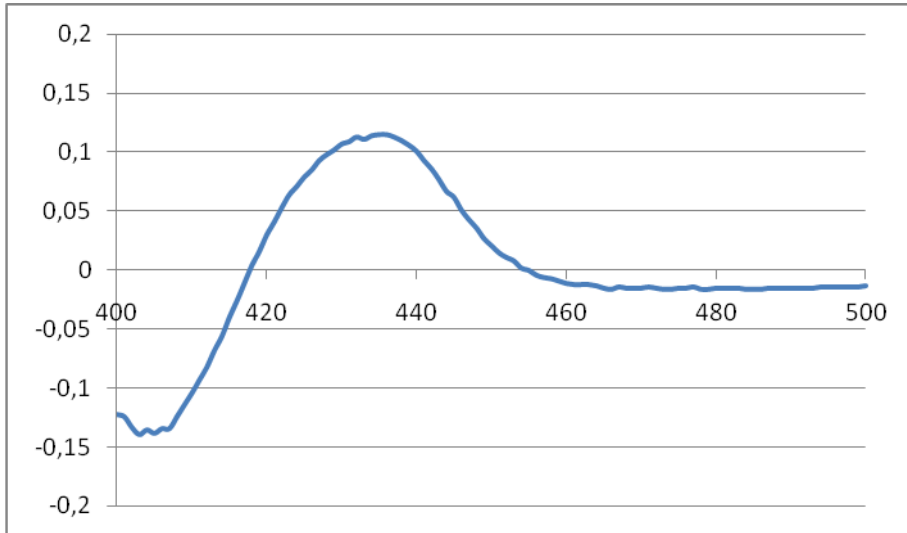
Vhb protohem IX içerir ve oksijen ile geri dönüşümlü bir biçimde bağlanır. Vhb, karbon monoksit (CO) ile indirgenğinde, sitokrom *o* 'ya benzer bir şekilde 419 ile 439 nm aralığında absorpsiyon gösterir. Kimyasal olarak ise, ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ile indirgenir ve 416 ile 430 nm aralığında absorpsiyon piki verir (Şekil 2.7).

Vgb oksijenle düzenlenmekte, mikroaerofilik şartlarda maksimum derecede uyarılmakta ve Vhb'nin hücre içi konsantrasyonu 40-50 kat yükselmektedir (Dikshit ve Webster, 1988; Chen et al., 1994; Geckil et al., 2004). Özellikle düşük oksijen içeren ortamlarda, Vhb'nin ortamdaki oksijen değişimlerine karşı bir tampon görevi görerek hücrelerin metabolik aktivitelerini düzenlediği, onların büyüme ve çoğalmasında önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Wei et al., 1998; Geckil et al., 2001).

A)



B)



Şekil 2.7: *E. coli* FBR5 (A) ve *vgb* içeren *E. coli* TS4 (B) suşlarına ait hücre homojenatlarında Vhb'nin ditiyonit ile indirgenmesi. A. Hemoglobini içermeyen FBR5 suşunda ditiyonit indirgenmesi sonucu absorpsiyon piki oluşmaması, B. TS4 suşunda Vhb'nin ditiyonit indirgenmesi sonucu oluşan absorpsiyon piki.

Vgb promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru (P_{vgb}) oksijene duyarlı bir promotordur. Promotorun oksijene duyarlılığı üzerinde taşıdığı ve global düzenleyici proteinlere, yani Fnr ve ArcA ve OxyR proteinlerine özgü dizilerden kaynaklanır (Şekil 2.8). *E. coli*'de *vgb* promotoru mikroaerobik koşullar altında (% 2 den daha az çözünmüş oksijen seviyelerinde) maksimum düzeyde indüklenirken (Kroneck et al., 1991). *E.*

aerogenes'de aynı şartlar altında böyle bir indüklenme olmadığı belirlenmiştir (Hart et al., 1994). Bu da *E. coli* ve *E. aerogenes* gibi iki birbirine yakın enterik bakteride bu genin farklı düzenlendiğini ve farklı düzenleyici mekanizmaların kullanıldığını ifade etmektedir. Ayrıca Fnr bakımından mutant *E. coli* hücrelerinin mikroaerobik koşullar altında *vgb* promotorunu aktive edemedikleri belirlenmiştir (Dikshit et al., 1992). Diğer çalışmalarda da *vgb*'nin oksijene duyarlı promotor aktivitesinin olduğunu ve genin proteinin, yani Vhb'nin, ifadesinin Fnr tarafından sağlandığı gösterilmiştir (Kiley ve Reznikoff 1991).

```

CGCTGGGG TTAAAAGTATTTGAGTTTTGA
*****
                                     OxyR Fnr
TG TGGATTAAGTTTTAAGAGGCAATAAAGATTATAATAA
*****
Fnr/ CRP/ ArcA           Fnr           Pribnow

GTGCTGCTACACCATACTGATGTATGGCAAACCATAAT
+1           inverted           repeat

```

Şekil 2.8: *vgb* promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri (Yang et al., 2005).

Bakterilerdeki ve diğer organizmalardaki aerobik solunum metabolizması oksijenin suya dönüşümü ile sonuçlanır. Ancak, oksijenin indirgenmesi bir, iki veya üç elektronun süperoksite ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşümü ile olur. *E. coli*'de bu oksidanlar öncelikle solunum zinciri bileşenlerinin otooksidasyonundan ortaya çıkar (Messner ve Imlay, 1999). Radyasyon, ışık, metaller ve oksidatif strese sebep olan birçok etken bu reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olabilirler. Mikroorganizmalarda oksijen duyarlılığının mekanizmasını açıklayan birçok model ortaya konmuştur. Süperoksit radikalleri ve H_2O_2 sıvı solüsyonlarda orta derecede reaktiflerdir. Ancak her ikisi de çok yüksek derecede reaktif olan $\cdot OH$ radikallerinin oluşumuna Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$) ve Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$) reaksiyonları ile neden olurlar. *E. coli*'nin de dahil olduğu bir çok bakteri sırasıyla $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'i

elimine eden süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerine sahiptir. Bu enzimler, bu reaktif oksijen türlerinin metal iyonları ile reaksiyona girip $\cdot\text{OH}$ üretmelerine engel olurlar (McCormick et al., 1998). Bakteri hücrelerinin bu radikallerin üretimi vasıtasıyla ölmeleri beklenir. Çünkü stresten sonra kontrolsüz metabolik aktiviteye sahip olurlar. Bu reaktif oksijen türlerinin içsel oluşumunun DNA'ya, proteinlere ve lipidlere (Aldsworth et al., 1999) zarar verdiği bilinmektedir.

OxyR; Lys R tip DNA bağlayan proteinlerdendir. Kendi ekspresyonu için negatif, hedef genler için pozitif regülasyonu vardır. Hidrojen peroksit ya da S-nitrosotiollere cevapta, OxyR transkripsiyon faktörü, hücreyi oksidatif strese ve nitrosatif strese karşı koruyan birçok genin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu nedenle, OxyR mutant *E. coli* bakterilerinin H_2O_2 'e oldukça duyarlı oldukları rapor edilmiştir (Storz ve Tartaglia, 1992).

VHb diğer tek hücreli hemoglobinlerdeki homologlarından daha büyük kimyasal reaktiviteye sahiptir. Bu özellik, redoks reaksiyonlarını katalizleme ve hücrenin oksidatif strese karşı koruyucu fonksiyonları ile ilişkili olabilmektedir (Frey ve Kallio, 2003; Kaur et al., 2002). VHb'nin oksijen depolama ve taşıma fonksiyonları yanında detoksifikasyon fonksiyonu da vardır (Minning et al., 1999). Yapılan bir araştırmada oksidatif stres koşullarında (dışarıdan H_2O_2 ilavesiyle) *vgb* içeren rekombinant *Enterobacter aerogenes* bakterisinin yabanıl tipe oranla çok daha fazla üreyebilme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (Geckil ve ark., 2003).

VHb proteininin endüstriyel kullanımı için araştırmalar henüz yenidir. Bugüne kadar aktarılmış olduğu tüm hücrelere (bakteriler, funguslar ve bitkiler) yüksek oksijen alım kabiliyeti kazandırması ve onların büyüme ve çoğalma karakteristiklerini arttırması bu proteinin oksijen gerektiren birçok biyoprosesse potansiyel kullanım alanı bulacağını göstermektedir (Khosravi et al., 1990; Farres ve Kallio, 2002; Geckil et al., 2004). Bu bağlamda, üretimleri belirli konsantrasyonda oksijen gerektiren bir takım metabolitlerin (bütandiol, asetoin ve etanol gibi) ve ikincil metabolitin (antibiyotik) VHb ekspresyonu yapan bakterilerde, yabanıl soylara göre önemli derecede fazla olduğu saptanmıştır (Geckil et al.; 2004). Başka bir çalışmada ise VHb'nin bazı mikroorganizmalarda DNT (dinitrotoluen) gibi aromatik bileşiklerin biyolojik olarak yıkımında oksijen gerekli olan basamaklara oksijen sağlayarak yıkımı hızlandırdığı belirlenmiştir (Nasr et al., 2001).

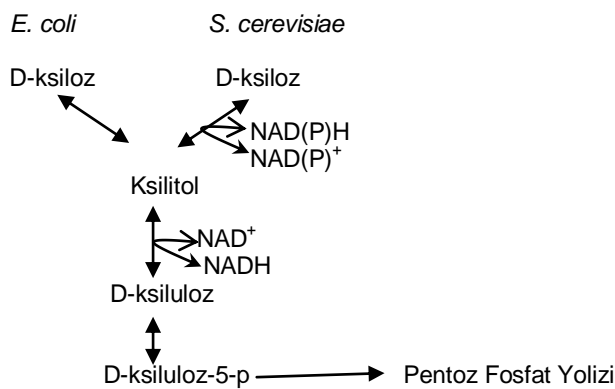
2.4. Biyoetanol Üretiminde Bakteriyel Hemoglobinin Rolü

Doğal olarak bulunduğu organizmada ve *vgb*'nin aktarıldığı rekombinant suşlarda VHb'nin mikroaerobik koşullarda oksijen bağladığı ve bunu solunum zincirindeki terminal oksidazlara aktardığı bilinmektedir. Böylece, oksijen sınırlı olduğunda aerobik büyümeye olanak sağlar (Webster 1987; Ramandeep et al., 2001; Park et al., 2002). VHb'nin konak organizmadaki ekspresyonunun bazı durumlarda oksijenaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Lin et al., 2003). Ayrıca VHb bakteriyel transkripsiyon faktörlerini de etkilemektedir (Anand et al., 2010). VHb ekspresyonunun, *Escherichia coli*'de yüzlerce genin ekspresyonunu pozitif ya da negatif yönde etkilediği gösterilmiştir (Roos et al., 2004). Yapılan çalışmalarda *vgb* klonlanan bakterilerde büyüme, çeşitli metabolit üretme özelliklerinin ve aromatik bileşiklerin yıkım oranının arttırıldığı görülmektedir (Nasr et al., 2001).

Önceki çalışmalarda, VHb eksprese eden *Serratia marcescens*' de % 2 kazein hidrolizat içeren ortamda asetoin ve 2.3 butandiol üretimi artmıştır (Wei et al.; 1998). Ayrıca, VHb eksprese eden *E. aerogenes*'de % 2 glukoz içeren besiyerinde asetoin ve 2.3 butandiol üretiminin arttığı gösterilmiştir (Geckil et al.; 2004). Bir diğer çalışmada, VHb *S. cerevisiae*'de eksprese edilmiş ve % 0.1 glukoz içeren besiyerinde, VHb eksprese etmeyene göre artmış etanol üretimi belirlenmiştir (Chen et al.; 1994).

Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada, *S. cerevisiae*' de, VHb ekspresyonu, % 5 ksiloz içeren sentetik medyada etanol üretim etkinliğini arttırmıştır (Ruohonen et al.; 2006). Hem maya hem de *E. coli*' de, ksiloz, pentoz fosfat yolizi ile etanole dönüşmektedir. Yabani tip mayada, ksilozun pentoz fosfat yolizine girmesinin hazırlanması için, ksilozu ksiluloza indirgeyici ve oksitleyici olan ksiloz redüktaz ve ksilitol dehidrogenaz enzimleri gerekmektedir. Önce ksiloz ksilitole $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NAD(P)}^+$ kofaktörüne sahip ksiloz redüktaz tarafından indirgenmektedir ve sonra ksilitol $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ kofaktörüne sahip ksilitol dehidrogenaz tarafından ksiluloza oksitlenmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'de etkisiz ksiloz metabolizmasının bir kısmı ksilozun indirgenmesi (ki NAD(P)^+ birikimine sebep olur) ve ksilitolün oksidasyonu (ki bu da NADH 'in birikimine sebep olur) arasındaki dengesizlikten ileri gelmektedir. Bu dengesizliğin sebeplerinden biri, düşük oksijenli koşulların, NAD^+

nin rejenerasyonunu sınırlarken, ksilitolü biriktirmesidir. VHB ekspresyonu, ksilitol üretimini % 40 kadar azaltabilir ve etanol üretimini % 30 kadar arttırabilir (Ruohonen et al., 2006). Bu sonucun birincil açıklaması, VHB'nin NADH'ın okside formuna (NAD⁺) dönüşümünü kolaylaştırması, böylece ksilozu ksilitol ara ürününden ksiluloza yönlendirmesi ve pentoz fosfat yolizine ksilozun girişine kolaylık sağlaması olarak açıklanmıştır. Yabani tip mayanın tersine, *E. coli* ksilozu, ksiluloza bir adımda ksiloz izomeraz enzimi ile çevirmektedir. Bunun sonucunda, *E. coli*'de pentoz fosfat yol izi için ksiloz hazırlanması bir redoks kofaktör dengesizliğine sahip değildir ve ksilitol bir ara ürün değildir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de ksilozdan etanol üretimi.

2.5. Tezin Amacı

Dünya atmosferinde CO₂ ve diğer sera gazlarının konsantrasyonlarındaki artış ile mevsim değişikliklerinin meydana gelmesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle biyoatıklar, biyoteknolojiye çevre kirliliğinin azaltılması açısından iyi bir olanak sunmaktadırlar. Biyoetanol, çeşitli biyokütlelerden üretilen bir üründür. Etanol veya etil alkol temiz renksiz bir sıvı olup, biyolojik olarak bozunur ve çevre açısından bir tehdit oluşturmaz. Biyoetanol, dünya çapında giderek artan yıllık üretimi ve pazar payı ile dünyanın önde gelen alternatif sıvı yakıtıdır.

Vitreoscilla hemoglobini ilk keşfedilen bakteriyel hemoglobin olup, aynı zamanda karakterizasyonu en iyi yapılmış prokaryotik hemoglobindir (Wakabayashi et al., 1986; Dikshit ve Webster, 1988). Bu proteinin düşük konsantrasyonlarda

bulunan ekstrasellüler oksijeni bağlayarak onu terminal solunum oksidazlarına vermesi ve bu şartlar altındaki hücrel solunuma katkıda bulunmasının esas fonksiyonu olduğu sanılmaktadır (Dikshit ve Webster, 1988). VHB'nin, klonlandığı organizmalara yüksek oksijen alma potansiyeli ve daha iyi büyüme-çoğalma özellikleri kazandırdığı bilinmektedir (Chen et al., 1994; Nasr et al., 2001; Geckil et al., 2003). Yapılan araştırmalarda, VHB ekspresyonu *Serratia marcescens*'te ve *Enterobacter aerogenes*'te asetoin ve butandiol üretimini arttırmıştır (Wei et al., 1998; Geckil ve ark 2004). Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae*' de VHB ekspresyonu ile etanol üretiminin arttığı belirlenmiştir (Ruohonen et al., 2006).

