

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

**FARKLI GIDA İŞLEME ATIKLARINDAN**  
**BİYOETANOL ÜRETİMİNDE VITREOSCILLA**  
**HEMOGLOBİNİ’NİN KULLANIM**  
**POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TANER ŞAR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**

**2013**

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

**FARKLI GIDA İŞLEME ATIKLARINDAN**  
**BİYOETANOL ÜRETİMİNDE VITREOSCILLA**  
**HEMOGLOBİNİ'NİN KULLANIM**  
**POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TANER ŞAR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ**

**GEBZE**

**2013**



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ  
ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.06.2013 tarih ve 2013/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/06/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan TANER ŞAR'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

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

ÜYE

: Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Ferda HACİVELİOĞLU

**ONAY**

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....  
tarih ve ...../..... sayılı kararı.

**İMZA/MÜHÜR**

## ÖZET

Bu çalışmada, VHb'nın kullanımı ile karbon kaynağı olarak şeker pancarı melas hidrolizatı (MH) ve peynir altı suyunun tozunu (PAST) içeren ortamlarda biyoetanol üretiminin artırılması incelendi. Çalışmada, *E. coli* FBR5 suşu ve bu suştan *pdc* (piruvat dekarboksilaz geni), *adhb* (alkol dehidrogenaz geni) ve *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin geni) ile geliştirilen TS3 ve TS4 suşları kullanılarak hücre büyümesi, VHb seviyeleri ve etanol üretim değerleri incelendi. VHb ekspresyonunun TS3 ve TS4 suşlarında etanol üretimi arttırdığı belirlendi.

MH besiyeri ve PAST besiyerinde TS3 ve TS4 suşları ile tüm koşullarda, FBR5 suşuna göre önemli ölçüde daha fazla etanol üretildi. MH besiyerinde en fazla etanol üretimi TS4 suşu ile FBR5 suşuna göre % 88 daha fazla iken, TS3 suşu ile ise % 56 daha fazla etanol üretimi belirlendi.

PAST besiyerinde ise yüksek etanol üretimi, VHb ile eksprese edilen iki suş ile sağlandı ancak düşük VHb ile eksprese edilen TS3 suşu ile daha fazla etanol üretildi. Etanol üretiminde en fazla artış TS3 suşu ile % 40 ile % 360 arasında iken, TS4 suşu ile ise % 17 ile % 40 arasında etanol üretimi gözlemlendi.

Sonuçlar, VHb teknolojisinin şeker pancarı melası ve peynir altı tozu ile etanol üretiminde pratik öneme sahip olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Vitreoscilla* hemoglobin, Biyoetanol, Şeker pancarı melası, Peynir altı tozu.

## SUMMARY

In this work, the enhancement of bioethanol production from sugar beet molasses hydrolysate (SBMH) and whey powder (WP) included media as carbon sources through the use of VHb was investigated. In this study, *E. coli* strain FBR5 and those transformed with *pdc* (pyruvate decarboxilase gene), *adhb* (alcohol dehydrogenase gene) and *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin gene) (TS3 and TS4) were utilized. 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.

In SBMH medium and in WP medium both strains TS3 and TS4 produced significantly more ethanol than strain FBR5 for all conditions. In SBMH medium the highest ethanol production was achieved with TS4 strain producing 88% more ethanol compared to TS3 strain producing about 56% more ethanol than FBR5 strain.

In WP growth medium the highest ethanol enhancement was achieved by two VHb expressing strains but the lower VHb expressing strain, TS3, produced more ethanol. The more increase in ethanol production with the strain TS3 ranged from 40% to 360% were observed then the strain TS4 ranged from 17 % to 40%.

The results demonstrate that VHb technology can have practical importance in the production of ethanol from sugar beet molasses and whey powder.

**Key Words:** *Vitreoscilla* hemoglobin, Bioethanol, Sugar beet molasses, whey powder.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve tez çalışması süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, fikirleri ile deneysel çalışmalarıma yön veren ve olumlu desteği ile yanımda olan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Yüksek lisans yapmam için beni teşvik eden ve desteğinden dolayı İstanbul Üniversitesi Arş. Gör. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ'ye,

Proje desteğinden dolayı TÜBİTAK'A ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne,

Deney çalışmalarında kullanılan peynir altı tozu ve şeker pancarı melasını temin ettikleri için Malkara Birlik Süt ve Süt Mamülleri A.Ş. ile Pakmaya İzmit Fabrikasına,

Değerli deney çalışma arkadaşlarım Büşra ÖZÇELİK, Fatma SÜMER ve Tuğba KÖKÜMER'e,

Laboratuvar olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Sayın Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e ve Biyokimya Laboratuvarı çalışanları Fatma ERTAN, Arzu GÜRBÜZ ve Arş. Gör. Aişe ÜNLÜ'ye,

Yardım ve desteklerinden dolayı Dr. Tuğrul DORUK, Uzman Hüseyin BALCI, Şerif YILMAZ, M. Hamit EKİNCİ ve Ceyhun ÖZTÜRK'e,

Maddi ve manevi katkılarıyla her daim beni destekleyerek yanımda olan aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ÖZET                                                             | iv                  |
| SUMMARY                                                          | v                   |
| TEŞEKKÜR                                                         | vi                  |
| İÇİNDEKİLER                                                      | vii                 |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ                                   | ix                  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                  | xii                 |
| TABLolar DİZİNİ                                                  | xv                  |
| <br>                                                             |                     |
| 1. GİRİŞ                                                         | 1                   |
| 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği                             | 1                   |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                | 3                   |
| 2.1. Biyoetanol                                                  | 3                   |
| 2.1.1. Türkiye’de Biyoetanol                                     | 9                   |
| 2.1.2. Biyoetanol Üretiminde Hammadde Kaynağı                    | 10                  |
| 2.1.3. Rekombinant Soylar ile Biyoetanol Üretiminin Arttırılması | 14                  |
| 2.2. Bakteriyel Hemoglobin                                       | 16                  |
| 2.3. İmmobilizasyon                                              | 20                  |
| 2.3.1. Hücre İmmobilizasyonu                                     | 20                  |
| 3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER                                         | 23                  |
| 3.1. Gereçler                                                    | 23                  |
| 3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler                                | 23                  |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar                                       | 23                  |
| 3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları                                | 24                  |
| 3.2. Yöntemler                                                   | 25                  |
| 3.2.1. Şeker Pancarı İşleme Suyunun (Melas) Hidrolizi            | 25                  |
| 3.2.2. Peynir Altı Tozunun Kullanımı                             | 26                  |
| 3.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması                          | 27                  |
| 3.2.4. Kalsiyum Aljinat ile Hücre İmmobilizasyonu                | 28                  |
| 3.2.5. Stok Kültürlerinin Pasajlanması ve Muhafazası             | 29                  |
| 3.2.6. Ön Kültürlerinin Hazırlanması                             | 29                  |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.7. Düşük Oksijenli Koşullar                                                                                       | 30 |
| 3.2.8. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi                                                                       | 30 |
| 3.2.9. Toplam Hücre Sayısının (Biyokütle) Belirlenmesi                                                                | 30 |
| 3.2.10. Biyoetanol Miktarının Ölçümü                                                                                  | 31 |
| 3.2.11. Besiyerinde Kalan Şeker Miktarının Ölçümü                                                                     | 31 |
| 3.2.12. Rekombinant Soylardaki Hemogloblin Ekspresyonunu Ölçümü                                                       | 32 |
| 3.2.13. Suşların Plazmid Kararlılığın Ölçümü                                                                          | 32 |
| 3.2.14. İstatiksel Analizler                                                                                          | 33 |
| 4. BULGULAR                                                                                                           | 34 |
| 4.1. Şeker Pancarı Atık Suyu (Melas) Hidrolizatı ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (MH) Etanol Üretimleri               | 34 |
| 4.2. Glukoz ve Fruktoz İçeren LB (LBGF) Ortamlarındaki Etanol Üretimleri                                              | 37 |
| 4.3. Peynir Altı Tozu ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (PAST) Etanol Üretimleri                                        | 40 |
| 4.4. Laktoz İçeren LB (LBL) Ortamlarındaki Etanol Üretimleri                                                          | 44 |
| 4.5. İmmobilize Hücreler ile Şeker Pancarı (Melas) Hidrolizatı ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (MH) Etanol Üretimleri | 48 |
| 4.6. İmmobilize Hücreler ile Peynir Altı Tozu ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (PAST) Etanol Üretimleri                | 50 |
| 4.7. Rekombinant Hücrelerdeki Plazmid Kararlılığı                                                                     | 52 |
| 5. SONUÇLAR ve YORUMLAR                                                                                               | 54 |
| KAYNAKLAR                                                                                                             | 65 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                              | 72 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler ve</u>             | <u> Açıklamalar</u>                      |
|--------------------------------|------------------------------------------|
| <u>Kısaltmalar</u>             |                                          |
| % v/v                          | : Hacimsel karışım oranı                 |
| % w/v                          | : Ağırlık / Hacim                        |
| µl                             | : Mikrolitre                             |
| °C                             | : Celcius derece                         |
| ABD                            | : Amerika Bileşik Devletleri             |
| <i>adhb</i>                    | : Alkol dehidrogenaz II geni             |
| ATP                            | : Adenozin 5'-trifosfat                  |
| CaCl <sub>2</sub>              | : Kalsiyum klorür                        |
| Ca(OH) <sub>2</sub>            | : Kalsiyum hidroksit                     |
| CaCO <sub>3</sub>              | : Kalsiyum karbonat                      |
| CO                             | : Karbon monoksit                        |
| CO <sub>2</sub>                | : Karbon dioksit                         |
| COD                            | : Kimyasal oksijen ihtiyacı              |
| CH <sub>4</sub>                | : Metan                                  |
| CN <sup>-</sup>                | : Siyanür                                |
| d                              | : Yoğunluk                               |
| DNT                            | : Dinitrotoluen                          |
| E10                            | : % 10 biyoetanol + % 90 benzin karışımı |
| E24                            | : % 24 biyoetanol + % 76 benzin karışımı |
| E85                            | : % 85 biyoetanol + % 15 benzin karışımı |
| EHN                            | : 2-Etilheksil nitrat                    |
| ETBE                           | : Etil Tersiyer Bütil Eter               |
| ETOH                           | : Etanol                                 |
| g                              | : Gram                                   |
| G                              | : α-L-gluronik asit                      |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : Sülfürik asit                          |
| HFCs                           | : Hidrofluorokarbonlar                   |
| HMF                            | : 5-hidroksi-metil furfural              |
| Kon                            | : Oksijen bağlama sabitesi               |

|                                               |                                                                          |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Koff                                          | : Oksijen salınım sabitesi                                               |
| L                                             | : Litre                                                                  |
| LB                                            | : Luria-Bertani besiyeri                                                 |
| LBGF                                          | : Glukoz ve Fruktoz içeren LB besiyeri                                   |
| LBK                                           | : Ksiloz içeren LB besiyeri                                              |
| LBL                                           | : Laktoz içeren LB besiyeri                                              |
| <i>ldh</i>                                    | : laktat dehidrogenaz geni                                               |
| M                                             | : $\beta$ -D-mannuronik asit                                             |
| MH                                            | : Şeker pancarı atık suyu (Melas) hidrolizatı ile hazırlanan LB besiyeri |
| ml                                            | : Mililitre                                                              |
| mM                                            | : Milimolar                                                              |
| MTBE                                          | : Metil Tersiyer Bütıl Eter                                              |
| NaCl                                          | : Sodyum klorür                                                          |
| NH <sub>4</sub> -N                            | : Amonyum azotu                                                          |
| NO <sub>3</sub> -N                            | : Nitrat azotu                                                           |
| NO <sub>2</sub> -N                            | : Nitrit azotu                                                           |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | : Sodyum ditiyonit                                                       |
| NO <sub>x</sub>                               | : Azot oksitleri                                                         |
| N <sub>2</sub> O                              | : Nitröz oksit                                                           |
| NAD <sup>+</sup>                              | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid                                         |
| NADH                                          | : Hidrojenlenmiş NAD                                                     |
| ng                                            | Nanagram                                                                 |
| nm                                            | : Nanometre                                                              |
| nmol                                          | : Nanomol                                                                |
| OD                                            | : Optik yoğunluk                                                         |
| rpm                                           | : Dakikadaki devir sayısı                                                |
| PAST                                          | : Peynir altı tozu ile hazırlanan LB besiyeri                            |
| <i>pdh</i>                                    | : pirüvat dekarboksilaz geni                                             |
| PFCs                                          | : Perfluorokarbonlar                                                     |
| <i>pfl</i>                                    | : Pirüvat format liyaz geni                                              |
| pH                                            | : Potansiyel hidrojen                                                    |
| SF <sub>6</sub>                               | : Kükürt heksaflorür                                                     |
| TLC                                           | : İnce tabaka kromatografisi                                             |

*vgb* : *Vitreoscilla* hemoglobin geni  
VHB : *Vitreoscilla* hemoglobini  
VOCs : Uçucu Organik Bileşikler

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Sekil No:</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1: Etanol üretimi basamakları.                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 11                  |
| 2.2: Etanol üretiminin arttırılması için laktat dehidrogenaz ( <i>ldh</i> ) ve piruvat format liyaz ( <i>pfl</i> ) genlerinin susturulması.                                                                                                                                                                            | 15                  |
| 2.3: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobinin üç-boyutlu yapısı.                                                                                                                                                                                                                                                               | 16                  |
| 2.4: A. Hemoglobin içermeyen <i>E. coli</i> FBR5 suşunda ditiyonit indirgenmesi sonucu absorbsiyon piki oluşmaması, B. <i>vgb</i> içeren <i>E. coli</i> TS4 suşunda VHb'nin ditiyonit indirgenmesi sonucu oluşan absorbsiyon piki.                                                                                     | 18                  |
| 2.5: <i>vgb</i> promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri.                                                                                                                                                                                                    | 19                  |
| 2.6: A. Aljinat yapısını oluşturan M ve G alt ünitelerinin konfirmasyonu<br>B. Aljinat yapısını oluşturan tekrarsız M ve Galt üniteleri; M Block, çoklu M alt üniteleri; M – G Block, heteropolimerik yapıdaki M ve G alt üniteleri; G Block, çoklu G alt üniteleri.                                                   | 21                  |
| 4.1: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.  | 35                  |
| 4.2: Düşük havalandırmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. | 36                  |
| 4.3: MH besiyerinde, düşük havalandırmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.                                             | 37                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, LBGF ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.  | 38 |
| 4.5: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, LBGF ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. | 39 |
| 4.6: LBGF besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.                                             | 40 |
| 4.7: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, PAST ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.   | 42 |
| 4.8: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, PAST ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.  | 43 |
| 4.9: PAST besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.                                              | 44 |
| 4.10: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, LBL ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.  | 45 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.11: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, LBL ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. | 47 |
| 4.12: LBL besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.                                             | 47 |
| 4.13: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.   | 49 |
| 4.14: MH besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli koşullarda immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık).                                                                                                                                                         | 50 |
| 4.15: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD <sup>-1</sup> ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.   | 51 |
| 4.16: PAST besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli koşullarda immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık).                                                                                                                                                       | 52 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo No:</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Petrol ve etanol'ün bazı özellikleri.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3                   |
| 2.2: Etanol'ün yakıt özelliği.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 4                   |
| 2.3: Bazı ülkelerde uygulanan biyoetanol kullanım çeşiti.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 6                   |
| 2.4: Kyoto Protokolüne üye olan ülkeler.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 7                   |
| 2.5: CO <sub>2</sub> salınımının en yüksek olduğu 9 ülke ve Türkiye'de ki CO <sub>2</sub> salınım değerleri.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8                   |
| 2.6: Dünya çapında en iyi biyoetanol üretici 10 ülke (milyar galon).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 8                   |
| 2.7: 2007-2011 yılları arasında Türkiye'de işlenen melas ve üretilen alkolün cins ve miktarı.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 10                  |
| 2.8: Farklı biyokütlelerden etanol üretim potansiyeli.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 11                  |
| 2.9: Farklı lignoselülozik materyallerin içerikleri (% kuru ağırlık).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 14                  |
| 2.10: Bazı hemoglobinlerin oksijen bağlama ( $K_{on}$ ) ve oksijen salınım ( $K_{off}$ ) sabiteleri.                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 17                  |
| 3.1: Temin edilen şeker pancarı işleme suyu (melas)'nın özellikleri.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 25                  |
| 3.2: Temin edilen Peynir Altı Tozunun özellikleri.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 26                  |
| 3.3: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 28                  |
| 4.1: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve %1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.   | 35                  |
| 4.2: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. | 36                  |

- 4.3: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 38  
suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren LBGF besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.4: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 39  
suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren LBGF besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.5: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 41  
suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.6: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 43  
suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.7: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 45  
suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren LB besiyerinde (LBL) 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

- 4.8: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren LBL besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 46
- 4.9: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 49
- 4.10: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 51
- 4.11: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda TS3 ve TS4 suşlarının farklı besiyerlerindeki plazmid kararlılığı. 53

# 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak, kömür, doğalgaz, petrol gibi fosil kökenli enerji rezervleri önümüzdeki yıllarda tükenmekle karşı karşıya kalacaktır. Üretilen enerji ile tüketilen enerji arasındaki farkı kapatmak için, yenilenemeyen veya yenilenmesi 60-100 yıl alan petrol ve türevlerine karşın yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Bitkisel kaynakların kullanılmasıyla elde edilen biyogaz, biyoetanol, biyodizel gibi alternatif ve yenilenebilir enerji kaynakları “biyoyakıt” adı altında gruplandırılmaktadır.

Biyoetanol, sakkaroz içeren materyaller (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.), nişastalı ürünler (buğday, mısır, arpa vb.) veya ligoselülozik biyokütlelerden (odun, saman, ot vb.) elde edilen bir üründür. Etanol veya etil alkol temiz renksiz bir sıvı olup, biyolojik olarak bozunur. Etanol, kanserojen olarak bilinen benzen ve bütadien emisyonlarını yarı yarıya azaltılmasından dolayı çevre dostudur. Yüksek oktan sayısına sahip olan etanol, benzin ile karıştırıldığında, CO ve hidrokarbonlar gibi zararlı gazların emisyonlarını azaltarak tam yanma sağlamaktadır.

Dünya çapında farklı bitkisel kaynakları kullanılarak üretilen biyoetanol, ABD ve Brezilya’nın girişimleri ile diğer ülkeler için iyi bir model oluşturmaktadır. Etanol üretiminde, Brezilya genellikle şeker kamışını kullanırken, ABD çoğunlukla mısırı kaynak olarak kullanmaktadır. Ülkemizde de tarımsal ve gıda işleme suları ile tüketimi az olan biyokütleleri değerlendirerek, fermentasyon yoluyla etanol üretimi için uygun karbon kaynaklarının belirlenmesi gerekmektedir. Ucuz karbon kaynaklarının substrat olarak kullanılması ile birlikte, çevre kirliliğinin önlenmesi de mümkün olacaktır.

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Fermentasyon sonucu oluşan metabolitlerin üretimi, düşük fakat belirli seviyede oksijen gerektirirken; büyük ölçekli biyoreaktörlerde gerekli olan oksijen miktarının belirli seviyenin altına düşmesi önemli bir sorundur. Oksijen seviyesinin istenilen konsantrasyonun altına düşmesi, ürün oluşumu ile direkt ilgili diğer bir parametre olan “biyokütle oluşumunu” da olumsuz yönde etkilemektedir. Bu güne kadar

yapılan çalışmalar doğrultusunda, *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb)'nin etanol fermentasyonundaki etkilerinin neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobinin, VHb ekprese eden rekombinant *E. coli* suşları ile fermente olabilen şeker kaynağı olarak farklı gıda işleme atıklarından etanol üretimindeki kullanım potansiyeli araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyoetanol

Petrol, dünyada en yaygın kullanılan yakıt kaynağıdır. Fosil kaynaklı olan petrol, yenilenebilir olmadığından dolayı ilerleyen zamanlarda tükenme tehlikesiyle karşı karşıyadır [Silva et al., 2005].

Biyoetanol (etil akol,  $C_2H_5OH$ ,  $CH_3-CH_2-OH$ , ETOH) çeşitli biyokütlelerden üretilen sıvı formda biyoyakıt türüdür. Etanol temiz, yenilenebilir ve biyolojik kaynaklı olmasından dolayı diğer fosil kökenli yakıt ürünlerine alternatiftir [Balat et al., 2008]. Petrol ve petrole alternatif olan etanolün bazı özellikleri Tablo 2.1’de gösterilmektedir [İçöz et al., 2009].

Tablo 2.1: Petrol ve etanol’ün bazı özellikleri.

| Özellik                        | Petrol                  | Etanol          |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Kimyasal Formül                | $C_nH_{2n+2}$ (n: 4-12) | $C_2H_5OH$      |
| Moleküler Ağırlık              | 100-105                 | 45.07           |
| İçeriği, ağırlıkça %           |                         |                 |
| Karbon                         | 85 - 88                 | 121             |
| Hidrojen                       | 12 - 15                 | 210             |
| Oksijen                        | 0                       | 34.7            |
| Yoğunluk [ $kg l^{-1}$ ]       | 0.719 – 0.779           | 0.792           |
| Kaynama Sıcaklığı              | 44.4 – 242.5            | 95.5            |
| Oktan Sayısı [[R+M] $2^{-1}$ ] | 86 – 94                 | 100             |
| Donma Noktası [ $^{\circ}C$ ]  | -22.2                   | -96.1           |
| Isınma Değeri                  | 45.600 – 43.000         | 29.800 – 26.800 |

Fosil yakıtlardan kaynaklanan  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $CH_4$  ve  $NO_x$  gibi sera gazların emisyonu iklim değişikliğine sebep olmaktadır. Sera gazı emisyonu ve fosil yakıtların kullanımını azaltmak için biyoetanol ve biyokütlelerin kullanımı gereklidir [İçöz et al., 2009].

