T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ EKSPRESE EDEN E.COLI SUŞU İLE PEYNİR ALTI SUYU TOZUNDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

TANER ŞAR
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ EKSPRESE EDEN E.COLI SUŞU İLE PEYNİR ALTI SUYU TOZUNDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

TANER ŞAR
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2019

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

BIOETHANOL PRODUCTION FROM WHEY POWDER THROUGH E.COLI STRAIN EXPRESSING VITREOSCILLA HEMOGLOBIN

TANER ŞAR

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTORATE OF PHYLOSOPHY

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY and GENETIC

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2019

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/07/2019 tarih ve 2019/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/07/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tamer ŞAR'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI)	: Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ
ÜYE	: Prof. Dr. Güleda ENGİN
ÜYE	: Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN
ÜYE	: Doç. Dr. Funda Şentürk AKFIRAT
ÜYE	: Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi ..... Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu çalışmada, aljinat ile immobilize edilmiş Vitreoscilla hemoglobin eksprese eden (TS3) ve eksprese etmeyen (FBR5) E.coli suşları ile peynir altı suyu tozundan etanol üretimi incelenmiştir. Bu kapsamda, 6 farklı laktoz konsantrasyonu (%3-15, w/v) içerecek şekilde peynir altı tozu ve maya özütü (WP1-WP9) ile hazırlanan besiyerleri hem çalkalamalı inkübasyon hem de fermentör koşullarında 96 saat ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalkalamalı inkübatör koşullarında en yüksek etanol üretimi (%3.55, v/v) immobilize E.coli TS3 suşu ile 96 saat süre sonunda WP6 besi ortamında (%8 laktoz, w/v) elde edilmiştir. Fermentör koşullarında ise, 96 saat inkübasyon sonrası elde edilen en yüksek etanol üretiminin %3.93 (v/v) olduğu görülmüştür. İmmobilize kültürlerin tekrarlı kullanılabilirlikleri, WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyon ve 2 farklı saklama solüsyonunda (SS1, glukoz ve maya özütü; SS2, $CaCl_2$) uzun süre (60 gün) +4ºC sıcaklıkta depo edilmeleri sonrası yeniden kullanılmaları ile belirlenmiştir. Tekrarlı fermantasyonda, her iki immobilize suşun da etanol üretiminin ilk 6 tekrarlı fermantasyonda kararlı olduğu görülmüştür. Yedinci tekrarlı fermantasyon sonrası etanol üretiminin immobilize TS3 suşu ile %4.38 (v/v) oranında olduğu görülmüştür. On birinci tekrarlı fermantasyon sonrası, FBR5 suşu ile etanol üretiminin önemli oranda azaldığı belirlenirken, TS3 suşu ile etanol üretiminin kararlı olduğu tespit edilmiştir. 15 tekrarlı fermantasyon süresince, TS3 suşunun FBR5 suşuna göre etanol üretiminde avantajlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca iki saklama solüsyonda 15 ve 30 gün sürelerde depo edilen immobilize suşların 8 tekrarlı fermantasyonda başarılı olarak kullanılabildiği ve etanol üretebildikleri belirlenmiştir. Her iki suş ile hazırlanan immobilize boncukların farklı inokulum oranları (%5, 10, 20, 30) ile etanol üretimleri de incelenmiştir. En yüksek etanol üretiminin, WP6 besi ortamında %10 inokulum oranı ile inkübe edilen immobilize TS3 suşu ile 72 saat inkübasyon sonrası, %99 teorik alkol verimi ile %4.64 (v/v) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, peynir altı tozundan etanol üretiminde VHb teknolojisi ve immobilizasyonun bir arada kullanımının endüstride umut verici bir uygulama olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Peynir altı tozu, immobilizasyon, Vitreoscilla hemoglobini, etanol üretimi, E.coli.

SUMMARY

In this work, bioethanol production from whey powder through alginate immobilized E.coli strains either expressing (TS3) or not expressing (FBR5) Vitreoscilla hemoglobin (VHb) was investigated. For determining effective lactose concentration, prepared from whey powder, 6 different lactose concentrations (3-15%, w/v) were evaluated. For this, media (WP1-WP6) with different levels of whey powder and yeast extract (0.3% and 0.5%, w/v) were evaluated comparatively with 96 h fermentations in both shake flask and fermenter cultures. The WP6 medium (lactose 8%, w/v) yielded the highest ethanol production (3.55%, v/v) by immobilized E.coli strain TS3 after 96 hours incubation in shake cultures. However the highest produced ethanol was measured as 3.93% (v/v) in fermenter conditions after 96 hours of incubation. Reusibilities of immobilized strains were investigated with 15 repeated batch fermentations by fresh WP6 medium, and after long term storage (60 days) in two different solutions (SS1, glucose and yeast extract; SS2, $CaCl_2$) at 4°C. During the repeated batch fermentations, ethanol levels for both strains were consistent at the first 6 repeated batch fermentations. At the end of the 7th cycle of fermentation, ethanol production was increased up to 4.38% (v/v) by immobilized strain TS3. After the 11th repeated batch fermentations, ethanol production by strain FBR5 was sharply decreased, while ethanol production by strain TS3 was stable. During the all repeated fermentations, strain TS3 was maintained a substantial advantage for ethanol production over strain FBR5. Immobilized cells successfully produced ethanol after 60 days storage in both solutions. The stored immobilized strains (for 15 or 30 days) maintained their ethanol production abilities without distruption over the 8 successive repeated batch fermentations. The inoculum size of immobilized beads (5, 10, 20, 30%) were also investigated regarding bioethanol production of both strains. The highest level of ethanol (4.64% v/v, with 99% fermentation efficiency) was archieved by strain TS3 cultivated in WP6 medium (containing 8% lactose) with 10% inoculum level after 72 hours incubation. Overall, the combination of immobilization and VHb technology may be promising application for ethanol production from whey powder in industry.

Key Words: Whey Powder, Immobilization, Vitreoscilla Hemoglobin, Ethanol Production, E.coli.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, olumlu desteği ile yanımda olan ve deneyimleri ile farklı çalışmalara yön veren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Meltem Yeşilçimen AKBAŞ'a,

Doktora eğitimim süresince desteklerinden dolayı tez izleme jüri üyelerim Prof. Dr. Güleda ENGİN ve Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'a ve yine tez jürimde yer alan Dr. Öğretim Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI ve Doç. Dr. Funda Şentürk AKFIRAT'a

Bilimsel çalışmalarımıza desteklerinden dolayı Prof. Benjamin C. STARK'a,

Doktora eğitimi sırasında laboratuvarında çalışma olanağı sağlayan Prof. Mohammad J. TAHERZADEH'e, yardımlarından dolayı Dr. Jorge FERREIRA ve Resorce Recovery çalışma arkadaşlarıma,

Laboratuvar çalışmalarımda desteklerinden dolayı Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma,

Proje desteklerinden dolayı Gebze Teknik Üniversitesi ve TÜBİTAK kurumlarına,

Çalışmada kullanılan peynir altı tozunu temin eden Bahçıvan Gıda'ya,

Maddi ve manevi destek sağlayarak daima yanımda olan ailem Sevinç ŞAR ve Zihni ŞAR'a Teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP-2013-A02, BAP-2016-A13 ve BAP-2017-A102-19) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoetanol	3
2.1.1. Biyoetanol'ün Genel Özellikleri	3
2.1.2. Dünya'da ve Türkiye'de Biyoetanol Üretimi ve Kullanımı	4
2.1.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadde Kaynakları	7
2.2. Peynir Altı Suyu Tozu	8
2.3. İmmobilizasyon	11
2.4. *Vitreoscilla* Hemoglobini	14
2.4.1. *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Biyokimyası	14
2.4.2. *Vitreoscilla* Hemoglobini Teknolojisinin Biyoteknolojide Uygulamaları	16
2.4.3. *Vitreoscilla* Hemoglobini Exprese Eden *E.coli* Suşlarının Geliştirilmesi	17
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. Bakteri suşları	19
3.2. Fermantasyon Ortamlarının Hazırlanması	19
3.3. Stok Kültürlerin Pasajlanması	20
3.4. Ön Kültürlerin Hazırlanması	20
3.5. Hücre İmmobilizasyonu	21
3.6. Fermantasyon denemeleri	21

3.7. Analiz Yöntemleri 24
3.8. Verim Hesaplamaları 25
3.9. İstatiksel Analizler 26
4. BULGULAR 27
4.1. Çalkalamalı Kültürlerde Biyoetanol Üretiminde Peynir Altı Tozunun, İmmobilizasyonun ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi 27
4.1.1. Biyoetanol Üretiminde Peynir Altı Tozu Miktarının (Laktoz Konsantrasyonun) Etkisi 27
4.1.1.1.Biyoetanol Üretiminde Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında Maya Özütünün Etkisi 28
4.1.1.2. Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında Hazırlanan Peynir Altı Tozu İçeren Besiyerlerinde Laktoz Tüketimleri ve Etanol Fermantasyon Verimleri 28
4.1.1.3. Kültürlerin pH Değerleri 31
4.1.2. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun Etkisi 31
4.1.3. Biyoetanol Üretiminde *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi 34
4.1.4. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi 34
4.2. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun Kullanım Etkinliğinin İncelenmesi 35
4.2.1. İmmobilize Hücrelerin Biyoetanol Üretiminde Farklı Laktoz Konsantrasyonlarının Etkisi 35
4.2.2. İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Fermantasyonda Kullanımı 36
4.2.3. İmmobilize Hücrelerin Uzun Süreli Depo Edilmesi 39
4.3. Biyoetanol Üretiminde Hücrelerin Fermantasyon ve Biyokütle Dönüşüm Etkinliklerinin Karşılaştırılması 44
4.4. Fermentörde Biyoetanol Üretimi 46
4.5. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyon ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Birlikte Kullanım Etkinliğinin Arttrılması 48
4.5.1. İmmobilize Hücrelerin İnokulum Miktarının Etkisi 49
4.5.2. Farklı Laktoz Konsantrasyonlarının Etkisi 49
4.5.3. Biyoetanol Üretiminde Hücrelerin Fermantasyon ve Biyokütle Dönüşüm Etkinliklerinin Karşılaştırılması 50
5. TARTIŞMA 53

KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
°	:	Derece
µ	:	Mikron
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
α	:	Alfa
β	:	Beta
ABD	:	Amerika Bileşik Devletleri
C	:	Celcius
cm	:	Santimetre
cm/s	:	Birim saniyede santimetre
g	:	Gram
HCl	:	Hidroklorik asit
HNO_3	:	Nitrik asit
H_2SO_4	:	Sülfirik asit
H_3PO_4	:	Fosforik asit
K	:	Kelvin
kD	:	Kilodalton
kg	:	Kilogram
kJ	:	Kilojoule
kPa	:	Kilopaskal
L	:	Litre
M	:	Molarite
mL	:	Mililitre
MTBE	:	Metil Tersiyer Bütil Eter
nm	:	Nanometre
nmol	:	nanomol
OD	:	Optik yoğunluk
pH	:	Potansiyel Hidrojen
ppm	:	Miligram / Litre

rpm	:	Dakikada döngü sayısı
SS1	:	Glukoz ve maya özütü içeren saklama solüsyonu
SS2	:	$CaCl_2$ içeren saklama solüsyonu
UV	:	Ultraviyole
v/v	:	Hacim/Hacim
vgb	:	*Vitreoscilla* hemoglobin geni
VHb	:	*Vitreoscilla* hemoglobini
vvm	:	Dakikada birim hava akış hacmi
w/v	:	Ağırlık / Hacim
WP	:	Peynir altı tozu ile hazırlanan besiyerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Türkiye'nin 2013 yılına ait temel enerji talepleri.	5
2.2:	İmmobilizasyonda kullanılan teknikler a) katı bir yüzey üzerine adsorbsiyon; b) gözenekli bir matriks ile tutuklama; c) çapraz bağlama ile hücrelerin bir arada toplanması, d) mikroenkapsülasyon.	13
2.3:	Etanol üretiminin arttırılması için a) laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve piruvat format liyaz (*pfl*) genlerinin susturulması, b) ve c) etanol üretim genleri (*pdc* ve *adhb)* taşıyan pLOI297 plazmidinin oluşturulması, c) TS3 suşunun geliştirilmesinde kullanılan *vgb* taşıyan pKT230 (pTS3) plazmidi.	18
4.1:	Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8 ve D; %15) ve farklı konsantrasyonlarda maya özütü (%0.3 ve %0.5, w/v) içeren besiyerlerinde (WP1-WP6 ve WP9) biyoetanol üretimi.	29
4.2:	Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8, D; %15) hazırlanan (WP1-WP6, WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarları (EtOH (w/v) / OD).	33
4.3:	Serbest (a) ve immobilize (b) TS3 suşu ile farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8, D; %15) hazırlanan (WP1-WP6; WP9) besiyerlerinde 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyonlar sonundaki eksprese edilen VHb miktarları (nmol/g).	35
4.4:	İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı.	37
4.5:	SS1 (a) ve SS2 (b) solüsyonlarında farklı sürelerde depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik fermantasyon sonrası etanol üretim değerleri (% v/v).	40
4.6:	SS1 (a, 15 gün; c, 30 gün) ve SS2 (b, 15 gün; d, 30 gün) solüsyonlarında depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası etanol üretimi değerleri (% v/v).	42

4.7: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 (A) ve WP9 (B) ortamları ile biyoetanol üretimi ve birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarları (EtOH (w/v) / OD). 47

4.8: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranlarında (%5-30) 72 saat süre ile biyoetanol üretimi. 50

5.1: Farklı laktoz oranları ile elde edilen en iyi etanol üretimi ortam koşulu; WP6 besi ortamında %10 inokulum oranında immobilize TS3 suşu ile 72 saat süreli fermantasyon. 61

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
2.1:	Türkiye'deki biyoetanol üretim tesisleri.	6
2.2:	2014 yılında Türkiye'de biyoetanol üretimi için kullanılan ürünlerin miktarları (ton).	6
2.3:	Karbon kaynağı olarak peynir altı suyu ve tozunun çeşitli metabolitlerin üretiminde kullanımı.	11
2.4:	VHb'nin çeşitli kirleticilerin yıkımında kullanımı.	17
2.5:	VHb'nin çeşitli metabolitlerin üretiminde kullanımı.	17
3.1:	Biyoetanol üretiminin değerlendirilmesi için hazırlanan ve değerlendirilen fermantasyon besi ortamları.	20
4.1:	Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3, %5, %8 ve %15) hazırlanan (WP1-WP6 ve WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası kültürlerin laktoz tüketim verimi değerleri (%).	30
4.2:	Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (%3, %5, %8 ve %15) ile hazırlanan (WP1-WP6, WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası kültürlerin teorik alkol verim değerleri (%).	32
4.3:	İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim değerleri (%).	38
4.4:	İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşu ile VHb ekspresyon miktarları (nmol/g).	38
4.5:	SS1 ve SS2 solüsyonlarında 60 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik fermantasyon sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim değerleri (%).	41
4.6:	SS1 ve SS2 solüsyonlarında 60 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik	41

fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşunun VHb ekspresyon miktarları (nmol/g).

4.7: SS1 ve SS2 solüsyonlarında, 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim degerleri (%). 43

4.8: SS1 ve SS2 solüsyonlarında, 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşu ile VHb ekspresyon miktarları (nmol/g). 44

4.9: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamları ile 48, 72 ve 96 saatik fermantasyon sonrası kültürlerin laktoz tüketim verimleri (%). 47

4.10: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamları ile 48, 72 ve 96 saatik fermantasyon sonrası kültürlerin teorik alkol verimleri (%). 48

4.11: Serbest ve immobilize *E.coli* TS3 suşu ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamlarında 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyon sonrası eksprese edilen VHb miktarları (nmol/g). 48

4.12: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15)) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranları (%5-30) ile 24, 48 ve 72 saatlik fermantasyon sonrası teorik alkol verim değerleri (%). 51

4.13: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranları (%5-30) ile 24, 48 ve 72 saatlik fermantasyon sonrası substrat dönüşüm verimi değerleri (%). 52

1. GİRİŞ

Fosil kökenli yakıtların zararlı etkileri nedeni ile yenilenebilir ve temiz enerji olarak ifade edilen biyoyakıtlara olan ilgi her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Biyoyakıtlar, biyokütlelerin canlı organizmalar kullanılarak kimyasal veya biyolojik süreçler doğrultusunda enerji bakımından zenginleştirilmiş kimyasallar olarak ifade edilebilmektedir. Biyoyakıt üretiminde bakteri, maya, mantar gibi mikroorganizmalar kullanılabildiği gibi mikro ve makro algler gibi fotosentetik organizmalar da kullanılabilmektedir. Elde edilen biyoyakıt ürünleri katı, sıvı veya gaz yapıda olabilir [Rodionova et al., 2017]. Katı biyoyakıt olarak genel olarak yakacak odun, odun peletleri ve odun kömürü gibi enerji kaynakları kullanılmaktadır. Sıvı biyoyakıt türlerine ise biyoetanol, biyodizel, piroliz, biyoyağ ve ulaşım yakıtı örnek verilebilmektedir [Guo et al., 2015]. Lignoselülozik, nişastalı ve şekerli hammaddelerin fermantasyonu ile elde edilen biyoetanol, fosil kökenli benzinle karıştırılarak araç yakıtı olarak kullanılmaktadır [Aditiya et al., 2016]. Gaz yapıdaki biyoyakıtlar ise, genel olarak biyogaz ve singaz üretimleridir. Biyokütlelerden anaerobik ortam koşullarında üretilen biyogazın mevcut doğal gaz tüketiminin %25'ini karşılaması nedeniyle özellikle Avrupa ve Çin'de kullanımı hızla artmaktadır. Ancak, odunsu biyokütlelerin gazlaştırılması ile elde edilen singaz'ın üretimi ve tüketimi maliyet açısından uygun olmadığı ifade edilmektedir [Guo et al., 2015]

Dünyada biyoyakıt üretimi ve tüketimi son yıllarda önem kazanmıştır. Özellikle Avrupa'da, 2016 ve 2017 yılların raporlarına göre, biyoyakıt tüketimi %9.2 oranında artmıştır. Avrupa'da son yıllarda artan biyoyakıt tüketimi yaklaşık olarak 15.5 milyon ton petrol rezervine eşdeğer olarak ifade edilebilir. Avrupa'da 2016 yılın verilerine göre 2017 yılında tüm biyoyakıt türlerin tüketiminde artış görülse de en fazla artışın biyoetanol (%5.8 oranında artış) ve biyodizelde (%10 oranında artış) olduğu bildirilmiştir. Sadece İsveç, Finlandiya ve Almanya'nın raporlarına göre biyogaz tüketimi 2016 yılına göre 2017 yılında %9.7 artış sağlandığı raporlanmıştır. Veriler biyoyakıt tüketiminin 2030 yılına kadar iki katına kadar çıkabileceğini ve biyoyakıt tüketiminde özellikle biyoetanol ile biyodizelin aktif rol oynayacağını öngörmektedir [Web 1, 2019].

Bu tez çalışmasında, son yıllarda fosil kökenli yakıtlara alternatif olarak ilgi çeken biyoyakıtların üretimi ve tüketiminde umut vaat edici bir enerji kaynağı olarak süt işleme sanayi yan ürünü olan peynir altı suyu tozundan etanol üretiminin geliştirilmesi araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Günümüz enerji ihtiyaçların büyük bir kısmı petrol, kömür ve doğalgaz rezervlerinden sağlanmaktadır. Bu tarz fosil kökenli kaynaklar ilerleyen zaman içerisinde tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Yenilenmesi uzun zaman alan (60-100 yıl) fosil kökenli kaynakların yerine yenilenebilir yeni enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bilinen saf içeriği ve biyolojik kaynaklı olmasından dolayı biyoetanol, fosil kökenli kaynaklara iyi bir alternatiftir.