Düşük fakat belirli seviyede oksijen gerektiren maddelerin üretimi, oksijen konsantrasyonunun belli kritik seviyelerin altına düştüğü büyük ölçekli biyo-reaktörlerde önemli bir sorundur. Bu tür biyo-proseslerde oksijen seviyesinin istenen konsantrasyonların altına düşmesi ürün oluşumu ile direkt ilgili diğer bir parametre olan “biyokütle oluşumunu” da negatif yönde etkilemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada endojen, etkin bir oksijen alımı sağlayan ve biyokütle oluşumuna katkısı ile bilinen bir sistem olan *vgb/VHB*'nin, bu problemleri aşmak için iyi bir çözüm olabileceği düşünülmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda, VHB'nin etanol fermentasyonundaki fizyolojik etkilerinin neler olduğu tamamen aydınlığa kavuşmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının ana amacı Dr. Sanny tarafından geliştirilen VHB ekprese eden rekombinant organizmaların (Sanny et al., 2010) fermente olabilen şeker kaynağı olarak patates işleme atık suyu hidrolizatının kullanılmasıyla üreme ve üretkenliği dolayısıyla da etanol üretimi arttırılmasıdır. Çalışmanın özel amaçları ise, VHB ekspresyonu yapan rekombinant *E. coli* suşları farklı havalandırma koşullarında, glukozu veya patates işleme atık suyu hidrolizatı içeren besi ortamlarında üretilmesi, bu rekombinant suşların denenen farklı koşullardaki hücre yoğunluklarının, VHB ekspresyonlarının ve ürettikleri etanol miktarlarının belirlenmesidir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerinden tripton, NaOH, $H_2NaO_4P \cdot H_2O$, alfa-amilaz (EC. 3.2.1.1) ve amiloglikosidaz (EC. 3.2.1.3) Sigma, Oakville, Kanada'dan sağlandı. CH_3COONa (sodyum asetat), $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2HPO_4 , $Na_2S_2O_4$ (sodyum ditiyonit), NaCl, HCl, D(+)-glukoz, D(+)-ksiloz, asetonitril, alfa naftol, etanol, pepton, maya özütü, agar ve stroptomisin sülfat, ampisilin sodyum, gentamisin sülfat antibiyotikleri ise Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edildi. Etanol ölçümü için kullanılan Enzymatic BioAnalysis, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya'dan sağlandı. 0.2 μm por çaplı şırınga filtresi Whatman, Maidstone, İngiltere ve 0.2 μm por çaplı 500 ml'lik vakum filtre Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.'den, glukoz ölçümünde kullanılan ince tabaka kromatografisi plakaları ise Whatman, TLC Plates Partisil® K5, Maidstone, İngiltere'den temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında hücrelerin büyüme süreci için, Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya ve Edmund Bühler GmbH (çalkalamalı), TH15, Hechingen, Almanya inkübatörleri kullanıldı. Hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD; Bio-Rad, SmartSpec™ 3000, Philadelphia, A.B.D.) spektrofotometre ile ölçüldü. Patates işleme atık suyu hidrolizinde Beckman Coulter, Avanti J-30I, Krefeld, Almanya ve hücreleri çöktürmede ise Heraeus Instruments, Labofuge 400R, Osterode, Almanya santrifüjleri kullanıldı. pH değerleri, Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D. ile belirlendi. Hücreler hemoglobin ekstraksiyonu için Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D. sonikatörü ile parçalandı. Hemoglobin ölçümü ise Shimadzu, UV-3600 UV-VIS NIR, Kyoto, Japonya UV spektroskopisi ile ölçüldü. Besiyerinde kalan glukoz miktarları TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D. kullanılarak ölçüldü. Plazmit stabilitesi için yapılan inokülasyon öncesi dilüsyonlar

IKA, Genius3, Staufen, Almanya vorteksi ile karıştırıldı. Tüm sarf malzemeleri ve diğer malzemeler ise deneylerden önce Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya otoklavı kullanılarak steril edildi.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

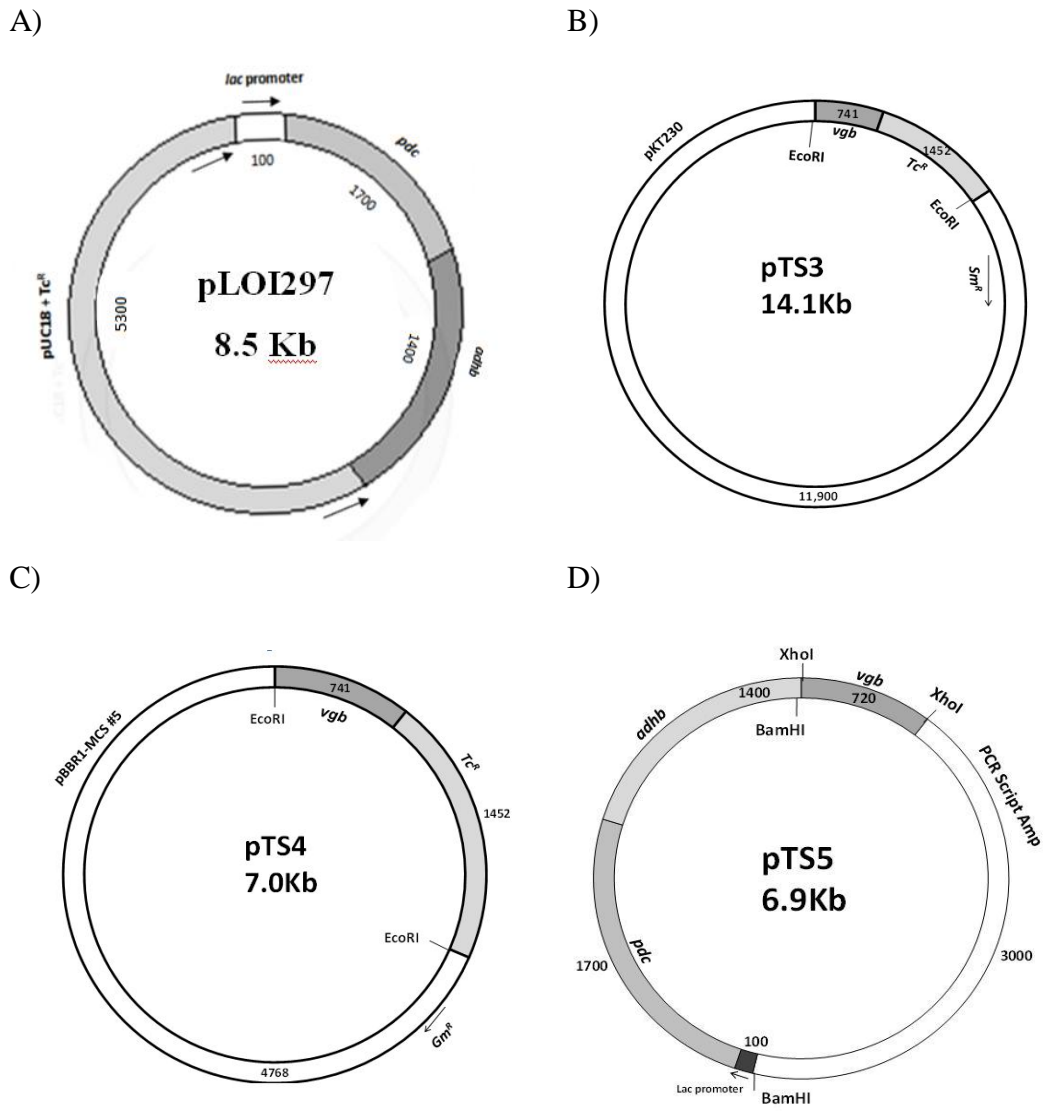
Bu çalışmada, VHb'nin patates işleme atık suyu hidrolizatında, biyoetanol üretimini arttırmadaki etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Bu nedenle, tez çalışmasında, USDA laboratuvarından temin edilen *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) (Dien et al., 2000) ve bu suşlardan Dr. Sanny tarafından geliştirilen, TS3, TS4 ve TS5 (Sanny et al., 2010) suşları kullanıldı (Çizelge 3.1). Bunun için, rekombinant suşlar, *pdh*, *adh* (Dien et al., 2000) ve *vgb* içerecek şekilde (TS3, TS4 ve TS5), Illinois Institute of Technology, Department of Biological Chemical and Physical Sciences, Chicago, IL, USA' de, yeni oluşturulan plazmidlerle transforme edilerek elde edildi (Şekil 3.1) (Sanny et al., 2010).

Çizelge 3.1: Proje çalışmasında kullanılan bakteriler, plazmidler ve özellikleri (Sanny et al., 2010)

Suşlar	Özellikler
NZN111	<i>E. coli</i> [F+ λ- <i>rpoS</i> 396(Am) <i>rph</i> -1 Δ <i>pflB</i> ::Cam Δ <i>ldhA</i> ::Kan]
FBR5	<i>pdh</i> ve <i>adh</i> taşıyan pLOI297 plazmidini ile transforme edilmiş NZN111 suşu
FBR5/pTS3 (TS3 suşu)	<i>vgb</i> taşıyan pKT230 plazmidini (pTS3) ile transforme edilmiş FBR5 suşu
FBR5/pTS4 (TS4 suşu)	<i>vgb</i> taşıyan pBBR1MCS-5 plazmidini (pTS4) ile transforme edilmiş FBR5 suşu
NZN111/pTS5 (TS5 suşu)	<i>vgb</i> taşıyan pLOI297 plazmidini (pTS5) ile transforme edilmiş NZN111 suşu

Bu tez çalışmasında, *vgb*⁻ *E. coli* FBR5 suşu ve *vgb*⁺ rekombinant *E. coli* suşları (TS3, TS4 ve TS5) VHb'nin etanol üretimindeki etkilerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılan bu rekombinant suşlar farklı oksijen koşullarında (aerobik ve

mikroaerobik), saf şeker olarak glukozu (%8 w/v) içeren Luria Bertani (LB) besiyerinde ve patates işleme atık suyu hidrolizatı (glukoz oranı %8 w/v) içeren besiyerinde üretilerek, VHb ekspresyon seviyeleri, etanol üretimleri ve bu hücrelerin üreme özellikleri incelendi. Hücrelerdeki VHb ekspresyonu oksijen ile düzenlendiğinden, kültürler farklı oksijen koşullarında aerobik ve mikroaerobik olarak büyütüldü. Bu koşullar, kültür ortamındaki besiyeri hacmi değiştirilerek sağlandı.



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan rekombinant suşların içerdiği plazmidlerin gösterimi (Sanny et al., 2010); A. pLOI297, B. pTS3, C. pTS4, D. pTS5.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Patates İşleme Atık Suyunun Hidrolizi

Patates işleme atık suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri, GYTE Çevre Mühendisliği Laboratuvarları'nda analiz edilerek belirlendi (Çizelge 3.2).

Çalışmada kullanılacak olan patates atık suyundaki nişastanın *E. coli* suşları tarafından kullanılarak etanole dönüştürülebilmesi için glukoz monomerlerine hidrolizi amacıyla denemeler yapıldı. Bunun için dört farklı hidroliz işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2: Patates işleme atık suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Ölçüm Kriterleri	Sonuçlar
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	63.660.000 mg/L (ISO 15705:2002)
Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ)	10.000 mg/L (TS4957-3EN 1899-2)
Askıda katı madde	49.025.000 mg/L (TS EN 872)
Sülfat	104 mg/L (TS3263 ISO 10523 Nisan 1999)
NH ₄	88.3 mg/L (AWWA4500-3NH ₃)
pH	5.80 mg/L (TS 3263 ISO 10523)

İki Basamaklı Enzimatik Hidroliz, İlk pH değeri 6.3 olarak belirlenen patates işleme atık suyunun pH değeri 1 N NaOH ile pH 6.5'e ayarlandı ve her bir litresi için 1 gr α -amilaz ilave edildi (Sigma, EC. 3.2.1.1, Oakville, Kanada). 75°C sıcaklıkta, 30 dakika süre ile bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) bekletildikten sonra 105°C sıcaklıkta 15 dakika süresince otoklavlandı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya). Soğutulduktan sonra tekrar patates işleme atık suyunun her bir litresi için 1 gr α -amilaz eklendi ve 85°C sıcaklıkta 30 dakika süre ile bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) bekletildi. Soğutulduktan sonra pH değeri 1N HCl ile 5.0'e düşürüldü. Patates işleme atık suyunun her bir litresi için 1 gr amiloglikosidaz (Sigma, EC 3.2.1.3, Oakville, Kanada) eklendi. 55°C sıcaklıkta 48 saat süresince bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) bekletildi. NaOH ile pH 7.0'ye yükseltildi ve +4 °C sıcaklıkta 10 000 rpm hızda 15 dakika süre

ile bir santrifüjde (Beckman Coulter, Avanti J-30I, Krefeld, Almanya) çöktürüldü ve üst sıvılar alınıp 0.2 µm por çaplı membran filtre (Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.) kullanılarak vakum filtrasyon ile steril edildi (Yamada et al., 2009).

Tek Basamaklı Enzimatik Hidroliz, Patates işleme atık suyunun pH değeri 1N NaOH ile pH 6.5'e ayarlandı ve her bir litresi için 0.02 gr α-amilaz (Sigma, E.C. 3.2.1.1, Oakville, Kanada) eklendi. 108°C sıcaklıkta 7 dakika süre ile otoklavlandı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya). Daha sonra 90°C sıcaklıkta 2 saat süre ile bir inkübatörde bekletildi (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya). 30°C sıcaklığa soğutulduktan sonra patates işleme atık suyunun her bir litresi için 0.02 gr amiloglikosidaz (Sigma, EC 3.2.1.3, Oakville, Kanada) eklendi. 60°C sıcaklıkta 72 saat süre ile bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) bekletildi. Daha sonra, pH değeri NaOH ile pH 7.0'ye ayarlandı. +4°C sıcaklıkta 10 000 rpm hızda bir santrifüjde 15 dakika ile bir santrifüjde (Beckman Coulter, Avanti J-30I, Krefeld, Almanya) çöktürüldü ve üst sıvılar alınıp 0.2 µm por çaplı membran filtre (Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.) kullanılarak vakum filtrasyon ile steril edildi (Davis et al., 2006).

Asit Hidrolizi, 50 ml patates işleme atık suyu (pH 6.3) üzerine 1 gr NH₄NO₃ ve 0.2 gr pepton eklendi. Üzerine 150 ml 0.5N HCl ilave edildi. Daha sonra 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile otoklavlandı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya). Daha sonra patates işleme atık suyunun pH değeri NaOH ile 7.0'ye ayarlandı. +4°C sıcaklıkta 10 000 rpm hızda bir santrifüjde (Beckman Coulter, Avanti J-30I, Krefeld, Almanya) 15 dakika süre ile çöktürüldükten sonra üst sıvılar alınıp 0.2 µm por çaplı membran filtre kullanılarak (Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.) vakum filtrasyon ile steril edildi (Arapoglou et al., 2010).

Kaynatma ile Asit Hidrolizi, 0.5 N HCl 100 °C sıcaklığa kadar ısıtıldı. Daha sonra aynı hacimdeki patates işleme atık suyu (pH 6.3) asit çözeltisinin üzerine eklendi. Soğutulduktan sonra pH 7.0'ye ayarlandı. +4 °C sıcaklıkta 10 000 rpm hızda bir santrifüjde (Beckman Coulter, Avanti J-30I, Krefeld, Almanya) 15 dakika süre ile çöktürüldükten sonra üst sıvılar alınıp 0.2 µm por çaplı membran filtre kullanılarak

(Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.) vakum filtrasyon ile steril edildi (Tasic et al., 2000).

Yapılan ince tabaka kromatografisi analizleri dikkate alınarak en kısa sürede (48 saat) en iyi sonucu veren yöntemin iki basamaklı enzimatik hidroliz yöntemi olduğu görüldü (Çizelge 3.3). Çalışma süresince kullanılacak patates işleme atık suyunun bu yöntem ile hidrolizi edilerek kullanılmasına karar verildi.

Çizelge 3.3: Denemeleri yapılan patates atık suyu hidroliz yöntemleri sonucu elde edilen glukoz miktarları.

Hidroliz Yöntemi	Glukoz Miktarı (g/L)
İki basamaklı enzimatik hidroliz	106
Tek basamaklı enzimatik hidroliz	108
Pepton içeren asit hidrolizi	43
Kaynatma ile asit hidrolizi	50

3.2.2. Stok Kültürlerin Pasajlanması ve Muhafazası

Litrede 12.5 g tripton, 6.25 g maya özütü, 6.25 g NaCl, 18.75 g agar içeren LB agar ortamı (pH 7.0) hazırlandı. % 40'luk (w/v) ksiloz çözeltisi ise distile su ile hazırlanarak otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ayrı olarak steril edildi. Steril edildikten sonra ılınması beklenen ksiloz çözeltisi son konsantrasyon % 8 (w/w) olacak şekilde LB agar besiyerine eklendi. Hazırlanan besi ortamı 50 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra uygun oranlarda ilgili rekombinant soylar için farklı antibiyotikler ilave edilerek petrilere döküldü (Çizelge 3.4)

Petri kaplarındaki ksiloz içeren LB (LBK) agar besiyerlerine öze yardımıyla hücreler inoküle edilerek bir gece 37 °C sıcaklıkta büyümeleri için bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) inkübe edildi. Büyüyen taze kültürler 4°C sıcaklıkta saklanarak ayda bir kez olmak üzere pasajlandı.