Etanolun enerji değeri petrol türevi yakıtlardan % 68 daha az olmasına rağmen, etanolun yapısındaki oksijen sayesinde toksik bileşiklerin salınımı azdır.

Tablo 2.2’de etanolun yakıt özelliği gösterilmektedir. Biyoetanol, yüksek oktan sayısına sahip olup, yaklaşık % 35’ini oksijen oluşturur. Biyoetanoldeki oksijen varlığı ile oluşan karbon monoksit ve hidrokarbonların salınımını azaltır ancak nitrojen oksit emisyonlarını artırır. Etanol, yüksek oktan sayısı ile motorlu araçlarda benzin ile karıştırılarak tam yanma sağlamaktadır. Düşük setan sayısı ve yüksek buharlaşma ısısı ile dizel araçlarda kendiliğinden ateşlemeyi engelleyebilmektedir. Setan sayısı, dizel yakıtlarında tutuşma kalitesinin bir ifadesidir. Setan arttırıcı katkı maddelerinin kullanılmasıyla, yakıtın tutuşma kalitesi arttırılabilir. Sıklıkla setan arttırıcı olarak, % 0.05 - % 4 oranında 2-Etilheksil nitrat (EHN, octyl nitrat) kullanılmaktadır. Katkı maddelerinin daha yüksek oranlarda kullanılması, yakıtın fiziksel özelliklerini ve stabilitesini bozabilir [Balat et al., 2008], [Mussatto et al., 2010], [Öcal, 2007].

Tablo 2.2: Etanol’ün yakıt özelliği.

| Yakıt özelliği           | Etanol |
|--------------------------|--------|
| Setan Sayısı             | 8      |
| Oktan Sayısı             | 107    |
| Ateşleme derecesi (K)    | 606    |
| Buharlaşma ısısı (MJ/Kg) | 0.91   |
| Düşük ısı değeri         | 26.7   |

Biyoetanol yakıtının, petrol kullanımına göre:

- Fosil kaynaklı yakıtların kullanım sonucu artan CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, etanol kullanımı sonucunda atmosferde CO<sub>2</sub> artışına sebep olmaması,
- Etanol, benzine oranla daha az toksik maddelere sahip olduğundan dolayı daha az kirletici olması,
- Benzin farklı birleşiklerle karmaşık yapıdayken, etanol bilinen içeriği ile saf kaynak olması,
- Etanol yenilenebilir enerji kaynağı olduğundan dolayı güvenli yakıt türü olması,
- Dünyanın herhangi bir yerinden farklı biyokütle kaynaklarından üretilmesi

gibi pek çok avantaja sahiptir [Silva et al., 2005].

CO<sub>2</sub> seviyesinin azaltılmasında rol oynayan etanol, ulaşım araçlarında da kullanılabilir. Benzin yerine etanol kullanımı sonucunda % 80'den fazla karbon emisyonu azalmasını sağlayarak, asit yağmurlarının oluşumunu en aza indirmektedir. Biyoetanol donmayı engeller, motorun daha serin ve enjektörlerin daha temiz kalmasını sağlar. Bu nedenle biyoetanol yakıtlarda oktan arttırmak amacı ile kullanılan benzen, metil tersiyer bütıl eter (MTBE), bütadien gibi kanserojen maddelerin çevreci alternatifidir. Biyoetanol kullanılması ile, ozon tabakasının azalmasına yol açan uçucu organik madde (Volatile organic compounds; VOCs)'lerde % 30 ve üzeri azalma sağlanmaktadır [Mussatto et al., 2010], [Grassi, 2000], [Web 1, 2013].

Biyoetanol, benzin ile karıştırılarak araçlarda yakıt olarak, dizel motorlarda katkı maddesi olarak ve tarım makinalarında da kullanılmaktadır. Kojenerasyon ünitelerinde; dizel güç jeneratörlerinde, buhar enjeksiyonlu gaz türbinlerinde, suyun tuzluluğun giderilmesinde, soğutma sistemlerinde biyoetanol kullanılmaktadır [Web 1, 2013].

Yakıt olarak biyoetanolün en popüler uygulaması; % 85 biyoetanol ve % 15 benzin karışımı olan E85 olarak bilinen uygulamasıdır. Brezilya etanol üretimini şeker pancarından üretmektedir ve benzin etanol karışımını % 76 benzin + % 24 biyoetanol (E24) olarak kullanmaktadır. ABD'nin de dahil olduğu bir çok ülke biyoetanolü E10 şeklinde (% 90 benzin + % 10 biyoetanol) kullanmaktadır. % 85 ve üzeri oranda biyoetanol kullanımına kadar çalışabilen (esnek yakıtlı) araçlarda, E85 karışımı uygulanabilmektedir (Tablo 2.3) [Balat et al., 2008].

Fransa ve İspanya arpa, buğday ve şeker pancarından ürettiği biyoetanolü ETBE (Etil Tersiyer Bütıl Eter)'ye dönüştürerek, içten yanmalı motorlu araçlarda kullanılmaktadır [Poitrat, 1999].

Biyoetanol, tarımsal ürünlerden veya gıda işleme ürünlerinden üretilmektedir. Biyoteknolojik uygulamalar, güncel etanol üretiminin büyük bir kısmından sorumludur. Dünyadaki biyoetanol üretiminin yaklaşık % 95'i tarımsal ürünlerden sağlanmaktadır. Biyoetanol üretiminin % 40'ı şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker içeren ürünlerden üretilirken, % 60'ı nişasta içeren ürünlerden kaynaklanmaktadır [Mussatto et al., 2010].

Tablo 2.3: Bazı ülkelerde uygulanan biyoetanol kullanım çeşiti.

| Ülke       | Biyoetanol kullanım çeşiti                             |
|------------|--------------------------------------------------------|
| Brezilya   | E20, E24 (esnek yakıtlı araçlarda farklı karışımlarda) |
| ABD        | E10 (esnek yakıtlı araçlarda E85)                      |
| Kanada     | E10 (esnek yakıtlı araçlarda E85)                      |
| İsveç      | E10 (esnek yakıtlı araçlarda E85)                      |
| Hindistan  | E5                                                     |
| Avustralya | E10                                                    |
| Tayland    | E10                                                    |
| Çin        | E10                                                    |
| Kolombiya  | E10                                                    |
| Paraguay   | E7                                                     |

Dünya çapında biyoetanol üretimi, 1975 yılında bir milyar litreden az iken; 2006 yılında 39 milyar litreye ulaşmıştır ve 2015 yılında etanol üretiminin 100 milyar litreye ulaşması amaçlanmıştır. Brezilya, Amerika Bileşik Devletleri, Kanada, Japonya, Hindistan, Çin ve Avrupa ülkeleri gibi dünya çapındaki birçok ülke kendi biyoyakıtlarını üretmeyi amaçlamıştır [Mussatto et al., 2010].

- Küresel petrol rezervlerinin hızla azalması ve buna bağlı olarak petrol fiyatlarının artışı,
- Yakıt emisyonlarının nedenleri,
- Karbon emisyonları üzerine Kyoto Protokolü'nün gerektirdikleri,
- Tarımsal ürünlerden alternatif ürünlerin oluşumu

gibi bir çok nedenle ülkeler kendi etanolünü üretmeye başlamışlardır

Kyoto Protokolü, gelişmiş ülkelerin 2000 yılındaki sera gazı emisyonlarını (Karbon dioksit (CO<sub>2</sub>), Metan (CH<sub>4</sub>), Nitröz Oksit (N<sub>2</sub>O), Hidrofluorokarbonlar (HFCs), Perfluorokarbonlar (PFCs), Kükürt heksaflorür (SF<sub>6</sub>)) 1990 yılı seviyesinde tutmak için, Tablo 2.4'te yer alan ülkelerin sera gazı salınımlarını 2012 yılına kadar 1990 seviyesinin % 5.2 altına düşürmeyi amaçlamaktadır. 2004 yılında Rusya Federasyonu'nun Kyoto Protokolünü onaylamasıyla birlikte 16 Şubat 2005 yılında resmen yürürlüğe girmiştir. Kyoto Protokolünde Türkiye üye devlet iken,

gelişmekte olan ülke statüsünde olduğundan dolayı emisyon azaltım sorumluluğu yoktur. Tablo 2.5’te 2007 yılı verileri baz alınarak, dünya çapında CO<sub>2</sub> salınımının en yüksek olduğu 9 ülke ile Türkiye’deki CO<sub>2</sub> salınımının değerleri karşılaştırılmıştır. [Arıkan ve Özsoy, 2008], [Yüksel, 2008], [Çınar vd., 2012].

Tablo 2.4: Kyoto Protokolüne üye olan ülkeler.

| Üye Devletler |             |                 |            |           |              |
|---------------|-------------|-----------------|------------|-----------|--------------|
| ABD           | Almanya     | Avrupa Birliği  | Avustralya | Avusturya | Belçika      |
| Beyaz Rusya   | Bulgaristan | Çek Cumhuriyeti | Danimarka  | Estonya   | Finlandiya   |
| Fransa        | Hollanda    | Hırvatistan     | İngiltere  | İrlanda   | İspanya      |
| İsveç         | İsviçre     | İtalya          | İzlanda    | Japonya   | Letonya      |
| Litvanya      | Lüksemburg  | Kanada          | Norveç     | Polonya   | Portekiz     |
| Romanya       | Rusya       | Slovenya        | Slovakya   | Ukrayna   | Yeni Zelenda |
| Yunanistan    | Türkiye     | Liechtensein    | Monako     |           |              |

Brezilya 1975’de yayımladığı “Ulusal Alkol Programı” çerçevesinde otomobil yakıtı olarak benzin yerine etanolün kullanılmasını teşvik etmektedir. Bu protokole göre 1975/76 yıllarında 556 milyon litre etanol üretirken, 1985/86 yıllarında 11.4 milyar litre üreterek, dünya çapında en büyük etanol üreticisi ve tüketicisi konumuna gelmiştir. Brezilya günümüzde benzini % 24-26 oranında etanol ekleyerek kullanmaktadır ve şeker pancarından ürettiği biyoetanolün büyük kısmını yerel ekonomisinde harcarken, % 20’lik kısmını ABD, Avrupa Birliği ülkelerine ve diğer ülkelere ihraç etmektedir. Brezilya, 1975 yılında başladığı “Biyokütleden Biyoetanol Oluşum” programına, şu anda biyoetanol üretimi ve tüketimi ile önemli bir konuma sahiptir [Silva et al., 2005].

Amerika Birleşik Devletleri biyoetanol üretiminin yaklaşık % 90’ını mısır kaynağından sağlamaktadır. ABD, 2006 yılında 4.85 milyar galon etanol üreterek etanol üretici ülkeler arasında önemli bir yer edinmiştir (Tablo 2.6). Avrupa ülkelerinde ise biyoetanol üretim için kullanılacak hammadde kaynağı genellikle buğday, şeker pancarı ve şarap endüstrisinin yan ürünleridir. Toplam tarımsal alanlarının % 4–13 olduğu tahmin edildiği Avrupa bölgesinde, biyoetanol üretimi için gerekli biyokütle kaynağının yetiştirilebilmesi için tarımsal bölgelerin genişletilmesi gereklidir. Etanol üretimi için sıklıkla kullanılan melas ve mısıra ek

olarak; laktoz içeren peynir altı suyu ile lignoselülozik biyokütleler kullanılmaktadır [Balat et al., 2008].

Tablo 2.5: CO<sub>2</sub> salınımının en yüksek olduğu 9 ülke ve Türkiye’de ki CO<sub>2</sub> salınım değerleri.

| Ülkeler   | CO <sub>2</sub> emisyonu<br>(milyon ton) | Kişi başına düşen<br>CO <sub>2</sub> emisyonu (ton) |
|-----------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ABD       | 6.094                                    | 19.74                                               |
| Rusya     | 1.580                                    | 11.13                                               |
| Japonya   | 1.303                                    | 10.00                                               |
| Almanya   | 841                                      | 10.23                                               |
| Çin       | 6.538                                    | 4.92                                                |
| Hindistan | 1.610                                    | 1.38                                                |
| Brezilya  | 368                                      | 1.94                                                |
| İngiltere | 546                                      | 8.97                                                |
| Kanada    | 590                                      | 17.91                                               |
| Türkiye   | 304                                      | 4.17                                                |

Tablo 2.6: Dünya çapında en iyi biyoetanol üretici 10 ülke (milyar litre).

| Ülke         | 2004  | 2005  | 2006  |
|--------------|-------|-------|-------|
| ABD          | 13.40 | 16.10 | 18.35 |
| Brezilya     | 15.10 | 16.01 | 16.99 |
| Çin          | 3.63  | 3.78  | 3.86  |
| Hindistan    | 1.74  | 1.70  | 1.89  |
| Fransa       | 0.83  | 0.90  | 0.94  |
| Almanya      | 0.26  | 0.41  | 0.75  |
| Rusya        | 0.75  | 0.75  | 0.64  |
| Kanada       | 0.22  | 0.22  | 0.56  |
| Güney Afrika | 0.41  | 0.37  | 0.37  |
| Tayland      | 0.26  | 0.30  | 0.34  |

### 2.1.1. Türkiye’de Biyoetanol

Ülkemizde piyasaya akaryakıt olarak arz edilen benzin türlerinde, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanol içeriğinin; 01.01.2013 tarihi itibariyle en az % 2, 01.01.2014 tarihi itibariyle ise en az % 3 olması zorunludur.

Bu kapsamda, Türkiye’de yerli tarımsal atık kaynaklarından biyoetanol üretim süreci başlamıştır. Türkiye’de üretilen biyoetanolün çoğu şeker pancarı melasından üretilmektedir. Melasın yanı sıra mısır ve buğday atıkları da Türkiye’de biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde kaynaklarındandır [Web 2, 2012].

Ülkemizde Biyoetanol üretimi yapan firmalar:

- Tarımsal Kimya Teknolojileri (Tarkim) San. ve Tic. A.Ş.
- Tezkim Tarımsal Kimya İnş. San. ve Tic. A.Ş.
- Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş. Çumra Şeker Fabrikası

Ayrıca, Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.’ne bağlı olarak Eskişehir, Turhal (Tokat), Malatya ve Erzurum Alkol Fabrikalarında etil alkol üretim tesisleri mevcuttur. Türkiye Şeker Fabrikalarında, şeker pancarı (melas) işlenerek etil alkol üretilmektedir. Melas kaynağının fermente edilmesi ile oluşan şlempe atığının, çevre kirliliği üzerine olumsuz etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, Eskişehir Alkol Üretim Tesisi’ne Şlempe Arıtım Tesisi kurularak, sadece Eskişehir Şeker Fabrikasında etil alkol üretilmektedir. Diğer alkol üretim tesislerinde, şlempe atık tesisi bulunmadığından dolayı etil alkol üretilmemektedir. Tablo 2.7’de 2007 – 2011 yılları arasında Türkiye Şeker Fabrikalarında işlenen şeker pancarı melası ve üretilen etil alkol miktarı gösterilmektedir [Web 2, 2012].

Özel statülü şeker fabrikalarından Amasya Şeker Fabrikasında, şeker pancarı melasından etil alkol üretilmektedir. Şeker fabrikalarında üretilen etil alkol çoğunlukla alkollü içecek yapımında kullanılmaktadır.

Tablo 2.7: 2007-2011 yılları arasında Türkiye’de işlenen melas ve üretilen alkolün cins ve miktarı.

| Yıllar | İşlenen Melas<br>(Ton) | Üretilen Saf Alkol<br>(x1000 Litre) | Biyoetanol<br>(x1000 Litre) |
|--------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 2007   | 21.880                 | 6.650                               | -                           |
| 2008   | 20.930                 | 6.560                               | 160                         |
| 2009   | 13.266                 | 4.200                               | -                           |
| 2010   | 20.924                 | 6.560                               | -                           |
| 2011*  | 16.086                 | 5.190                               | -                           |

\* 2011 yılında sadece Eskişehir Alkol Fabrikasında toplam 5.190.000 litre alkol üretilmiştir.

### 2.1.2. Biyoetanol Üretiminde Hammadde Kaynağı

Biyoetanol üretimi için öncelikli olarak uygun hammadde kaynağın belirlenmesi gerekmektedir. Farklı biyokütlelerin biyoetanol üretim potansiyeli Tablo 2.8’de gösterilmektedir. Seçilen hammadde kaynağın maliyeti, oluşan biyoetanolün maliyetini de etkilemektedir. Farklı biyokütlelerden üretilen biyoetanol temelde 4 basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) [Balat et al., 2008], [Bayrakçı, 2009].

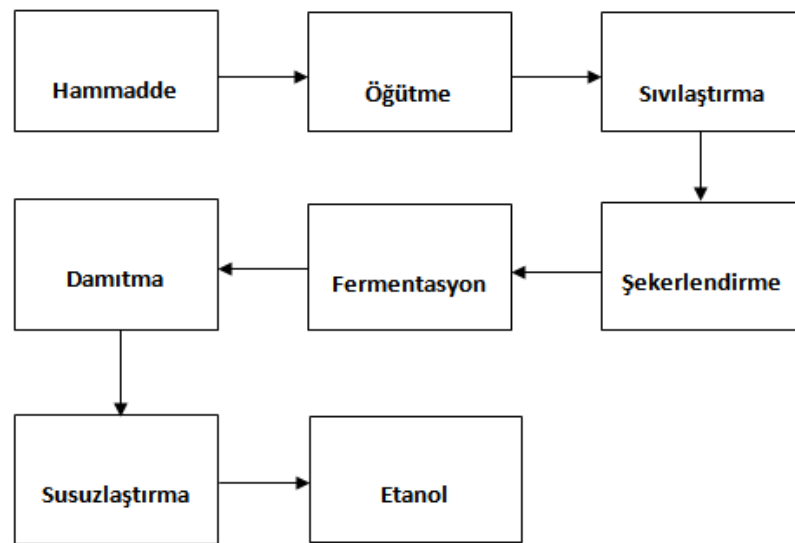
- Biyokütle kaynaklarından, şeker eldesi için gerekli ön işlemlerin uygulanması,
- Biyokütle kaynağından mikroorganizmaları kullanarak, etanol ve CO<sub>2</sub> oluşturması,
- Fermentasyon ortamındaki diğer bileşenlerin ayrılması,
- Etanolün karışık olarak bulunduğu suyun ortamdan uzaklaştırılması.

Tablo 2.8: Farklı biyokütlelerden etanol üretim potansiyeli.

|                        | Biyoetanol üretim<br>Potansiyeli (l/ton) |
|------------------------|------------------------------------------|
| Şeker kamışı           | 70                                       |
| Şeker pancarı          | 110                                      |
| Tatlı patates          | 125                                      |
| Patates                | 110                                      |
| Manyok                 | 180                                      |
| Mısır, darı            | 360                                      |
| Arpa                   | 250                                      |
| Buğday                 | 340                                      |
| Tatlı sorgum           | 60                                       |
| Selülozlu biyoküteller | 280                                      |

Biyoetanol, basit şekerlerden veya şekerlere dönüşebilecek nişasta ve selüloz benzeri polisakkaritlerden direk fermantasyon yoluyla elde edilmektedir. Böylece, karbohidrat kaynakları 3 ana grup olarak sınıflandırılabilir [Balat et al., 2008]:

- Basit şekerler: şeker kamışı, şeker pancarı, sorgum, peynir altı suyu.
- Nişasta: darı gibi tahıllar: buğday, manyok ve patates gibi köksü bitkiler.
- Lignoselülozik biyoküteller: odunsu materyaller, saman, tarımsal atıklar .



Şekil 2.1: Etanol üretimi basamakları.

Biyoetanol üretimi için hammadde kaynağı temelde şeker kamışı ve şeker pancarıdır. Şeker fabrikalarında, şeker üretimi sırasında şeker pancarı ve şeker kamışı işlenerek yan ürün olarak melas atığı oluşmaktadır. Oluşan melas atığında ortalama % 50 oranında sakkaroz (sukroz) şekeri içermektedir.

Melas gibi sakkaroz içeren hammadde kaynakları, glukoz ve fruktoz monomerlerinden oluşan disakkarit yapıda şeker içermelerinden dolayı, fermentasyon ortamında kolaylıkla biyoetanole dönüşmektedir [Meral ve Kanberoğlu, 2012].

Peynir Altı Suyu, potansiyel bir çevre kirletici olarak, peynir sanayisinde geniş çapta üretilen atık su kaynağıdır. Peynir Altı Suyu yüksek karbohidrat içeriğinden dolayı, etanol üretimi için pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Peynir Altı Suyu, % 5-6 laktoz, % 0.8-1 protein ve % 0.06 yağ içermektedir [Kargi and Ozmihci, 2006], [Leite et al., 2000].