Fermentasyon ile metabolit üretiminde belli seviyede oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, büyük ölçekli biyoreaktörlerde, gerekli olan oksijen miktarının belli bir seviyenin altına düşmesi önemli bir sorundur. Fermantasyon süresince oksijen seviyesinin gerekli oksijen konsantrasyonun altına düşmesi, biyokütle oluşumunu olumsuz etkilemekte ve böylece ürün oluşumu da olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında "Peynir altı suyu tozundan *E.coli*'nin *Vitreoscilla* hemoglobin ekspresyonu ile etanol üretimi arttırılabilir. Bu üretim sürekli fermantasyon proseslerinde hücre immobilizasyonu ile daha avantajlı olabilir" hipotez olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında peynir altı suyundan elde edilen peynir altı tozunun, *vgb*/VHb içeren rekombinant *E.coli* TS3 suşu ile biyoetanol üretiminde kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. VHb eksprese eden (TS3) ve etmeyen (FBR5) *E.coli* suşlarının immobilizasyonu ile immobilizasyonun biyoetanol üretimi üzerine etkisinin karşılaştırılması ve immobilize *E.coli* suşlarının tekrarlı kullanılması ile sanayiye yönelik etanol üretiminin avantajlarının laboratuvar ortamında belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoetanol

Petrol ve doğalgaz dünyanın çoğunluğunda en önemli ve birincil enerji kaynaklarıdır. Ulaşım ve sanayi ise çoğunlukla fosil kökenli enerji kaynaklarına bağlıdır. Fosil kökenli yakıtların tüketilmesi sera gazı emisyonlarını arttırır ve küresel ısınmaya sebep olur. Böylelikle iklim değişikliği ile deniz seviyesinin yükselmesi, biyoçeşitliliğin azalması ve çevre kirliliği oluşur [Abnisa et al., 2013], [Kundu et al., 2013], [Vanhala et al., 2016]. Biyoetanol biyoyakıtlar içerisinde önemli bir konumdadır ve miktarı azalan fosil kökenli yakıtlara potansiyel bir alternatif olarak düşünülmektedir.

2.1.1. Biyoetanol'ün Genel Özellikleri

Etanol (C_2H_5OH) birçok avantajlı özelliğe sahip olması nedeniyle, benzine (C_7H_{17}) alternatif yeni bir enerji kaynağıdır. 1 litre etanol aynı miktardaki benzinin %66'sı kadar enerji sağlamasına rağmen daha fazla oktan sayısı (etanol 106-110; benzin 91-96) içermektedir. Etanolün yüksek oktan seviyesi daha kısa bir yanma süresi ile daha yüksek bir sıkıştırma oranında yakılmasını ve daha düşük bir motor vuruşuyla sonuçlanmasını sağlamaktadır [Nigam and Singh, 2011]. Ayrıca biyoetanol oksijen (%34.7) içeriği sayesinde benzine göre daha iyi yanma etkinliği (%15 oranında) sağlamaktadır [Kar and Deveci, 2006]. Buna ek olarak, etanol benzine göre daha yüksek evaporasyon entalpi değerine (60°C'de etanol ve benzin için sırasıyla 1177 kJ/kg ve 348 kJ/kg) ve laminer alev hızına (100kPa'da 325 K'de etanol ve benzin için sırasıyla 39 ve 33 cm/s) sahiptir [Al-Hasan, 2003], [Bayraktar, 2005], [Hara and Tanoue, 2006], [Naik et al., 2010]. Etanolün buharlaşma ısısı (840 kJ/kg) benzinin buharlaşma ısısına (305 kJ/kg) göre oldukça fazladır. Bu durum, etanol benzin ile karıştırıldığında, yakıtın hacimsel olarak daha verimli olmasını sağlamaktadır [Lynd, 1996]. Etanolün benzine göre daha avantajlı özelliklerinin olması, benzin ile etanol karıştırılarak oluşan yeni yakıtın yakıtın performansı artabilmektedir. Yüksek korozyon olasılığı, düşük yanma parlaklığı ve su ile

azeotropik bir karışım oluşturmak için yüksek eğilim göstermesi ise biyoetanolün dezavantajları arasındadır [Acaroğlu, 2013].

Etanol ve benzinin karıştırılması, kükürt salınımının ve aynı zamanda karsinojen olan ve asit yağmurunun oluşmasına katkı sağlayan kükürtdioksit emisyonun azalmasına yardımcı olmaktadır [Pickett et al., 2008], [Nigam and Singh, 2011]. Biyoetanol aynı zamanda metil tersiyer bütil eter (MTBE)'in güvenilir bir bileşenidir ve genellikle oktan arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Biyoetanol ve MTBE katkılı yakıtlar, benzinin yanması sonrası açığa çıkan karbon monoksit ve karbondioksit gazların salınımını azaltmaktır [Yao et al., 2009].

Biyoetanol yüksek oktan sayısına, yüksek yanma sınırı ve hızına, yüksek evaporasyon sıcaklığına ve daha yüksek bir sıkıştırma oranına sahip olma özelliklerinden dolayı yakıt olarak kullanılabilmektedir.

2.1.2. Dünya'da ve Türkiye'de Biyoetanol Üretimi ve Kullanımı

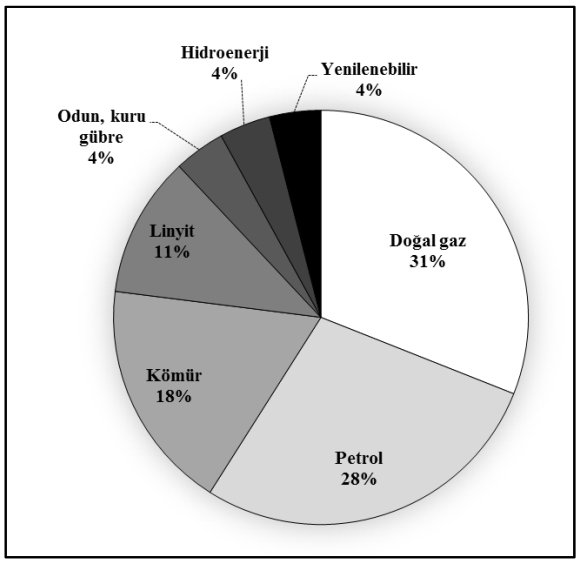
Çeşitli yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyoetanol, fosil yakıtlara yönelik en umut verici alternatiflerden biridir. ABD, Brezilya, Çin, Kanada ve çeşitli Avrupa Birliği ülkeleri fosil kökenli kaynaklara olan bağımlılığı azaltmak için biyoetanol programlarını ilan etmişlerdir [Zabed et al., 2017].

2006'da Brezilya 3 milyon araçta kullanılması ve yıllık 15 milyar litre saf etanol üretebilmek için 300'den fazla biyoetanol üretim tesisini faaliyete geçirmiştir. Amerika'da aynı yıllarda 10 milyar litre etanol üretimi 80'den fazla kuruluşta üretilmiştir. 2008 yılında Amerika küresel etanol üretiminde hızlı bir artış yakalamıştır [Wang et al., 2012]. ABD biyoetanol üretimini 1980 yılından 2015 yılına kadar 175 milyon galondan (660 milyon litre) 14810 milyon galona (56 milyar litre) çıkartmıştır. ABD 2014 yılında 14.3 milyar galon (65 trilyon litre) ürettiği etanolün 825 milyon galonunu (3.1 trilyon litre) dünya çapında 51 ülkeye ihraç etmiştir [RFA, 2015]. ABD 2022 yılına kadar etanol üretimini 36 milyar galona çıkarmayı hedeflemiştir [Schnepf and Yacobucci, 2013].

Alternatif Yakıt Veri Merkezi (AFDC) raporuna göre, 2015 yılında küresel toplam etanolün %58'i ABD'de, %28'i Brezilya'da üretilmiştir. Küresel biyoetanol üretim miktarı 2014 yılına kıyasla 2015 yılında %4 artış ile 98.3 milyar litreye ulaşmıştır [RFA, 2015]. Avrupa'da etanol üretiminde ise Almanya ve Fransa ağırlıklı

olmak üzere toplam %5'lik bir paya sahiptir. Biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde kaynakları, Avrupa'da genellikle tarımsal ürünler ile şeker pancarı, ABD'de mısır gibi nişastalı ürünler ve Brezilya'da ise şeker kamışı türevleri olmaktadır [Sarris and Papanikolaou, 2016].

Günümüzde Türkiye'nin temel enerji taleplerinden başlıcaları doğal gaz, petrol ve kömür gibi fosil kökenli yakıtlardır (Şekil 2.1) [Bayrakci Ozdingis and Kocar, 2018]. Ayrıca Türkiye doğalgaz ve petrol gibi enerji kaynaklarının büyük bir kısmını diğer ülkelerden temin etmektedir. [Acaroğlu and Aydoğan, 2012]. Elektrik, çoğunlukla termik santraller tarafından kömür, linyit, doğalgaz ve akaryakıt kullanılarak üretilmektedir. Yenilenebilir elektrik üretimi azdır. Nükleer enerji ise yeni ve çok sınırlıdır [Kaya and Kilic, 2015].



Şekil 2.1: Türkiye'nin 2013 yılına ait temel enerji talepleri.

Türkiye'de 12 adet biyoetanol üretim tesisi mevcuttur (Tablo 2.1) [Bayrakci Ozdingis and Kocar, 2018] ve bu tesislerin potansiyel biyoetanol üretimi günlük yaklaşık 800.000 litredir [Bayrakcı, 2009]. Bu tesislerden 3 tanesi aktif olarak şeker pancarı, buğday ve mısır kaynaklarından yılda ortalama 162 milyon litre biyoetanol üretmektedir. Bu tesislerde üretilen biyoetanolün 76 milyon litresi yakıt olarak kullanılmaktadır. Biyoyakıt olarak üretilen etanolün %92'si yurt içinde kullanılırken, geri kalan %8'i ise ihraç edilmektedir [TAPDK, 2015]. Diğer üretim tesislerinde üretilen etanol, gıda ve kozmetik gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [Turkozu et al., 2010], [Bayrakci Ozdingis and Kocar, 2018]. 2014 yılında, Türkiyenin

biyoetanol üretiminde kullanılan ürün grupların miktarı Tablo 2.2.'de [Bayrakci Ozdingis and Kocar, 2018] gösterilmektedir.

Türkiyede üretilen biyoetanolün büyük bir kısmı Çumra Şeker Fabrikasından sağlanmaktadır. Şeker pancarı ve şeker pancarı melası kullanılarak, yıllık yaklaşık 84 milyon litre biyoetanol üretilmektedir. Bu fabrika, Türkiye'nin biyoetanol üretim kapasitesinin %56'sını üretmekte ve petrol dağıtıcılarına teslim etmektedir [Web 2, 2019].

Tablo 2.1: Türkiye'deki biyoetanol üretim tesisleri.

Fabrika / Şirket	Şehir	Biyoetanol türü
Allco İçecek Şirketi	İzmir	Etil Alkol
Amasya Şeker Fabrikası	Amasya	Etil Alkol
Antalya Alkollü İçecekler	Antalya	Etil Alkol
Infotex	Afyonkarahisar	Etil Alkol
Çumra Şeker Fabrikası	Konya	Yakıt biyoetanolü
Mey Alkollü İçecekler Fabrikası	Karaman	Etil Alkol
Tarkim	İstanbul	Yakıt biyoetanolü
Tezkim	Adana	Yakıt biyoetanolü
Erzurum Şeker Fabrikası	Erzurum	Etil Alkol
Eskişehir Şeker Fabrikası	Eskişehir	Etil Alkol
Malatya Şeker Fabrikası	Malatya	Etil Alkol
Turhal Şeker Fabrikası	Turhal	Etil Alkol

Tablo 2.2: 2014 yılında Türkiye'de biyoetanol üretimi için kullanılan ürünlerin miktarları (ton).