3.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Kontrol şekeri (glukoz; %8, w/v) içeren kültür besiyeri (100 ml); 50 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 20 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 20 ml glukoz solüsyonu (%40, w/v) + 9 ml steril distile su + 1 ml sodyum asetat (%10, w/v) içerecek şekilde hazırlandı (Dien et al., 2000). Tüm içerik ayrı ayrı steril edilerek muhafaza edildi ve bu besiyeri her denemeden önce taze olarak hazırlandı. Daha sonra (antibiyotikli koşullar için) uygun antibiyotikler belirtilen oranlarda (Çizelge 3.4) farklı rekombinant suşlar için ayrı ayrı hazırlanan besiyerine ilave edildi.

Çizelge 3.4: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.

Suş	Antibiyotikler
FBR5	100 µg/ml Ampisilin
FBR5/pTS3 (TS3)	100 µg/ml Ampisilin ve 50 µg/ml Streptomisin
FBR5/pTS4 (TS4)	100 µg/ml Ampisilin ve 5 µg/ml Gentamisin
NZN111/pTS5 (TS5)	100 µg/ml Ampisilin

Patates işleme atık suyu hidrolizatını içeren kültür besiyeri; Hidrolizden sonra glukoz içeriği %7-8 (w/v) olarak ölçülen patates işleme atık suyu hidrolizatının (PASH) (pH 7.0) bir litresine; 5 g pepton + 3 g maya özütü + 3 g MgSO₄ + 1 g (NH₄)HPO₄ + 10 ml CH₃COONa (% 10, w/v) + 200 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edildi (Davis et al., 2006). Tüm karışım 0.2 µm por çaplı bir vakum filtresi (Nalgene, Supor MachV, Rochester, New York, A.B.D.) kullanılarak vakum filtrasyon ile steril edildi. Daha sonra (antibiyotikli koşullar için) uygun antibiyotikler belirtilen oranlarda (Çizelge 3.4) farklı rekombinant suşlar için ayrı ayrı hazırlanan besiyerine ilave edildi.

3.2.4. Ön Kültürlerin Hazırlanması

Ön kültürler, FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşları, %8 (w/v) glukoz içeren LB (LBG) besiyeri veya patates işleme atık suyu hidrolizatını ve Çizelge 3.4'te belirtilen

uygun antibiyotikleri içerecek şekilde hazırlanan kültür besiyerlerinin 5 ml'sine (50 ml'lik erlenlerde) 1 veya 2 koloni inoküle edilerek, bir gece boyunca, 37°C sıcaklıkta, 180 rpm hızında çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) büyütülerek hazırlandı.

3.2.5. Aerobik Koşullar

Hazırlanan bir gecelik ön kültürlerden yaklaşık 300 µl/100 ml alınarak (OD₆₀₀ ~0.02 olacak şekilde) 250 ml'lik erlenlere 50 ml ya da 1 litrelik erlenlere 200 ml olacak şekilde, glukoz içerikleri %8 (w/v) olan LBG veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. Kültür ortamlarının 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta, 48 saat süre ile çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) inkübasyonu sağlandı.

3.2.6. Mikroaerobik Koşullar

Hazırlanan bir gecelik ön kültürlerden yaklaşık 300 µl/100 ml alınarak (OD₆₀₀ ~0.02 olacak şekilde) 100 ml'lik erlenlere 80 ml ya da 1 litrelik erlenlere 800 ml olacak şekilde, glukoz içerikleri %8 (w/v) olan LBG veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. Erlenlerin ucu kauçuk tıplar ile kapatıldı ve 22-kalibre iğne ile delinerek gaz çıkışı sağlandı. Kültür ortamlarının 180 rpm hızda, 37 °C sıcaklıkta 48 saat süre ile çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) inkübasyonu sağlandı.

Aerobik ve mikroaerobik koşullar Çizelge 3.4'te sözü edilen uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen ortamlarda ayrı ayrı denendi.

İnkübasyon sonrası 48 saatlik kültürlerin pH değerleri, OD₆₀₀ değerleri, etanol-g/100 ml (% w/v), etanol-ml/100 ml (% v/v) ölçümleri, Vhb miktarları (nmol/g) ve kültür ortamında kalan glukoz miktarları (% w/v) belirlendi.

3.2.7. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi

Glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile farklı havalandırma koşullarında 48 saat süre ile inkübe edilen kültürlerin pH değerleri, bir pH metre (Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D.) kullanılarak belirlendi.

3.2.8. Toplam Hücre Sayısının (Biyokütle) Belirlenmesi

Bir spektrofotometre cihazı (Bio-Rad, SmartSpec™ 3000) kullanılarak glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile gerçekleştirilen farklı havalandırma koşullarındaki 48 saat süren inkübasyon sonundaki hücre sayımları kültürlerin A_{600} nm'deki optik yoğunlukları OD 0.6 değerini aşmayacak şekilde steril özgün besiyeri ile seyreltilerek ölçüldü. Ölçüm için kör olarak yine kültüre özgün steril besiyeri kullanıldı.

3.2.9. Fermentasyon Ortamındaki Biyoetanol Miktarının Ölçümü

Farklı havalandırma koşullarında glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile 48 saat süren inkübasyon sonundaki fermentasyon ortamında oluşan etanol miktarının belirlenmesi için hücre kültürleri bir santrifüj (Heraeus Instruments, Labofuge 400R, Osterode, Almanya) ile 4000 rpm de 4 °C sıcaklıkta çöktürülerek üst sıvıları alındı ve mikrofüj tüplerine aktarıldı. VHB miktarının belirlenmesi için, kalan hücre pelletlerinin yaş ağırlıkları hesaplanarak ve en az bir gece boyunca dondurularak -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Farklı koşullarda üretilen kültürlerin içerdikleri biyoetanol miktarı (% w/v; % v/v) Enzymatic BioAnalysis, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya ile ölçülerek belirlendi. Kitin prensibi; etanolun NAD ile alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla asetaldehite oksitlenmesine, bu oluşan asetaldehitin de aldehit dehidrogenazla asetik aside oksitlenmesine ve böylece oluşan NADH'ın 340 nm'de oluşturduğu absorbans farkının ölçülmesine dayanmaktadır.

3.2.10. Besiyerinde Kalan Glukoz Miktarının Ölçümü

Glukoz ve patates işleme atık suyu hidrolizatının şeker kaynağı olarak kullanıldığı ve farklı havalandırma koşullarında 48 saat süre boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonunda kültür ortamında kalan glukoz miktarının ölçülmesi için ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) kullanıldı. Bunun için glukoz içeriği 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/ml (w/v) olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Örnekler standartların dışına çıkmaması için uygun oranlarda seyreltildi.

TLC plakaları (Whatman, TLC Plates Partisil® K5, Maidstone, İngiltere) üzerine standartlar ve seyreltilmiş örnekler mikro şırınga ile 1 µl olacak şekilde damlatıldı. Plakalar kurutulduktan sonra % 85'lik (v/v) asetonitril çözeltisi içerisine hafif bir açı ile bırakılarak şekerlerin yürümesi için bekletildi. Plakalar kurutulduktan sonra işlem bir kez daha tekrarlandı ve tekrar kurutulan plakalar alfa naftol (% 0.5 v/v) çözeltisine daldırılarak boyandı. Şeker noktalarının görünür hale gelmesi için TLC plaka ısıtıcısında 120 °C sıcaklıkta 10 dakika süre ile yakıldı.

Besiyerinde kalan glukoz miktarları, TLC görüntüleme densitometresinde (Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D.) taratılarak hacim hesaplamaları yapıldı. R² değeri 0.920 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edildi.

3.2.11. Rekombinant Soylardaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü

Yapılan denemelerde kullanılan *vgb* içeren rekombinant organizmaların (TS3, TS4 ve TS5) ürettikleri VHb miktarı, UV-3600 Shimadzu UV-VIS NIR Spectro vasıtasıyla, ditiyonit (sodyum hidrosülfid) eklenerek indirgenmiş-indirgenmemiş fark spektrasıyla ölçülerek belirlendi (Webster ve Liu, 1974). Bunun için farklı glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile farklı havalandırma koşullarında 48 saat süren inkübasyon sonunda üretilen hücre kültürleri 4000 rpm hızda 4 °C sıcaklıkta santrifüj edilerek (Heraesus Instruments, Labofuge 400R, Osterode, Almanya) hücrelerin çökmesi sağlandı. Daha sonra pelletlerin yaş ağırlıkları belirlendi ve -20 °C sıcaklıkta en az bir gece boyunca muhafaza edildi. Daha sonra 30 ng/ml olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5) ile sulandırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonları bir sonikatör (Branson Ultrasonic Corporation,

Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D.) yardımı ile buz içerisinde 20 saniyelik vurma ve 10 saniyelik bekleme süreleri ile toplamda 3 dakika boyunca 6 kez sonike edildi.

Elde edilen hücre homojenatları 4 °C sıcaklıkta 15000g hızda 10 dakika süre ile santrifüj (Heraeus Instruments, Labofuge 400R, Osterode, Almanya) edildi. Üst sıvılar Vhb miktarı tayini için ayrıldı. Kör olarak ditiyonit ile muamele edilmeyen üst sıvılar kullanıldı. Ölçümler 400-500 nm aralığında yapıldı. Vhb'nin ditiyonitle indirgenğinde karakteristik olarak verdiği 416 ve 430 nm dalga boyları arasındaki fark spektrumundan ($\Delta\varepsilon = 34 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) Vhb miktarı nmol/g olarak hesaplandı.

3.2.12. Suşların Plazmid Kararlılığının Ölçümü

48 saat sonunda, farklı koşullarda, antibiyotiksiz olarak üreyen kültürlerden, plazmid kararlılığının ölçülmesi için, % 0.9 (w/v) oranında NaCl içeren fizyolojik tuzlu su ile seri dilüsyonlar yapıldı. Daha sonra yeterli olduğu düşünülen konsantrasyonlardan 100 µl sıvı alınarak LB agar üzerine cam bir baget ile yayıldı. Bir gecelik inkubasyondan sonra, 37 °C sıcaklıkta büyüyen kolonilerden 50 tanesi steril kürdanlar ile uygun antibiyotiği içeren LBK (%8 (w/v) ksiloz içeren LB agar) katı besi yerine çizgi ekimi yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen ve üremeyen koloniler sayılarak plazmid kararlılığı (%) belirlendi.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2007 6.0 programı ile yapıldı. *P* değerleri tek kuyruklu *t*-testi ile Vhb'nin etanol üretimini arttırabileceği hipotezine dayanılarak belirlendi. *P* = 0.05 ve daha küçük bulunan denemelerin sonuçları 'anlamlı' olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Glukoz-LB Ortamlarındaki Etanol Üretimleri

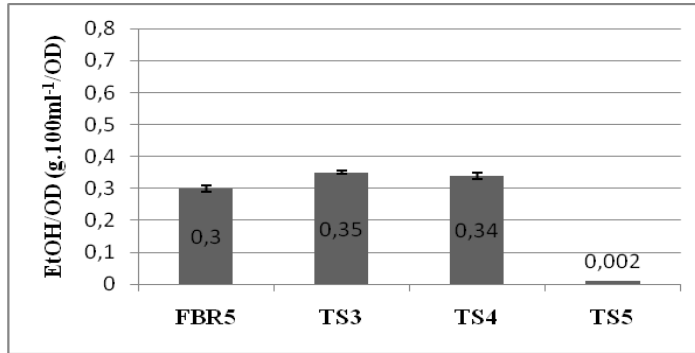
4.1.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kùltürler

FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 250 ml'lik erlenler içerisinde 50 ml olacak şekilde hazırlanan, % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBG besiyerinde, aerobik koşulda büyütölen kùltürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla TS5 suşu ile olmakla birlikte, azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v), TS4 ve FBR5 suşları benzer ($p > 0.05$) olmasına rağmen, TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 11 daha fazla ($p > 0.05$) etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.1). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 17 ($p = 0.04$) ve TS4 suşu ile ise % 13 ($p > 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 31 nmol/g ($p = 0.04$) olduğu göröldü (Şekil 4.5). Glukoz tüketimi FBR5 suşu için yaklaşık % 77 oranında en fazla miktarda görölürken, etanol üretimi açısından zayıf olan TS5 suşu ile sadece % 20 oranında glukoz tüketimi olduğu saptandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarin ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.3 (0.13)	6.72 (0.44)	2.01 (0.22)	2.55 (0.28)	1.81 (0.45)
TS3	6.0 (0.10)	6.31 (0.23)	2.23 (0.13)	2.82 (0.17)	2.03 (0.38)
TS4	6.3 (0.00)	6.03 (0.18)	2.04 (0.09)	2.58 (0.11)	2.73 (0.45)
TS5	5.3 (0.21)	2.71 (0.15)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	6.37 (0.32)



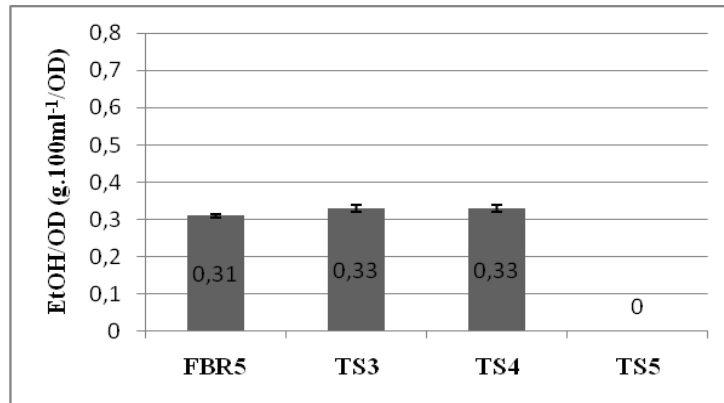
Şekil 4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarin ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen, LBG besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonunda, yine TS5 suşu ile en fazla olacak şekilde, pH değerlerinde azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. TS5 suşu ile etanol üretimi (% w/v; % v/v) görülmezken, diğer suşların ürettiği etanol miktarlarının benzer olduğu ($p > 0.05$) tespit edildi (Çizelge 4.2). Bununla birlikte, TS3 ve TS4 suşları ile her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD), FBR5 suşuna göre, benzer şekilde % 6 daha fazla olduğu belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 4.2). Kültür ortamında bulunan glukozu (% w/v) en fazla TS3 (% 75), en az ise TS5 suşunun tükettiği belirlendi (Çizelge 4.2). Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4

suşu ile 29 nmol/g ($p = 0.03$) olduğu ancak, tüm suşlarda antibiyotikli koşullara göre daha düşük değerlere sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5).