Süt ürünlerinde bulunan laktoz, glukoz ve galaktoz (O-β-D-galactopiranosil-[1-4]-β-D-glukoz, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) monomerlerinden oluşan disakkarit formdadır. Genellikle laktaz olarak bilinen β-galaktosidaz enzimi, peynir altı suyunda bulunan laktozu hidroliz eder. Ayrıca, β-galaktosidaz enzimi *E. coli* gibi pek çok mikroorganizmada yaygın olarak bulunmaktadır [Panesar et al., 2006].

Peynir altı suyunun dünya çapında yıllık 10<sup>8</sup> ton üzerinde üretildiği tahmin edilmektedir ve önemli bir çevre kirleticidir.

Peynir altı tozu ise, N (Azot), P (Fosfor) ve diğer eser elementler ile birlikte laktoz içeren, peynir altı suyunun konsantre ve kuru formudur. Zengin mineral içeriğinden dolayı, organik asit (laktik, asetik), alkol (etanol), tek hücre proteini, metan gibi farklı kimyasalların üretiminde peynir altı suyu ve tozu kullanılmaktadır [Kargi and Ozmihci, 2006].

Peynir altı tozunun konsantre laktoz içeriği, uzun süre stabil olması, ulaşım ve depolanmasının kolay olması, istenilen konsantrasyonda kullanılması gibi avantajları ile biyoetanol üretiminde peynir altı suyuna göre iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir [Guimaraes et al., 2010].

Buğday, mısır, patates gibi biyokütleler direk şeker içermeyip, şekerin bir formu olan nişasta içermektedir. Nişasta kaynaklı hammaddeler genellikle Kuzey Amerika ve Avrupa'da kullanılmaktadır. Etanol üretimi için, nişastanın hidroliz edilmesi ile basit şekerlere dönüşmesi gerekmektedir. Nişasta içeren hammadde kaynaklarının kullanımı için, enzime (α-amilaz ve glikoamilaz) ihtiyaç duyulması ve

yüksek sıcaklığa maruz bırakılması gerektiğinden dolayı maliyet artmaktadır. Enzimatik hidrolizin yanı sıra asitle muamele sonucunda da nişasta hidrolizi gerçekleşebilmektedir. Ancak asitle muamele sonucunda toksik etkisi bulunan HMF (5-hidroksi-metil furfural) oluşmaktadır [Meral ve Kanberoğlu, 2012].

Başlıca selülozik biyoküteller, odunsu madde ve tarımsal atık kaynaklarıdır. Tarımsal alanların sınırlı olması, tahıl ürünlerinin hem gıda için hem de etanol üretimi için kullanılıyor olması, gıda ve etanol fiyatlarını da arttırmaktadır. Bundan dolayı, etanol üretimi maliyetini azaltmak için zirai atıklar, odunsu maddeler gibi lignoselülozik maddeler biyoteknolojik uygulamalarda iyi bir alternatiftir [Meral ve Kanberoğlu, 2012].

Etanol üretiminde sıklıkla pirinç samanı ve buğday samanı da kullanılmaktadır. Lignoselülozik biyokütellerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilmesi için öncelikle hidroliz edilerek daha küçük yapıtaşlarına ayrılmış olması gerekir. Lignoselülozik tarımsal kalıntılar, % 32-47 selüloz, % 19-27 hemiselüloz ve % 5-24 ligninden oluşmaktadır. Selüloz,  $\beta$ -1,4-D-glukoz birimlerine sahip yüksek molekül ağırlıklı lineer polimerdir. Selüloz glukoz monomerlerinden oluşur, hemiselüloz ise şekerlerin heterojen zincirlerinden oluşur. Hemiselüloz; glukoz, mannoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, 4-o-metil glukuronik asit ve glukuronik asit gibi çeşitli polimerize olmuş monosakkarit karışımıdır. Lignin, fenil-propanoid öncü maddelerden sentezlenen halkasal bir polimerdir. Polisakkaritlerin etkili kullanımı için, hidroliz aşamasında öncelikli olarak lignini gidermek ve hemiselülozun kısmen hidroliz edilmesi gerekmektedir [Ren et al., 2009]. Selülozik biyokütle genellikle seyreltik sülfirik asitle muamele edilir. Hemiselülozlardan elde edilen likörün şeker kompozisyonu Tablo 2.9'da gösterilmektedir [Mohagheghi et al., 2006], [Balat, 2010], [Khatiwada and Silveira, 2009], [Tomas-Pejo et al., 2008].

Tablo 2.9: Farklı lignoselülozik materyallerin içerikleri (% kuru ağırlık).

| Biyokütle     | Glukan | Ksilan | Mannan | Galaktan | Arabinan | Lignin |
|---------------|--------|--------|--------|----------|----------|--------|
| Kavak         | 43.5   | 15.5   | 2.5    | 2.3      | 1.5      | 6.2    |
| Çam           | 46.4   | 7.8    | 10.6   | -        | 2.2      | 9.4    |
| Ladin         | 49.9   | 5.3    | 12.3   | 2.3      | 1.7      | 8.7    |
| Söğüt         | 41.5   | 15.0   | 3.0    | 2.1      | 1.8      | 5.2    |
| Huş ağacı     | 38.2   | 18.5   | 1.2    | -        | -        | 2.8    |
| Mısır koçanı  | 36.8   | 22.2   | -      | 2.9      | 5.5      | 3.1    |
| Buğday samanı | 30.2   | 18.7   | -      | 0.8      | 2.8      | 7.0    |
| Arpa samanı   | 33.1   | 20.2   | -      | 0.9      | 3.8      | 6.1    |
| Zeytin ağacı  | 25.0   | 9.82   | 0.7    | 1.4      | 2.1      | 8.8    |

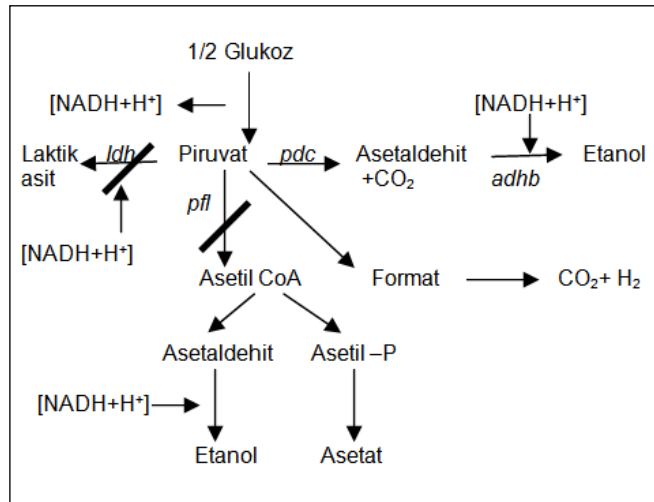
Etanol üretimi için, çeşitli biyokütlelere uygulanan ön işlemler fermente edilebilir şeker oluşumu artırmalı, karbohidratların yapısını korumalı, fermentasyon aşamasında inhibe edici yan ürünleri oluşturmamalı ve maliyet düşük olmalıdır.

### 2.1.3. Rekombinant Soylar İle Biyoetanol Üretiminin Arttırılması

Mikroorganizmalar içerisinde *E. coli*, etanol üretimi için ümit verici bir alternatif mikroorganizmadır. Çünkü *E. coli*, birçok farklı şekeri fermente ederek etanol oluşturur. Metabolik mühendisliğinin bu alandaki ilk başarılı uygulamalarında, *Zymomonas mobilis*'in etanol fermentasyon yolizindeki iki enzimi kodlayan genleri (piruvat dekarboksilaz, *pdc*, ve alkol dehidrogenaz II, *adhb*) bir plazmid (pLOI297) üzerinde *E. coli*'ye aktarılmıştır [Ingram et al., 1987]. Daha sonraki çalışmalarda, *E.coli*'nin etanol üretimi için karbon kaybına neden olan doğal fermentasyon yol izleri susturulmuş ve yine *Zymomonas mobilis*'in *pdc* ve *adhb* genlerini taşıyan plazmidle (pLOI297) klonlanan bu yeni *E. coli* suşu ile daha etkili bir etanol yolizi sağlanmıştır [Sanny, 2009].

Biyoetanol üretimi için, farklı biyokütlenin içerdiği şekerlerin karışımını fermente edebilen bir mikroorganizma gereklidir. Mikroorganizmalar arasında *E. coli* geniş spektrumlu şekerleri metabolize edebilmesine rağmen diğer şekerlere göre glukozu tercih eder. 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 (*ldh*) enzimi vasıtasıyla çevrilir. Bir çalışmada, *E. coli* NZN111 suşu, laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve piruvat format liyaz (*pfl*) genlerinin içine homolog rekombinasyonla antibiyotik direnç genlerinin eklenerek susturulması ile elde edilmiştir.

Bu suşun, glikolizisten oluşan NADH dengesi için, piruvattan NAD<sup>+</sup> i elde edemediği ve bunun sonucu olarak da anaerobik üremeyi sürdüremediği görülmüştür (Şekil 2.2). Anaerobik olarak NZN111 suşunun üreyebilmesi, bu suşun lac promotorunun kontrol ettiği *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli piruvat dekarboksilaz (*pdc*) ve alkol dehidrogenaz II (*adhb*) genlerini taşıyan pLOI297 plazmidi ile transformasyonu sonucu sağlanmıştır. *E. coli* NZN111:pLOI297 suşu FBR5 suşu olarak ifade edilmiştir [Dien et al., 2000].



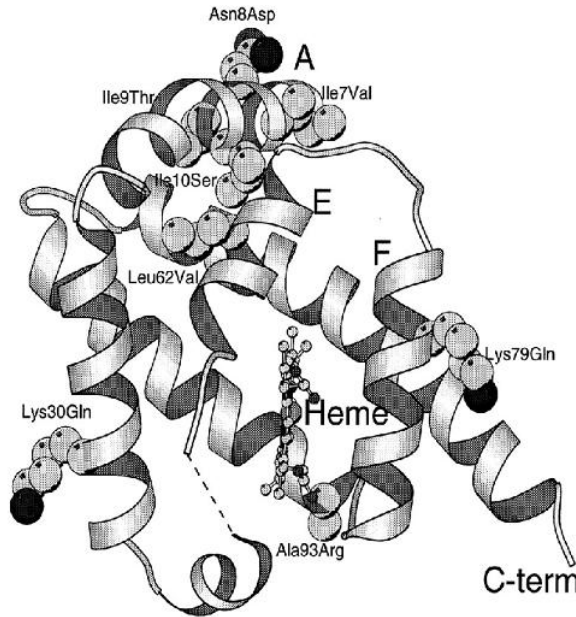
Şekil 2.2: Etanol üretiminin arttırılması için laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve piruvat format liyaz (*pfl*) genlerinin susturulması.

## 2.2. Bakteriyel Hemoglobin

Son zamanlarda hemoglobine benzeyen ve oksijen taşıyıcılığı yapan proteinlerin protozoa, bitki, fungus ve bakteriler de varlığı belirtilmiştir (Tablo 2.10) [Aytan, 2009].

*Vitreoscilla* (VHb) hemoglobini, bakteriyel hemoglobinler arasında en yaygın kullanım alanına sahip olup, aynı zamanda karakterizasyonu en iyi yapılmış hemoglobindir [Wakabayashi et al., 1986], [Dikshit and Webster, 1988].

Lokale olan hem bölgesi *Vitreoscilla* hemoglobinin 3 boyutlu yapısında Şekil 2.3'te gösterilmektedir [Joshi et al., 1998]. Bazı hemoglobinlerinin oksijen bağlama sabitesi ( $K_{on}$ ) ve oksijen salınım sabitesi ( $K_{off}$ ) değerleri Tablo 2.10'da gösterilmektedir. Orii ve Webster [1986], VHb'nin diğer hemoglobinelere göre, oksijeni çok daha hızlı ( $K_{off} = 5600 \text{ s}^{-1}$ ) serbestlediğini raporlamıştır [Frey and Kallio, 2003], [Aytan, 2009].

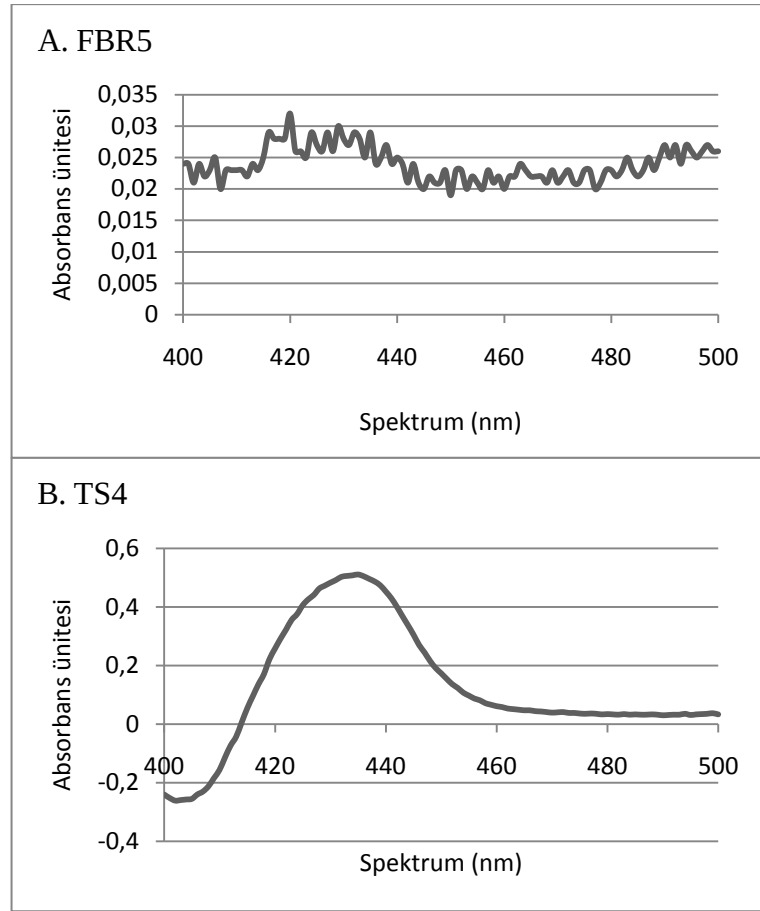


Şekil 2.3: *Vitreoscilla* hemoglobinin üç-boyutlu yapısı.

Tablo 2.10: Bazı hemoglobinlerin oksijen bağlama ( $K_{on}$ ) ve oksijen salınım ( $K_{off}$ ) sabiteleri.

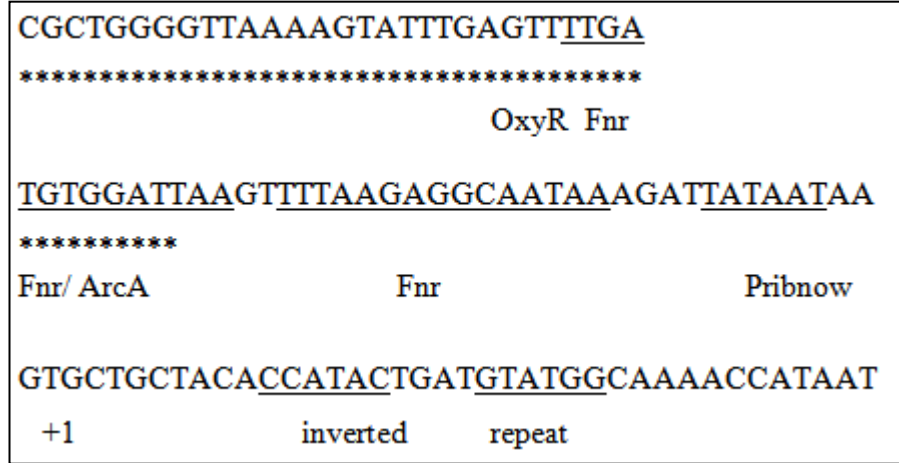
| Protein                                             | $K_{on}$<br>[ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] | $K_{off}$<br>[ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini [VHb]               | 78                                               | 5600                                              |
| <i>Lupin</i> leghaemoglobin [Lba]                   | 120                                              | 5.6                                               |
| <i>Arabidopsis</i> hemoglobin1 [AHB1]               | 75                                               | 0.12                                              |
| <i>Arabidopsis</i> hemoglobin2 [AHB2]               | 1.07                                             | 0.14                                              |
| <i>Escherichia coli</i><br>Flavohemoglobinler [HMP] | 38                                               | 0.44                                              |
| <i>Candida</i> Hb [maya]                            | 850                                              | 17                                                |
| At miyoglobini                                      | 14                                               | 11                                                |
| Soya Lb                                             | 116                                              | 5.55                                              |

Hemoglobinler, çeşitli ligandlar ( $\text{O}_2$ , CO, NO ve  $\text{CN}^-$ ) ile hem grubuna bağlanarak adsorbsiyon spektrası oluşturur. Gözlemlenen adsorbsiyon spektrası hemoglobinlerin karakterizasyonunu gösterir. Oksijen ve CO sadece ferrous hem grubuna bağlanırken; NO, ferrous ve ferik hem grubuna bağlanır. VHb, karbon monoksit ile indirgendiğinde, 419 ile 439 nm aralığında adsorbsiyon gösterir. Kimyasal olarak ditiyonit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) ile indirgendiğinde ise, 416 ile 430 nm aralığında adsorbsiyon piki verir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: A. Hemoglobin içermeyen *E. coli* FBR5 suşunda ditiyonit indirgenmesi sonucu absorpsiyon piki oluşmaması, B. *vgb* içeren *E. coli* 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 promotordur. Promotorun oksijene duyarlılığı üzerinde taşıdığı ve global düzenleyici proteinlere, yani Fnr ve ArcA ve OxyR proteinlerine özgü dizilerden kaynaklanır (Şekil 2.5) [Yang et al., 2005]. *E. coli*'de *vgb* promotoru mikroaerobik koşullar altında (% 2'den daha az çözünmüş oksijen seviyelerinde) maksimum düzeyde indüklenir [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 birbirine yakın enterik bakteride bu genin farklı düzenlendiğini ve farklı düzenleyici mekanizmaların kullanıldığını ifade etmektedir. Ayrıca Fnr bakımından mutant *E. coli* hücrelerinin mikroaerobik koşullarda altında *vgb* promotorunu aktive edemedikleri belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Diğer çalışmalarda da *vgb*'nin oksijene duyarlı promotor aktivesinin olduğunu ve genin proteinin, yani VHB'nin, ifadesinin Fnr tarafından sağlandığı gösterilmiştir [Kiley and Reznikoff, 1991].



Şekil 2.5: *vgb* promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri.

Daha önceki yapılan çalışmalarda, VHb ekspresyonu yapan *E. coli* hücrelerinin daha iyi üreme ve yüksek hücre yoğunluğuna sahip oldukları gösterilmiştir [Frey and Kallio, 2003], [Khosla and Bailey, 1988]. Ayrıca *vgb* taşıyan rekombinant *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın daha yüksek oksijen alım oranına sahip olduğu görülmüştür [Geckil et al., 2001]. VHb'nin oksijen depolama ve taşıma fonksiyonları yanında detoksifikasyon fonksiyonu da vardır [Minning et al., 1999].

VHb klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan bir çok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb hemoglobinin, solunumu ve büyümeyi de artırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, bu proteinin oksijen gerektiren birçok biyoproseste potansiyel kullanım alanı bulacağını göstermektedir [Geckil and Gencer, 2004], [Farres and Kallio, 2002], [Geckil et al., 2004], [Khosravi et al., 1990]. Bu bağlamda, üretimleri belli konsantrasyonda oksijene ihtiyaç duyan bir takım metabolitlerin (bütandiol, asetoin) bu proteinin ekspresyonunu yapan bakterilerde ana konakçılara göre önemli derecede fazla olduğu saptanmıştır [Geckil et al., 2004].

VHb'nin bazı mikroorganizmalarda benzoik asit, DNT (dinitrotoluen) gibi aromatik bileşiklerin biyolojik olarak yıkımında, oksijen gerekli olan basamaklara, oksijen sağlayarak yıkımı hızlandırdığı belirlenmiştir [Nasr et al., 2001]. Benzer çalışmalarda, VHb eksprese eden *Serratia marcescens*'de Luria–Bertani (LB) besi

ortamında ve % 2 kazein hidrolizati içeren LB besi ortamında, asetoin ve 2.3 butandiol üretimi artmıştır [Wei et al., 1998].

*E. aerogenes* ile yapılan çalışmada, düşük oksijen koşullarında, *vgb* hemoglobini varlığında asetoin ve 2.3 butandiol üretiminin arttığı belirlenmiştir [Geckil et al., 2004]. Bir diğer çalışmada, VHb eksprese eden *Streptomyces lividans*'de, düşük oksijen koşullarında daha fazla hücre sayısı büyümesi gözlenen kültürlerde, VHb hemoglobini eksprese etmeyen *S. lividans* kültürlerine nazaran daha fazla miktarda aktinorhodin üretilmiştir [Pauli et al., 1993].

*Phellinus igniarius* hücreleri ile yapılan bir çalışmada, VHb eksprese eden misel hücrelerinin metabolit üretimi gözlemlenmiştir. Mikroaerofilik koşullarında sentezlenen flavon miktarı VHb ekspresyonu ile 9.67 gL<sup>-1</sup>'den 17.21 gL<sup>-1</sup>'ye artmıştır [Zhu et al., 2011].