Hammade Ürünü	Miktar (Ton)
Buğday	19 000 000
Arpa	6 300 000
Mısır	5 950 000
Şeker pancarı	16 572 790

Türkiye'de biyoetanolün benzin ile karıştırılarak yakıt olarak kullanılması yasal zorunlu hâle getirilmiştir. Bu karar kapsamında etanolün benzinde yerel içerik oranı 1 Ocak 2013 tarihinden itibaren %2, 1 Ocak 2014 tarihinden itibaren ise en az %3 olması kararlaştırılmıştır [ResGaz, 1].

2.1.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadde Kaynakları

Biyoetanol üretimi için yenilenebilir kaynaklar şekerler, nişastalı bileşenler, lignoselülozik biyokütleler ve algler olarak ifade edilebilir [Nigam and Singh, 2011].

Şeker kamışı, şeker pancarı, tatlı sorgum, üzüm gibi çeşitli meyveler ve melas gibi şeker endüstri atıkları şeker bazlı ham maddelerine dahildir [Nwufo et al., 2016]. Şeker kamışı suyu Brezilya için birincil kaynaktır ve etanol üretiminin yaklaşık %79'unu teşkil eder. Melas ise Hindistan'ın en büyük etanol üretim kaynağıdır [Soam et al., 2016]. Avrupa, Kuzey Amerika ve Fransa'da etanol üretimi için şeker pancarı kullanılmaktadır [Vohra et al., 2014]. Ananas ve üzüm gibi bazı meyve işleme atıkları da biyoetanol üretimi için kullanılabilmektedir [Rodríguez et al., 2010], [Upadhyay et al., 2010]. Sukroz kaynağı olarak tatlı sorgum da biyoetanol üretimi için alternatif olarak kullanılmaktadır [Phukoetphim et al., 2017].

Nişastalı ürünler uzun süreli kararlı bir şekilde depolanabilmesi, biyodönüşüm kolaylığı ve yüksek etanol verimi nedeniyle biyoetanol üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ürünler arasında tahıllar (%60-80 nişasta), yumrular ve kökler (%60-90 nişasta), baklagiller (%25-50 nişasta) ile yeşil ve olgunlaşmamış meyveleri (%70 nişasta kadar) yer almakatadır [Santana and Meireles, 2014]. Mısır, sorgum tahılları, buğday, manyok, patates ve tatlı patates etanol üretim kaynaklarıdır [Balat, 2011]. Biyoetanol üretiminde nişastalı ürünler içerisinde yaygın olarak mısır kullanılmaktadır. Mısır en fazla Kuzey Amerika'da üretilirken, bunu Asya, Avrupa ve Güney Amerika takip etmektedir. Manyok ve patates ise biyoetanol üretimi için potansiyel birer ham madde kaynaklarıdır [Abanoz et al., 2012], [Sumer et al., 2015], [Martinez et al., 2018]. Tayland, Hindistan, Japonya, İspanya ve Kanada gibi ülkeler biyoetanol üretimi için pirinç, buğday, mısır, patates, tatlı patates ve arpayı da kullanmaktadır [Gupta and Verma, 2015], [Soam et al., 2016], [Zabed et al., 2017].

Biyoetanol eldesinde önemli bir kaynağı oluşturan lignoselülozik biyokütle ise, enerji bitkileri (çok yıllık otlar ve diğer özel enerji bitkileri), su bitkileri (su sümbülü), orman malzemeleri (yumuşak ağaç, sert ağaç, talaş, budama ve kabuk inceltme kalıntıları), tarımsal kalıntılar (saman, kazanlar ve keklik) ve katı organik atıklar gibi çeşitli gruplara ayrılabilir [Zabed et al., 2017].

Biyoyakıt üretiminde biyolojik kökenli olan algler alternatif bir kaynak olarak kullanılabilmektedir. Algler farklı yüzeylerde ve sulu ortamlarda üreyebilmesi ve

yüksek oranda lipid ve karbohidrat içermesi nedeniyle önemli substrat kaynağıdır [Sirajunnisa and Surendhiran, 2016]. Son zamanlarda pek çok araştırmacı, biyoetanol üretiminde alglerin kullanım potansiyellerini araştırmışlardır [Sulfahri et al., 2016], [Rizza et al., 2017], [Hamouda et al., 2018], [Sasaki et al., 2018], [Markou and Monlau, 2019]. Alg üretimi ile ilgili en önemli sorun ise alg kültürünün çoğunlukla (%99.9) sudan oluşması ve biyokütle oranının (%0.1) çok düşük olmasıdır [Mayfield, 2011].

Nişastalı ürünler genellikle amilolitik enzimler (α-amilaz, β-amilaz, glukoamilaz, pullulanaz ve izoamilaz) ile hidroliz edilir. Nişasta hidrolizine benzer olarak lignoselülozik atıkların da fermente edilebilir şekerlere dönüşümü enzimatik veya kimyasal (asit veya alkali) ön işlemler ile gerçekleştirilmektedir. Asit ile ön işlem (H_2SO_4, HCl, H_3PO_4 ve HNO_3) sonrası çeşitli inhibitörler (5-hidroksi metilfurfural; HMF, furfural, levunilik asit, formik asit, asetik asit, fumarik asit ve maleik asit) açığa çıkabilmektedir [Zabed et al., 2017]. Açığa çıkan inhibitör materyaller ise mikrobiyal üremeyi ve metabolit üretimini olumsuz olarak etkilemektedir [Larsson et al., 1999], [Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000]. Enzimatik hidoliz ise biyolojik kökenli, çevre dostu, kolay uygulanabilir ve hidrolizasyonda etkili olmasına rağmen asit uygulamalarına göre daha fazla maliyetlidir [Duvernay et al., 2013], [Zabed et al., 2017].

Şeker bazlı ham maddeler (şeker pancarı melası, peynir altı suyu ve tozu gibi) enzim ve/veya asit ile ön işlem uygulamalarına gerek olmadığından dolayı biyoetanol üretiminde etkili olarak kullanılmaktadır. Şekerli ürünlerden etanol üretim maliyeti ise nişastalı ve lignoselülozik ürünlere göre daha azdır. Peynir altı suyu ve tozu şekerli ürünlere dahil olup, biyoetanol üretimi için potansiyel bir karbon kaynağıdır.

2.2. Peynir Altı Suyu Tozu

Peynir altı suyu, peynir üretim sürecinde süt kazeinin uzaklaştırılması ve prespitasyonu sonucu oluşan bir yan üründür. Peynir altı suyu laktoz (%4-5, w/v), çözünebilir proteinler (%0.6-0.8, w/v), lipid (%0.4-0.5, w/v), vitaminler (B grubu ve diğerleri), mineral tuzlar (kuru ağırlığın %8-10), laktik asit (%0.05), sitrik asit, protein yapıda olmayan nitrojen bileşenler (üre ve ürik asit), biyoaktif bileşikler (β-

lactoglobulin, α-lactoglobulin, immunoglobinler, serum albümin ve laktoferrin) ve süt bileşenlerin %55'ini içermektedir [Yang et al., 1994], [Siso, 1996], [Casal et al., 2006], [Panesar et al., 2007]. Peynir altı suyu çok fazla miktarda üretilir ve yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ, 30000-50000 ppm) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ, 60000-80000 ppm) değerlerine sahip olmasından dolayı çevre kirliliği açısından önemli bir kirletici kaynaktır. Fakat BOD seviyesinin %75'inden fazlası laktozun etanol, metan, hidrojen veya tek hücre proteini gibi biyodönüşüm ile azaltılabilmektedir [Siso, 1996].

Peynir altı suyundan biyoetanol üretimini pek çok araştırmacı incelemiştir [Kargi and Özmihci, 2006], [Zafar and Owais, 2006], [Guimarães et al., 2010], [Koushki et al., 2012]. Peynir altı suyundan biyoetanol üretiminde önemli bir konu ise laktozun fermente edilebilen şeker monomerlerine (glukoz ve galaktoz) dönüşümüdür. Önemli etanol üreticisi olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae* β-galaktosidaz enzimi yoksunluğundan dolayı, laktozu hücre içerisine alamaz ve laktozu direkt olarak fermente edemez [Domingues et al., 2010]. *S.cerevisiae*'nın laktozdan direkt biyoetanol üretimi için laktozun hidroliz edilerek glukoz ve galaktoza dönüştürülmesi gerekmektedir [Champagne and Goulet, 1988]. Fakat, yüksek glukoz konsantrasyonu galaktoz kullanımını katabolik represyondan dolayı engelleyebilmektedir [Gancedo, 1998]. *Kluyveromyces marxianus* ve *Candida pseudotropicalis* gibi bazı maya türleri laktozu fermente edebilmesine rağmen, yüksek laktoz ve etanol konsantrasyonlarında inhibe olmaktadırlar [Dragone et al., 2011].

Laktoz hidrolizi kimyasal olarak sülfirik asit gibi çeşitli asit uygulamaları (pH<1.5) ile yüksek sıcaklık (>150°C) koşullarında gerçekleşir [Gekas and López-Leiva, 1985], [Guimarães et al., 2010]. Asit ile hidroliz işlemi sonrası protein denatürasyonu ile Maillard reaksiyonuna bağlı olarak kahverenk oluşumu ve istenmeyen yan ürünlerin oluşması gibi bazı dezavantajlar görülmektedir [Siso, 1996]. Enzimatik hidroliz ise, laktaz enziminin kullanılması ile disakkarit formda bulunan laktozun monosakkarit bileşenleri olan glukoz ve galaktoza dönüşmesini sağlamaktadır [Kosaric and Asher, 1985], [Siso, 1996]. Enzimatik hidrolizasyonu sonucunda laktoz ve galaktozun polimerizasyonu ile oligosakkaritlerin oluşumu gözlemlenebilmekte [Guy and Bingham, 1978], [Gekas and López-Leiva, 1985] ve hücrelere laktoz kütle transferi sınırlamaları oluşabilmektedir [Joshi et al., 1987].