Çizelge 4.2: Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.9 (0.04)	6.74 (0.15)	2.07 (0.11)	2.62 (0.13)	2.15 (0.21)
TS3	5.7 (0.01)	6.51 (0.05)	2.13 (0.09)	2.70 (0.07)	2.01 (0.31)
TS4	6.1 (0.02)	6.00 (0.08)	1.98 (0.08)	2.51 (0.10)	3.14 (0.27)
TS5	5.5 (0.11)	2.65 (0.18)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	5.95 (0.37)



Şekil 4.2: Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.1.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

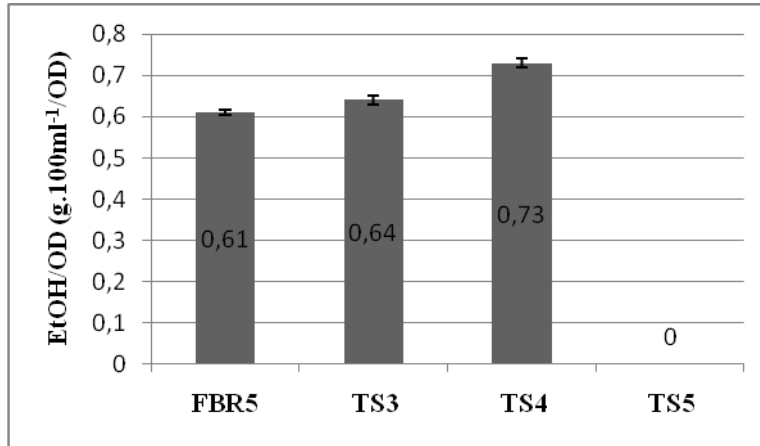
FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyeri (pH 7.0) ile

mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBG besiyerinde, mikroaerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en fazla değere sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.3). TS5 suşu ile etanol üretimi (% w/v; % v/v) gözlenmezken, en fazla etanol miktarının TS4 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 14 ($p = 0.04$) daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ile FBR5 suşunun ürettiği etanol miktarları (% w/v; % v/v) benzer olmasına rağmen ($p > 0.05$), her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$), FBR5 suşu ile elde edilenden TS3 suşu ile % 5 ($p > 0.05$) ve TS4 suşu ile ise % 20 daha fazla ($p = 0.01$) olduğu görüldü (Şekil 4.3). FBR5, TS3 ve TS4 suşları besiyerindeki tüm glukozu tüketmelerine rağmen, TS5 suşunun sadece % 26’sını kullandığı tespit edildi (Çizelge 4.3). Ayrıca en yüksek VHb ekspresyonu (nmol/g yaş ağırlık) TS4 suşu ile 1163 nmol/g ($p = 0.00$) belirlenirken, TS5 suşunun VHb ekspresyonunun sadece 2 nmol/g olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5).

Çizelge 4.3: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH		OD (600 nm)		EtOH (g/100 ml)		EtOH (% v/v)		Glukoz (% w/v)	
FBR5	6.3	(0.05)	6.12	(0.02)	3.77	(0.04)	4.70	(0.06)	0.00	(0.00)
TS3	6.1	(0.00)	5.92	(0.08)	3.76	(0.07)	4.77	(0.09)	0.00	(0.00)
TS4	6.3	(0.00)	5.81	(0.11)	4.25	(0.22)	5.39	(0.28)	0.00	(0.00)
TS5	6.6	(0.20)	2.18	(0.42)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	5.87	(0.63)

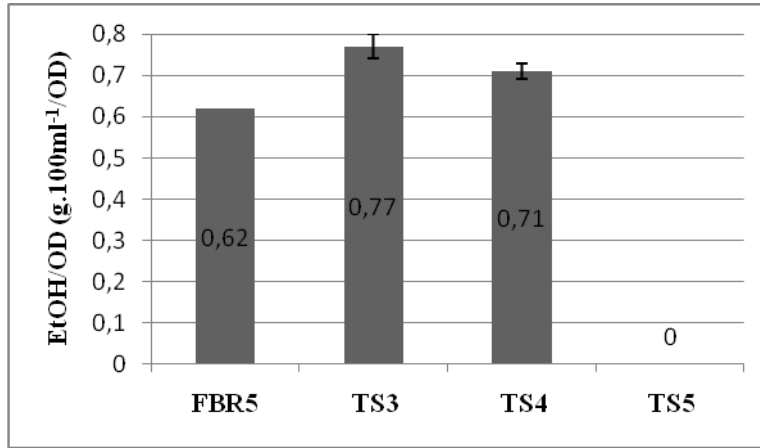


Şekil 4.3: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

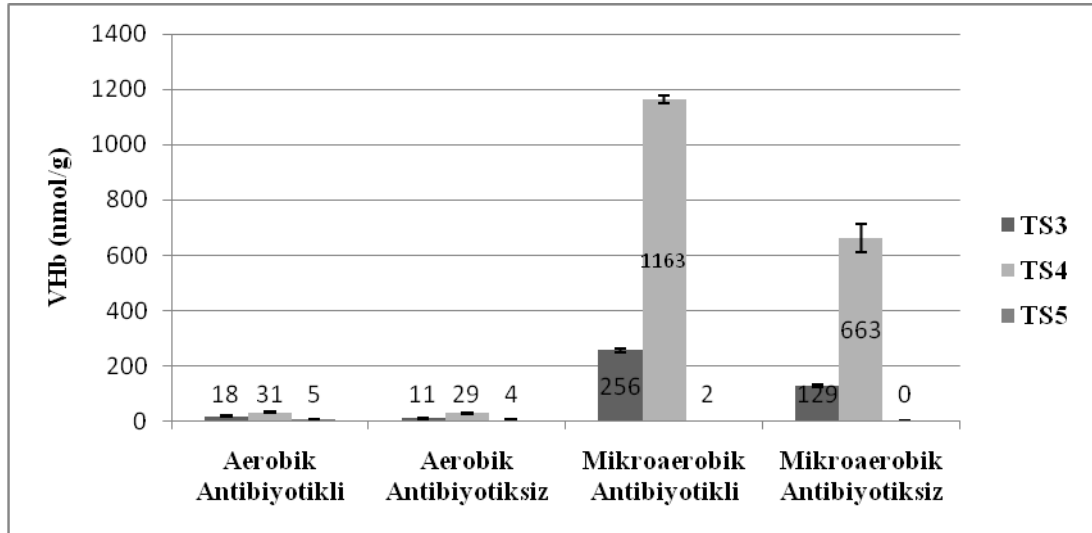
Antibiyotik içermeyen LBG besiyerinde, mikroaerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonunda, pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) tespit edildi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.4). TS3 suşunun FBR5 suşuna göre % 11 daha fazla ($p = 0.05$) etanol ürettiği (% w/v; % v/v) ve yine TS3 suşu ile her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) % 24 daha fazla ($p = 0.04$) olduğu tespit edildi (Şekil 4.4). TS5 suşu ile VHb ekspresyonu (nmol/g yaş ağırlık) ve etanol üretimi belirlenemedi. En yüksek VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla ($p = 0.01$) TS4 suşu ile 663 nmol/g olduğu görüldü (Şekil 4.5). Kültür ortamında bulunan glukozun (% w/v) FBR5, TS3 ve TS4 suşları tüketirken, TS5 suşunun ancak % 41 kadarını kullandığı gözlemlendi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.3 (0.01)	6.35 (0.10)	3.95 (0.07)	5.01 (0.11)	0.00 (0.00)
TS3	6.0 (0.00)	5.65 (0.08)	4.39 (0.10)	5.56 (0.64)	0.00 (0.00)
TS4	6.3 (0.03)	5.66 (0.16)	4.03 (0.37)	5.11 (0.47)	0.00 (0.00)
TS5	5.9 (0.16)	2.41 (0.67)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	4.71 (0.75)



Şekil 4.4: Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.5: LBG besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin Vhb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

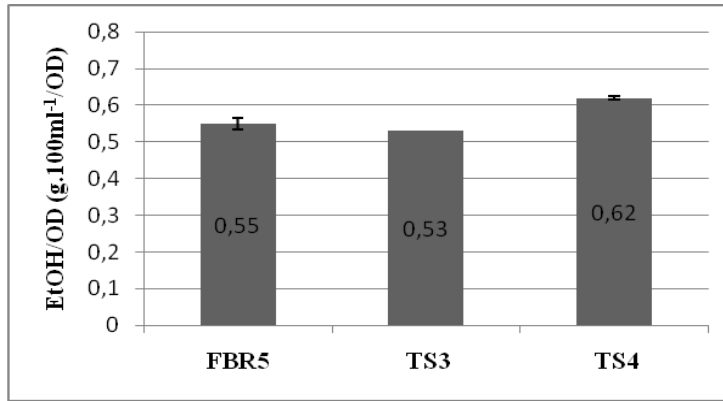
4.1.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, büyük hacimli, % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBG besiyerinde, aerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.5). Etanol üretiminin (% w/v, % v/v) FBR5 suşu ile üretilenden, TS3 suşu ile % 5 ($p > 0.05$), TS4 suşu ile ise % 11 daha fazla ($p = 0.02$) olduğu gözlemlendi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$) ise FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 13 daha fazla ($p = 0.04$) olduğu tespit edildi (Şekil 4.6). Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) en fazla TS4 suşu ile 775 nmol/g ($p = 0.01$) olduğu görüldü (Şekil 4.10). Tüm suşların besiyerindeki glukozun neredeyse tamamını tükettiği belirlendi. (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.5: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.0 (0.05)	6.09 (0.07)	3.32 (0.06)	4.22 (0.08)	0.00 (0.00)
TS3	5.9 (0.11)	6.63 (0.02)	3.49 (0.05)	4.42 (0.06)	0.00 (0.00)
TS4	6.1 (0.08)	5.96 (0.03)	3.69 (0.07)	4.67 (0.11)	0.00 (0.00)

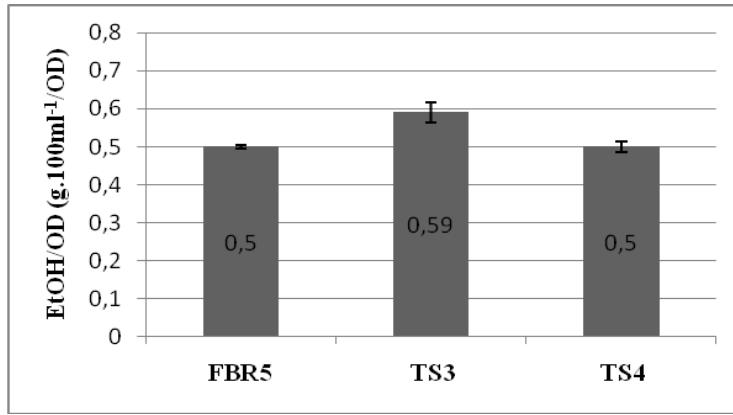


Şekil 4.6: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen, LBG besiyerinde, aerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerin, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.5). Etanol üretiminin (% w/v, % v/v) TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 6 daha fazla ($p > 0.05$) olduğu gözlemlendi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) ise FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 18 daha fazla ($p > 0.05$) olduğu tespit edildi (Şekil 4.7). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) en fazla TS4 suşu ile 420 nmol/g ($p = 0.00$) olduğu görüldü (Şekil 4.10). Tüm suşların besiyerindeki glukozun tamamını tükettiği belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.6: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.9 (0.09)	6.85 (0.10)	3.43 (0.04)	4.34 (0.05)	0.00 (0.00)
TS3	5.8 (0.03)	6.33 (0.08)	3.75 (0.13)	4.76 (0.17)	0.00 (0.00)
TS4	6.0 (0.13)	6.00 (0.16)	2.98 (0.11)	3.78 (0.13)	0.00 (0.00)



Şekil 4.7: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.1.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

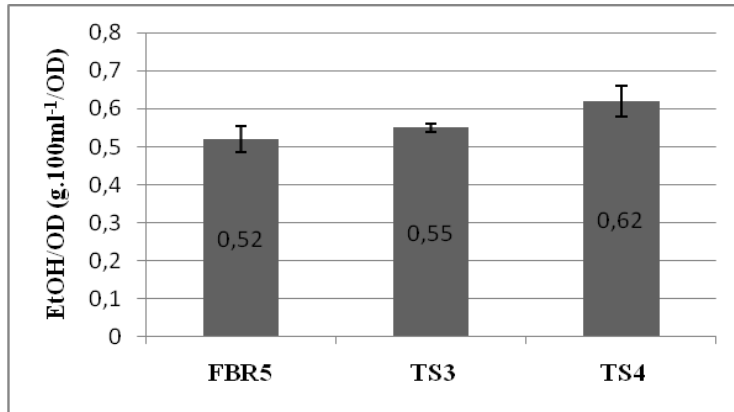
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v), 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, büyük hacimli, % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyeri (pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBG besiyerinde, mikroaerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm yapılan

ölçüm sonuçlarında FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. TS3 suşunun, FBR5 suşu ile üretilenden % 9 daha fazla ($p = 0.04$) miktarda etanol ürettiği (% w/v; % v/v) tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$) FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 5 ($p > 0.05$), TS4 suşu ile ise % 19 ($p > 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.8). VHb ekspresyonunun ($\text{nmol/g yaş ağırlık}$) en fazla TS4 suşu ile 949 nmol/g ($p = 0.00$) olduğu tespit edildi. (Şekil 4.10). Tüm kültür ortamında bulunan glukozun tamamının tüketildiği görüldü (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.2 (0.02)	7.26 (0.10)	3.82 (0.10)	4.84 (0.13)	0.00 (0.00)
TS3	5.9 (0.01)	7.50 (0.13)	4.16 (0.04)	5.27 (0.07)	0.00 (0.00)
TS4	6.2 (0.02)	6.48 (0.05)	4.00 (0.28)	5.06 (0.35)	0.00 (0.00)

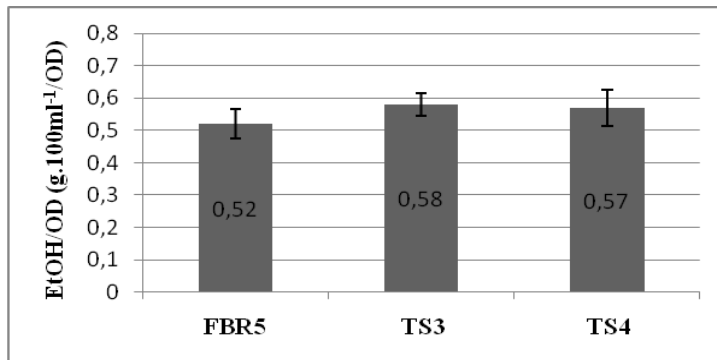


Şekil 4.8: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

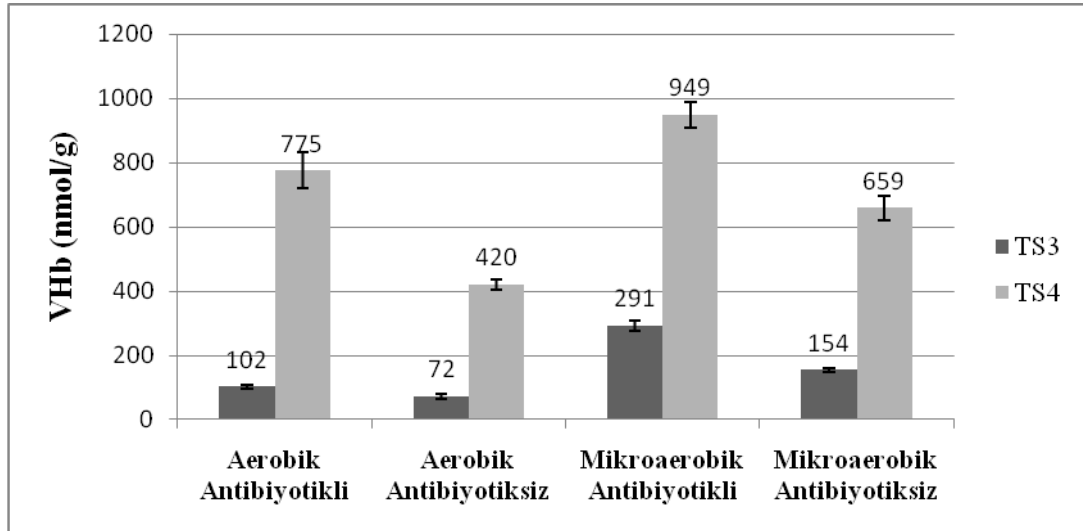
Antibiyotik içermeyen LBG besiyerinde, mikroaerobik, antibiyotiksiz koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde en fazla azalmanın TS3 suşu ile ($p < 0.05$) olduğu tespit edildi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretiminin (% w/v; % v/v), FBR5 suşu ile üretilenden TS3 suşu ile % 13 ($p > 0.05$), TS4 suşu ile ise % 6 ($p > 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi (Çizelge 4.8). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$), FBR5 suşu ile üretilenden daha fazla olacak şekilde, TS3 ile % 12 ($p > 0.05$) ve TS4 suşu ile % 10 ($p > 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi. (Şekil 4.9). Vhb ekspresyonunun ($\text{nmol/g yaş ağırlık}$) en fazla TS4 suşunda 659 nmol/g ($p = 0.01$) miktarda olduğu görüldü (Şekil 4.10). Besiyerindeki glukozun tüm suşlar tarafından tüketildiği tespit edildi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.2 (0.30)	7.22 (0.13)	3.76 (0.25)	4.77 (0.32)	0.00 (0.00)
TS3	5.7 (0.29)	7.34 (0.27)	4.25 (0.28)	5.58 (0.36)	0.00 (0.00)
TS4	6.2 (0.18)	7.00 (0.17)	3.99 (0.53)	5.05 (0.67)	0.00 (0.00)