## 2.3. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, enzimlerin devamlı ve sürekli sistemlerde fiziksel aktivitelerini koruyarak, belli bir bölge ile sınırlandırılması işlemidir. Enzim immobilizasyonu için, adsorpsiyon, kovalent bağlama, tutuklama, kapsülleme, çapraz bağlama gibi çeşitli immobilize metodları vardır [Tan et al., 2010].

Son yıllarda özellikle biyoteknolojik üretimler için, enzimlerin yanı sıra hücrelerin immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerde önem taşımaktadır. Mikroorganizmaları tutuklama tekniği, hücre yoğunluğunun artması ve buna bağlı olarak ürün miktarının artırılmasında öncü rol oynamaktadır [Kourkoutas et al., 2004]. İmmobilize mikrobiyal hücrelerin, biyotransformasyon ve biyosentetik özelliklerinin artması ile antibiyotik, alkol, organik asit ve enzim gibi değerli ürünlerin oluşumunda artış görülmüştür [Kourkoutas et al., 2004], [Anisha and Prema, 2008].

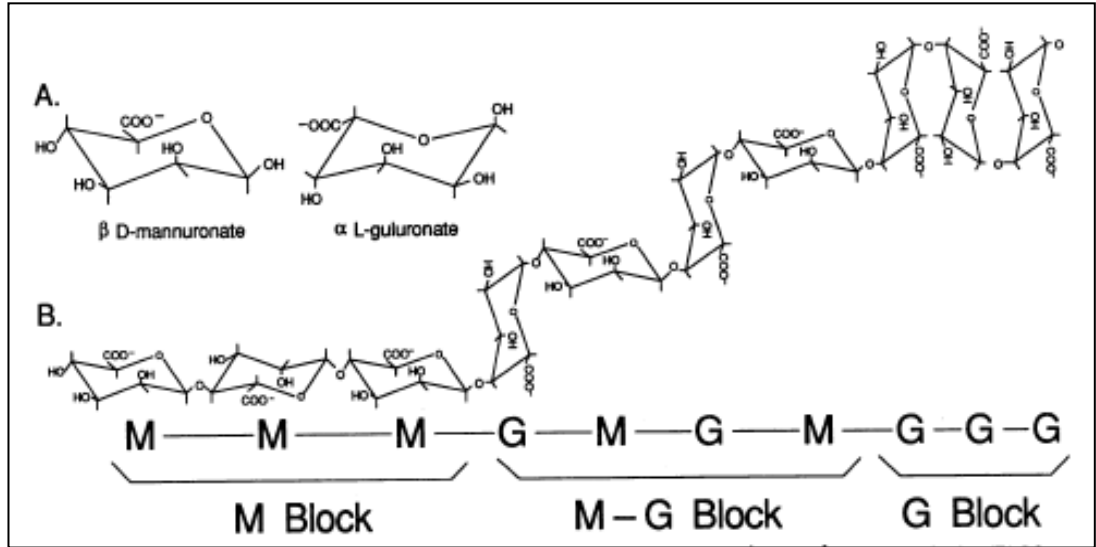
### 2.3.1. Hücre İmmobilizasyonu

Biyolojik atık su arıtım tesisleri ve metabolit üretimi gibi endüstride immobilizasyon uygulamaları sadece hücre sayısının artırılmasını değil, aynı zamanda ürünlerin katı ya da sıvı ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesini de

sağlamaktadır. Farklı immobilize metodları arasında genellikle kullanılan yöntem destekleyici bir matrix içerisine hücrelerin hapsedilmesi olan tutuklama işlemidir. Çeşitli doğal ürünler (agar, agaroz, K-carrageenan, aljinat, kitosan vb.) ve sentetik polimer materyaller (poliakrilamid, poliüretan, poliüretan glisol vb.) immobilizasyon işlemi için uygundur [Song et al., 2005].

Endüstriyel fermantasyonda, serbest hücrelerin yerine immobilize hücrelerin kullanılması ile, ürünün ortamdan kolaylıkla ayrılması, hücresel kaynaklı kontaminasyon riskinin azalması, ürün veriminin artması, hücre kazanımı ve tekrar kullanımı ile prosedür maliyetini azaltması gibi pek çok avantaj görülmektedir [Ghorbani et al., 2011], [Göksungur and Zorlu, 2001].

Sodyum aljinat, hücre immobilizasyonunda en sık kullanılan matristir. Genel olarak kahverengi deniz alglerinden elde edilen aljinat, tekrarsız alt ünitelerinin ( $\beta$ -D-mannuronik asit (M) ve  $\alpha$ -L-gluronik asit (G)) 1 $\rightarrow$ 4 glikozidik bağlanarak oluşturduğu kopolimerdir (Şekil 2.6). Aljinat, divalent (+2) katyonlar (kalsiyum, magnezyum, stronsiyum ve baryum gibi) ile birlikte, suda çözünmeyen jel yapı oluşturmaktadır. Jel yapı oluşumunu etkileyen temel faktör, aljinatın gluronik asit alt ünitesinin oranı (M/G) ve uzunluğudur [Göksungur ve Güvenç, 2002], [Chitnis and Ohman, 1990].



Şekil 2.6: A. Aljinat yapısını oluşturan M ve G alt ünitelerinin konformasyonu. B. Aljinat yapısını oluşturan tekrarsız M ve G alt üniteleri; M Block, çoklu M alt üniteleri; M – G Block, heteropolimerik yapıdaki M ve G alt üniteleri; G Block, çoklu G alt üniteleri.

Hücre immobilizasyonu için farklı teknikler uygulanabilirken, genellikle toksik etkisi bulunmayan, endüstride kolay kullanılabilir olması ve tüm mikroorganizmaların immobilize edilmesi için uygun olan kalsiyum aljinat metodu uygulanmaktadır. Bu metod kısaca, sodyum aljinat ile hücreleri süspanse ederek, kalsiyum klorür solüsyonuna damlatılması ile hücrelerin kalsiyum aljinat içerisinde tutuklanması işlemidir. Kalsiyum aljinat ile tutuklama işleminde farklı hücrelerin [bakteri, maya, alg, küf, mantar, protoplast, bitki ve hayvan hücreleri gibi] immobilizasyonu uygulanabilmektedir [Anisha and Prema, 2008], [Göksungur and Zorlu, 2001].

Kalsiyum aljinat ile oluşan jel yapının fonksiyonu; aljinatın tipi ve yoğunluğuna,  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinin konsantrasyonuna ve reaksiyon süresine bağlıdır. Sitrik asit, laktik asit gibi organik asitler ile  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$  gibi bazı katyonlar, kalsiyum aljinatta bulunan kalsiyum iyonları ile yer değiştirerek jel yapısının dayanıklılığını bozmaktadır. Bunun için, organik asit ve etil alkol üretiminde, fermentasyon ortamına  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ve  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi ekleyerek, jel yapının korunması sağlanabilir [Göksungur ve Güvenç, 2002].

İmmobilize hücreler, serbest hücreler ile karşılaştırıldığında geniş termal stabilite özelliği sergiledikleri ve buna bağlı olarak inkübasyon sıcaklık değişimlerine daha az duyarlı oldukları gözlenmiştir [Yan and Lehe, 2007].

## **3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER**

### **3.1. Gereçler**

#### **3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler**

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelerinden tripton, NaOH, sodyum aljinik asit Sigma, Oakville, Kanada'dan sağlandı. CH<sub>3</sub>COONa (Sodyum asetat), H<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>P.H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Sodyum ditiyonit), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, D(+)-glukoz, D(+)-ksiloz, D(-)-fruktoz, D(+)-laktoz, asetonitril, alfa naftol, etanol, pepton, maya özütü, tiamin, agar ve steptomisin sülfat, ampisilin sodyum, gentamisin sülfat antibiyotikleri ise Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edildi. Etanol ölçümleri için kullanılan EnzyChrom Etanol Assay Kit, 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 MarchV, Rochester, New York, A.B.D.'den temin edildi. Şeker miktarı tayini için kullanılan ince tabaka kromatografisi plakaları ise Whatman, TLC Plates Partisil® K5, Maidstone, İngiltere'den sağlandı.

#### **3.1.2. Kullanılan Cihazlar**

Bu tez çalışmasında hücrelerin büyüme süresi için, Binder, BD 115, Tuttlinger, Almanya ve Edmund Bühler GmbH (çalkalamalı), TH15, Hechingen Almanya inkübatörleri kullanıldı. Hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (Optik Density; OD) Bio-Rad, SmartSpec™ 3000, Philadelphia, A.B.D. spektrofotometre ile ölçüldü. Şeker pancarı işleme atık suyu ve peynir altı suyunun tozu ile hazırlanan solüsyonu Beckman Coulter, Allegra™ 25R, Krefeld, Almanya ve hücreleri çöktürmek için Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka santrifüjleri kullanıldı. Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D. cihazı ile pH değerleri belirlendi. Hücre hemoglobin ekstraksiyonu için Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D. sonikatörü ile

parçalandı ve hemogloblin ölçümleri için kullanılan UV spektroskopisi ise Shimadzu, UV-3600 UV-VIS NIR, Kyoto, Japonya ile ölçüldü. TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D. kullanılarak ölçüldü. Plazmid stabilitesi için yapılan inokülasyon öncesi dilüsyonlar IKA, Genius3, Staufen, Almanya vorteksi ile karıştırıldı. Tüm sarf malzemeleri ve diğer malzemeler ise deneylerde kullanılması için Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya otoklavı ile steril edildi.

### 3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu tez çalışmasında, VHB'nin farklı gıda işleme atıkları şeker pancarı işleme suyu (melas) ve peynir altı tozu kullanılarak biyoetanol üretimini arttırmadaki etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Bu nedenle tez çalışmamızda, USDA laboratuvarından temin edilen *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) [Dien et al., 2000] ve bu suşlardan Dr. Sanny tarafından geliştirilen TS3 ve TS4 [Sanny, 2009] suşları kullanıldı. Bunun için, bütün suşlar *pdc* (piruvat dekarboksilaz), *adhB* (alkol dehidrogenaz) [Dien et al., 2000] ve *vgb* (TS3, TS4) [Sanny, 2009] içerecek şekilde, Illinois Institute of Technology, Department of Biological Chemical and Physical Sciences, Chicago, IL, USA' de, yeni oluşturulan plazmitlerle transforme edilerek elde edildi [Sanny et al., 2010].

Kullanılacak olan suşlar ve özellikleri:

- NZN111 - *E. coli* [F+  $\lambda$ - *rpoS*396(Am) *rph*-1  $\Delta$ *pflB*::Cam  $\Delta$ *ldhA*::Kan].
- FBR5 - *pdc* ve *adhB* taşıyan pLOI297 plazmidi ile transforme edilmiş NZN111 suşu.
- FBR5/*pTS3* (TS3 suşu) - *vgb* taşıyan pKT230 plazmidi (pTS3) ile transforme edilmiş FBR5 suşu.
- FBR5/*pTS4* (TS4 suşu) - *vgb* taşıyan pBBR1MCS-5 plazmidi (pTS4) ile transforme edilmiş FBR5 suşu.

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

işleme atıklarını (şeker pancarı işleme suyu ve peynir altı tozu) içeren LB (Luria Bertani) besiyerinde ve kontrol besiyeri olarak fruktoz (% 1.2, w/v) ve glukozu (% 1.2, w/v) içeren LB besiyeri ile laktoz (% 5.5, w/v) içeren LB besiyerinde üretilerek, oluşturdıkları VHb ekspresyon seviyeleri, etanol üretimleri ve bu hücrelerin üreme özellikleri incelendi.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1 Şeker Pancarı İşleme Suyunun (Melas) Hidrolizi

Kullanılan şeker pancarı işleme suyu (melas) Pakmaya İzmit Fabrikası, Kocaeli'den sağlandı. Melasın fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait bilgiler Pakmaya İzmit Fabrikasından sağlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Temin edilen şeker pancarı işleme suyu (melas)'nın özellikleri.

| Melas Bileşikleri                     |          |
|---------------------------------------|----------|
| Kuru Madde (%)                        | 6.10     |
| pH (direkt)                           | 7.04     |
| Sukroz (%)                            | 50.00    |
| Renk-375 nm                           | 0.285    |
| Ozmotik Basınç<br>(osmol/kg) (direkt) | 0.738    |
| K <sup>+</sup> (mg/L)                 | 8600.00  |
| Ca <sup>+</sup> (mg/L)                | 830.00   |
| NH <sub>4</sub> -N (mg/L)             | 81.60    |
| NO <sub>3</sub> -N (mg/L)             | 500.00   |
| NO <sub>2</sub> -N (mg/L)             | 3.40     |
| d (yoğunluk) (g/mL)                   | 1.024    |
| Betain (g/L)                          | 11.150   |
| COD (mg/L)                            | 49500.00 |

% 50 oranında sukroz içeren melastan, fruktoz ve glukoz monomer eldesi için asit hidroliz yöntemi uygulandı. Melas distile su ile 5 kat sulandırıldı ve 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

ile pH değeri 3.0'e ayarlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletilen melas 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre ile bir otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ısıtıldı. Soğutulduktan sonra, NaOH ile pH 7.0'ye yükseltildi ve +4 °C sıcaklıkta 7000 rpm hızda 15 dakika süre ile bir santrifüjde (Beckman Coulter, Allegra™ 25R, Krefeld, Almanya) çöktürüldü. Üst sıvı 0.2 µm por çaplı vakum filtreden (Nalgene, Supor MarchV, Rochester, New York, A.B.D.) geçirilerek steril hale getirildi [Karaalp, 2007].

### 3.2.2 Peynir Altı Tozunun Kullanımı

Kullanılan Peynir Altı Tozu Maybi (Malkara Birlik Süt ve Süt Mamülleri A.Ş.)'den "Grade A" formunda temin edildi. Peynir altı tozunun içeriği Çizelge 3.2'de gösterilmektedir [Web 3, 2013].

Tablo 3.2: Temin edilen Peynir Altı Tozunun özellikleri.

| Peynir Altı Tozu Bileşikleri |             |
|------------------------------|-------------|
| Nem                          | Maks % 3    |
| Protein                      | % 7 – 10    |
| Laktoz                       | % 75 – 78   |
| Kül                          | Maks % 9.00 |
| Tuz                          | Min % 2.85  |
| Yağ                          | Maks % 1    |
| Asitlik (L.A)                | Maks % 0.20 |
| pH                           | Min 6.0     |
| Çözünürlük indeksi           | Min % 98    |

400 ml distile su içerisine 200 gr peynir altı tozu olacak şekilde bir solüsyon hazırlandı ve 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile bir otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ısıtılarak steril hale getirildi. Hazırlanan solüsyon 7000rpm hızda 15 dakika süre ile steril bir şekilde santrifüj (Beckman Coulter, Allegra™ 25R, Krefeld, Almanya) edilerek safsızlıklardan arındırıldı [Özmihçı, 2009, adapte edilmiştir].

### 3.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Hazırlanan şeker pancarı işleme suyu (melas) hidrolizatını (MH) içeren kültür besi ortamı; 500 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 200 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 10 ml CH<sub>3</sub>COONa (% 10, w/v) + 89 ml distile su + 1 ml tiamin (% 0.1, w/v) + 3 g MgSO<sub>4</sub> + 1 g (NH<sub>4</sub>)PO<sub>4</sub> içeren ortama 200 ml melas hidrolizatı (pH 7.0) ilave edilerek bir litreye tamamlandı [Dien et al., 2003, adapte edilmiştir].

Kontrol Besiyeri (glukoz; %1.2 w/v, fruktoz; %1.2 w/v içeren kültür ortamı) (1000ml); 500 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 200 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 200 ml glukoz (%6, w/v) ve fruktoz (%6, w/v) solüsyonu + 10 ml CH<sub>3</sub>COONa (% 10, w/v) + 89 ml distile su + 1 ml tiamin (% 0.1, w/v) + 3 g MgSO<sub>4</sub> + 1 g (NH<sub>4</sub>)PO<sub>4</sub> ilave edilerek hazırlandı [Dien et al., 2003, adapte edilmiştir].

Hazırlanan Peynir altı solüsyonu PAST içeren kültür ortamı; 500 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 200 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 10 ml CH<sub>3</sub>COONa (% 10, w/v) + 89 ml distile su + 1 ml tiamin (% 0.1, w/v) içeren ortama 200 ml peynir altı tozu solüsyonu (pH 7.0) ilave edilerek bir litreye tamamlandı [Dien et al., 2003, adapte edilmiştir].

Kontrol Besiyeri (laktoz; %5.5, w/v içeren kültür ortamı) (1000ml); 500 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 200 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 200 ml laktoz (%27.5, w/v) solüsyonu + 10 ml CH<sub>3</sub>COONa (% 10, w/v) + 89 ml distile su + 1 ml tiamin (% 0.1, w/v) ilave edilerek hazırlandı [Dien et al., 2003, adapte edilmiştir].

İmmobilizasyon için, saf şeker olarak ksiloz içeren kültür ortamı (100ml); 50 ml 2X-LB (NaCl içermeyen, pH 7.0) + 20 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) + 20 ml ksiloz (%40, w/v) solüsyonu + 1 ml CH<sub>3</sub>COONa (% 10, w/v) + 8.9 ml distile su + 0.1 ml tiamin (% 0.1, w/v) ilave edilerek bir litreye tamamlandı [Dien et al., 2003, adapte edilmiştir].

Tüm içerikler ayrı ayrı steril edilerek muhafaza edildi ve bu besi ortamları her denemeden önce taze olarak hazırlandı. Antibiyotikli koşullar için uygun antibiyotikler belirtilen oranlarda (Tablo 3.3) farklı rekombinant suşlar için ayrı ayrı hazırlanan besi ortamına ilave edildi.

Tablo 3.3: 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    |

### 3.2.4. Kalsiyum Aljinat ile Hücre İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon yönteminde kullanılmak üzere ilk olarak sodyum aljinat  z ltisi (% 4, w/v), CaCl<sub>2</sub>  z ltisi (% 2, w/v) ve fizyolojik tuzlu su  z ltisi (NaCl; % 0.85, w/v) hazırlandı. Sodyum aljinat (% 4, w/v)  z ltisi hazırlanırken, yıĥın oluşumunu engellemek için, manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan saf suya toz haldeki sodyum aljinat azar azar ilave edildi ve  z nmeyi saĥlamak için karıştırma sürekli devam edildi. Hazırlanan tüm  z ltiler 121  C sıcaklıkta 15 dakika süre ile ısıtılarak steril edildi (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) [Ürküt, 2007].

Hazırlanan bir gecelik  n kültürlerden yaklaşık 600 µl/100 ml alınarak (OD<sub>600</sub> ~0.04 olacak şekilde) 250 ml'lik erlenmayerlere 200ml ksiloz içeren kültür ortamına inoküle edildi. Erlenlerin ucu kauçuk tıplar ile kapatıldı ve 22-kalibre iĥne ile delinerek gaz çıkışı saĥlandı. Kültür ortamları 180rpm hızda, 37 C sıcaklıkta 24 saat süre ile çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund B hler GmbH, TH15, Hechingen Almanya) inkübasyonu saĥlandı.

Kültür ortamında üreyen rekombinant *E.coli* suşları 4000 rpm hızında 15 dakika süre ile bir santrifüjde (Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka)   kt r lerek, steril fizyolojik tuzlu su (NaCl; % 0.85 w/v) ile süspanse edildi. Steril edilip soĥutulan sodyum aljinat (% 4, w/v), hücre süspansiyonu ile 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı ve 400 ml CaCl<sub>2</sub> (% 2, w/v)  z ltisine mikropipet (1000µl) yardımıyla damlatıldı. Damlalar CaCl<sub>2</sub> ile temas ettikleri anda katılaştı ve tutuklanmış hücreleri içeren yaklaşık 3.5 – 4.0 mm çapında boncuklar elde edildi. Jel yapısının sertleşmesi için, CaCl<sub>2</sub>  z ltisinde 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak boncukların dayanıklı hal alması saĥlandı. Elde edilen boncuklar fazla kalsiyum iyonlarını ve hapsedilmemiş (serbest haldeki) hücreleri uzaklaştırabilmek için steril fizyolojik su ile (NaCl; % 0.85 w/v) yıkandı [Ürküt, 2007].

Oluşan kalsiyum aljinat boncukları, 1gr boncuk'a yaklaşık 5ml maya özütü (% 0.2 w/v) ve glukoz (% 0.2 w/v) içeren solüsyonda, +4 °C sıcaklıkta saklandı [Ürküt, 2007, adapte edilmiştir]. Boncuklardan hücre kaçışını gözlemlemek amacıyla, her ay ksiloz içeren LB (LBK) agar besiyerlerine direkt yayma plak ekimi yapıldı ve bir gece 37 °C sıcaklıkta bir inkübatörde (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) inkübe edildi.

Tutuklanmış hücreler, şeker pancarı işleme suyu (melas) hidrolizatı ile peynir altı tozu içeren solüsyonda, 48 saat süre ile 37 °C sıcaklıkta, 180 rpm hızda, çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen Almanya) inkübe edildi. Fermentasyonda, 800 ml kültür ortamı için yaklaşık 8-10 boncuk seçilerek besi ortamına aktarıldı. İnkübasyon sonrası 48 saatlik kültürlerin pH değerleri, OD<sub>600nm</sub> değerleri, etanol-g/100 ml (% w/v), etanol-ml/100 ml (% v/v) ölçümleri, VHB miktarları (nmol/g) ve kültür ortamında kalan toplam şeker miktarları (% w/v) belirlendi.