E.coli, *Aspergillus* ve *Kluyveromyces* gibi bazı mikroorganizmalar laktozu doğal olarak fermente edebilir. *Kluyveromyces* türleri orta miktarda şeker ve tuz varlığında inhibe olur ve *S.cerevisiae* ile kıyaslandığında etanol toleransı düşüktür [Siso, 1996], [Zafar et al., 2005]. Peynir altı suyundan *K. fragilis* ile etanol üretiminde teorik alkol verimi ise %70 civarındadır [Pasotti et al., 2017]. Dien ve arkadaşları (2000) biyoetanol üretim etkinliğinin arttırılması için genetik mühendisliği çalışmaları sonucunda *E.coli* FBR5 suşunu geliştirmişlerdir. Aynı çalışmada mısır hidrolizatı kullanılarak FBR5 suşu ile biyoetanol üretim verimini %86-92 seviyesine çıkartmışlardır [Dien et al., 2000]. Benzer olarak *E.coli* FBR5 suşu ile peynir altı suyu ve tozundan etkin etanol üretimi gerçekleştirilmiştir [Akbas et al., 2014].

Laktozun etanole teorik olarak dönüşüm değeri, 1 kg tüketilen laktoz için 0.538 kg etanoldür [Mawson, 1994], [Sansonetti et al., 2009]. %4-5 laktoz içeren peynir altı suyu ile üretilen %2-3 (v/v) seviyesindeki etanol konsantrasyonu kültürden yüksek distilasyon maliyeti gerektirmesi nedeniyle ekonomik olarak uygun bulunmamıştır [Ozmihci and Kargi, 2008], [Guimarães et al., 2010].

Peynir altı suyu tozu yüksek laktoz içermesi, daha az hacim kaplaması ve aynı zamanda ulaşım ve depolanmasına kolaylık sağlaması nedeniyle peynir altı suyuna göre avantajlıdır [Ozmihci and Kargi, 2007a], [Ozmihci and Kargi, 2007b], [Guo et al., 2010]. Peynir altı suyundaki laktozu yoğunlaştırmak için ultrafiltrasyon tekniği kullanılır ve laktoz konsantrasyonu 5-6 kez arttırılır. Ultrafiltrasyon maliyeti ise bir metreküp peynir altı suyu için yaklaşık 50 dolardır [Guadix et al., 2004]. 1 kg peynir altı tozunun maliyeti yaklaşık olarak 0.20 ile 0.40 dolar arasında değişmektedir [Ozmihci and Kargi, 2007c]. Yeni geliştirilen hibrit reaktör sistemleri ile 1 kg peynir altı tozu üretiminin maliyeti 0.11 dolar seviyesine kadar indirilebilir [Pal and Nayak, 2016]. Ayrıca peynir altı tozu, yüksek şeker yoğunluğu ile fermentör koşullarında kullanıldığında ultrafiltrasyon maliyetini azaltır [Kargi and Ozmihci, 2006], [Ozmihci and Kargi, 2007a], [Ozmihci and Kargi, 2007b], [Dragone et al., 2011].

Peynir altı suyu ve tozu biyoetanol üretimi gibi pek çok biyoteknolojik üretim süreçlerinde laktoz kaynağı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Karbon kaynağı olarak peynir altı suyu ve tozunun çeşitli metabolitlerin üretiminde kullanımı.

Metabolit	Referans
Biyoetanol	Tomaszewska and Białończyk, 2016
	Bipasha et al., 2017
	Pasotti et al., 2017
	Sharma et al., 2018
	Murari et al., 2019
	Zhou et al., 2019
Laktik asit	Juodeikiene et al., 2016
	Ghasemi et al., 2017
Hyaluronik asit	Amado et al., 2016
Polihidroksi alkanoat (PHAs)	Colombo et al., 2016
Hidrojen	Remón et al., 2016
	Ramos and Silva, 2018
Elektrik	Ghasemi et al., 2017
	Al-Fetlawi and Hadi, 2018
Biyogaz	Michalopoulos et al., 2017
Bütanol	Díez-Antolinez et al., 2016

2.3. İmmobilizasyon

Etanol fermantasyonu için mikroorganizmalar genellikle serbest hücreler şeklinde kullanılırlar. Bununla birlikte, bir fermantasyon sisteminde hücrelerin spesifik büyüme oranı, hem ürün hem de substrat ile ilgili birçok faktörden etkilenebilmektedir [Nikolić et al., 2010]. Hücreler üzerindeki substrat ve ürün inhibisyonunun üstesinden gelmenin yanı sıra etanol toleransını arttırmak için hücre immobilizasyonu son yıllarda biyoetanol üretimi için araştırılmıştır [Mishra et al., 2016].

Hücrelerin immobilizasyonu, serbest hücre sistemine göre uzun süre hücre stabilitesi, yüksek substrat konsantrasyonuna artan tolerans, yüksek etanol verimi, daha büyük hacim verimliliği, düşük son ürün inhibisyonu, yüksek hücre yoğunlukları nedeniyle kontaminasyon riski gibi bazı teknik ve ticari avantajlar sunmaktadır. Bunun yanı sıra daha kolay ürün geri kazanımı, hücrelerin uzun süre yenilenmesine ve tekrar kullanılmasına bağlı olarak enerji talebinin ve proses giderlerinin azaltılması, tekrarlı fermantasyon uygulamalarında hücre geri dönüşümü

ve hücrelerin toksik maddelere karşı koruması gibi kullanım avantajları bulunmaktadır [Kourkoutas et al., 2004], [Nikolić et al., 2010], [Mishra et al., 2016].

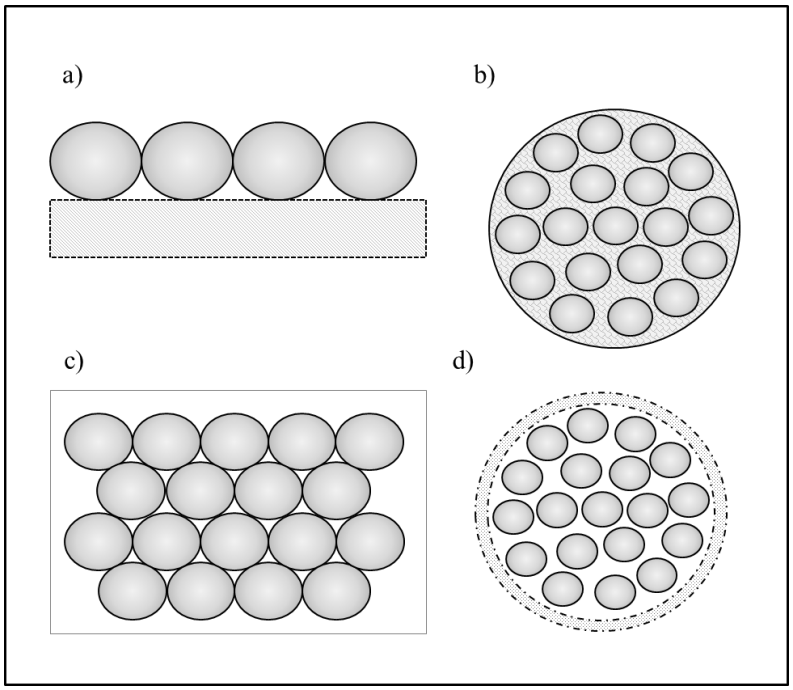
İmmobilize hücrelerin serbest hücrelere göre daha fazla etanol üretebilme [Zhao and Xia, 2010], [Razmovski and Vučurović, 2011], [Sembiring et al., 2013], [Milessi et al., 2015], ürün maliyetini azaltma [Nikolić et al., 2010], [Pacheco et al., 2010], [Singh et al., 2013], uzun süreli fermantasyonlarda kararlı etanol üretimi [Kirdponpattara and Phisalaphong, 2013] ve hücrelerin tekrarlı fermantasyonlarda yeniden kullanımı [Duarte et al., 2013] gibi bir çok avantajı vardır. [El-Dalatony et al., 2016], [Guldhe et al., 2016].

Aynı zamanda immobilize maya hücrelerinin etanol ve diğer inhibitör bileşenler gibi stres faktörlerine karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir [Nikolić et al., 2010].

Pek çok biyoteknolojik proseslerde immobilizasyon uygulamaları avantajlıdır ve bu kapsamda çeşitli teknikler ve destek malzemeleri önerilmiştir. Bu teknikler, uygulanan fiziksel mekanizmaya dayanılarak dört ana kategoriye ayrılabilir; katı taşıyıcı yüzeyler üzerine tutunma veya adsorbsiyon (Şekil 2.2a), gözenekli bir matriks ile tutuklama (Şekil 2.2b), çapraz bağlama maddeleri ile (yapay olarak) kendi kendine toplanması (Şekil 2.2c) veya doğal olarak topaklaşması ve bariyerlerin arkasında hücrelerin tutuklanmasıdır (Şekil 2.2d) [Karel et al., 1985], [Pilkington et al., 1998], [Kourkoutas et al., 2004].

Katı bir yüzeye hücre immobilizasyonunda, elektrostatik güç veya hücre membranı ile taşıyıcı arasında kovalent bağ ile oluşturulmaktadır. Bir yüzey üzerine tutundurulan immobilize hücreler için genellikle selülozik (DEAE-selüloz, odun, talaş) ve inorganik (poligorskit, montmorilonit, hidromika, gözenekli porselen, gözenekli cam) materyaller kullanılmaktadır [Norton and D'Amore, 1994].

İmmobilizasyon için diğer yöntem ise gözenekli bir matriks içerisine hücrelerin hareketlerinin kısıtlanarak tutuklanmasıdır. Bu tip immobilizasyon için genellikle aljinat, k-karrajen, agar, kitosan ve poligalaktronik asit gibi polisakkaritler veya jelatin, kollajen ve polivinilalkol gibi organik polimer matriksler kullanılmaktadır [Norton and D'Amore, 1994], [Ramakrishna and Prakasham, 1999], [Park and Chang, 2000].



Şekil 2.2: İmmobilizasyonda kullanılan teknikler a) katı bir yüzey üzerine adsorbsiyon; b) gözenekli bir matriks ile tutuklama; c) çapraz bağlama ile hücrelerin bir arada toplanması, d) mikroenkapsülasyon.

Hücre flokülasyonu, literatürde hücrelerin bir arada tutulması olarak tanımlanmıştır ve süspansiyonlarda hücrelerin daha büyük bir ünite oluşturması veya kümeler halinde çökelmesi şeklindedir [Jin and Speers, 1998]. Hücrelerin bir arada topaklanması, akışkan yataklı ve sürekli karıştırma tanklı gibi reaktörlerde potansiyel olarak kullanılabilmektedir. Bu durum bir immobilizasyon tekniği olarak düşünülebilmektedir.