Şekil 4.9: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, LBG besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.10: LBG besiyerinde büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.2. Patates İşleme Atık Suyu Hidrolizatı ile Hazırlanan Besiyerlerindeki Etanol Üretimleri

4.2.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kültürler

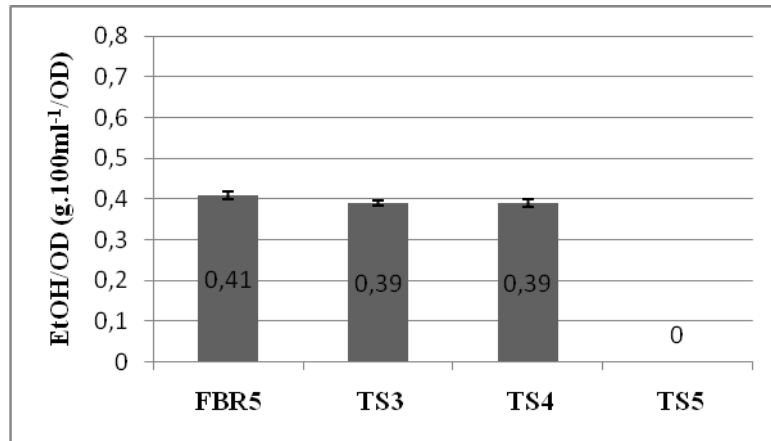
FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v), 250 ml'lik erlenler içerisinde 50 ml olacak şekilde hazırlanan, % 7-8 (w/v) glukoz içeren patates işleme atık suyu hidrolizatı kullanılarak hazırlanmış besiyeri (PASH, pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PASH besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en yüksek değer TS3 suşu ile olduğu gözlemlendi. Etanol üretimi (% w/v; % v/v) TS5 suşu ile tespit edilemezken, diğer suşlarda benzer değerler ($p > 0.05$) elde edildi (Çizelge 4.9). Her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$) incelendiğinde, TS3 ve TS4 suşları ile FBR5 suşuna oranla

önemli bir artış ($p > 0.05$) gözlenemedi (Şekil 4.11). Bu koşullardaki VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) TS3 ve TS4 suşlarında glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.5) daha fazla ($p > 0.05$) bulundu. Bu koşullardaki VHb ekspresyonlarının, glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.5) daha fazla ($p < 0.05$) olduğu tespit edildi (Şekil 4.15). Kültür ortamında bulunan glukozun FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile hemen hemen tamamının tükendiği, ancak TS5 suşu tarafından yaklaşık sadece % 42'sinin tüketildiği belirlendi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.4 (0.05)	6.50 (0.35)	2.67 (0.06)	3.38 (0.07)	0.00 (0.00)
TS3	5.3 (0.00)	6.90 (0.35)	2.68 (0.04)	3.40 (0.05)	0.00 (0.00)
TS4	5.6 (0.15)	6.61 (0.14)	2.57 (0.27)	3.26 (0.36)	0.00 (0.00)
TS5	5.1 (0.04)	2.70 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	4.61 (0.61)

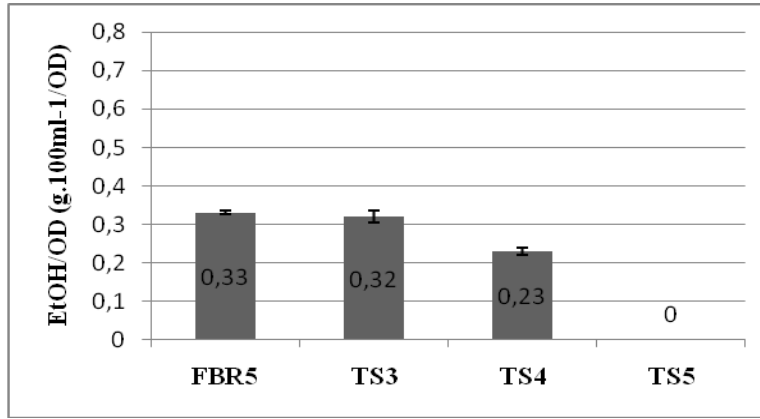


Şekil 4.11: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen, PASH besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, büyümenin 48. Saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en yüksek değer TS3 suşu ile olduğu gözlemlendi. Etanol üretimi (% w/v; % v/v) en fazla TS3 suşu ile elde edilmesine rağmen, FBR5 suşunun ürettiği etanol miktarı ile arasında önemli bir fark ($p > 0.05$) görülmedi (Çizelge 4.10). Her ünite başına üretilen etanol miktarları ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$) incelendiğinde, TS3 ve TS4 suşları ile FBR5 suşuna göre önemli bir artış ($p > 0.05$) bulunamadı (Şekil 4.12). Bu koşullardaki VHB ekspresyonlarının, glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.5) daha fazla ($p < 0.05$) olduğu tespit edildi (Şekil 4.15). Kültür ortamında bulunan glukozun FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile tamamının tükendiği, ancak TS5 suşu tarafından yaklaşık sadece % 39'unun tüketildiği belirlendi (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10: Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.4 (0.05)	6.55 (0.25)	2.17 (0.16)	2.70 (0.20)	0.00 (0.00)
TS3	5.3 (0.00)	7.05 (0.15)	2.22 (0.14)	2.80 (0.18)	0.00 (0.00)
TS4	5.4 (0.00)	6.65 (0.15)	1.85 (0.12)	2.35 (0.15)	0.00 (0.00)
TS5	5.2 (0.04)	3.18 (0.03)	0.01 (0.00)	0.02 (0.00)	4.88 (0.41)



Şekil 4.12: Aerobik, antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

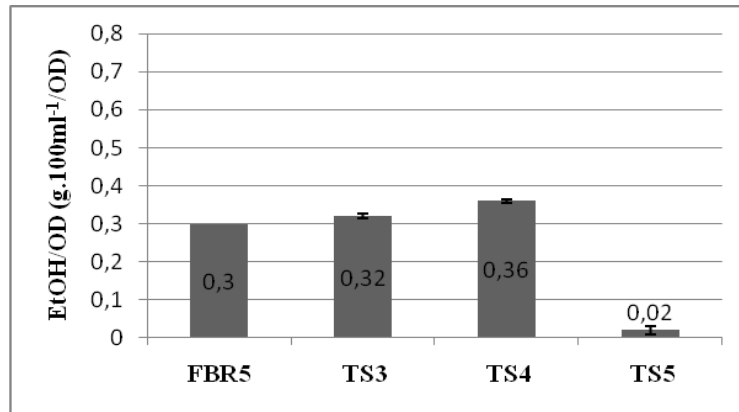
4.2.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v), 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 7-8 (w/v) glukoz içeren patates işleme atık suyu hidrolizatı kullanılarak hazırlanmış besiyeri (PASH, pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PASH besiyerinde mikroaerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en fazla değer TS3 suşu ile olduğu bulundu. Etanol üretiminin (% w/v; % v/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 15 ($p = 0.02$) ve TS4 suşu ile ise % 11 ($p = 0.01$) daha fazla olduğu belirlendi (Çizelge 4.11). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD), FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 20 daha fazla ($p = 0.01$) olduğu görüldü (Şekil 4.13). Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık), TS3 ve TS4 suşları ile glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.5) daha az ($p < 0.05$) bulundu (Şekil 4.15). Kültür ortamında bulunan glukozun hemen tamamı FBR5, TS3 ve TS4 suşları tüketirken, TS5 suşunun ancak % 26'sını (w/v) tükettiği belirlendi (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.6 (0.05)	8.63 (0.01)	2.57 (0.01)	3.26 (0.02)	0.00 (0.00)
TS3	5.5 (0.04)	9.17 (0.01)	2.96 (0.08)	3.76 (0.10)	0.00 (0.00)
TS4	5.8 (0.06)	7.90 (0.08)	2.86 (0.04)	3.62 (0.05)	0.00 (0.00)
TS5	5.6 (0.61)	3.01 (0.53)	0.08 (0.02)	0.10 (0.03)	5.93 (1.13)



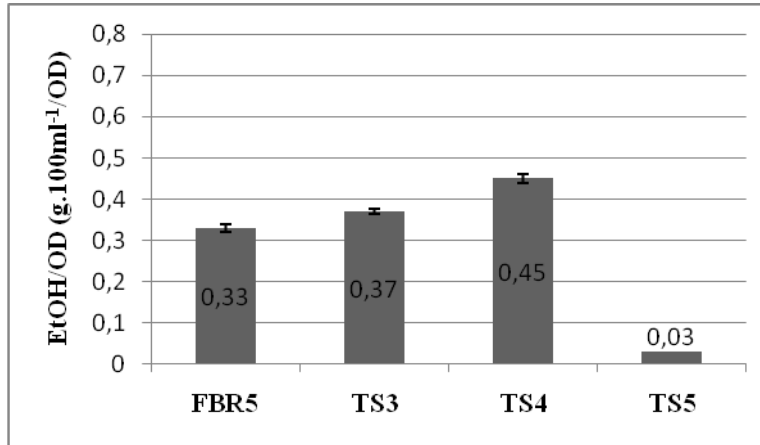
Şekil 4.13: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen, PASH besiyerinde, mikroaerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonunda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerlerinde benzer azalmalar görülürken, TS5 suşu ile daha yüksek bir değer belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en fazla değer TS3, en az değer ise TS5 suşu ile olduğu gözlemlendi. Etanol üretiminin (% w/v; % v/v), TS5 suşu ile en az, TS3 ve TS4 suşları ile ise benzer şekilde en fazla olduğu belirlendi (Çizelge 4.12). FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 15 ($p = 0.05$) ve TS4 suşu ile % 16 ($p = 0.04$) daha fazla etanol üretimi belirlendi (% w/v; % v/v). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol

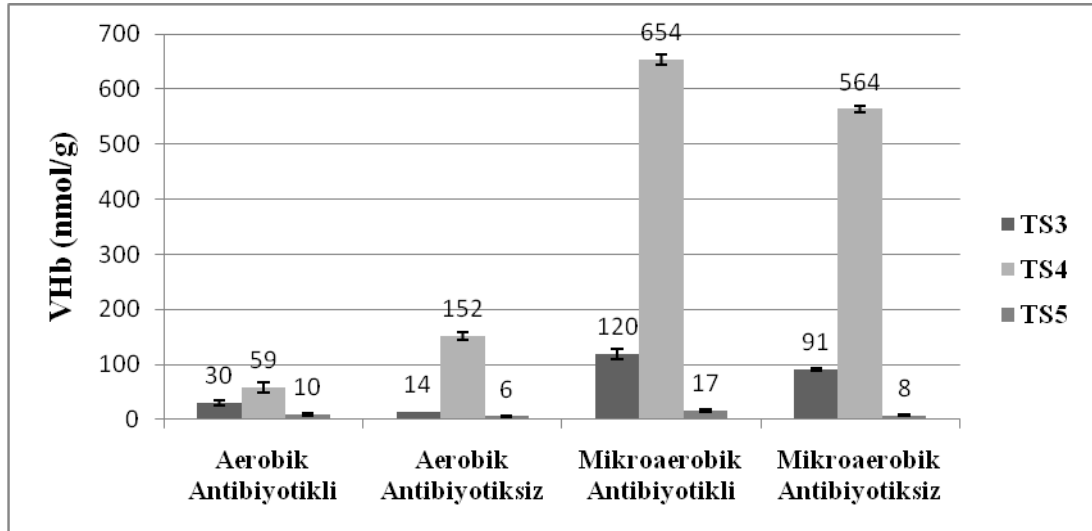
x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD), FBR5 suşundan TS3 suşu ile % 12 (p > 0.05), TS4 suşu ile ise % 36 (p = 0.02) daha fazla saptandı (Şekil 4.14). Bu koşullardaki VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık), TS3 ve TS4 suşlarında, glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.5) farklı (p > 0.05) bulunmadı (Şekil 4.15). Kültür ortamında bulunan glukozun tamamını FBR5, TS3 ve TS4 suşları tüketirken, TS5 suşunun yaklaşık % 16'sını (w/v) tükettiği belirlendi (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12: Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.6 (0.04)	8.82 (0.44)	2.93 (0.15)	3.72 (0.18)	0.00 (0.00)
TS3	5.5 (0.01)	9.20 (0.30)	3.37 (0.08)	4.32 (0.10)	0.00 (0.00)
TS4	5.8 (0.08)	7.56 (0.04)	3.39 (0.08)	4.31 (0.10)	0.00 (0.00)
TS5	6.3 (0.41)	2.30 (0.27)	0.07 (0.03)	0.08 (0.04)	6.70 (0.30)



Şekil 4.14: Mikroaerobik, antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.15: PASH besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin Vhb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.2.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kültürler

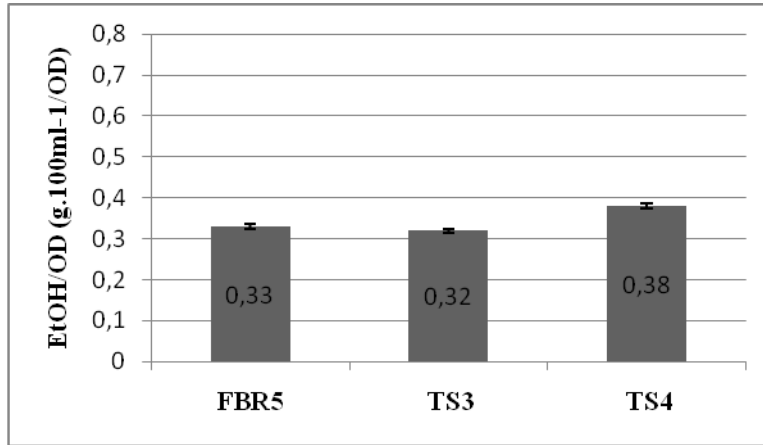
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v), 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 7-8 (w/v) glukoz içeren patates işleme atık suyu hidrolizatı kullanılarak hazırlanmış besiyeri (PASH, pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PASH besiyerinde, aerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde, büyümenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en fazla değer TS3 suşunda olduğu gözlemlendi. Etanol üretiminin (% w/v, % v/v), FBR5 suşu ile üretilene göre TS3 suşu ile % 4 ($p > 0.05$) ve TS4 suşu ile ise % 8 ($p > 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi (Çizelge 4.13). Her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$) incelendiğinde, TS4 suşu ile FBR5 suşuna göre % 15 oranında bir artış ($p = 0.03$) görüldü (Şekil 4.16). Bu koşullardaki Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) TS3 ve TS4 suşlarında glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.10)

daha az ($p > 0.05$) bulundu (Şekil 4.20). Kültür ortamında bulunan glukozun FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile tamamının tüketildiği tespit edildi (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH		OD (600 nm)		EtOH (g/100 ml)		EtOH (% v/v)		Glukoz (% w/v)	
FBR5	5.77	(0.02)	8.24	(0.06)	2.80	(0.08)	3.48	(0.10)	0.00	(0.00)
TS3	5.77	(0.18)	9.03	(0.03)	2.90	(0.09)	3.68	(0.11)	0.00	(0.00)
TS4	5.83	(0.02)	7.99	(0.05)	3.03	(0.12)	3.85	(0.15)	0.00	(0.00)