İmmobilizasyon, oda sıcaklığında ve steril koşullar altında gerçekleşti.

### **3.2.5. 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 'lık (w/v) ksiloz çözeltisi ise distile su ile hazırlanarak otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ayrı ayrı steril edildi. Sterilizasyon sonrası, son konsantrasyonun % 8 (w/w) olacak şekilde LB agar besiyerine eklendi ve 50 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra uygun oranlarda ilgili rekombinant soylar için farklı antibiyotikler ilave edilerek petrilere döküldü.

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.

### **3.2.6. Ön Kültürlerin Hazırlanması**

Ön kültürler, FBR5, TS3 ve TS4 suşları uygun antibiyotik içeren farklı besi ortamların (melas hidrolizatı ve peynir altı tozu solüsyonu içeren) 5 ml'sine (50 ml'lik erlenlerde) 1 veya 2 koloni inoküle edilerek, bir gece boyunca, 37°C

sıcaklıkta, 180rpm hızda çalkamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen Almanya) büyütülerek hazırlandı.

### **3.2.7. Düşük Oksijenli Koşullar**

Hazırlanan bir gecelik ön kültürlerden yaklaşık 4800 µl alınarak 800 ml (1000 ml'lik erlende) farklı kültür besi ortamları içerisine ( $OD_{600} \sim 0.04$  olacak şekilde) inokülasyon yapıldı. Erlenlerin ucu, kauçuk tıplar ile kapatıldı ve 22-µm kalibre iğne ile delinerek gaz çıkışı sağlandı. Kültür ortamlarının 180rpm hızda, 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen Almanya) inkübasyonu sağlandı.

Düşük oksijenli koşullar uygun antibiyotikleri içeren ve içermeyen ortamlarda ayrı ayrı denendi.

İnkübasyon sonrası 48 saatlik kültürlerin pH değerleri,  $OD_{600nm}$  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.

### **3.2.8. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Farklı besi ortamları ile inkübe edilen kültürlerin pH değerleri, bir pH metre (Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D.) kullanılarak belirlendi.

### **3.2.9. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi**

Farklı besi ortamları ile inkübe edilen kültürlerin 48 saat süre sonundaki hücre sayımları bir spektrofotometre cihazı (Bio-Rad, SmartSpec™ 3000, Philadelphia, A.B.D.) kullanılarak belirlendi. Kültürlerin  $OD_{600nm}$ 'deki optik yoğunlukları,  $OD_{600}$  0.6 değerini aşmayacak şekilde steril özgün besi ortamı ile seyreltilerek ölçüldü. Optik yoğunluğunu belirlemede kör olarak yine kültüre özgün steril besi ortamı kullanıldı.

### 3.2.10. Biyoetanol Miktarının Ölçümü

Düşük oksijen koşullarında farklı kültür besi ortamları 48 saat süren inkübasyon sonundaki fermentasyon ortamında oluşan etanol miktarının belirlenmesi için hücre kültürleri bir santrifüj (Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka) ile 4000 rpm hızında +4 °C sıcaklıkta çöktürülerek üst sıvıları alındı ve santrifüj tüplerine aktarıldı. VHB miktarının belirlenmesi için, kalan hücre pelletlerinin yaş ağırlıkları hesaplanarak, en az bir gece boyunca -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Düşük oksijen koşullarda üretilen kültürlerin içerdikleri biyoetanol miktarı (% w/v; % v/v) EnzyChrom Etanol Assay Kit 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.

### 3.2.11. Besiyerinde Kalan Şeker Miktarının Ölçümü

Kullanılan besiyerlerinin (MH ve PAST) ve farklı kültür besi ortamları ile inkübe edilen kültürlerin 48 saat süre sonunda fermentasyon ortamında kalan şeker miktarlarının tayini ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) ile belirlendi.

TLC kullanımı için öncelikli olarak glukoz, galaktoz, fruktoz ve laktoz içeriği 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mg/ml (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı standart çözeltileri hazırlandı. Örnekler standartların dışına çıkmayacak şekilde, uygun oranlarda distile su ile seyreltildi.

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

Kültür ortamlarındaki kalan şekerlerin miktar tayini için, TLC görüntüleme densitometresinde (Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D.) taratılarak hacim

hesaplama işlemi yapıldı. Standart grafiği üzerinde,  $R^2$  değeri 0.950 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edildi.

### **3.2.12. Rekombinant Soylerdeki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü**

Yapılan denemelerde kullanılan *vgb* içeren rekombinant organizmaların (TS3 ve TS4) ürettikleri VHb miktarı, UV-3600 Shimadzu UV-VIS NIR Spektrometresi vasıtasıyla, dityonit (sodyum hidrosülfat) eklenerek indirgenmiş-indirgenmemiş fark spektrasıyla ölçülerek belirlendi (Webster and Liu, 1974). Bunun için farklı kültür besi ortamlarında 48 saat süren inkübasyon sonunda üretilen hücre kültürleri 4000 rpm hızda 4 °C sıcaklıkta 15 dakika süre ile santrifüj edilerek (Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka) 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 6 kez sonike edildi.

Elde edilen hücre homojinatları 4 °C sıcaklıkta 4000 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj (Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka) edildi. Üst sıvılar VHb miktarı tayini için ayrıldı. Kör olarak dityonit ile muamele edilmeyen üst sıvılar kullanıldı. Ölçümler 400-500 nm aralığında yapıldı. VHb'nin dityonitle indirgendiğinde karakteristik olarak verdiği 416 ve 430 nm dalga boyları arasındaki fark spektrumundan (Shimadzu, UV-3600 UV-VIS NIR, Kyoto, Japonya) VHb miktarı nmol/g olarak hesaplandı.

### **3.2.13. Suşların Plazmid Kararlılığının Ölçümü**

Düşük havalandırma koşullarında farklı kültür ortamlarında, 48 saat süre ile antibiyotiksiz olarak üreyen kültürlerden plazmid kararlılığını 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 inkübasyondan sonra, 37 °C sıcaklıkta büyüyen

kolonilerden 50 tanesi steril kürdanlar ile uygun antibiyotiği içeren LBK (ksiloz; % 8, w/v) katı besi ortamına çizgi ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen ve üremeyen koloniler sayılarak plazmid kararlılığı (%) belirlendi.

#### **3.2.14. İstatiksel Analizler**

İstatiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2007 programı ile yapıldı. *P* değerleri, tek kuyruklu *t*-testi ile VHb'nin etanol üretimini arttırabileceği hipotezine dayanılarak belirlendi.

## 4. BULGULAR

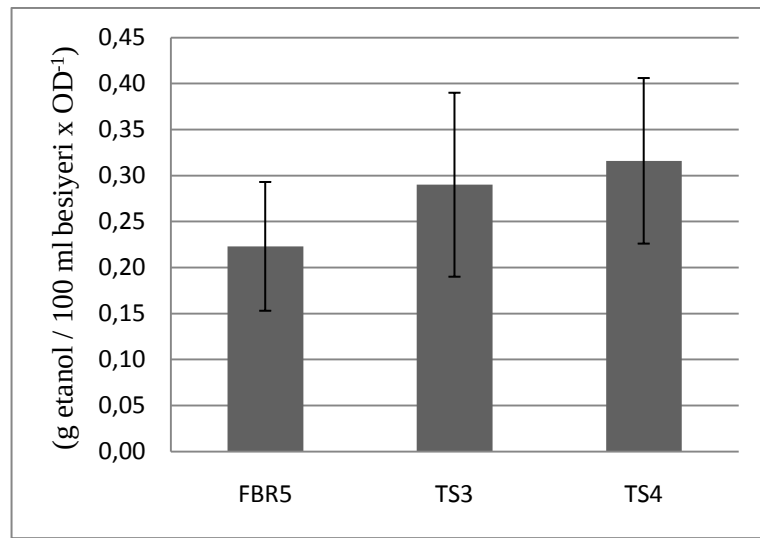
### 4.1. Şeker Pancarı Atık Suyu (Melas) Hidrolizati ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (MH) Etanol Üretimleri

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 şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde, % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren melas hidrolizati kullanılarak hazırlanmış LB besiyeri (MH, pH 7.0) ile düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren MH besiyerlerinde, düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için,  $OD_{600nm}$ 'de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS4 suşunda belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS4 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 88 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 56 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 42 ( $p = 0.03$ ) ve TS3 suşu ile % 30 ( $p > 0.05$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 961 nmol/g ( $p = 0.02$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.3). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve %1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH          | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Glukoz<br>(% w/v) | Fruktoz<br>(% w/v) |
|--------|-------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| FBR5   | 6.36 (0.17) | 3.92 (0.33)    | 0.87 (0.54)        | 1.11 (0.69)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS3    | 6.46 (0.05) | 4.45 (0.49)    | 1.29 (0.08)        | 1.73 (0.23)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS4    | 6.49 (0.06) | 5.20 (0.14)    | 1.64 (0.03)        | 2.09 (0.05)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |



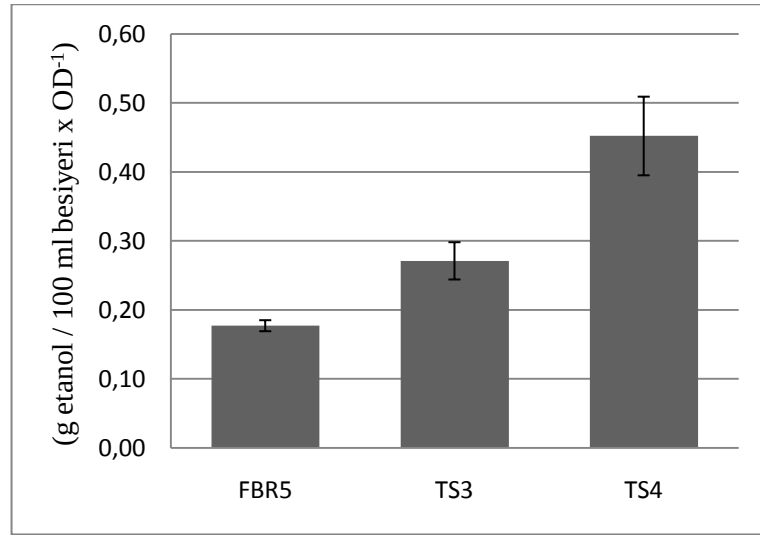
Şekil 4.1: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Antibiyotik içermeyen, MH besiyerinde düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görülmektedir. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS3 suşunda ( $p = 0.03$ ) belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS4 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 57 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 40 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>) yine FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 155 ( $p = 0.04$ ) ve TS3 suşu ile % 53 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil

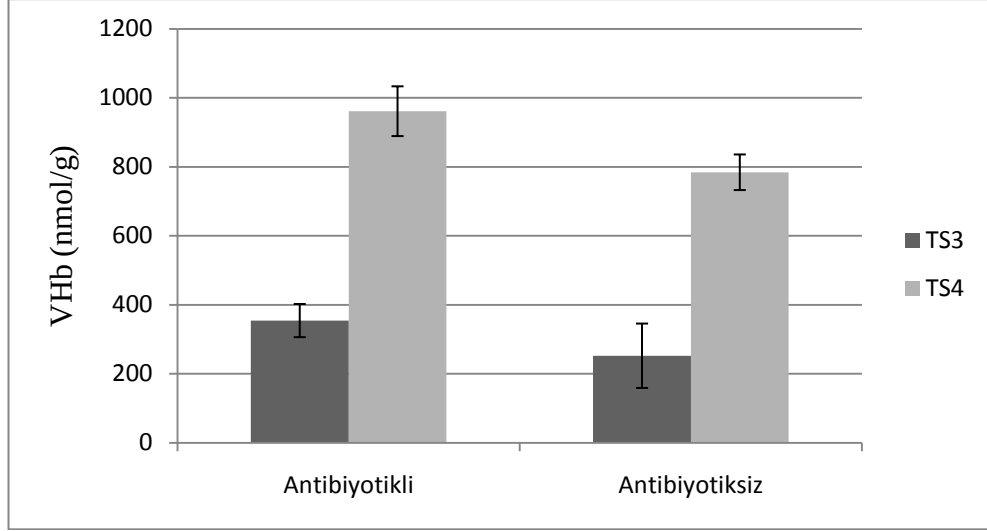
4.2). VHB ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 784 nmol/g ( $p = 0.01$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.3). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH          | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Glukoz<br>(% w/v) | Fruktoz<br>(% w/v) |
|--------|-------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| FBR5   | 6.20 (0.40) | 3.75 (0.92)    | 0.66 (0.17)        | 1.18 (0.32)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS3    | 6.43 (0.04) | 4.65 (1.06)    | 1.25 (0.23)        | 1.65 (0.30)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS4    | 6.42 (0.06) | 3.23 (0.75)    | 1.46 (0.34)        | 1.85 (0.44)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |



Şekil 4.2: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.3: MH besiyerinde, düşük havalandırmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.2. Glukoz ve Fruktöz İçeren LB (LBGF) Ortamlarındaki Etanol Üretimleri

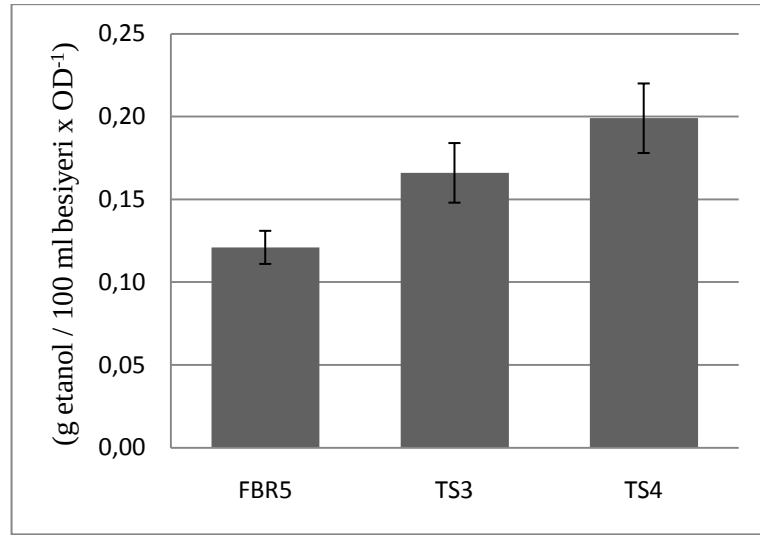
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren LB besiyeri (LBGF, pH 7.0) ile düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBGF besiyerlerinde, düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS3 suşunda belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS4 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 56 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 44 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $\text{g etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 64 ( $p = 0.04$ ) ve TS3 suşu ile % 37 ( $p > 0.05$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil

4.4). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 853 nmol/g ( $p = 0.03$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.6). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren LBGF besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH          | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Glukoz<br>(% w/v) | Fruktoz<br>(% w/v) |
|--------|-------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| FBR5   | 6.35 (0.22) | 5.51 (1.49)    | 0.66 (0.06)        | 0.85 (0.08)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS3    | 6.42 (0.01) | 5.85 (0.54)    | 0.97 (0.02)        | 1.23 (0.03)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS4    | 6.50 (0.04) | 5.28 (0.76)    | 1.05 (0.01)        | 1.33 (0.01)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |



Şekil 4.4: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda, LBGF ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

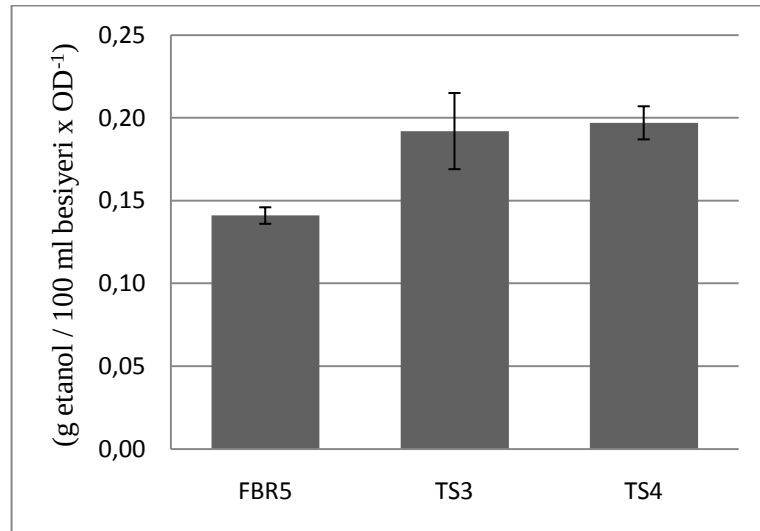
Antibiyotik içermeyen, LBGF besiyerinde düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda ( $p = 0.01$ ) görüldü. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS4 suşunda belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS4 suşu ile FBR5 suşu

ile elde edilenden % 58 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 40 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $\text{g etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times \text{OD}^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 40 ( $p = 0.02$ ) ve TS3 suşu ile % 36 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.5). VHb ekspresyonunun ( $\text{nmol/g}$  yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda  $495 \text{ nmol/g}$  ( $p = 0.03$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.6). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.4).

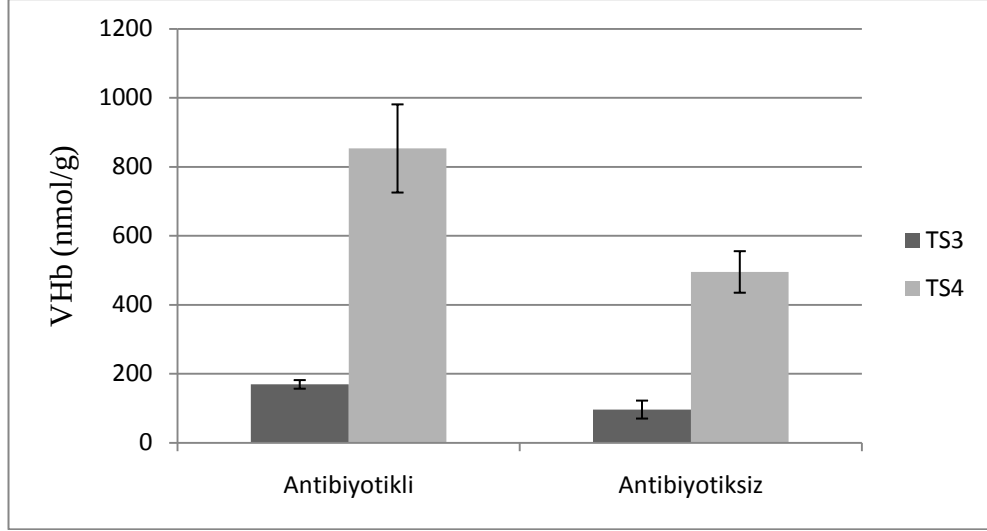
Tablo 4.4: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren LBGF besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır.

Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH          | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Glukoz<br>(% w/v) | Fruktoz<br>(% w/v) |
|--------|-------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| FBR5   | 6.61 (0.05) | 4.77 (0.04)    | 0.67 (0.01)        | 0.86 (0.02)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS3    | 6.43 (0.04) | 4.94 (0.01)    | 0.94 (0.11)        | 1.20 (0.16)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS4    | 6.41 (0.06) | 5.43 (0.60)    | 1.07 (0.06)        | 1.36 (0.08)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |



Şekil 4.5: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, LBGF ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ( $\text{g etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times \text{OD}^{-1}$ ). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.6: LBGF besiyerinde, düşük havalandırmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

VHb ekspresyonları ile (TS3 ve TS4 suşlarında), kontrol suşuna göre, MH içeren ortamlarda, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda, etanol miktarlarında (% w/v, % v/v) ve her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol (ETOH/OD) değerlerinde TS4 suşu ile daha fazla olmak üzere, LBGF besi ortamı ile aynı koşullarda elde edilenden daha fazla artışlar sağlandı.