Hücre immobilizasyonu için uygulanan diğer bir yöntemde ise hücreleri mikro gözenekli membran filtreleri ya da bir mikrokapsül içerisine sıkıştırılması (mikroenkapsülasyon) ile sağlanabilmektedir. Mikroenkapsülasyon yöntemi ile hücre immobilizasyonun en büyük dezavantajı ise kütle transferi sınırlamaları [Lebeau et al., 1998] ve hücre çoğalmasının neden olduğu olası membran biyobozulmasıdır [Gryta, 2002].

Ayrıca, son yıllarda elma parçaları, şeker kamışı parçaları, muz yaprağı kılıfı ve portakal kabuğunu içeren destek malzemeleri üzerinde çeşitli taşıyıcılar araştırılmıştır [Zabed et al., 2014]. Logaritmik fazda üreyen hücreler kültür ortamından alınarak boncuk elde etmek için destek üzerine immobilize edilmiştir [Najafpour et al., 2004].

2.4. *Vitreoscilla* Hemoglobini

2.4.1. *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Biyokimyasi

Vitreoscilla Hemoglobini (VHb) ilk defa Dale Webster tarafından Gram negatif, mor fotosentetik bir bakteri olan *Vitreoscilla* sp. C1'de keşfedilmiştir [Webster and Hackett, 1966]. VHb çözünebilen bir protein olmasına rağmen, terminal solunum oksidazlarına (sitokrom *o*) spektral özelliği benzerliği nedeniyle "çözünebilir sitokrom *o*" olarak ifade edilmiştir [Appleby, 1969]. 1986 yılında VHb'nin aminoasit dizilimi ile çözünebilir sitokrom *o* olmadığı, hemoglobin yapıda olduğu belirlenmiştir [Wakabayashi et al., 1986]. VHb'nin en temel görevi, düşük oksijen konsantrasyonlarında, oksijeni bağlaması ve terminal solunum oksidaz(lar)ına (sitokrom *o* gibi) bu oksijeni doğrudan göndermesidir. [Webster, 1987], [Ramandeep et al., 2001], [Park et al., 2002], [Duk, 2007]. *Vitreoscilla* bakterisi zorunlu aerob olmasına rağmen, düşük oksijen koşullarında VHb'nin uyarılması ile hipoksik yaşam alanlarında yaşamaktadır [Boerman and Webster, 1982], [Dikshit et al., 1990]. Hem *Vitreoscilla*'da hem de *E.coli*'de VHb promotoru oksijen seviyesi %2'nin altında olan mikroaerobik koşullarda uyarılır [Khosla and Bailey, 1988], [Khosla and Bailey, 1989].

Vitreoscilla'da VHb, iki özdeş altbirim (her biri 15.7 kD) ünitesine sahip tek bir dimerik protein olarak bulunur ve her bir dimerde iki hem *b* molekülü bulunur [Webster 1987]. Orii ve Webster (1986) VHb'den oksijenin ayrılmasının çok hızlı olduğunu (k_{off}=5600 $\mu M^{-1}s^{-1}$) ve bu oranın diğer bilinen hemoglobinlere göre birkaç kat daha fazla olduğunu raporlamışlardır.

Vgb geni klonlanan *E.coli*'de, VHb'nin (yaklaşık %40'ı) çoğunun periplazmada yer aldığı gösterilmiştir [Khosla and Bailey, 1989]. Ramandeep ve arkadaşlarının (2001) yaptığı immünogold işaretleme çalışması sonucunda, hem konak *Vitreoscilla*'da hem de VHb eksprese eden *E.coli*'de, VHb'nin plazma membranının hemen altındaki sitoplazmada yoğunlaştığını bildirmişlerdir. VHb bu bölgede yoğunlaşarak periplazmik bölgede olduğu gibi, terminal solunum oksidazlarına O_2'nin iletilmesine ve etkileşime girmesine izin vermektedir [Ramandeep et al., 2001].

VHb alternatif bir terminal oksidaz olarak görev alabilmektedir. Terminal oksidazlardan (sitokrom *o* ve *d*) yoksun bir mutant *E.coli* suşu aerobik olarak büyüyememektedir. VHb eksprese eden *E.coli* suşunun aerobik koşullarda üreyebildiği belirlenmiştir. Bu sonuç, VHb'nin kendisinin alternatif bir solunum terminal oksidazı olarak görev yapabildiğini göstermektedir [Dikshit et al., 1992]. Maya ikili hibrit sistemi ile yapılan çalışmalarda terminal solunum oksidazlardan sitokrom *bo* [Park et al., 2002] ve sitokrom *d* [Duk 2007] ile VHb'nin direkt ilişkili olduğu bildirilmiştir.

VHb'nin terminal solunum oksidazlarına ek olarak, VHb'nin diğer proteinlerle olan etkileşimini içeren birtakım fonksiyonları olduğu da görülmektedir. VHb yüzlerce genin transkripsiyonunda etkili olmasının yanı sıra [Roos et al., 2004] ribozom ve tRNA seviyelerini de arttırmaktadır [Nilsson et al., 1999]. Isarankura-Na-Ayudhya ve arkadaşları (2008) aynı zamanda *E.coli*'deki VHb ekspresyonunun birkaç farklı metabolik proteinin düzeylerini etkileyebileceğini bulmuşlardır.

E.coli'de aerobikten anaerobik ortama geçişte veya tersine durumlar global düzenleyici proteinlerden FNR ve ArcAB ile düzenlenirken, SoxRS ve OxyR oksidatif stres durumlarına cevapta önemli düzenleyici genlerdir. Hücrenin redoks durumu ile metabolizmayı geniş bir şekilde etkileyebilen global transkripsiyon düzenleyicileri (OxyR ve FNR) ile VHb etkileşime girmektedir [Anand et al., 2010]. FNR çok çeşitli *E.coli* genlerinin global bir düzenleyicisidir. FNR çeşitli operonların (narGHJI, frdABCD, dmsABC ve cydAB) transkripsiyonunu aktive eder ve cyoABCDE'nin transkripsiyonunu ve kendi ekspresyonunu represe eder (Munjal et al., 2012). ArcAB aerobikten anaerobik metabolizmaya geçişi algılayan ve membrana bağlı sensör ArcB ile düzenleyici protein ArcA'dan oluşan iki bileşenli bir düzenleyici sistemdir [Iuchi and Lin, 1992], [Iuchi, 1993]. *E.coli*'de hidrojen peroksite cevapta OxyR transkripsiyon faktörü tarafından birçok genin ekspresyonu tarafından düzenlenir. OxyR, H_2O_2'nin oksidasyonu [Christman et al., 1985], [Kiley and Storz, 2004] ve reaktif nitrojen türleri ile aktive olur [Hausladen et al. 1996]. OxyR regulonu tarafından katalaz (*katG*), glutaredoksin 1 (*grxA*) ve glutatyon redüktaz (*gorA*) kontrol edilir [Prinz et al., 1997], [Zheng et al., 1998], [Storz and Imlayt 1999]. OxyR, organik solventler, reaktif nitrojen türleri ve hipoklorik asite karşı hücrenin korunmasında düznleyici görev görmektedir. Benzer olarak diğer yapılan çalışmalarda da VHb'nin oksidatif stres ile ilgili enzimlerin (katalaz ve süperoksit dismutaz, SOD) artışı ile ilişkili olduğu raporlanmıştır [Abrams and

Webster, 1990], [Geckil et al., 2003], [Erenler et al., 2004], [Akbas et al., 2011]. SOD ve katalaz seviyesinin artışı, reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak artan hücre ölümleri ve mutasyonlardan korunmayı arttırmaktadır.

Chen ve Bailey (1994), VHb eksprese eden *E.coli*'de VHb negatif kontrolüne göre ATP ve transmembran ΔpH seviyelerinde artış olmadığını, ancak VHb suşunun büyüme oranının daha hızlı olduğunu raporlamışlardır. Ek bir NMR araştırması, VHb ekspresyonundan dolayı ATP sentezinde %68 ve ATP akışında %30 artış olduğunu ileri sürmüştür. Bununla birlikte, aynı iki suşu karşılaştıran bir diğer çalışmada ise, VHb ekspresyonu ile korelasyon olacak şekilde H^+/O ve transmembran ΔpH seviyelerinde %50-60 oranlarında, ATP seviyesinde ise yaklaşık iki kat artış olduğunu göstermiştir [Kallio et al., 1994]. Tsai ve arkadaşlarının (1996) yapmış oldukları bir model çalışmasında ise, VHb eksprese eden *E.coli*'de VHb içermeyen kontrole göre ATP ve NADH akışını incelemişlerdir. Model sonuçlarına göre, VHb ekspresyonu ile ATP akışında %17, NADH akışında ise %56 oranında bir artış olabileceği önerilmiştir. NAD(P)H seviyeleri ve net NAD(P)H üretme oranı yine VHb eksprese eden *E.coli*'de, VHb içermeyen kontrol suşu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla 1.8 kat ve 2.4 kat azalmıştır [Tsai et al., 1995]. VHb eksprese eden *E.coli*'yi kullanan bir sonraki çalışmada, VHb varlığı ile ilişkili ATP seviyelerinde yaklaşık %60'lık bir artış olduğu tespit edilmiştir [Frey et al., 2001].

2.4.2. *Vitreoscilla* Hemoglobini Teknolojisinin Biyoteknolojide Uygulamaları

Vitreoscilla hemoglobini'nin hücre biyokütle miktarını arttırmasındaki etkisi ile biyoteknoloji ile ilgili çalışmalarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır [Stark et al., 2011]. *Vitreoscilla* hemoglobini'nin dinotrobenzen, organofosfatlar, tiyosülfatlar gibi bileşiklerin ile çevre açısından zararlı olan tekstil boyaların yıkımındaki olumlu etkileri çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Tablo 2.4). Benzer şekilde VHb teknolojisinin pek çok metabolit (enzim, aminoasit, biyoyakıt, polimer, antibiyotik) üretimindeki potansiyel etkisi birçok farklı çalışma ile araştırılmıştır (Tablo 2.5). *Vgb*'nin etanolojenik *E.coli*'ye aktarılması ile elde edilen *E.coli* TS3 ve TS4 suşları [Sanny et al., 2010] ile patates, mısır, şeker pancarı melası, peynir altı suyu ve tozu gibi çeşitli karbon kaynaklarından biyoetanol üretimini arttırdığı bildirilmiştir [Sanny

et al., 2010], [Abanoz et al., 2012], [Arnaldos et al., 2012], [Akbas et al., 2014], [Sumer et al., 2015].