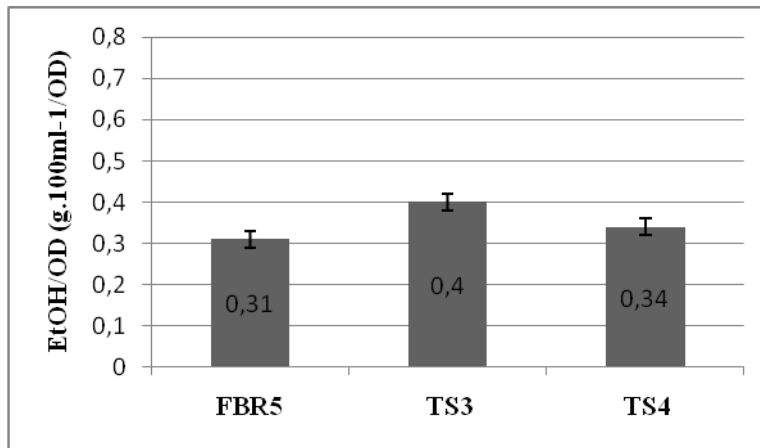
Şekil 4.16: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen PASH besiyerinde, aerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde benzer azalmalar belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en fazla değer FBR5 suşu ile olduğu görüldü. Etanol üretiminin (% w/v; % v/v) TS3 suşu ile FBR5 suşu ile üretilenden % 19 daha fazla ($p = 0.04$) olduğu tespit edildi (Çizelge 4.14). Her ünite hücre biyokütlesi başına

üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD) incelendiğinde, FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 29 (p = 0.02) ve TS4 suşu ile % 10 (p > 0.05) oranında bir artış görüldü (Şekil 4.17). Bu koşullardaki Vhb ekspresyonlarının (nmol/g yaş ağırlık) glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.10) daha az olduğu (p < 0.05) tespit edildi (Şekil 4.20). Kültür ortamında bulunan glukozun tüm suşlar tarafından tüketildiği belirlendi (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	4.64 (0.08)	7.13 (0.03)	2.24 (0.10)	2.84 (0.13)	1.54 (0.26)
TS3	4.91 (0.05)	6.55 (0.15)	2.66 (0.15)	3.37 (0.19)	1.65 (0.19)
TS4	4.75 (0.09)	6.86 (0.12)	2.21 (0.15)	2.81 (0.25)	2.52 (0.75)



Şekil 4.17: Büyük hacimde, aerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

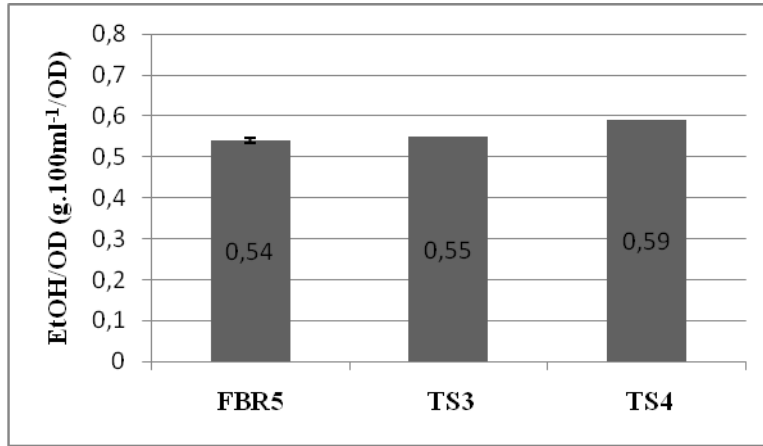
4.2.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v), 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 7-8 (w/v) glukoz içeren patates işleme atık suyu hidrolizatı kullanılarak hazırlanmış besiyeri (PASH, pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren, PASH besiyerinde, mikroaerobik koşulda ve büyük hacimde büyütölen kùltürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS3 suşu ile göröldü ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en yüksek değer TS3 suşu ile belirlendi. Etanol üretimi (% w/v; % v/v) ise en yüksek TS4 suşu ile ($p = 0.00$) tespit edildi (Çizelge 4.15). FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 5 ($p = 0.02$) ve TS4 suşu ile % 11 ($p = 0.01$) daha fazla etanol üretimi belirlendi (Çizelge 4.15). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$) FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 9 daha fazla ($p = 0.01$) olduğu göröldü (Şekil 4.18). VHb ekspresyonlarının (nmol/g yaş ağırlık) TS3 ve TS4 suşu ile glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden daha az ($p < 0.05$) olduğu belirlendi (Şekil 4.20). Kùltür ortamında bulunan glukozun tamamını FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının tükettikleri belirlendi (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	6.20 (0.02)	6.71 (0.08)	3.66 (0.00)	4.64 (0.00)	0.00 (0.00)
TS3	5.81 (0.01)	7.00 (0.02)	3.83 (0.03)	4.85 (0.04)	0.00 (0.00)
TS4	6.16 (0.02)	6.95 (0.07)	4.08 (0.02)	5.17 (0.03)	0.00 (0.00)

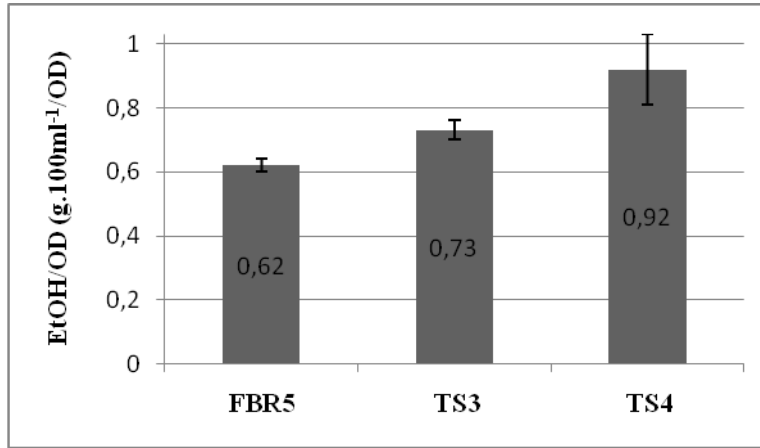


Şekil 4.18: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotikli koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

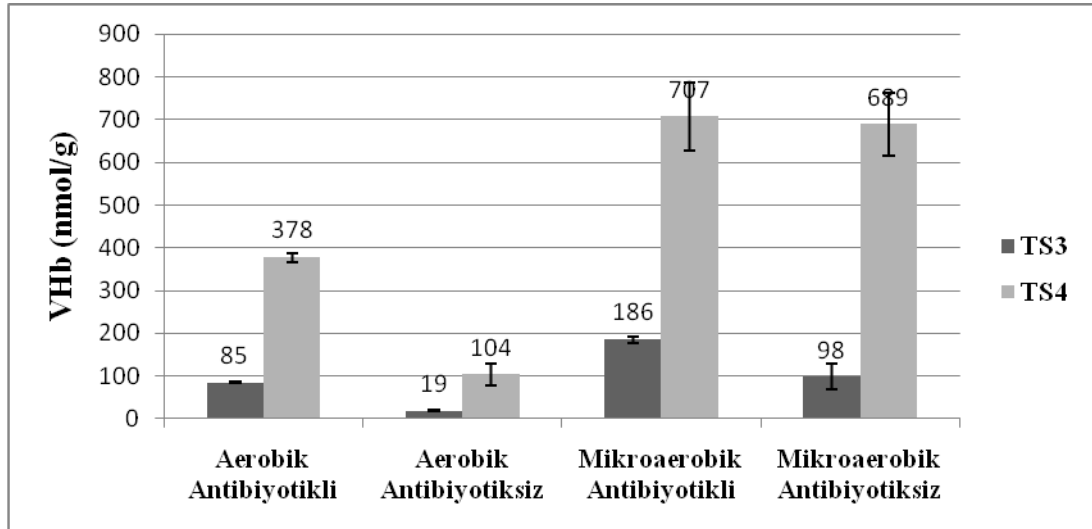
Antibiyotik içermeyen PASH besiyerinde, mikroaerobik koşulda ve büyük hacimde büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki değerlerinde benzer azalmalar belirlendi ($p < 0.05$). Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında, en fazla değer FBR5 suşunda olduğu gözlemlendi. Etanol üretiminin FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 17 ($p = 0.05$) ve TS4 suşu ile % 18 daha fazla ($p = 0.04$) olduğu belirlendi (Çizelge 4.16). Her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarının (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 17 ($p = 0.05$) ve TS4 suşu ile % 48 ($p = 0.03$) daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.19). Bu koşullardaki VHb ekspresyonlarının (nmol/g yaş ağırlık) TS3 ve TS4 suşlarında glukoz ile aynı koşullarda elde edilen değerlerden (Şekil 4.10) fazla farklı olmadığı ($p > 0.05$) görüldü (Şekil 4.20). Kültür ortamında bulunan glukozun FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile tamamının tükendiği tespit edildi (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının PASH ile hazırlanan ve % 7-8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan glukoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Glukoz (% w/v)
FBR5	5.72 (0.28)	6.74 (0.13)	4.18 (0.17)	5.29 (0.23)	0.00 (0.00)
TS3	5.54 (0.34)	6.69 (0.18)	4.88 (0.18)	6.18 (0.24)	0.00 (0.00)
TS4	5.42 (0.55)	5.42 (0.25)	4.94 (0.38)	6.27 (0.46)	0.00 (0.00)



Şekil 4.19: Büyük hacimde, mikroaerobik ve antibiyotiksiz koşullarda, PASH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.20: PASH besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

VHb ekspresyonunun (TS3 ve TS4 suşlarında), kontrol suşuna göre, PASH içeren ortamlarda ve farklı koşullarda, etanol miktarları (% w/v; % v/v) ve her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol (EtOH/OD) değerleri açısından, glukoz ile aynı koşullarda elde edilenden daha fazla artış sağladığı tespit edildi.

4.3. Rekombinant Hücrelerdeki Plazmid Kararlılığı

Antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin, 48 saat sonundaki plazmid kararlılığının belirlenebilmesi için seri dilüsyonlar hazırlandı ve uygun dilüsyondan antibiyotiksiz LB agarlara ekim yapıldı. 37 °C sıcaklıkta, 24 saat büyütülen koloniler steril kürdanlar vasıtası ile uygun antibiyotikleri içeren LBK katı besiyerine ekildi. Yine 37 °C sıcaklıkta, 24 saat büyütülen koloniler sayıldı ve tüm antibiyotiksiz koşullarda, TS3 suşunun % 50, TS4 suşunun ise % 100 plazmid kararlılığı gösterdiği belirlendi.

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) ve bu suşlardan *pdh*, *adh* ve *vgb* içerecek şekilde geliştirilen TS3, TS4 ve TS5 suşlarının farklı havalandırma koşullarında, glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizatı ile hazırlanan, antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerindeki biyoetanol üretim özellikleri incelendi.

Daha önceki çalışmalarda, VHb ekspresyonu yapmak üzere geliştirilen rekombinant bakteriler arasında bütandiol ve asetoin gibi fermentasyon ürünlerinin de yer aldığı birçok metabolitin üretiminin arttığı belirlenmiştir (Geckil et al., 2004). Ayrıca, VHb'nin *Saccharomyces cerevisiae*'de etanol üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Chen et al., 1994). Ancak VHb'nin etanol üretimindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileri tamamen aydınlığa kavuşmamıştır.

Gıda işleme sanayisi atık suyundaki lignoselülozik materyallerin selüloz ve hemiselüloz kısımları fermente edilebilir şekerlerden glukoz (%49), ksiloz (%18) ve arabinoz (%3) (Mohagheghi et al., 2006) içermektedir. Patates işleme atık suyu ise hidrolizi ile glukozla dönüşebilen önemli bir nişasta kaynağıdır. *E. coli* FBR5 suşu bu üç şekeri de fermente edebilmektedir (Dien et al., 2000). Buna dayanarak, bu tez çalışmasında, *E. coli*'nin fizyolojisi, biyokimyası, moleküler biyolojisi ve VHb konusundaki pratik uygulamaları oldukça iyi bilindiği için, VHb ekspresyonu yapan *vgb* ile transforme edilmiş *E. coli* FBR5 suşları (TS3, TS4 ve TS5) kullanıldı.

Bu çalışmada, VHb ekspresyonunun, aerobik ve mikroaerobik koşullarda, LBG (glukoz; % 8, w/v) veya PASH içeren (glukoz; % 7-8, w/v) besiyerlerinde, hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin artmasına neden olduğu görüldü.

LBG besiyerinde, mikroaerobik koşullarda, antibiyotik içeren büyük ölçekli ortamlarda, 48 saatlik inkübasyon sonunda, etanol üretiminin, FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 13 daha fazla olduğu belirlendi. Hem küçük hem de büyük ölçekli LBG besiyerinde, aerobik olarak büyütülen kültürlerde, her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminde, en yüksek değerler TS3 suşu yaklaşık % 18 daha fazla olarak elde edildi. Mikroaerobik koşullarda, antibiyotik içermeyen, küçük ölçekli

LBG besiyerinde her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi için en yüksek değerler ise, FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 24 daha fazla olarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre, en fazla etanol üretimi, büyük ölçekli PASH içeren antibiyotiksiz ortamlarda, 48 saat süren mikroaerobik inkübasyonun sonunda, FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 17 ve TS4 suşu ile % 18 daha fazla olacak şekilde sağlandı. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi için ise en yüksek değerler, büyük ölçekli PASH içeren antibiyotiksiz ortamlarda, 48 saat süren mikroaerobik inkübasyonun sonunda, yine FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 17 ve TS4 suşu ile % 48 daha fazla olarak belirlendi.

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada da *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları kullanılmış ve mikroaerobik koşullarda, % 8 (w/v) glukoz veya ksiloz ya da % 20 mısır hidrolizatı içeren LB besiyerinde üretilen kültürlerde, düşük seviyelerde VHb ekspresyonu yapan TS3 suşunun, FBR5 suşundan daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, VHb ekspresyonunun ksilozdan etanol üretimini arttırdığı, glukozdan ise az miktarda arttırabildiği gösterilmiştir.

Araştırmacılar, VHb ekspresyonunun glukoz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde, küçük ölçekli ortamda % 30, ksiloz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde % 119 ve mısır hidrolizatı (% 20, w/v) içeren LB besiyerinde % 59 oranında etanol üretimini arttırdığını belirlemişlerdir. Çalışmanın devamında, 2 litrelik fermentörlerde, glukoz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde denemelerde, TS3 suşunun % 10 daha fazla etanol ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, yukarıda söz edilen çalışmadaki verilere uygun bir şekilde, % 8 (w/v) glukoz içeren küçük ölçekli ve büyük ölçekli LBG besiyerinde etanol üretimi genellikle en fazla TS3 suşu ile elde edildi. Ancak PASH besiyeri ile küçük ölçekli ve mikroaerobik denemelerde, VHb ekspresyonunun, TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık % 16 etanol üretimini arttırdığı; her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini ise en fazla TS4 suşu ile yaklaşık % 36 oranında arttığı saptandı. Ayrıca PASH besiyeri ile büyük ölçekli denemelerde, yine FBR5 suşuna göre, TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık % 18 oranında etanol üretiminin arttığı ancak her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin en fazla, yine TS4 suşu ile % 48 oranında arttığı belirlendi.

Hem aerobik hem de mikroaerobik koşullarda genel olarak TS3 suşlarındaki VHb ekspresyonu seviyeleri TS4 suşundakinden daha düşük bulundu. pTS3

plazmidi, pTS4 plazmidinden daha düşük kopya sayısına sahip olduğundan, VHb ekspresyonları arasındaki bu farkın nedeninin gen doz etkisi olabileceği düşünüldü. Yapılan denemelerde TS3 suşunun, antibiyotiksiz LBG veya PASH besiyerinde, aerobik ve mikroaerobik koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonunda plazmid kararlılığının % 50 oranında olduğu, TS4 suşunun ise % 100 oranında olduğu belirlendi. Buna karşın, pTS5 plazmidi, pTS3 ve pTS4 plazmidlerinden daha fazla kopya sayısına sahip olmasına rağmen, TS5 suşunda bazı koşullarda VHb ekspresyonunun ve hiçbir koşulda etanol üretiminin saptanamamasının nedeninin ise, bu suşta *vgb*, *adhb*, *pdh* genlerinin aynı plazmidde taşınması ve bir şekilde *vgb* ekspresyonunun diğer *adhb*, *pdh* genlerinin ekspresyonlarını etkileyebilmesinden veya bu plazmidin kararlı olmamasından ileri gelebileceği düşünüldü.