### 4.3. Peynir Altı Tozu ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (PAST) Etanol Üretimleri

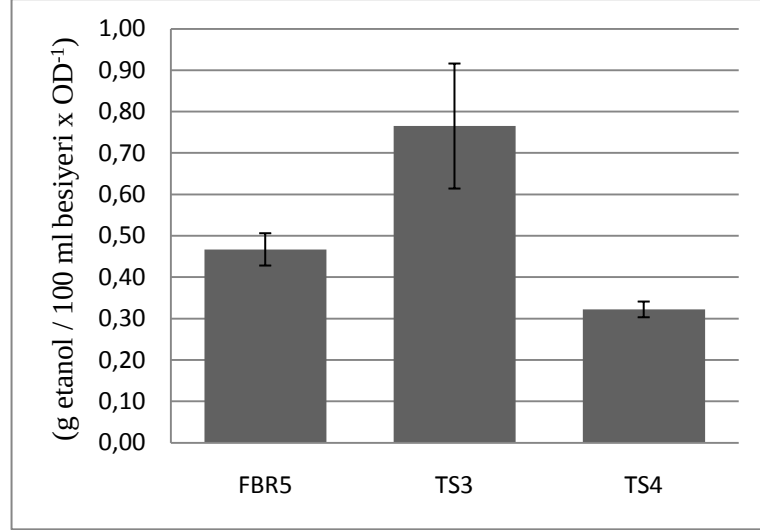
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde, % 5.5 (w/v) laktoz içeren peynir altı suyunun tozu kullanılarak hazırlanmış LB besiyeri (PAST, pH 7.0) ile düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAST besiyerlerinde, düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS3 suşunda belirlendi. Etanol

üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 360 ( $p = 0.01$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS4 suşu ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 40 ( $p = 0.02$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol / 100 ml besiyeri  $\times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 64 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.7). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 119 nmol/g ( $p = 0.05$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.9). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH             | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Lak<br>(% w/v) | Glu<br>(% w/v) | Gal<br>(% w/v) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FBR5   | 6.35<br>(0.29) | 1.83<br>(0.53) | 0.85<br>(0.17)     | 1.08<br>(0.23)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS3    | 6.38<br>(0.04) | 5.14<br>(1.88) | 3.93<br>(0.64)     | 4.99<br>(0.81)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS4    | 6.24<br>(0.08) | 3.70<br>(0.42) | 1.19<br>(0.20)     | 1.51<br>(0.25)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |

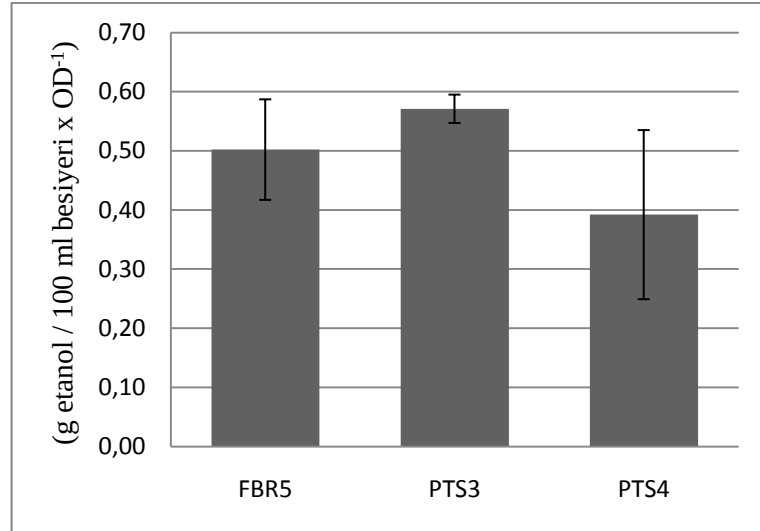


Şekil 4.7: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, PAST ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

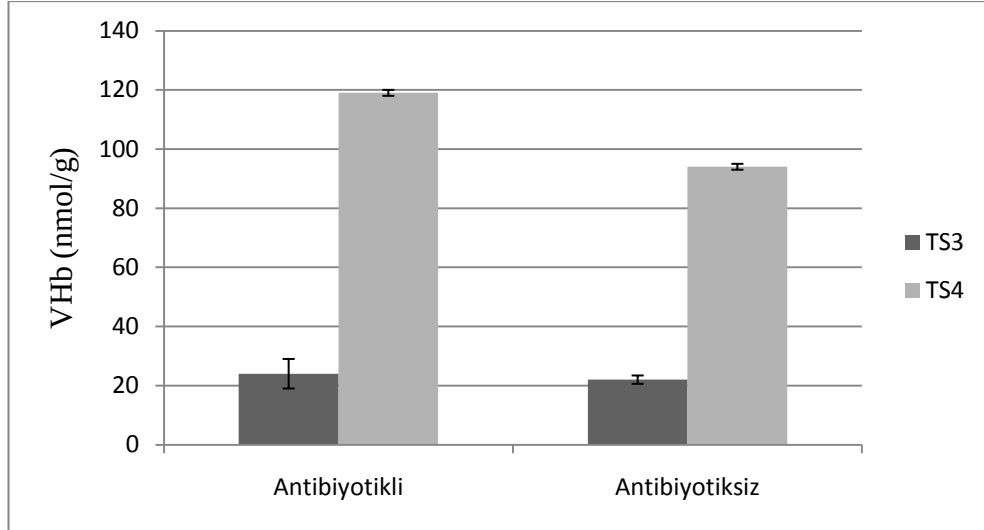
Antibiyotik içermeyen, PAST besiyerinde düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS3 suşunda ( $p = 0.05$ ) belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 180 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS4 suşu ile ise etanol üretiminin (% w/v; % v/v) FBR5 suşu ile elde edilenden % 17 ( $p = 0.01$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 14 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.8). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 94 nmol/g ( $p = 0.02$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.9). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH             | OD<br>(600nm)  | EtOH<br>(g/100ml) | EtOH<br>(% v/v) | Lak<br>(% w/v) | Glu<br>(% w/v) | Gal<br>(% w/v) |
|--------|----------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FBR5   | 6.24<br>(0.20) | 1.95<br>(0.57) | 0.97<br>(0.08)    | 1.24<br>(0.10)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS3    | 6.35<br>(0.14) | 4.80<br>(0.57) | 2.74<br>(0.26)    | 3.48<br>(0.33)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS4    | 6.22<br>(0.04) | 2.92<br>(0.46) | 1.14<br>(0.03)    | 1.45<br>(0.04)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |



Şekil 4.8: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, PAST ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.9: PAST besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.4. Laktoz İçeren LB (LBL) Ortamlarındaki Etanol Üretimleri

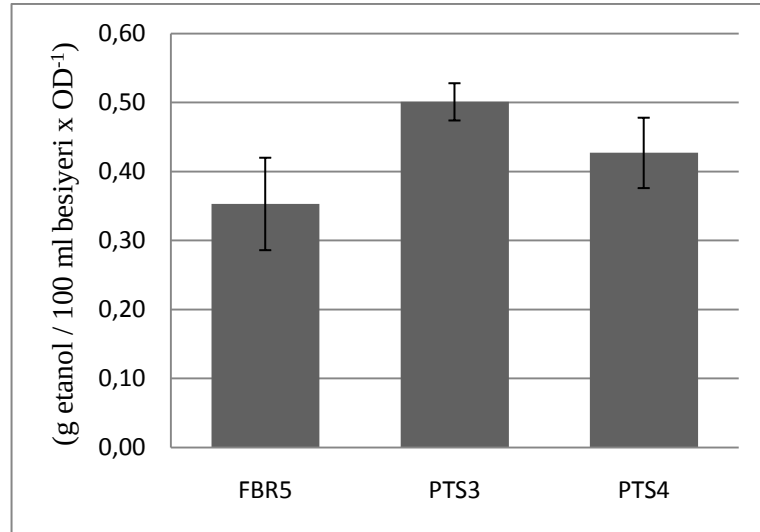
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v), 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 5.5 (w/v) laktoz içeren LBL besiyeri (pH 7.0) ile düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren ve içermeyen koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LBL besiyerlerinde, düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için,  $OD_{600nm}$ 'de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer FBR5 suşunda belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 40 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. TS4 suşu ile ise etanol üretiminin FBR5 suşu ile elde edilenden % 17 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 42 ( $p = 0.06$ ) daha fazla olduğu ve TS4 suşu ile % 21 ( $p = 0.02$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.10). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 724

nmol/g ( $p = 0.03$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.12). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren LB besiyerinde (LBL) 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH             | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100ml) | EtOH<br>(% v/v) | Lak<br>(% w/v) | Glu<br>(% w/v) | Gal<br>(% w/v) |
|--------|----------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FBR5   | 6.11<br>(0.12) | 2.30<br>(0.00) | 0.81<br>(0.15)    | 1.03<br>(0.20)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS3    | 6.26<br>(0.16) | 2.28<br>(0.11) | 1.14<br>(0.11)    | 1.45<br>(0.15)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS4    | 6.35<br>(0.24) | 2.23<br>(0.21) | 0.95<br>(0.18)    | 1.21<br>(0.23)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |



Şekil 4.10: Düşük havalandırmalı ve antibiyotikli koşullarda, LBL ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

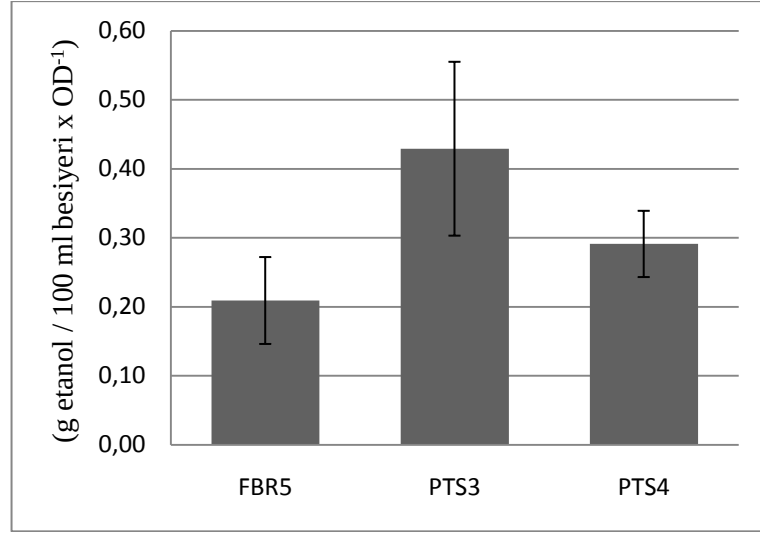
Antibiyotik içermeyen, LBL besiyerinde düşük havalandırma koşullarında büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma

FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için, OD 600nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değere TS4 suşunda ( $p = 0.01$ ) belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarı TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 100 ( $p = 0.04$ ) daha fazla ve TS4 suşu ile ise FBR5 suşu ile elde edilenden % 39 ( $p = 0.03$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $\text{g etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times \text{OD}^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 105 ( $p = 0.06$ ) ve TS4 suşu ile % 39 ( $p = 0.05$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.11). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 811 nmol/g ( $p = 0.01$ ) olduğu görüldü (Şekil 4.12). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.8).

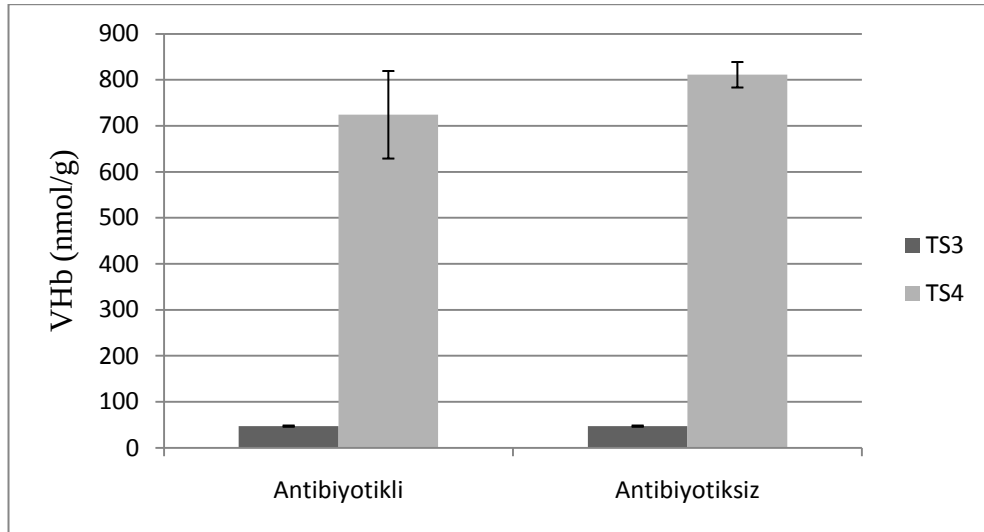
Tablo 4.8: Düşük havalandırmalı ve antibiyotiksiz koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren LBL besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH             | OD<br>(600nm)  | EtOH<br>(g/100ml) | EtOH<br>(% v/v) | Lak<br>(% w/v) | Glu<br>(% w/v) | Gal<br>(% w/v) |
|--------|----------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FBR5   | 5.96<br>(0.27) | 2.48<br>(0.04) | 0.51<br>(0.16)    | 0.66<br>(0.21)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS3    | 6.01<br>(0.37) | 2.43<br>(0.13) | 1.04<br>(0.25)    | 1.32<br>(0.33)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS4    | 6.15<br>(0.07) | 2.89<br>(0.01) | 0.84<br>(0.21)    | 1.01<br>(0.18)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |

VHb ekspresyonu, LBL besiyerinde, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda en fazla TS4 suşunda belirlenirken, TS3 suşunda benzer olarak 47 nmol/g ( $p = 0.01$ ) olarak belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: Düşük havalandırmalı ve antibiyotiksiz koşullarda, LBL ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.12: LBL besiyerinde, düşük havalandırmalı, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

VHB ekspresyonlarının (TS3 ve TS4 suşlarında), PAST içeren ortamlarda, antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda, LBL besiyeri içeren ortamlarda elde edilen değerlere göre daha düşük olduğu belirlendi. Etanol miktarlarındaki artışların TS3 ve TS4 suşlarında (% w/v, % v/v) PAST içeren besiyerinde her iki koşulda da (antibiyotikli ve antibiyotiksiz) LBL besiyeri içeren ortamdan daha fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşu ile her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol

(ETOH/OD) değerlerinin LBL besiyeri ile aynı koşullarda elde edilenden daha fazla artışlar sağlandığı tespit edildi. PAST besiyeri içeren antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda, TS4 suşu ise her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol (ETOH/OD) değerlerinde, kontrol suşuna göre herhangi bir artış görülmezken, LBL besiyeri ile aynı koşullarda FBR5 suşuna göre daha fazla artışlar sağlandı.

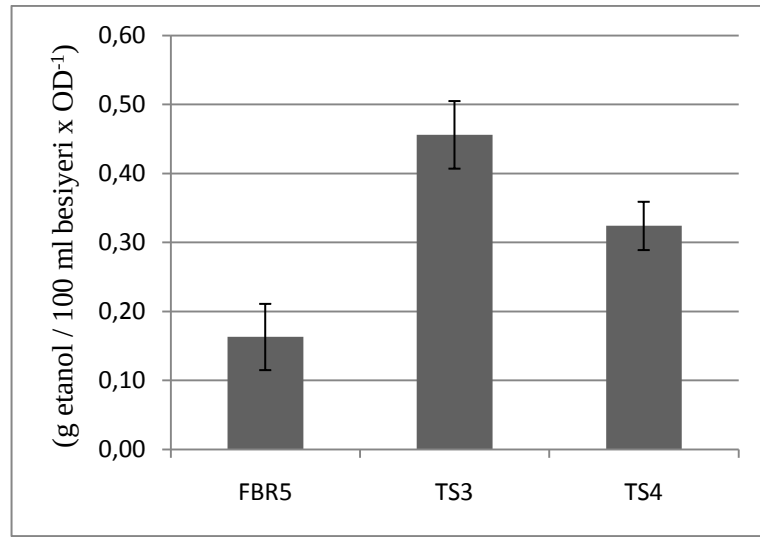
#### **4.5. İmmobilize Hücreler ile Şeker Pancarı (Melas) Hidrolizatı ile Hazırlanan Besiyerlerindeki (MH) Etanol Üretimleri**

İmmobilize edilen 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 şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde, % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren melas hidrolizatı kullanılarak hazırlanmış LB besiyerinde (MH, pH 7.0) düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

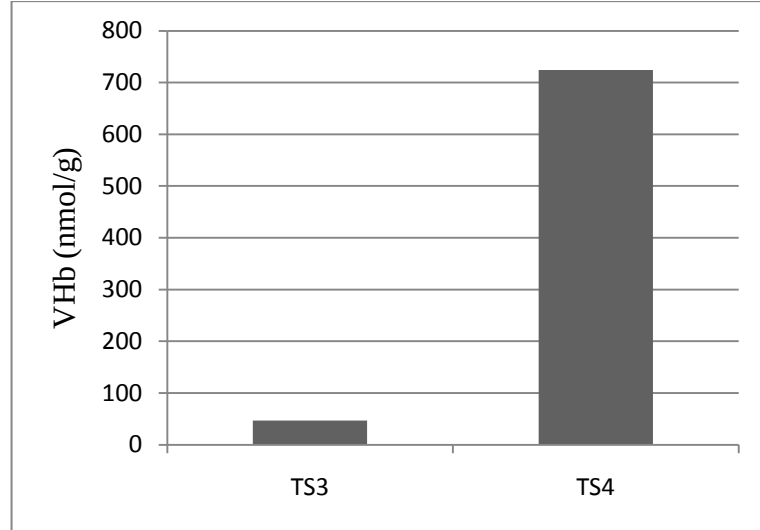
Uygun antibiyotikleri içeren MH besiyerlerinde düşük havalandırma koşullarında, immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için,  $OD_{600nm}$ 'de yapılan ölçüm sonuçlarında, en yüksek değer TS4 suşunda ( $p = 0.04$ ) belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarının, TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 119 ( $p = 0.01$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Etanol üretiminin (% w/v; % v/v) TS4 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 111 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 159 ( $p = 0.00$ ) daha fazla olduğu ve TS4 suşu ile % 98 ( $p = 0.02$ ) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.13). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 872 nmol/g olduğu görüldü (Şekil 4.14). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren MH besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (glukoz ve fruktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH          | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Glukoz<br>(% w/v) | Fruktoz<br>(% w/v) |
|--------|-------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| FBR5   | 6.68 (0.02) | 5.46 (0.92)    | 0.89 (0.05)        | 1.13 (0.07)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS3    | 6.71 (0.01) | 4.30 (1.74)    | 1.95 (0.03)        | 2.48 (0.01)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |
| TS4    | 6.72 (0.03) | 5.82 (0.12)    | 1.88 (0.22)        | 2.39 (0.28)     | 0.00 (0.00)       | 0.00 (0.00)        |



Şekil 4.13: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.14: MH besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli koşullarda immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık).

#### 4.6. İmmobilize Hücreler ile Peynir Altı Tozu ile Hazırlanan Besiyerindeki (PAST) Etanol Üretimleri

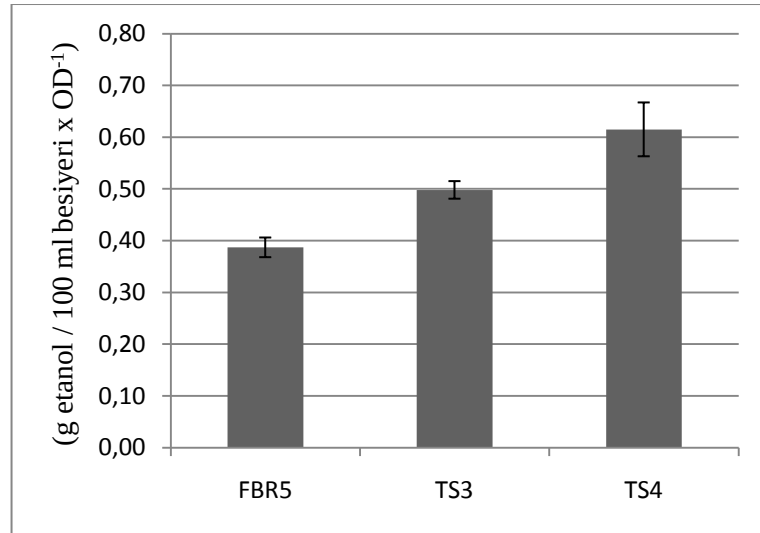
İmmobilize edilen FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde, % 5.5 (w/v) laktoz içeren peynir altı suyunun tozu kullanılarak hazırlanmış LB besiyeri (PAST, pH 7.0) düşük havalandırma koşullarında, uygun antibiyotik içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAST besiyerlerinde düşük havalandırma koşullarında, immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saat sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda görüldü. Toplam hücre sayımları için,  $OD_{600nm}$ 'de yapılan ölçüm sonuçlarında en yüksek değer TS3 suşunda belirlendi. Etanol üretimleri açısından (% w/v; % v/v) en fazla etanol üretim miktarı, TS3 suşu ile FBR5 suşu ile elde edilenden % 26 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Etanol üretiminin TS4 suşu ile ise FBR5 suşu ile elde edilenden % 23 ( $p = 0.04$ ) daha fazla olduğu tespit edildi. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} / 100 \text{ ml besiyeri} \times OD^{-1}$ ) yine FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 59 ( $p = 0.03$ ) ve TS3 suşu ile ise % 28 ( $p = 0.01$ ) daha fazla olduğu belirlendi.