Tablo 2.4: VHb'nin çeşitli kirleticilerin yıkımında kullanımı.

Metabolit	Mikroorganizma	Referans
Tiyosülfat	*Thialkalivibrio versutus*	Mu et al., 2017
Tekstil boyası	*E.coli*	Zhang et al., 2015
Dinitrobenzen	*Pseudomonas aeruginosa*	Kahraman and Geckil, 2016
Organofosfat	*Pseudomonas putida*	Gong et al., 2018
DBT	*Paenibacillus*	Bai, 2015

Tablo 2.5: VHb'nin çeşitli metabolitlerin üretiminde kullanımı.

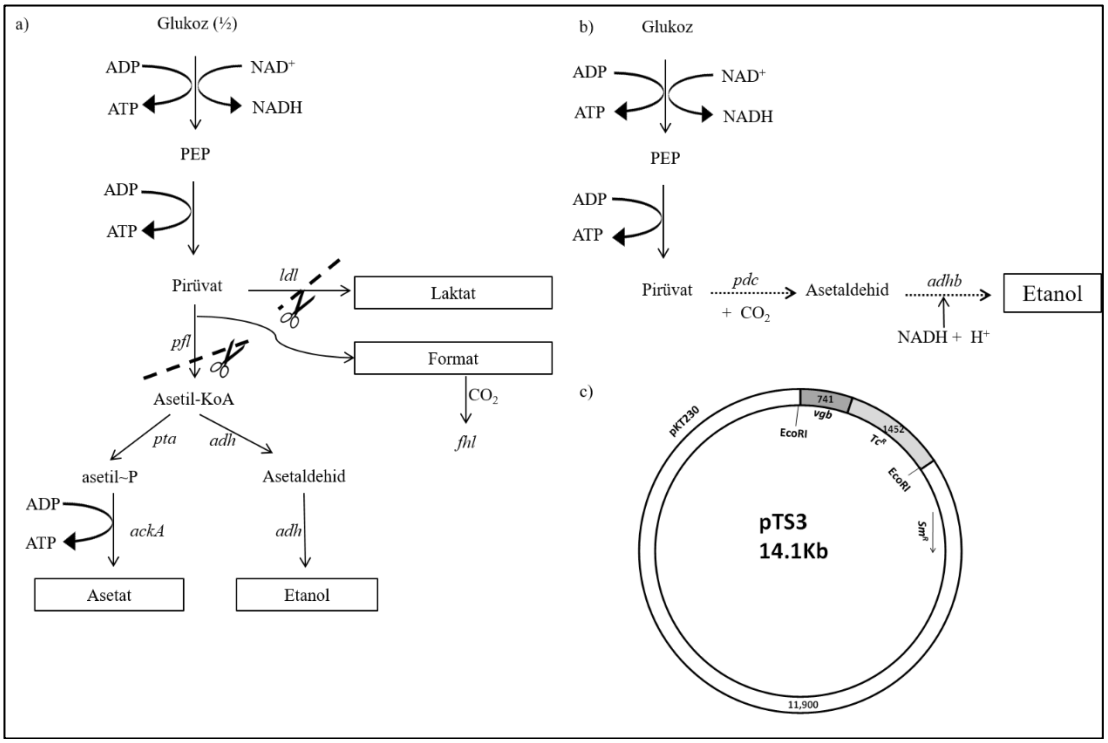
Metabolit	Mikroorganizma	Referans
trans-4-hidroksil-l-pirolin	*E.coli*	Zhao et al., 2017
Rifamisin	*Amycolatopsis mediterranei*	Mejía et al., 2018
Sürfaktin	*Bacillus subtilis*	Wang et al., 2018
β-glukosidaz	*E.coli*	Deng et al., 2018
Lipid	*Yarrowia lipolytica*	Zhang et al., 2019
Tropan alkaloidler	*Hyoscyamus niger*	Guo et al., 2018
Yağ asidi	*E.coli*	Liu et al., 2017
Bakteriyel Selüloz	*Gluconacetobacter xylinus*	Liu et al., 2018
2,3-butanediol	*Klebsiella oxytoca*	Jeong et al., 2015
Etanol	*E.coli*	Sanny et al., 2010

2.4.3. *Vitreoscilla* Hemoglobini Exprese Eden *E.coli* Suşlarının Geliştirilmesi

E.coli pentoz ve laktoz olmak üzere birçok farklı şekeri fermente edebilmesinden dolayı, etanol üretimi için alternatif bir mikroorganizmadır. Bu kapsamda, etanol üretim genlerinin *E.coli*'ye transforme edilmesiyle *E.coli* FBR5 [Dien et al., 2000] ve etanol üretiminin arttırılması için bakteriyel hemoglobin geninin de aktarılmasıyla *E.coli* TS3 suşu elde edilmiştir [Sanny et al., 2010].

E.coli FBR5 ve TS3 suşlarınn geliştrilmesi için ilk yapılan çalışmalar, karbon kaybına neden olan doğal fermantasyon yol izlerinin susturulması ile *E.coli* NZN111 suşunun oluşturulmasıdır. NZN111 suşu piruvattan laktik asit, asetat ve formik asit üretimi ile ilgili laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve piruvat format liyaz (*pfl*) genlerinin

homolog rekombinasyonla antibiyotik direnç genlerinin eklenerek susturulması ile elde edilmiştir (Şekil 2.3a). Elde edilen NZN111 suşuna, *Zymomonas mobilis*'e ait etanol üretimi ile ilgili genleri (piruvat dekarboksilaz; *pdc* ve alkol dehidrogenaz II; *adhb*) taşıyan pLOI297 plazmidi [Ingram et al., 1987] ile transformasyonu sonucu sağlanmış ve elde edilen yeni suş *E.coli* FBR5 olarak ifade edilmiştir (Şekil 2.3a) [Dien et al., 2000]. Daha sonraki çalışmalarda, *E.coli*'nin etanol üretimi için yine *Z.mobilis*'in *pdc* ve *adhb* genlerini taşıyan plazmidle (pLOI297) *vgb* genini taşıyan başka bir plazmitin (pKT230; Şekil 2.3b) *E.coli* NZN111'e klonlanması ile *E.coli* TS3 suşu elde edilmiş ve daha etkili etanol üretimi sağlanmıştır [Sanny, 2009], [Sanny et al., 2010].



Şekil 2.3: Etanol üretiminin arttırılması için a) laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve piruvat format liyaz (*pfl*) genlerinin susturulması, b) ve c) etanol üretim genleri (*pdc* ve *adhb)* taşıyan pLOI297 plazmidinin oluşturulması, c) TS3 suşunun geliştirilmesinde kullanılan *vgb* taşıyan pKT230 (pTS3) plazmidi.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bakteri suşları

Bu tez çalışmasında, etanol üreticisi *E.coli* FBR5 (*pdc* ve *adhb* genlerini kodlayan pLOI297 plazmidi ile transforme edilen NZN111 suşu) ve *E.coli* TS3 (*vgb* genini kodlayan pKT230 plazmidi ile transforme edilen FBR5 suşu) suşları kullanıldı [Dien et al., 2000], [Sanny et al., 2010].

3.2. Fermantasyon Ortamlarının Hazırlanması

- Peynir Altı Tozu Solüsyonu Hazırlanması

Peynir altı suyu tozu Bahçıvan Gıda A.Ş. (Kırklareli, Türkiye)'den temin edildi. 128 gram peynir altı suyu tozu 400 mL distile su ile karıştırıldı ve 121°C'de 15 dakika süre ile ısıtılarak (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) steril hale getirildi. Elde edilen karışım soğuduktan sonra 10000 rpm (15344 x *g*) hızında 10 dakika süre ile santrifüj edilerek (Beckman Coulter, Allegra™ 25R, Krefeld, Almanya) safsızlıklardan arındırıldı ve peynir altı tozu solüsyonu elde edildi [Özmıhçı ve Kargı, 2009'dan adapte edilmiştir]. Elde edilen peynir altı tozu solüsyonu farklı oranlarda laktoz içerecek şekilde fermantasyon ortamların hazırlanmasında kullanıldı.

- Fermantasyon Ortamlarının Hazırlanması

Tez çalışması dahilinde biyoetanol üretiminin değerlendirilmesi amacıyla 9 farklı fermantasyon (WP1-WP9) ortamı hazırlandı (Tablo 3.1). Fermantasyon ortamları peynir altı tozu solüsyonu ile farklı oranlarda laktoz (%3-15; w/v) içerecek şekilde hazırlanarak bu fermantasyon ortamlarına farklı oranlarda maya özütü (%0.3 ve %0.5; w/v) ilave edildi. Ayrıca hazırlanan tüm besi ortamlarına $CaCl_2$ (%0.5 w/v) ilave edildi. Farklı besi ortamlarının pH değerleri steril koşullar altında 10N NaOH ile pH 7.0 (Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D.) olacak şekilde ayarlanarak 10000 rpm (15344 x *g*) hızında 10 dakika süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı kısım fermantasyon ortamı olarak değerlendirildi. Fermantasyon

ortamlarına, daha sonra FBR5 suşu için ampisilin (100 µg/mL), TS3 suşu için ise ampisilin (100 µg/mL) ve streptomisin (50 µg/mL) antibiyotikleri ilave edildi.

Tablo 3.1: Biyoetanol üretiminin değerlendirilmesi için hazırlanan ve değerlendirilen fermantasyon besi ortamları.

Fermantasyon Besi Ortamı	Besiyeri bileşenleri		
	Laktoz (%)	Maya Özütü (%)	$CaCl_2$ (%)
WP1	3	0.3	0.5
WP2	3	0.5	0.5
WP3	5	0.3	0.5
WP4	5	0.5	0.5
WP5	8	0.3	0.5
WP6	8	0.5	0.5
WP7	10	0.5	0.5
WP8	12	0.5	0.5
WP9	15	0.5	0.5

3.3. Stok Kültürlerin Pasajlanması

E.coli FBR5 ve TS3 suşlarının pasajlanmasi için ksiloz (%8 w/v) içeren LB agar (10 g/L pepton, 5 g/L maya özütü, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar; pH 7.0) ortamı hazırlandı. LB agar ortamlarına ayrıca FBR5 (100 µg/mL ampisilin) ve TS3 (100 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL streptomisin) suşları için uygun antibiyotikler ilave edildi. *E.coli* suşları ksiloz ve antibiyotik içeren LB agar besiyerlerine öze yardımıyla inoküle edilerek 37°C sıcaklıkta, 16-18 saat süre ile (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kültürler 4°C sıcaklıkta saklanarak en az 15 günde bir pasajlandı.