Önceki çalışmalarda *E.coli*'de VHb ekspresyonunun mikroaerobik koşullarda etanol üretimini azalttığı belirlenmiştir (Tsai et al., 1996). Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, % 20 (v/v) mısır hidrolizatı içeren LB besiyerinde yüksek seviyede eksprese olan VHb ile etanol üretimi arasında ters bir orantı belirlenmiştir. Bu verilerle uyumlu bir şekilde, bu tez çalışmasında, glukoz içeren LBG besiyerinde TS3 suşu ile VHb'nin düşük seviyelerdeki ekspresyonunun hem etanol miktarını hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Buna karşın, PASH besiyerinde VHb'nin TS4 suşunda görülen yüksek seviyelerdeki ekspresyonu, özellikle her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini arttırdığı belirlendi.

Daha önceki çalışmalarda, mayada VHb, ksiloz fermentasyonunu artırarak ksilozun ksiluloza dönüşümündeki redoks dengesizliğine rağmen etanol üretimini arttırmıştır (Ruohonen et al., 2006). *E. coli*'de ksilozun ksiluloza dönüşümü tek basamaklıdır (Song ve Park., 1997). Ksilozun direkt ksiluloza dönüşümü ilk indirgeyici adımı ve ikinci oksidatif adımı elimine eder. Böylece VHb ekspresyonu, *E. coli*'de ksilozdan etanol üretimini artırır. Bu da VHb'nin gelecekte fermentasyonda ksiloz izomeraz sentezleyen endüstriyel diğer mikroorganizmaların kullanılabileceğini gösterir. Bu bağlamda, ksiloz veya glukoz içeren ortamlarda, etanol üretiminin, VHb ekspresyonu ile etkinliğinin artırılması, *E. coli*'de hücre içi ATP seviyesini yükselterek daha güçlü enerji durumunu mümkün kılabilir. Bilindiği gibi, önceki çalışmalarda, VHb'nin oksijeni terminal oksidazlara transfer eden bir

araç olarak iş gördüğü belirlenmiştir. VHb sitokrom *bo* ubikinol oksidazın 1 nolu alt ünitesine bağlanır, oksijeni transfer eder ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretimini özellikle düşük oksijenli koşullarda sağlar. (Park et al., 2002). *E. coli*'de VHb eksprese eden suşlar VHb eksprese etmeyen yabani suşlara göre daha yüksek büyüme oranı ve daha az glukoz tüketim oranı göstermişlerdir ki bu da glikolizisten daha etkin ATP ve NADH oluşumu ile ilişkilidir (Tsai et al., 1996). VHb'nin, NADH/NAD⁺ ve ATP/ADP oranlarındaki değişiklikleri indükleyici bir rol oynadığı sanılmaktadır. VHb'nin hücre içeriğini daha oksidize bir hale getirdiği ve böylece metabolik yollarda karbon akış şemasını değiştirdiği düşünülmektedir (Dikshit et al., 1992). VHb ekspresyonunun, *E. coli*'de, mikroaerobik koşulda NADH miktarının azalmasına ve de ATP miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Dikshit et al., 1992). Arnaldos ve arkadaşlarının (2012) TS3 ve FBR5 suşları ile yapmış olduğu bir çalışmada, NAD⁺, NADH ve ATP seviyeleri, VHb'nin etanol üretimi üzerindeki biyokimyasal etkilerinin anlaşılması açısından incelenmiştir. Fermentasyonun erken evrelerinde NAD⁺/NADH oranı TS3 suşu için FBR5 suşuna göre daha az iken, büyümenin geç evrelerinde arttığı görülmüştür (Arnaldos et al., 2012). Başka bir deyişle, mikroaerobik koşulda, hücreler anaerobikten çok aerobik metabolizmalarını kullanarak daha az karbon kaynağından daha çok enerji üretebilmektedirler (Tsai et al., 1996). Böylece, *vgb* taşıyan rekombinant hücrelerin geliştirilmesi ile enerjiyi verimli kullanmaları sayesinde, çeşitli karbon kaynaklarından üretilecek metabolitlerin daha yüksek miktarlarda elde edilebilmesi sağlanabilir. Bu tez çalışmasında da, özellikle mikroaerobik koşullarda, PASH besiyerinde, VHb ekspresyonu ile hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin arttığı ve ortamdaki glukozun tamamen tükendiği belirlendi. Patates işleme atık suyu hidrolizatının içerdiği glukoz oranı ile LBG besiyerindeki glukoz oranları eşit olmasına rağmen, patates atık suyunun, bileşiminden dolayı, üremeyi, VHb ekspresyonunu ve böylece etanol üretim etkinliğini arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

Etanol oluşumu her ne kadar fermentatif bir olay ise de, optimum sentezi belli kritik seviyede oksijene gereksinim duymaktadır. Bu bağlamda, VHb ile arttırılmış etanol üretim etkinliği *E.coli* hücrelerinin arttırılmış biyosentetik kapasitesi ile ilgili olabilir. Daha fazla enerji, etkin hücre büyümesi ve diğer metabolik işlemlerin (örneğin metabolik enzimlerin biyosentezi) çoğalmasına neden olarak hücrelerin

biyosentetik kapasitelerinin artmasına yol açar. Bu tez çalışmasında da, VHb ekspresyonunun etanol sentez yol izindeki enzimlerin aktivitesini arttırmış olabilir. Ayrıca *E.coli*'de VHb ekspresyonunun ribozom ve tRNA seviyelerini yükselttiği ve böylece hücrelerin biyosentetik kapasitelerini arttırdığı tahmin edilmektedir. *E.coli*'de VHb'nin 308 genin transkripsiyonunu etkilediği belirlenmiştir (Roos et al., 2004). Böylece VHb hücrenin düşük oksijenli ortamlara uymasını bu koşullarda biyokütle artışı ve artmış VHb düzeyi ile sağladığı tespit edilmiştir (Tsai et al., 1996).

VHb ekspresyonunun etanol üretimini arttırmadaki indirekt etkileri biyokimyasal yol izleri üzerine de olabilir. VHb glikolizisin hazırlık fazına aracılık edebilir. Örneğin VHb ekspresyonu ile yüksek ATP seviyeleri glukozdan, glukoz-3-fosfatın üretimini arttırabilir.

VHb'nin ekspresyonunun, oksijen difüzyonunu kolaylaştırdığı ve aerobik metabolizmayı geliştirdiği öne sürülmüştür (Khosla et al., 1990). Çalışmamız kapsamında yapılan deneylerde, VHb, etanol üretimini hücre içerisinde serbest oksijeni sağlayarak ve buna bağlı olarak uygun redoks durumu oluşturarak arttırmış olabilir. Bu da, VHb ile ilişkili etanol artışının biyokütle artışından çok daha fazla etanol üretim etkinliğini arttırdığı düşüncesini desteklemektedir.

Fermentasyon sonunda kültür ortamlarındaki pH değerlerinde benzer azalmalar belirlendi. Bu azalmalar, fermentasyonla CO₂ üretiminden ileri gelebilir. Bununla beraber, glukoz (% 8, w/v) içeren LBG besiyerinde en fazla TS3 suşu ile, PASH besiyerinde en fazla TS4 suşu ile ve tüm ortamlarda en az TS5 suşu ile etanol üretimi belirlenmesine rağmen genel olarak suşların üretildiği ortamların pH değerleri birbirine benzer bulundu ve etanol üretimi ile kararlı bir ilişki kurulamadı.

VHb ekspresyonunun düşük oksijenli koşullarda indüklendiği bilinmektedir (Webster, 1987). Bu tez çalışmasında da, benzer şekilde, VHb ekspresyonları düşük havalandırılmalı koşullarda yüksek havalandırılmalı koşullara göre bütün kültür ortamlarında daha fazla bulundu.

VHb'nin aracı olduğu gen ekspresyonundaki değişiklikler etanol üretiminin etkinliği üzerinde de etkili olabilir. Bu etki, VHb'nin oksidatif strese aktive olan transkripsiyon faktörü aktivitesini direk olarak etkilemesiyle ilgili olabilir ki bu da *E.*

coli'de OxyR transkripsiyon faktörü için gösterilmiştir (Anand et al., 2010). Buna bağlı olarak da VHb etanol üretimini arttırabilir hatta VHb üretimi fazla arttırmaya bile FBR5 suşu ile elde edilenden daha hızlı etanol üretimi sağlayabilir.

Böylece yapılan çalışmada elde edilen veriler, fazla maddi yükü olmayan patates işleme atık suyu hidrolizatı ile *vgb/VHb* sisteminin sanayide biyoetanol üretiminde potansiyel olarak kullanılabileceğini ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, *E. coli* suşları NZN111 ve FBR5 ve bu suşlardan geliştirilen TS3, TS4 ve TS5 suşları kullanılarak, VHb'nin gıda işleme atık suyunda (patates işleme atık suyu) biyoetanol üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Patates işleme atık suyu hidrolizati içeren ortamda ve farklı havalandırma koşullarında, *vgb*, *pdh* ve *adh* dizilerine sahip bu rekombinant suşlar ve ürettikleri etanol miktarının belirlenmesi, üreme özelliklerinin incelenmesi ve ürettikleri hemoglobin miktarının ölçülmesi, VHb teknolojisi ile yapılan çalışmalar kapsamında bir ilki oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması ile glukoz veya patates işleme atık suyu hidrolizati kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde, aerobik ve mikroaerobik koşullardaki, belirli seviyede VHb ekspresyonunun, biyokütle artışından çok her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminde artışına neden olduğu gösterilmiştir. Farklı koşullarda, VHb ekspresyonunun, TS3 ve TS4 suşlarında etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Etanol üretimi, %8 (w/v) glukoz içeren LBG besiyerinde, FBR5 kontrol suşu ile elde edilene göre, düşük seviyelerde VHb ekspresyonu yapan TS3 suşu ile %13 artarken, yine aynı suş ile her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin %24 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Patates işleme atık suyu hidrolizati içeren ortamda ise, FBR5 kontrol suşuna göre, VHb ekspresyonunun, etanol üretimini TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık %18 arttırdığı, bununla birlikte yüksek seviyelerdeki hemoglobin ekspresyonunun her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini TS4 suşu ile % 48 oranında arttırdığı belirlenmiştir. TS3 ve TS4 suşları ile patates işleme atık suyu hidrolizati içeren tüm ortamdaki glukozun tamamına yakınının kullanıldığı belirlenmiştir.

Güncel olan böyle bir konunun sanayiye yönelik uygulamalarının araştırılması kaçınılmazdır. Bu tez çalışması, bundan sonra yapılabilecek olan uluslararası işbirliğine dayalı diğer projelere ışık tutacaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bulunan en uygun koşullar, daha ileriki büyük ölçekli biyoetanol üretim çalışmaları için de temel oluşturacaktır. Sonraki çalışmalarda, patates işleme atık suyu içerisindeki nişastanın farklı metotlarla hidrolize edilmesi sağlanarak glukoz miktarının biraz daha arttırılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada,

patates işleme atık suyu hidrolizatı içerisine katılan pepton ve maya özütü miktarları değiştirilerek biyoetanol üretiminin verimi arttırılabilir. Ancak, böyle bir uygulamanın maddi yükü ayrıca değerlendirilmelidir.

Farklı çalışmalarda, bu çalışmada kullanılan rekombinant suşların farklı gıda işleme atık suyu (örneğin şeker pancarı) içeren ortamlarda etanol üretim kapasitelerinin incelenmesi de VHB teknolojisinin bu alanda kullanımına ek bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca, VHB'nin daha farklı biyoyakıtların (örneğin butandiol) üretimini arttırıcı etkisinin bu rekombinant suşlarla denenmesi ilgi çekici sonuçlar doğurabilecek niteliktedir.

Ülkemizde enerjide yüzde 80'in üzerinde olan dışa bağımlılık ve bu bağımlılığın getirdiği zorluklar, enerji dağılımında yapılan stratejik hatalar, küresel ısınma, enerji kaynaklarındaki azalmalar, güvenlik problemleri gibi nedenlerden dolayı alternatif enerji kaynaklarını hayata geçirmek için yeni projeler geliştirilmek zorunluluğu göz ardı edilemez düzeydedir. Alternatif enerji kaynaklarının başında gelen ve yenilenebilir olması sayesinde öne çıkan biyoetanolün üretim veriminin arttırılması ise en umut vaat edici yaklaşımdır.

Sonuç olarak, patates işleme atık suyundan biyoetanolün mikrobiyal yolla üretiminde *vgb/VHB* sisteminin kullanılması iyi bir uygulama alanı olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında gerçekleştirilecek diğer projeler ile VHB'nin gıda işleme atık sularından biyoetanol üretiminin endüstriye uygulanırılığının saptanması yanında çevresel ve ekonomik önemi olacağı şüphesizdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] MacKenzie, J.J., (2003) Technology growth curves: a new approach to reducing global CO₂ emissions, *Energy Policy* 31: 1183 – 1187.
- [2] Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., McMillan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B. and Zhang, M., (1997) Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective, In: *Fuels and Chemicals from Biomass*, 1: 2 - 45
- [3] AFDC - Alternative Fuel Data Center, Replacement Fuel & Alternative Fuel Vehicle Technical & Policy Analysis, (1997) An Overview and Summary, The United States Department of Energy.
- [4] Williams, P.R.D., Cushing, C.A. and Sheehan, P.J., (2003) Data Available for Evaluating the Risks and Benefits of MTBE and Ethanol as Alternative Fuel Oxygenates, *Risk Analysis*, 23 (5): 1085 – 1115.
- [5] EPDK – Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu, (2011) 5015 sayılı Petrol Piyasası Kanunu.
- [6] Tarkim - Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş., (2009) Yenilenebilir Enerji Kaynağı: Biyoetanol, Tarkim Hakkında.
- [7] Tezkim - Tezkim Tarımsal Kimya İnş. San. ve Tic. A.Ş., (2009) Rakamlarla Tezkim, Tezkim Hakkında.
- [8] Konya Şeker - Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş., (2009) Yatırımlar; Biyoetanol Üretim Tesisleri, Biyoetanol ve Biyoetanol Üretimi. Biyoetanol Kataloğu.
- [9] YDK - T.C. Başbakanlık Yüksek Denetleme Kurumu, (2008) Türkiye Şeker Fabrikaları Anonim Şirketi Genel Müdürlüğü 2007 Yılı Raporu.
- [10] PETDER - Petrol Sanayi Derneği, (2009) 2008 Yılı Sektör Raporu.
- [11] Bayraktaş, Ş. (TZOB Genel Başkanı), 21 Eylül 2011 Basın Bülteni.

- [12] Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B. and Walsh, F.C., (2006) Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelect.* 21: 2015 – 2045.
- [13] Von Blottnitz, H. and Curran, M.A., (2006) A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life-cycle perspective, *Journal of Cleaner Production* 34: 2654 – 2661.
- [14] Couper, A.S., (1858) On a New Chemical Theory, *Philosophical Magazine*, 16: 104-116.
- [15] Ballinger, P. and Long, F. A., (1960) Acid Ionization Constants of Alcohols. II. Acidities of Some Substituted Methanols and Related Compounds, *Journal of the American Chemical Society*, 82(4): 795-798.
- [16] Moore, J.W., Stanitski, C.L., Jurs, P.C., (2008) *Chemistry: The Molecular Science*, 3rd Edition.
- [17] Streitweiser, A. J. and Heathcock, C. H., (1976) *Introduction to Organic Chemistry*, MacMillan, 3: 1186
- [18] DiPardo, J., (2007) Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand, United States Department of Energy.
- [19] Grassi G., (2000) Bioethanol, Industrial world perspectives, *Renewable energy world*, May – June 2000
- [20] Farrel A.E., (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals, *Science*, 311, 506-08.
- [21] Mills, G.A. and Ecklund, E.E., (1987) Alcohols as Components of Transportation Fuels, *Annual Review of Energy* 12: 47.
- [22] Hennel, H., (1828) On the mutual action of sulphuric acid and alcohol, and on the nature of the process by which ether is formed, *Philosophical Transactions*, 118: 365-371.