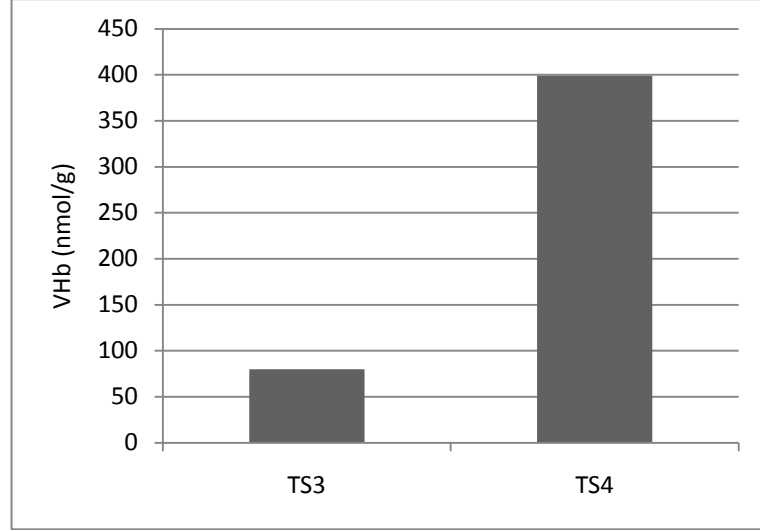
(Şekil 4.15). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşunda 399 nmol/g olduğu görüldü (Şekil 4.16). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 5.5 (w/v) laktoz içeren PAST besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan şeker (laktoz, glukoz ve galaktoz) miktarları (% w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

| Suşlar | pH             | OD<br>(600 nm) | EtOH<br>(g/100 ml) | EtOH<br>(% v/v) | Lak<br>(% w/v) | Glu<br>(% w/v) | Gal<br>(% w/v) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FBR5   | 6.28<br>(0.02) | 5.53<br>(0.04) | 2.13<br>(0.22)     | 2.81<br>(0.14)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS3    | 6.42<br>(0.03) | 5.61<br>(0.33) | 2.79<br>(0.01)     | 3.54<br>(0.01)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |
| TS4    | 6.62<br>(0.02) | 4.46<br>(0.14) | 2.74<br>(0.21)     | 3.47<br>(0.27)  | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) | 0.00<br>(0.00) |



Şekil 4.15: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotikli koşullarda, MH ile hazırlanan besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol / 100 ml besiyeri x OD<sup>-1</sup>). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.16: PAST besiyerinde, düşük havalandırılmalı, antibiyotikli koşullarda immobilize hücreler ile büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık).

#### 4.7. Rekombinant Hücrelerdeki Plazmid Kararlılığı

Antibiyotiksiz koşullarda büyütülen kültürlerin, 48 saat sonundaki plazmid kararlılığının belirlenmesi 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 koşullardaki plazmid kararlılığı (%) belirlendi (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Düşük havalandırılmalı ve antibiyotiksiz koşullarda TS3 ve TS4 suşlarının farklı besiyerlerindeki plazmid kararlılığı

| Besiyeri | Suşlar | Plazmid Kararlılığı (%) |
|----------|--------|-------------------------|
| MH       | TS3    | % 48                    |
|          | TS4    | % 100                   |
| LBGF     | TS3    | % 64                    |
|          | TS4    | % 100                   |
| PAST     | TS3    | % 41                    |
|          | TS4    | % 73                    |
| LBL      | TS3    | % 56                    |
|          | TS4    | % 94                    |

## 5. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Bu tez kapsamında, *E. coli* suşlarını [NZNIII ve FBR5] ve bu suşlardan *pdh*, *adh* ve *vgb* içerecek şekilde geliştirilen TS3 ve TS4 suşlarının düşük oksijen koşullarında, şeker pancarı işleme suyu (melas) hidrolizatı (MH) ve peynir altı tozu (PAST) ile hazırlanan, antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerinde, biyoetanol üretim özellikleri ve etanol üretiminde immobilize hücrelerin kullanımı incelendi.

Gıda işleme sanayisinde, şeker pancarı atık suyu (melas) ve peynir altı suyu potansiyel birer çevre kirleticileridir. Melas ve peynir altı suyu fermente edilebilir şekerlerden sırasıyla % 50 sukroz ve % 5-6 laktoz içermektedir. Peynir altı suyunun konsantre halindeki peynir altı tozu % 75-78 oranında laktoz içermektedir [Meral ve Kanberoğlu, 2012], [Kargi and Ozmihci, 2006].  $\beta$ -galaktosidaz enzimi, laktozun glukoz ve galaktoz olan iki monosakkarite hidroliz eder.  $\beta$ -galaktosidaz enzimi *E. coli* ve pek çok mikroorganizmada yaygın olarak bulunmaktadır [Panesar et al., 2006]. Bundan dolayı, fermentasyon ortamında *E. coli* hücreleri, sukroz monomerlerini ve laktozu fermente edebilmektedir. Buna dayanarak, bu tez çalışmasında, *E. coli*'nin fizyolojisi, biyokimyası, moleküler biyolojisi ve VHB konusundaki pratik uygulamalarına yönelik umut verici konular elde edildiği için, VHB ekspresyonu yapan *vgb* ile transforme edilmiş *E. coli* FBR5 suşları (TS3 ve TS4) kullanılmıştır.

MH besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en fazla etanol üretiminin antibiyotik içeren ortamlarda TS4 suşu (1.65 g/100ml) ile FBR5 suşuna göre % 88 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin ise, antibiyotik içermeyen ortamlarda FBR5 suşuna göre TS4 suşu ile % 155 daha fazla olduğu belirlenmiştir. LBGF besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en fazla etanol üretiminin antibiyotik içermeyen ortamlarda TS4 suşu (1.36 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 58 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin, antibiyotik içeren ortamlarda FBR5 suşuna göre TS4 suşu ile % 64 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

PAST besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en fazla etanol üretiminin antibiyotik içeren ortamlarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 360 daha fazla (4.99 g/100 ml) olduğu belirlenmiştir. Her ünite

hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin, antibiyotik içeren ortamlarda FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 64 daha fazla olduğu belirlenmiştir. LBL besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, etanol üretiminin en fazla antibiyotik içermeyen ortamlarda FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 100 daha fazla (1.32 g/100 ml) olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimleri bakımından, antibiyotik içermeyen ortamlarda FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 105 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, en fazla etanol üretimi, antibiyotik içeren MH besiyerinde, TS4 suşu ile FBR5 suşuna göre % 88 daha fazla ve antibiyotik içeren PAST besiyerinde, FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 360 daha fazla olarak belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına düşen etanol üretimi için en yüksek değer, FBR5 suşuna göre TS4 suşu ile antibiyotik içermeyen MH besiyerinde % 155 daha fazla ve TS3 suşu ile ise antibiyotik içermeyen LBL besiyerinde % 105 daha fazla olarak belirlenmiştir.

Konsantre haldeki peynir altı tozunun laktoz içeriği, uzun süre stabil olması, ulaşım ve depolanmasının kolay olması, belirli konsantrasyonlarda kullanılması gibi avantajları ile peynir altı suyuna alternatif olarak düşünülmektedir [Guimaraes et al.,2010]. Bu tez çalışmasında kullanılan *E. coli* suşları ile PAST besiyeri disakkarit formda bulunan laktoz şekerinin aktif ve hızlı bir şekilde kullanabilmesi için, peynir altı atık suyunun laktoz içeriğine yakın olarak % 5.5 laktoz [w/v] içerecek şekilde kullanılmıştır. Bunun sebebi, % 10 (w/v) ve daha yoğun laktoz içeren ortamlarda, yüksek osmotik basınçtan kaynaklanan bir lag fazı sebep olabileceğinin gösterilmesi olabilir [Kargi and Ozmihci, 2006].

Bu çalışmada, melas ile hazırlanan besi ortamına amonyum fosfat ilave edilerek, fosfat eksikliğinin giderilmesi ve buna bağlı olarak hücre yoğunluğunun artırılması amaçlanmıştır. Başka yapılan bir çalışmada, şeker pancarı işleme suyu (melas) ortamındaki nitrojen ve fosfat eksikliğinden dolayı, fermentasyon ortamına amonyum dihidrojen fosfat ve amonyum sülfat eklenmesiyle daha iyi hücre üremesi gözlemlenmiştir [Schneider, 1971]. Ergun ve Mutlu (2000) yaptıkları diğer bir çalışmada, melas ile hazırlanan besi ortamına 0.72 gL<sup>-1</sup> amonyum dihidrojen fosfat ilave edilmesiyle, etanol veriminin önemli ölçüde artırdığını raporlamışlardır. Silva ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir diğer çalışmada ise, LB ile zenginleştirilmiş melas ve peynir altı suyu gibi farklı ortamlara % 1 tiamin ilavesinin etanol üretimi üzerine etkili olabileceğini bildirilmiştir. Buna bağlı olarak bu tez çalışmasında da,

etanol üretiminin artırılması amacıyla MH ve PAST besiyerlerine % 1 tiamin eklenerek fermentasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, VHb ekspresyonun düşük havalandırma koşullarında, MH (glukoz; % 1.2, w/v ve fruktoz; % 1.2, w/v), PAST (laktoz; % 5.5, w/v), LBGF (glukoz; % 1.2, w/v ve fruktoz; % 1.2, w/) veya LBL (laktoz; % 5.5, w/v) içeren besiyerlerinde, hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin artmasına neden olduğu görülmüştür.

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları kullanılmış ve düşük havalandırma koşullarında (125 ml'lik erlenler içerisinde 100 ml besiyeri olacak şekilde) % 8 (w/v) glukoz, % 8 (w/v) ksiloz, % 8 (w/v) arabinoz ve % 20 mısır hidrolizati içeren LB besiyerlerinde antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda, etanol üretimleri ve VHb seviyeleri incelenmiştir. VHb ekspresyonu yapan TS3 suşunun glukoz, ksiloz ve mısır hidrolizati içeren kültür ortamlarında FBR5 suşuna göre daha fazla etanol üretildiği belirtilmiştir. Arabinoz içeren ortamda ise FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile etanol üretiminde herhangi bir artış olmadığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, düşük havalandırma koşullarında, TS3 suşu ile etanol üretimindeki en yüksek artışı ksiloz ve glukoz içeren antibiyotiksiz LB ortamlarında sırasıyla % 119 ve % 30 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada yine düşük havalandırma koşullarında ve antibiyotiksiz olarak hazırlanan % 20 mısır hidrolizati içeren besi ortamında, etanol üretiminin TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 59 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında, 2 litrelik fermentör denemelerinde, TS3 suşu ile FBR5 suşundan, glukoz ve ksiloz içeren ortamlarda sırasıyla % 10 ve % 15 oranlarında etanol üretimini arttığı bulunmuştur. İlgili başka bir çalışmada ise, Arnaldos ve arkadaşları (2012) % 8 ksiloz (v/v) içeren ortama farklı konsantrasyonlarda LB ilave ederek, etanol üretimini incelemişlerdir. Tüm ortam şartlarında, TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre daha fazla miktarda etanol üretildiği ve en iyi etanol üretiminin ise 0.5X LB konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında ise, 2X LB ile farklı oranlarda mısır hidrolizati (% 20, 40 ve 80) ile yaptıkları çalışmada, en fazla etanol üretimin TS3 suşu ile % 40 mısır hidrolizati içeren 2X LB ortamında olduğu belirlenmiştir.

Abanoz ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları bir çalışmada ise, patates işleme atık suyu hidrolizati içeren LB ortamında düşük havalandırma koşullarında, VHb ekspresyonu ile etanol üretiminin TS3 suşu ile % 5 ve TS4 suşu ile % 18 daha fazla olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında da, yukarıda söz edilen çalışmalardaki

verilere uygun bir şekilde % 1.2 (w/v) glukoz ve % 1.2 (w/v) fruktoz içeren MH ve LBGF besiyerlerinde etanol üretimleri açısından genel olarak TS4 suşu ile daha fazla olacak şekilde TS3 suşu ile benzer oranda artış olduğu görülürken, en fazla etanol üretim artışı TS4 suşu ile saptanmıştır.

Etanol üretimine benzer olarak her ünite hücre başına etanol üretiminde, PAST ve LBL besiyerlerinde hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz ortamlarda TS3 suşu ile artışlar sağlanırken, MH ve LBGF besiyerlerinde TS4 suşu ile daha fazla artışlar belirlenmiştir. % 5.5 (w/v) laktöz PAST ve LBL besiyerlerinde, etanol üretim artışı en fazla TS3 suşu ile elde edilmiştir. Ancak PAST besiyerinde antibiyotikli ortamda elde edilen etanol üretim artış miktarları, antibiyotiksiz ortamda elde edilen değerlerden yüksek iken, LBL besiyerlerinde antibiyotiksiz ortamlarda daha fazla etanol üretim artışları olduğu saptanmıştır. Etanol üretiminin VHB ekspresyonu ile TS3 veya TS4 suşu ile artışlarındaki farklılıkların, farklı besiyerlerindeki besiyeri bileşimlerinde bulunan çeşitli besleyici unsurlardan ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Silva ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada, *Zymomonas mobilis*'in piruvat dekarboksilaz (*pdc*) ve alkol dehidrogenaz II (*adhB*) genleri *E. coli* hücresinin kendi kromozomuna entegre edilerek, *E. coli* KOII suşu elde edilmiştir. Bu rekombinat suş ile farklı sukroz konsantrasyonlarında etanol üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, en iyi etanol üretimini  $17 \text{ gL}^{-1}$  olarak, % 8 sukroz (v/v) içeren LB besiyerinde ile 48 saat süre sonunda olduğu ancak % 12 sukroz (v/v) içeren LB besiyerinde etanol üretiminin azaldığını bildirmişlerdir. Bundan dolayı, fermentasyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun önemli bir faktör olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise antibiyotik içeren MH besiyerinde daha az oranda sukroz monomerleri (glukoz; % 1.2, w/v ve fruktoz; % 1.2, w/v) içermesine rağmen, TS4 suşu ile  $16.45 \text{ gL}^{-1}$  etanol üretildiği bulunmuştur. Bu kapsamda melas ile hazırlanan besi ortamlarında şeker yoğunluğunun belli bir oranda arttırılması ile etanol üretiminde artış gözlemlenebilir.

Lignoselülozik biyokütleler gibi şeker ihtiva eden biyokütlelerin hidroliz işlemlerinde asit ile ön işlem uygulandığında, furfural (2-furaldehid) ve 5-hidroksi metil furfural (HMF) oluşmaktadır. Bu furonik bileşikler, hem maya hem de bakteri türlerinde üreme hızını azaltır ve buna bağlı olarak etanol verimini düşürür. Eter ekstraksiyonu, alkalik ile çöktürme veya lakkazlar gibi enzimatik olarak toksik maddelerin giderim işlemleri (overliming) uygulanmaktadır. Arnaldos ve

arkadaşlarının (2012) yaptıkları bir çalışmada,  $\text{Ca(OH)}_2$  ile toksik maddelerin giderim işlemine ek olarak, mısır hidrolizatına belirli oranlarda aktif karbon ilave ederek, bazı toksik maddelerin ortamdan kaldırdığı bulunmuştur. Araştırmacılar, aktif karbon muamelesiyle furan miktarının azaldığı, fakat bununla birlikte toplam şeker miktarında  $54 \text{ gL}^{-1}$ 'den  $46 \text{ gL}^{-1}$ 'ye azaldığını belirtmişlerdir. Buna dayanarak, bu tez çalışmasında, melas hidrolizatının şeker miktarının kaybını engellemek için toksik maddelerin giderim işlemi uygulanmamıştır.

Tez çalışmasında beklendiği gibi, düşük havalandırma koşullarında genel olarak TS3 suşlarındaki VHb ekspresyonu seviyeleri TS4 suşlarından daha düşük bulunmuştur. pTS3 plazmidi, pTS4 plazmidinden daha düşük kopya sayısına sahip olduğundan, VHb ekspresyonları arasındaki bu farkın nedeninin gen doz etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan denemelerde antibiyotiksiz ve düşük havalandırma koşulları ile MH besiyerinde, 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşunun plazmid kararlılığı % 48 oranında olduğu, TS4 suşunun ise % 100 oranında olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiksiz ve düşük havalandırma koşulları ile LBGF besiyerinde, 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşunun plazmid kararlılığının % 64 oranında olduğu, TS4 suşunun ise % 100 oranında olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiksiz ve düşük havalandırma koşulları ile PAST besiyerinde, 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşunun plazmid kararlılığı % 41 oranında olduğu, TS4 suşunun ise % 73 oranında olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiksiz ve düşük havalandırma koşulları ile LBL besiyerinde, 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşunun plazmid kararlılığı % 56 oranında olduğu, TS4 suşunun ise % 94 oranında olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiksiz olarak hazırlanan PAST ve LBL besiyerlerindeki plazmid stabilitesinin düşük olması, besi ortamlarında var olan laktozun hidrolizinde hücrelerin kendi kaynaklarını kullanıyor olması ve plazmidin fazla kopya sayısına sahip olmasının hücreye ayrıca metabolik yük getirmesi ve buna bağlı olarak fermentasyon ortamında plazmid kararlılığının azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Plazmid kararlılığın düşük olmasına rağmen antibiyotiksiz ortamlarda üretilen etanol üretim miktarı antibiyotik içeren ortamlarda üretilen etanol üretim miktarlarına yakın olarak bulunmuştur. Bunun nedeni ise hücrelerin fermentasyon ortamında üremenin ilk 24 saat veya 36 saati sonunda plazmid kararlılığına sahip bir şekilde üreyerek etanol ürettikleri ancak 48 saat sonunda plazmidlerini kaybettiklerinden olabilir.

Önceki çalışmalarda, *E. coli*'de VHB ekspresyonunun düşük havalandırma koşullarında, etanol üretimini azalttığı belirlenmiştir [Tsai et al., 1996]. Başka bir çalışmada ise, % 20 mısır hidrolizatı içeren LB besiyerinde yüksek seviyede eksprese olan VHB ile etanol üretimi arasında ters bir orantı belirlenmiştir [Sanny et al., 2010]. Abanoz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, % 8 (w/v) glukoz içeren LB besiyerinde, TS3 suşu ile VHB'nin düşük seviyedeki ekspresyonunun hem etanol miktarını hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada da, MH ve LBGF besiyerlerinde, VHB'nin TS4 suşu ile yüksek seviyelerdeki ekspresyonu ile hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin arttığı belirlenmiştir. PAST ve LBL besiyerlerinde ise TS3 suşu ile hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin arttığı tespit edilmiştir. MH ve LBGF besiyerlerinde, etanol üretim miktarının VHB ekspresyonu yüksek olan TS4 suşu ile daha fazla artış sağlanması, belli bir VHB seviyesine kadar etanol üretiminin arttığı ve belli bir seviyeden sonra VHB'nin etanol üretimi üzerinde etkisinin azalabileceği yönünde olabilmektedir. Melas içeren ortamda, VHB seviyesinin yüksek olması ise melas hidrolizatının besleyici bileşenleri veya şeker içeriği ile ilişkili olabilir.

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 direk 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 kullanabileceğini 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 yabancı 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. VHB'nin NAD/NAD<sup>+</sup> 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 düşünölmektedir [Dikshit et al., 1992]. VHb ekspresyonun, *E. coli*'de, düşük havalandırma koşullarında 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, VHb ekspresyonun NAD<sup>+</sup>, NADH ve ATP seviyeleri ve etanol üretimi üzerindeki biyokimyasal etkilerin incelenmiştir. Fermentasyonun erken evrelerinde NAD<sup>+</sup>/NADH oranı TS3 suşu için FBR5 suşuna göre daha az iken, büyümenin geç evrelerinde bu oranının arttığı görölmüştür [Arnaldos et al., 2012]. Başka bir deyişle, düşük havalandırma koşullarında, 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 edilmesi sağlanabilmektedir.

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].

Bu tez çalışmasında immobilize hücreler ile antibiyotik içeren MH besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en fazla etanol üretiminin TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 119 daha fazla (1.95 g/100 ml) olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 179 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik

içeren PAST besiyerinde, düşük havalandırma koşullarında, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en fazla etanol üretiminin TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 26 daha fazla (2.8 g/100 ml) olduğu görülmüştür. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin, TS4 suşu ile FBR5 suşuna göre % 59 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada immobilize hücreler ile elde edilen sonuçlara göre, antibiyotik içeren MH besiyerinde etanol üretiminin serbest hücrelere göre, FBR5 suşunda % 2, TS3 suşunda % 43 ve TS4 suşunda ise % 14 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik içeren PAST besiyerinde etanol üretiminin serbest hücrelere göre, TS3 suşu ile bir artış gözlenmezken, FBR5 suşunda % 160 ve TS4 suşunda ise % 129 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Göksungur ve Zorlu (2001) yaptıkları bir çalışmada, şeker pancarı melasından Ca-aljinat ile tutuklanmış *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile etil alkol üretmişlerdir. % 10.90 (w/v) şeker içerecek şekilde hazırladıkları melastan, dolgulu yatak biyoreaktöründe % 4.65 (v/v) etanol verimi elde etmişlerdir. Sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktöründe ise % 3.94 (v/v) olarak, dolgulu yatak biyoreaktörüne göre daha düşük etil alkol üretimi gerçekleşmiştir. Bu tez çalışmasında, toplamda % 2.4 şeker içeren melas ortamında etanol üretiminin TS3 suşu ile % 2.48 (v/v) ve TS4 suşu ile % 2.39 (v/v) olduğu belirlenmiştir.