- [23] John, J.A. and Miller S.A, (1969) Ethylene and industrial derivatives, Ernest Benn, 690 – 801.
- [24] Nelson, C.R. and Courter, M.L., (1954) Ethanol by hydration of ethylene, Chemical Engineering Progress, 50: 526 – 532.
- [25] Lodgson, J.E., (1994) “Ethanol”, 4th ed. vol. 9, John Wiley & Sons, In J.I. Kroschwitz (Ed.) Encyclopedia of Chemical Technology, New York, 820.
- [26] Güven, S., ve Güneser, O., (2007) Biyoetanol Üretimi ve Önemi. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 1: 91-96
- [27] CSIR - Council of Scientific and Industrial Research, (1948-1976) The Wealth of India, New Delhi, India, Vols. 11
- [28] Picataggio, S.K., Zhang, M. and Wyman, C.H., (1996) Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington DC, 163–178.
- [29] Dien, B.S., Cotta, M.A. and Jeffries, T.W., (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status, Applied Microbiology and Biotechnology, 63:258–266.
- [30] Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A. and Kuhad, R.C., (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501, Bioresource Technology, 98: 1947–1950.
- [31] Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., McMillan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B. and Zhang, M., (1997) Advanced bioethanol production, Fuels and Chemicals from Biomass, 666: 2-45
- [32] Krishnan, M.S., Xia, Y., Ho, N.W.Y. and Tsao, G.T., (1997) Fuels and Chemicals from Biomass, 666: 20, 74-92.

- [33] Miyamoto, K., (1997) Renewable biological systems for alternative sustainable energy production, FAO Agricultural Services Bulletin, 128: 1010-1365.
- [34] Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martinez, A. Morales F., Saleh, A., Unverwood, S.A., Yomano, L.P., York, S .W., Zaldivar, J. and Zhou, S.D., (1999) Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production, Biotechnology Progress, 15: 855 – 866.
- [35] Matthew, H., Ashley, O., Brian, K., Alisa, E. and Benjamin, J.S., (2005) Wine Making, 101.
- [36] Janssens J.H., Burris N., Woodward A. and Bailey R.B. (1983) Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*, Applied and Environmental Microbiology, 45:598–602.
- [37] Ghaly A.E. and El-Taweel A.A., (1997) Continuous ethanol production from cheese whey fermentation by *Candida pseudotropicalis*, Energy Sources A Recover Util Environmental, 19: 1043–1063
- [38] Canbaş, A., (2003) Sarap Teknolojisi Ders Notları, Ç. Ü. Ziraat Fakültesi, Adana, 195.
- [39] Silveira, W.B., Passos, F., Mantovani, H.C. and Passos, F.M.L., (2005) Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels, Enzyme and Microbial Technology, 36:930–936.
- [40] Sprenger, G.A. (1996) Export of the periplasmic NADP-containing glucose–fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*, Archives of Microbiology, 166: 32–41.
- [41] Swings. J and DeLey J., (1977) The biology of *Zymomonas*, Bacteriological Reviews, 41(1): 1–46.

- [42] Sun, Y. and Cheng, J.J., (2002) Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production, *Bioresource Technology*, Volume 96, Issue 14: 1599–1606.
- [43] Nigam, J.N., (2001) Development of xylose fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate, *Applied Microbiology*, 90: 208–215.
- [44] Chan, A.W., Hoffman, R. and McInnis, B., (2004) *Ecology and Society* 9:1-17.
- [45] Wyman, C.E., (1996) *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor and Francis, Washington, DC, Chapter 1:1 – 18.
- [46] Andersson, E ., Harvey, S. and Berntsson, T., (2006) Energy efficient upgrading of biofuel integrated with a pulp mill, *Energy*, 31:1384 – 1394.
- [47] Cowling, E.B. and Kirk, T.K., (1976) Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 95–123.
- [48] Soares, E. V., Hebbelinck, K. and Soares, H., (2003) Toxic Effect Caused by Heavy Metals in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Comparative Study, *Canadian Journal of Microbiology*, 5: 336-343.
- [49] Parikka, M., (2004) Global biomass fuel resources, *Biomass Bioenergy*, 27: 613–620.
- [50] Solomon, B.O., Amigun, B., Betiku, E., Ojumu, T.V. and Layokun, S.K., (1999), Optimization of cellulase production by *Aspergillus flavus* linn isolate NSPR 101 grown on bagasse. *JNSChE*, 16: 61–68.
- [51] Kim, S. and Dale, B.E., (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.*, 26: 361–375.
- [52] Hood, E.E., (2004) *Nanotechnology: Looking As We Leap*, *Environmental Health Perspectives*, 13:112.

- [53] Das, H. and Singh, S.K., (2004) Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry—a critical appraisal, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 77–89.
- [54] Lynd, L.R., Zyl, W.H., Van McBride, J.E. and Laser, M., (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 577–583.
- [55] Mohagheghi, A., Ruth M. and Schell D.J., (2006) Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overlimining pH on sugar and ethanol yields, *Process Biochemistry*, 41, 1806-11.
- [56] Ragauskas, A.J. Williams, C.K. Davison, B.H. Britovsek, G. Cairney J. Eckert, C.A. Frederick, Jr. W.J., Hallett J.P. Leak D.J. and Liotta C.L., (2006) The path forward for biofuels and biomaterials, *Science*, 311: 484 – 489
- [57] Berndesa, G., Hoogwijkb, M. and Vanden Broeckc, R., (2003) The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies, *Biomass Bioenergy*, 25: 1–28.
- [58] Kadam, K. L. and Newman, M. H., (1997) Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass, *Appl. Microbiology and Biotechnology*, 47, 625-629.
- [59] Maleszka, R., Wang, P.Y. and Schneider, H., (1982) Yeasts that Ferment D-cellobiose as well as D-xylose, *Biotechnology Letters*, 4:133-136.
- [60] Slilinger, P.J., Bothast, R.J., Van Cauwenberge, J.E. and Kurzman, C.P., (1982) Conversion of D-xylose into Ethanol by the Yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 34:371-384.
- [61] Gong, C.S., Claypool, T.A., Mc Cracken, L.D., Maun, C.M., Veng, P.P. and Tsao, G.T., (1983) Conversion of Pentoses by Yeasts, *Biotechnol Biotechnology and Bioengineering*, 25:85-102.

- [63] Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M., (1996) Effects of Lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zynomonas mobilis*, *Pichia strpitrs*, and *Candida shehatae*, *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 220-225.
- [64] Cheung, S.W. and Anderson, B.C., (1997) Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresource Technology*, 59: 81–96.
- [65] Boopathy, R., Gurgas, M., Ullian, J. and Manning, J.F., (1998) Metabolism of explosive compounds by sulfate-reducing bacteria. *Curr. Microbiol.* 37 (2):127–131.
- [66] Dewes, T. and Hunsche, E., (1998) Composition and microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms, *Biological Agriculture and Horticulture*, 16: 251–258.
- [67] Anonim, (2010) Biyoetanol Çalışmaları, Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü.
- [68] Pasha, C., and Rao, L. V., (2009) Thermotolerant yeasts for bioethanol production using lignocellulosic substrates. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, Chapter 25.
- [69] Dien, B.S., Nichols, N.N., OBryan, P.S. and Bothast R.J., (2000) Development of new *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocelulosic biomass, *Applied Biocehmicl Biotechnology*, 84:181-196.
- [70] Bothast R. J., Dien, B. S., Iten, L. B., Hespell, R. B., and Lawton, J. W., (1996) Conversion of corn fiber to ethanol. *Liquid Fuel and Industrial Products from Renewable Resources*, American Society of Agricultural Engineering, St. Joseph, MI, 241–252.
- [71] McMillan, J. D., (1996) Hemicellulose conversion to ethanol. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Taylor and Francis, Washington DC, 287–314.

- [72] Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O., (1991) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:893–900.
- [73] Hahn-Hagerdal, B., Jeppsson, H., Olsson, L., and Mohagheghi, A., (1994) An interlaboratory comparison of the performance of ethanolproducing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 62–72.
- [74] Dien B. S., Kurtzman, C. P., Saha, B. C., and Bothast, R. J., (1996) Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58: 233-242.
- [75] Lawford, H. G. and Rousseau, J. D., (1995) Loss of ethanologenicity in *Escherichia coli* B recombinants pLOI297 and K011 during growth in the absence of antibiotics, *Biotechnology Letters*, 17: 751–756.
- [76] Lawford, H. G. and Rousseau, J. D., (1996) Factors contributing to the lost of ethanologenicity of *E. coli* recombinants pLOI297 and K011, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58: 277–292.
- [77] Wakabayashi, S., Matsubara H. and Webster D.A., (1986) Primary sequence of a dimeric bacterial hemoglobin yrom *Vitreoscilla*, *Nature*, 322:481-483.
- [78] Pringsheim, E.G., (1951) The *Vitreoscilla*: a family of colourless, gliding, filamentous organism, *Journal of General Microbiology*, 5:124-149.
- [79] Khosla, C., and Bailey, J.E., (1988) The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*, *Molecular and General Genetics*, 214: 158-161.

- [80] Kroneck, P.M.H., Jakob, W., Webster, D.A. and R. DeMaio, (1991) Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*: redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein, *BioMetals*, 4:119-125.
- [81] Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Hahm, C.M., Tanner, R.S., Krieg, N.R. Kooops, H-K., Harms H. and Stackebrandt, E., (1984) The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision, *Systematic and Applied Microbiology* 5:327-336.
- [82] Lee, S.Y., Stark, B.C., Webster, D.A., (2004) Structure-function of the *Vitreoscilla* hemoglobin D-region, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 1101-06.
- [83] Dikshit, K. L. and Webster, D.A., (1988) Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*, *Gene*, 70: 377-86.
- [84] Chen W., Hughes, D.E. and Bailey, J.E., (1994) Intracellular expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Progress*, 10: 308-13.
- [85] Geckil H., Barak, Z., Chipman, D.M., Erenler S.O., Webster D.A. and Stark B.C., (2004) Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant *Enterobacter aerogenes* carrying *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26:325-330.
- [86] Wei M.L., Webster, D.A. and Stark, B.C., (1998) Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: alterations in fermentation pathways, *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 640-646.
- [87] Geckil, H., Stark, B.C. and Webster, D.A., (2001) Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Journal of Biotechnology*, 85: 57-66.

- [88] Hart, R.A., Kallio, P.T. and Bailey, J.E., (1994) Effect of biosynthetic manipulation of heme on insolubility of *Vitreoscilla* Hemoglobin in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 2431-7.
- [89] Dikshit, R.P., Dikshit, K.L., Liu, Y.X. and Webster, D.A., (1992) The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293:241-5.
- [90] Kiley, P.J. and Reznikoff, W.S., (1991) *Fnr* mutants that activate gene expression in the presence of oxygen, *Journal of Bacteriology*, 173, 16-22.
- [91] Yang, J., Webster, D. A. and Stark, B. C., (2005) ArcA works with *Fnr* as a positive regulator of *Vitreoscilla* (bacterial) hemoglobin gene expression in *Escherichia coli*, *Microbiology Research*, 160: 405-15.
- [92] Messner, K.R. and Imlay, J.A., (1999) The identification of primary sites superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 10119– 28.
- [93] McCormick, M.L., Buettner, G.R. and Britigan, B.E., (1998) Endogenous superoxide dismutase levels regulate iron-dependent hydroxyl radical formation in *Escherichia coli* exposed to hydrogen peroxide, *Journal of Bacteriology*, 180: 622–5.
- [94] Aldsworth, T.G., Sharman, R.L. and Dodd, C.E.R., (1999) Bacterial suicide through stress, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56: 378–83.
- [95] Storz, G. and Tartaglia, L. A., (1992) OxyR: a regulator of antioxidant genes, *Journal of Nutrition*, 122: 627–30.
- [96] Frey, A.D. and Kallio, P.T., (2003) Bacterial hemoglobins and flovohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology, *FEMS Microbiology Reviews*, 41: 525-45.

- [97] Kaur, R., Pathania, R., Sharma, V., Mande, S.C. and Dikshit, K.L., (2002) Chimeric *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in *Escherichia coli*: new insight into the functional role of VHb, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 152–60.
- [98] Minning, D.M., Gow, A.J., Bonaventuras, J., Braun R., Dewhirst M., Goldberg D.E., Stamler J.S., (1999) *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide activated 'deoxygenase', *Nature*, 401: 497–502.
- [99] Geckil, H., Gencer, S., Kahraman, H., and Erenler, S.O., (2003) Genetic engineering of *Enterobacter aerogenes* with *Vitreoscilla hemoglobin* gene: cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress, *Research in Microbiology* 154: 425-31.
- [100] Khosravi, M., Webster, D.A., Stark, B.C., (1990) Presence of the bacterial hemoglobin gene improves α -amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain, *Plasmid*, 24, 190-4.
- [101] Farres, J. And Kallio, P.T., (2002) Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin, *Biotechnology Progress*, 18, 229-33.
- [102] Geckil, H., Barak, Z., Chipman, D.M., Erenler, S.O., Webster D.A., and Stark B.C., (2004) Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant *Enterobacter aerogenes* carrying *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 325-330.
- [103] Nasr, M.A., Hwang, K.W., Akbas, M., Webster, D.A. and Stark, B.C., (2001) Effects of culture on enhancement of 2,4 Dinitrotoluene degradation by *Burkholderia* engineered with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Biotechnology Progress*, 17: 359-61.
- [104] Webster, D.A., (1987) Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins, *Advances in Inorganic Biochemistry*, 245-65.

- [105] Ramandeep, Hwang, K.W., Raje, M., Kim, K.J., Stark, B.C., Dikshit K.L. and Webster, D.A., (2001) *Vitreoscilla* hemoglobin, Intracellular localization and binding to membranes, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 24781–24789.
- [106] Park, K., Kim, K., Howard, A., Stark, B. and Webster, (2002) *Vitreoscilla* hemoglobin binds to Submit I of Cytochrome bo Ubiquinol oxidases, *Journal Biological Chemistry*, 277:36-37.
- [107] Lin, J.M., Stark, B.C. and Webster, D.A., (2003) Effects of *Vitreoscilla* hemoglobin on the 2, 4-dinitrotoluene (DNT) dioxygenase activity of *Burkholderia* and on DNT degradation in two-phase bioreactors, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 362–368.
- [108] Anand, A., Duk, B.T., Singh, S., Akbas, M.Y., Webster, D.A., Stark, B.C. and Dikshit, K.L., (2010) Redox mediated interactions of *Vitreoscilla* hemoglobin [VHb] with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress, *Biochemical Journal*, 426: 271–280.
- [109] Roos, V., Andersson, C.I.J. and Bulow, L., (2004) Gene expression profiling of *Escherichia coli* expressing double *Vitreoscilla* haemoglobin, *Journal of Biotechnology*, 114: 107–120.
- [110] Chen., W., Hughes, D.E. and Bailey, J.E., (1994) Intracellular expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Progress*, 10: 308-13.
- [111] Ruohonen, L., Aristidou, A., Frey, A.D., Penttila, M. and Kallio, P.T., (2006) Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the metabolism of xylose in recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* under low oxygen conditions, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 6-14.
- [112] Sanny, T., Arnaldos, M., Kunkel, S.A., Pagilla, K.R. and Stark, B.C., Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5): 1103-1112.

- [113] Yamada, S., Shinomiya, N., Ohba, K., Sekikiwa, M. and Yuji O., (2009) Enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of by products from potato processing plants, *Food Sciences and Technology Research*, 15, 6: 633-58.
- [114] Davis, L., Rogers, P., Pearce, J. and Peiry, P., (2006) Evaluation of *Zymomonas* based ethanol production from a hydrolysed waste stream, *Biomass and Bioenergy*, 30: 809-814.
- [115] Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A. and Israilides. C., (2010) Ethanol production from potato peel waste (PWW), *Waste Management* 30: 1898-1902.
- [116] Tasic, M.B., Budimir, V., Konstantinovic, B.V., Lasic, M.L. and Velkovic, V.B., (2000) The acid hydrolysis of potato tubermash in bioethanol production, *Biochemical Engineering Journal*, 43: 208-211.
- [117] Tsai, P.S., Hatzimanikatis, V. and Bailey, J.E., (1996) Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(2): 139-150.
- [118] Song, S., and Park C., (1997) Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcription activator, *Journal of Bacteriology*, 179: 7025–7032.
- [119] Khosla, C., Curtis, J.E., Demodena, J., Rinas, U. and Bailey J.E., (1990) Expression of intracellular hemolobin improves protein synthesis in oxygen limited *Escherichia coli*, *Biotechnology*, 8: 849-853.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra ABANOZ, 24 Mayıs 1986'da İZMİR'de doğdu. 2004 yılında EGE ÜNİVERSİTESİ, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2009 yılında Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Opsiyonundan mezun oldu. 2010 yılında GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans eğitimine kabul edildi ve 2012 yılında tez çalışmasını tamamlayarak mezun oldu.