Guo ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada, *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile oluşturdukları ko-immobilize sistemde, peynir altı tozundan etanol üretimini incelemişlerdir. 100 gL<sup>-1</sup> peynir altı tozu kullandıkları çalışmada, serbest hücre halinde *K. marxianus* ile % 3.8 (v/v) etanol üretimi gerçekleşirken, *S. cerevisiae* ile ko-immobilizasyon uygulamasında etanol üretimi % 5.3 (v/v) olarak belirlenmiştir. Ozmihci ve Kargi (2008) yaptıkları bir çalışmada, hücrelerin bağlanması için zeytin çekirdeklerini kullanmışlardır. 50 gL<sup>-1</sup> peynir altı tozu kullandıkları çalışmada, dolgulu yatak biyoreaktöründe 19.5 gL<sup>-1</sup> etanol üretimi elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, kontrollü bir fermentasyon ortamı olan biyoreaktör kullanılmamasına rağmen benzer şekilde 73 gL<sup>-1</sup> peynir altı tozu kullanılarak, etanol üretiminin TS3 suşu ile 27.93 gL<sup>-1</sup> ve TS4 suşu ile ise 27.41 gL<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir. Bu da vgb ekspresyonu yapan bu rekombinant suşlar kullanılarak etanol üretiminin daha etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, FBR5, TS3 ve TS4 suşları % 2 sodyum aljinat ile süspanse edilerek, % 2 kalsiyum klorür çözeltisine mikropipet (1000µl) yardımıyla damlatılarak 3.5 – 4.0 mm çapında boncuklar elde edilmiştir. İmmobilize

hücrelerinin serbest hücrelere göre genel olarak, hücre yoğunluğunu ve etanol üretimini arttırmasından dolayı etanol üretiminde immobilize hücrelerin kullanılmasının avantajlı olabileceği belirlenmiştir. Ancak, fermentasyon süresince oluşturulan boncukların bozulduğu ve eridikleri görülmüştür. Bunun sebebi, etanol ve organik asit gibi üretilen metabolitlerin, kalsiyum aljinat jel yapısındaki kalsiyum iyonları ile yer değiştirmesi ve buna bağlı olarak jelin dayanıklılığını bozmasından kaynaklanmaktadır. Kalsiyum aljinat, hücrelerin immobilizasyonunda kolay ve uygulanabilir olmasına rağmen, etanol üretiminde immobilize hücrelerinin tekrar kullanılmasını olumsuz kılmıştır. Jelin dayanıklılığı temel olarak aljinat yapısındaki gluronik asit miktarına bağlıdır. Gluronik asit miktarının yoğun olması, asitler gibi jelin dayanıklılığını bozan bileşiklere karşı jelin stabilitesini korur. Yapılan daha önceki çalışmalarda, fermentasyon ortamına kalsiyum iyonu veya kalsiyum içeren bileşiklerin ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) ilave edilmesi ile kalsiyum aljinat yapısının korunması amaçlanmıştır. Fermentasyon ortamına ilave edilen bu bileşiklerin, kalsiyum aljinat yapısını koruduğu ancak hücre sızıntısının devam ettiği görülmüştür [Göksungur ve Güvenç, 2002]. Bu nedenle daha farklı konsantrasyonlarda kalsiyum aljinat kullanılarak immobilizasyon denemelerinin ve ayrıca bu bileşiklerin, hücre yoğunluğu ve metabolit oluşumu üzerine etkilerinin incelenmesi ile daha verimli sonuçlar elde edilebilir.

Bu tez çalışmasında kullanılan suşların hücre yoğunluğu  $\text{OD}_{600} < 0.5$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Immobilizasyonda hücre yoğunluğunun fazla olması, kalsiyum aljinat jel yapısından hücre kaçışına sebep olabilmektedir. Bundan dolayı daha önceki çalışmalarda, fermentasyon esnasında hücre kaçışını engelleyebilmek için immobilizasyonda kullanılacak olan hücre yoğunluğu  $\text{OD}_{600} < 0.5$  olacak şekilde dilüe edilmesi önerilmiştir [Unrean and Srienc, 2010].

İmmobilizasyon uygulamalarında aljinat kullanımının yanı sıra doğal destekleyici materyaller de uygulanmaktadır. Pirinç kabuğu [Martini et al., 2010], şarap endüstrisi kalıntıları, mısır koçanı [Genisheva et al., 2011], selülozik küspeler [Chen et al., 2011], lif kabağı süngeri [Ogbonna et al., 2001] gibi materyaller ile oluşturulan immobilizasyon denemelerinde etanol üretiminin yüksek olduğu belirtilmiştir. Destekleyici materyallerin besin maddeleri içermesinin, etanol üretimi üzerine olumlu etkisi olabileceği düşünülmektedir. Doğal materyallerin yanı sıra biyolojik olarak üretilen selüloz, immobilizasyon matriksi olarak kullanılabilir. Bakteriyel selülozun, fermentasyon ortamında bozulan

kalsiyum aljinat yapısını güçlendirmesi ve buna bağlı olarak boncukların tekrar kullanılabilirliği sağlanmıştır [Kirdponpattara and Phisalaphong, 2013]. Bu nedenle bu tez çalışmasında, kalsiyum aljiatın yanı sıra farklı biyolojik matrikslerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, VHb ekspresyonu yapan *E. coli* suşlarının (TS3 ve TS4) immobilize edilerek etanol üretiminin arttığı belirlenmiştir. İmmobilize sistemde kalsiyum aljinat yapısının destekleyici materyaller ile korunması ve oluşturulan boncukların tekrardan kullanılabilirliği sağlanarak, büyük ölçekli fermentörlerde aktif bir şekilde uygulanabilirliği araştırılmalıdır.

Hazırlanan tüm besiyerleri ile 48 saatlik inkübasyon sonunda, ortamdaki toplam şekerin tamamının tükendiği belirlenmiştir. Ayrıca, ortamdaki şekerlerin tamamının tükenmesi ve etanol üretiminin sanayide de uygulanabilir olması gerektiğinden, fermentasyon süresi olarak 48 saatin yeterli olduğu belirlenmiştir.

48 saatlik inkübasyon sonrası tüm besi ortamlarındaki pH değerlerinde azalmalar belirlenmiştir. Bu azalmalar, fermentasyon esnasında CO<sub>2</sub> üretiminden kaynaklanıyor olabilir. Genel olarak, pH değerlerindeki bu azalmalar, suşların üretildiği ortamların pH değerleri ile etanol üretimi arasında kararlı bir ilişki kurulamamıştır.

Bu tez çalışmasında, düşük havalandırma koşullarında, MH ve PAST besiyerlerinde, VHb ekspresyonu ile hem etanol üretiminin arttığı hem de her ünite hücre başına etanol üretiminin arttığı ve ortamdaki şekerlerin tamamının tükendiği belirlenmiştir. MH ve PAST besiyerlerinin içerdikleri şeker oranı ile LBGF ve LBL besiyerleri eşit oranda şeker içermelerine rağmen, şeker pancarı işleme suyu (melas) ve peynir altı tozunun bileşiminden dolayı, üremeyi, VHb ekspresyonunu ve böylece etanol üretim etkinliği arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

Farklı ve zengin içeriklere sahip olan peynir altı tozu ile şeker pancarı işleme suyunun (melas) belirli oranlarda karıştırılarak, etanol üretimi üzerine etkisi incelenebilir. Fakat, farklı şekerlerin bulunduğu fermentasyon ortamında metabolit üretimi üzerine katabolitik represyon etkili olabilmektedir.

Melas hidrolizatı içeren besiyeri (MH), düşük oranda şeker içermesine rağmen, % 2 (v/v) etanol üretimi ile potansiyel bir enerji kaynağıdır. Melas içeriğinde bulunan glukozun yanı sıra fruktozunda etanol üretimi üzerine olumlu etkisi olabilir. Bundan dolayı fruktoz içeren meyve suyu ve şarap endüstrisi

atıklarının VHB teknolojisi ile etanol üretimi üzerine incelenmesi, bu alanda ek bilgiler sağlayacaktır.

Etanol üretiminde peynir altı suyu kullanımı ekonomik açıdan uygun değildir. Distilasyon işleminin pahalı olması sebebi ile düşük laktoz içeren peynir altı suyu ile üretilen % 2-3 (v/v) etanol miktarının artırılması gerekmektedir [Guimaraes et al., 2010]. Bu tez çalışmasında, peynir altı tozundan (laktoz, % 5.5, w/v) TS3 suşu ile üretilen etanol miktarı % 4.99 (v/v)'dur. Besiyerine ilave edilen peynir altı tozunun artırılması ile dolayısıyla laktoz oranının % 8 (w/v)'e artırılması ile etanol üretiminde artış olabileceği düşünülmektedir. Ancak, artan şeker miktarının hücre üremesi üzerine engelleyici etkisinin de olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında denemeler, 1 litrelik erlenmayer kullanılarak, çalkalamalı bir inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, sıcaklık, pH gibi parametreler ile kontrollü bir fermentasyon ortamı sağlamadığından, kontrollü ortam şartlarında ve taze besiyeri ile yenilenen büyük ölçekli fermentörlerde, etanol üretim miktarlarının daha yüksek olabileceği düşünülmektedir.

VHB'nin üretildiği rekombinant organizmaların kullanımının artması nedeniyle, VHB'nin üremeyi ve üretkenliği etkilemesine yönelik çalışmalar giderek artan bir şekilde ilgi çekmektedir. Böylece yapılan bu tez çalışmasında elde edilen veriler, şeker pancarı işleme suyu (melas) ve peynir altı tozu ile *vgb/VHB* sisteminin sanayide biyoetanol üretiminde potansiyel olarak kullanılabileceğini ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Abanoz K., (2012), “*Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) ile patates işleme atık suyundan biyoetanol üretiminin artırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Abanoz K., Stark B. C., Akbas M. Y., (2012), “Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin”, Letters in Applied Microbiology, 55, 436-443.
- Anisha G. S., Prema P., (2008), “Cell immobilization technique for the enhanced production of  $\alpha$ -galactosidase by *Streptomyces griseolobus*”, Bioresource Technology, 99 (9), 3325–3330.
- Arıkan Y., Özsoy G., (2008), “A’dan Z’ye İklim Değişikliği Başucu Rehberi” Bölgesel Çevre Merkezi, ISBN: 978-975-6180-31-0.
- Arnaldos M., Kunkel S. A., Wang J., Krishna R. P., Stark B. C., (2012), “*Vitreoscilla* hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth Media”, Biomass and Bioenergy, 37, 1-8.
- Aytan E., (2009), “*Vitreoscilla* hemoglobin geninin *Erwinia herbicola*'ya klonlanması ve L-DOPA üretimi üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi.
- Balat M., (2010), “Security of energy supply in Turkey: Challenges and solutions”, Energy Conversion and Management, 51 (10), 1998–2011.
- Balat M., Balat H., Öz C., (2008), “Progress in bioethanol processing”, Progress in Energy and Combustion Science, 34 (5), 551-573.
- Bayrakçı A. G., (2009), “Değişik biyokütle kaynaklarından biyoetanolün elde edilmesi üzerine bir araştırma”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.
- Chen W., Yu H., Liu Y., Hai Y., Zhang M., Chen P., (2011), “Isolation and characterization of cellulose nanofibers from four plant cellulose fibers using a chemical-ultrasonic process”, Cellulose, 18 (2), 433-442.
- Chitnis C. E., Ohman D. E., (1990), “Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* algG, which controls alginate structure”, Journal of Bacteriology, 172 (6), 2894-2990.
- Çınar S., Yılmaz M., Fazlılar T. A., (2012), “Kirlilik yaratan sektörlerin ticareti ve çevre: gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler karşılaştırılması”, Doğu Üniversitesi Dergisi, 13 (2), 212-226.
- Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W., (2003), “Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status”, Applied Microbiology and Biotechnology, 63 (2), 258-266.

- Dien B. S, Nichols N. N, OBryan P. S, Bothast R. J., (2000), "Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocelulosic biomass", *Applied Biochemical Biotechnology*, 84, 181-196.
- Dikshit K. L., Webster D. A., (1988), "Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*", *Gene*, 70, 377-386.
- Dikshit R., Dikshit K. L., Liu Y., 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 (2), 241-245.
- Ergun M., Mutlu S. F., (2000), "Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*", *Bioresource Technology*, 73 (3), 251-255.
- Farres J., Kallio P. T., (2002), "Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin", *Biotechnology Progress*, 18, 229-233.
- Frey A. D, Kallio P. T., (2003), "Bacterial hemoglobins and flovohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology", *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (41), 525-545.
- Geckil H., Barak Z., Chipman D. M., Erenler S. O., Webster D. A., 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.
- Geckil H., Gencer S., (2004), "Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 691-697.
- Geckil H., Stark B. C., 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.
- Genisheva Z., Mussatto S. I., Oliveira J. M., Teixeira J. A., (2011), "Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production", *Industrial Crops and Products*, 34 (1), 979-985.
- Ghorbani F., Younesi H., Sari A. E., Najafpour G., (2011), "Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*", *Renewable Energy*, 36, 503-509.
- Göksungur, Y., Güvenç U., (2002), "Kalsiyum Aljinatta Hücre İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojideki Uygulamaları", *Gıda*, 27(6), 511-518.

- Göksungur Y., Zorlu N., (2001), "Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor", *Turk J Biol*, 25, 265-275.
- Grassi G (2000). Bioethanol: Industrial world perspectives. *Renewable energy world*, May-June.
- Guimaraes P. M. R., Teixeira J. A., Domingues L., (2010), "Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey", *Biotechnology Advances*, 28, 375–384.
- Guo X., Zhou J., Xiao D., (2010), "Improved Ethanol Production by Mixed Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese Whey Powder Solution Fermentation", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (2), 532-538.
- Hart R. A., Kallio P. T., Bailey J. E., (1994), "Effect of biosynthetic manipulation of heme on insolubility of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli*", *Applied Environmental Microbiology*, 60(7), 2431-2437.
- Ingram L. O, Conway T, Clark D. P, Sewell G. W, Preston J.F, (1987), "Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2420-2425.
- İçöz E., Tuğrul K. M., Saral A., İçöz E., (2009), "Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey", *Biomass and Bioenergy*, 33 (1), 1-7.
- Joshi M., Mande S., Dikshit K. L., (1998), "Hemoglobin biosynthesis in *Vitreoscilla stercoraria* DW: cloning, expression, and characterization of a new homolog of a bacterial globin gene", *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6), 2220-2228.
- Karaalp T., (2007), "Bakteriyel selüloz üretiminde farklı karbon kaynaklarının değerlendirilmesi", *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi*.
- Kargi F., Ozmihci S., (2006), "Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters, *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (5), 711-718.
- Khatiwada D., Silveira S., (2009), "Net energy balance of molasses based ethanol: The case of Nepal", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13 (9), 2515–2524.
- Khosla C., Bailey J. E., (1988), "Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth Properties of recombinant *Escherichia coli* strain", *Plasmid*, 24, 190-194
- Khosravi M., Webster D. A., Stark B. C., (1990), "Presence of the bacterial hemoglobin gene improves  $\alpha$ -amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain", *Plasmid*, 24, 190-194.

Kiley P. J., Reznikoff W. S., (1991), “fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen”, *Journal of Bacteriology*, 173, 16-22.

Kirdponpattara S., Phisalaphong M., (2013), “Bacterial cellulose–alginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production”, *Biochemical Engineering Journal*, 77, 103–109.

Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. A., (2004), “Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review”, *Food Microbiology*, 21 (4), 377–397.

Kroneck P. M. H., Jakob W., Webster D. A., DeMaio R., (1991), “Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*”, *Biolog of metals*, 4 (2), 119-225

Leite A. R., Guimaraes W. V., Araujo E. F., Silva D. O., (2000), “Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31 (3), 211-215.

Maritini E., Andriani D., Kang K. E., Kim Y., Sriramulu G., Park D., Kim J., (2010), “Bioconversion of rice hulls to ethanol with SAA pretreatment and immobilized cellulase in calcium alginate”, 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 8-55, Clearwater Beach, FL, USA, 19-22 April.

Meral R., Kanberoğlu G. S., (2012), “Tahıllardan etanol üretimi”, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (3), 61-68.

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.

Mohagheghi A., Ruth M., Schell D. J., (2006), “Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields”, *Process Biochemistry*, 41 (8), 1806–1811.

Mussatto S. I., Dragone G., Guimaraes P. M. R., Silva J. P. A., Carneiro L. M., Roberto I. C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J. A., (2010), “Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production”, *Biotechnology Advances*, 28 (6), 817-830.

Nasr M. A., Hwang K. W., Akbas M., Webster D. A., 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, 359-361.

Ogbonna J. C., Mashima H., Tanaka H., (2001), “Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor”, *Bioresource Technology*, 76 (1), 1–8.

Orii Y., Webster D. A., (1986), “Photodissociation of oxygenated cytochrome o(s) (*Vitreoscilla*) and kinetic studies of reassociation”, *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 3544-3547.

Ozmihci S., Kargi F., (2008), "Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times", *Biochemical Engineering Journal*, 42 (2), 180–185.

Öcal M., (2007), "Setan sayısı hakkında 6 soru", *Mühendis ve Makine*, 48, 24-25.

Özmihçi S., (2009), "Ethanol production from cheese whey powder solution by fermentation", Ph.D. Thesis, Dokuz Eylül University.

Panesar P. S., Panesar R., Singh R. S., Kennedy J. F., Kumar H., (2006), "Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*", 81 (4), 530–543.

Park K., Kim K., Howard A. J., Stark B. C., Webster D. A., (2002), "*Vitreoscilla* Hemoglobin Binds to Subunit I of Cytochrome *bo* Ubiquinol Oxidases", *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33334-33337.

Pauli T. K., Dong J. K., Philip S. T. James E. B., (1994), "Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions", *European Journal of Biochemistry*, 219, 201-208

Poitrat E., (1999), "The potential of liquid biofuels in France", *Renewable Energy*, 16 (1-4), 1084-1089.

Ren N., Wang A., Cao G., Gao L., (2009), "Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges", *Biotechnology Advances*, 27 (6), 1051-1060.

Roos V., Andersson C. I. J., Bülow L., (2004), "Gene expression profiling of *Escherichia coli* expressing double *Vitreoscilla* haemoglobin", *Journal of Biotechnology*, 114 (1-2), 107–120.

Ruohonen L., Aristidou A., Frey A. D., Penttilä M., 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 (1), 6-14.

Sanny T., (2009), "Increased ethanol production efficiency by genetic engineering of *Escherichia coli* to Express *Vitreoscilla* hemoglobin", Ph.D. Thesis, Illinois Institute of Technology.

Sanny T., Arnaldos M., Kunkel S. A., Pagilla K. R., Stark B. C., (2010), "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.

Schneider F., (1971), "Şekerin Teknolojisi" Ajans Türk Matbaacılık Sanayii, Ankara (Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş. Yayınları), Yayın no: 168.

Silva G. P., Araujo E. F., Silva D. O., Guimaraes W. V., (2005), "Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2", Brazilian Journal of Microbiology, 36, 395-404.

Song S., Park C., (1997), "Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator", Journal of Bacteriology, 179 (22), 7025-7032.

Song S. H., Choi S. S., Park K., Yoo Y. J., (2005), "Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification", Enzyme and Microbial Technology, 37 (6), 567-573.

Tan Y., Deng W., Chen C., Xie Q., Lei L., Li Y., Fang Z., Ma M., Chen J., Yao S., (2010), "Immobilization of enzymes at high load/activity by aqueous electrodeposition of enzyme-tethered chitosan for highly sensitive amperometric biosensing", Biosensors and Bioelectronics, 25 (12), 2644-2650.

Tomas-Pejo E., Oliva J. M., Ballesteros M., (2008), "Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review", Journal of Scientific & Industrial Research, 67, 874-884.

Tsai P. S., Hatzimanikatis V., Bailey J. E., (1996), "Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism, Biotechnology and Bioengineering", 49 (2), 139-150.

Unrean P., Srienc F., (2010), "Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains", Journal of Biotechnology, 150, 215-223.

Ürküt Z., (2007), "Kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Aureobasidium pullulans* P56 hücreleri ile pullulan üretiminin optimizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.

Wakabayashi S., Matsubara H., Webster D. A., (1986), "Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*", Nature, 322, 481-483.

Webster D. A., Liu C. Y., (1974), "Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cytochrome *o* Reductase Associated with Cytochrome *o* Purified from *Vitreoscilla*" *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 4257-4260.

Wei M. L., Webster D. A., Stark B. C., (1998), "Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: alterations in fermentation pathways", Biotechnology and Bioengineering, 59, 640-646.

Yan L., Lehe M., (2007), "Production of Indigo by Immobilization of *E. coli* BL21 (DE3) Cells in Calcium-Alginate Gel Capsules", Chin. J. Chem. Eng., 15(3), 387-390.

Yang J., Webster D. C., Stark B. C., (2005), “ArcA Works with Fnr as a positive regulator of *Vitreoscilla* (bacterial) hemoglobin gene expression in *Escherichia coli*, Microbiological Research, 160 (4), 405-415.

Yüksel I., (2008), “Energy utilization, renewables and climate change mitigation in Turkey”, Energy exploration and exploitation, 26 (1), 35-52.

Zhu H., Sun S., Zhang S., (2011), “Enhanced production of total flavones and exopolysaccharides via *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Phellinus igniarius*”, Bioresource Technology, 102 (2), 1747-1751.

Web 1, (2013), <http://www.eie.gov.tr/yenilenebilir/biyoetanol.aspx>, (Erişim Tarihi: 22/03/2013).

Web 2, (2012),  
[http://www.turkseker.gov.tr/FaaliyetRapor/Seker\\_Fabrikalari\\_Faaliyet\\_Raporu\\_2012.pdf](http://www.turkseker.gov.tr/FaaliyetRapor/Seker_Fabrikalari_Faaliyet_Raporu_2012.pdf), (Erişim Tarihi: 13/12/2012).

Web 3, (2013), <http://www.maybi.com.tr/pst-urun-tanitim.pdf>, (Erişim Tarihi: 15/04/2013).

## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul’da doğdu. 2006 yılında Kadıköy Kazım İşmen Lisesi’nden okul ikincisi olarak mezun oldu. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji opsiyonundan mezun oldu. 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde yüksek lisans eğitimine başladı.