3.4. Ön Kültürlerin Hazırlanması

E.coli suşlarının (FBR5 ve TS3) ön kültür ortamlarının hazırlanması için 100mL erlenmayerler içerisinde uygun antibiyotik içeren 10mL besi ortamları (WP1-WP9) aktarıldı. Hazırlanan ortamlara *E.coli* suşlarından 1 veya 2 koloni inoküle edilerek 37°C sıcaklıkta, 16-18 saat süre ile 180rpm hızda (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen Almanya) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyütülen kültürler

hem immobilizasyon için hem de fermantasyon denemelerinde serbest hücre olarak kullanıldı.

3.5. Hücre İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, kalsiyum-aljinat yöntemine göre uygulandı. Sodyum aljinat (Sigma Aldrich, İngiltere) bir ekim kabini içerisinde 30 dakika süre ile UV ışığı kullanılarak steril edildi [Sar et al., 2017a], [Sar et al., 2017b]. Sodyum aljinat (%6, w/v) çözeltisi hazırlanırken, yığın oluşumunu engellemek için manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan steril saf suya toz haldeki sodyum aljinat azar azar ilave edildi ve çözünmeyi sağlamak için karıştırma sürekli devam edildi.

İnkübe edilen ön kültürlerin OD 600nm değeri 0.8 olacak şekilde 40mL NaCl solüsyonu (%0.9, w/v) ile sulandırıldı ve 4000 rpm hızında 15 dakika süre ile santrifüj edilerek hücre yoğunluğu elde edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre yoğunluğu sırasıyla 20mL NaCl solüsyonu (%0.9, w/v) ve 20mL sodyum aljinat (%6, w/v) çözeltisi ile karıştırıldı. Hücre içeren aljinat solüsyonu (son aljinat oranı %3, w/v) 250mL steril $CaCl_2$ solüsyonuna (1M) şırınga (3P 21G 0.80 x 38 mm) ile damlatılmasıyla yaklaşık 3 mm çapında boncuk yapıda immobilize hücreler elde edildi. Oluşan boncuklar 30 dakika boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Boncuklar $CaCl_2$ solüsyonundan toplandı ve NaCl solüsyonu (%0.9, w/v) ile yıkandı. Elde edilen boncuklar glukoz (%0.2, w/v) ve maya özütü (%0.2, w/v) içeren bir solüsyonda, bir gece +4°C'de saklandı. Ayrıca, $CaCl_2$ solüsyonundan LB agara 100µL yayma ekim yapılarak, immobilizasyon aşamasında tutuklanmayan hücre sayısı tespit edildi.

3.6. Fermantasyon denemeleri

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri farklı koşullarda değerlendirildi.

- Farklı laktoz konsantrasyonları ile çalkalamalı kültürlerde fermantasyon denemeleri

Biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak peynir altı tozunun etkisinin belirlenmesi için farklı oranlarda laktoz (%3-15) içerecek şekilde hazırlanan peynir altı tozu besiyerleri (WP1-WP6 ve WP9) kullanıldı. Ayrıca, etanol üretiminin arttırılmasında VHb teknolojisinin ve immobilizasyonun etkilerini incelemek için sırasıyla *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile immobilize ve serbest hücreler karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi.

Fermantasyon denemeleri 400mL besiyeri içeren 500mL erlenmayerler kullanılarak çalkalamalı inkübator koşullarında gerçekleştirildi. Hazırlanan fermantasyon ortamlarına *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarından OD_{600} değeri 0.8 yoğunluğuna eş değer ön kültürlerden 1mL ilave edildi. İmmobilize hücreler için ise yine OD_{600} değeri 0.8 yoğunluğuna eş değer olacak şekilde 40 adet boncuk kullanıldı. Bu bölümde gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri 37°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullarında, 24 saat aralıklarla toplam 96 saat süre ile inkübe edildi.

- Fermentör koşullarında fermantasyon denemeleri

Bu bölümde, serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile biyoetanol üretimi, 2 litre kapasiteli bir fermentör (Biostat B plus Sartorius, Gottingen, Almanya) ortamında gerçekleştirildi. Fermentör kullanarak gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde, çalkalamalı kültürlerde en iyi etanol üretiminin belirlendiği WP6 (%8 laktoz) besiyeri kullanıldı. Ayrıca, yüksek laktoz konsantrasyonu ile etanol üretiminin fermentör koşullarındaki etkisini belirlemek için WP9 (%15 laktoz) besiyeri de kullanıldı.

Fermentör uygulaması için 1600 mL besi ortamına (pH 7.0) serbest hücre için 4mL önkültür (OD_{600} = 0.8), immobilize hücre için ise 160 boncuk (OD_{600} = 0.8) inoküle edildi. Fermentör sisteminde çözünmüş oksijen probu (DO) ve pH elektrodu kullanıldı. İnkübasyon sırasında %10 köpük önleyici solüsyon (antifoam A solution; Sigma Chemical Compony, St. Lois, MO) kullanıldı. Havalandırma, fermentör haznesinin tabanının 2 cm üzerine monte edilmiş paslanmaz çelik hava filtresinden 1 vvm (1 L/dak) oranında sürekli olarak fermantasyon ortamına beslemeyle sağlandı. Fermentör koşulları 37°C'de, 180 rpm çalkalamalı koşullarında, 24 saat aralıklarla toplam 96 saat süre ile inkübe edildi.

- İmmobilize *E.coli* suşları ile tekrarlı fermantasyon denemeleri

İmmobilize hücrelerin kullanım etkinliğinin belirlenmesi için çalkalamalı kültürlerde en iyi etanol üretiminin belirlendiği WP6 (%8 laktoz) besi ortamında tekrarlı fermantasyon denemeleri gerçekleştirildi. Fermantasyon denemeleri 500mL erlenmayer içerisinde 400mL besiyeri olacak şekilde çalkalamalı inkübatör koşullarında gerçekleştirildi. WP6 besi ortamına *E.coli* suşlarından OD_{600} değeri 0.8 yoğunluğuna eş değer 40 adet boncuk aktarıldı ve 37°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullarda, 96 saat süre ile inkübe edildi. İnkubasyon sonrası boncuklar toplanarak NaCl solüsyonu (%0.9 w/v) ile yıkandı ve tekrardan taze WP6 besiyerine aktarıldı. Bu koşullarda immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları 15 tekrarlı fermantasyon süresince inkübe edildi.

- İmmobilize *E.coli* suşlarının uzun süre depo edilmesi ve tekrarlı fermantasyonlarda kullanılması

İmmobilize edilen *E.coli* suşları iki farklı saklama solüsyonunda (SS1 ve SS2) 60 gün süre boyunca +4°C'de depo edildi. Saklama solüsyonu 1 (SS1), glukoz (%0.2, w/v) ve maya özütü (%0.2, w/v) içerecek şekilde hazırlandı [Ghorbani et al., 2011]. Saklama solüsyonu 2 (SS2)'de ise, $CaCl_2$ (%2, w/v) kullanıldı [Duarte et al., 2013].

Çalkalamalı kültürlerde en iyi etanol üretiminin belirlendiği WP6 besiyerinin 400mL'si 500mL hacimli erlenmayerler içerisine ilave edilerek fermantasyon ortamları hazırlandı. Depo edilen immobilize *E.coli* suşları 15 gün aralıklar ile WP6 besiyerine aktarıldı ve 37°C'de, 180 rpm çalkalamalı koşullarında, 96 saat süre ile inkübe edildi. Ayrıca, 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize *E.coli* suşları fermantasyon denemeleri sonrası toplandı ve NaCl solüsyonu (%0.9, w/v) ile yıkandı. Ardından boncuklar taze WP6 besiyerine aktarılarak 8 tekrarlı fermantasyon süresince inkübe edildi.

- İmmobilize hücrelerin farklı inokulum miktarları ile fermantasyon denemeleri

Bu bölümde immobilize hücrelerin inokulum etkisinin (%5-30) belirlenmesi için *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile farklı fermantasyon ortamları kullanıldı (WP6-WP9). 100mL erlenmayerler içerisinde inokulum oranı ile ilişkili olarak farklı miktarlarda besiyerleri ilave edildi. %5 inokulum oranı için 40 boncuk ve 76mL besiyeri, %10 inokulum oranı için 80 boncuk ve 72mL besiyeri, %20 inokulum oranı

için 160 boncuk ve 64mL besiyeri, %30 inokulum oranı için ise 240 boncuk ve 56mL besiyeri kullanıldı. Hazırlanan kültür ortamları 37°C'de, 180 rpm çalkalamalı koşullarında, 72 saat süre ile inkübe edildi.

3.7. Analiz Yöntemleri

Fermantasyon sonrası kültürlerin pH değerleri, OD_{600nm} değerleri, VHb miktarları (nmol/g), üretilen etanol miktarı (% v/v) ve kültür ortamında kalan şeker miktarları (% w/v) belirlendi.

- pH değerlerin ölçümü

Kültürlerin pH değerleri, bir pH metre (Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor, Michigan, A.B.D.) kullanılarak belirlendi.

- Toplam hücre sayısı ölçümü

Fermantasyon sonrasında hücre sayımları, bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800 UV-VIS, Kyoto, Japonya) kullanılarak belirlendi. Kültürlerin OD_{600nm}'deki optik yoğunlukları 0.6 değerini aşmayacak şekilde steril özgün besi ortamı ile seyreltilerek belirlendi. Optik yoğunluğun belirlemesinde kör olarak kültüre özgün steril besi ortamı kullanıldı.

- VHb miktarı ölçümü

Vgb içeren rekombinant *E.coli* TS3 suşunun ürettiği VHb miktarı dityonit (sodyum hidrosülfat) eklenerek 400-500 nm dalga boyları arasında indirgenmiş-indirgenmemiş fark spektrasına göre (UV-1800 Schimadzu UV-VIS NIR Spektrometresi) belirlendi [Webster and Liu, 1974].

VHb miktarının belirlenmesi için, hücre kültürleri 4000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile santrifüj edilerek (Awel MF48-R, A.B.D.) hücrelerin çökmesi sağlandı. Elde edilen hücre yoğunluğu 30 ng/mL olacak şekilde fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5) ile sulandırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonları buz kap içerisinde bir sonikatör (Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D.) yardımı ile 20 saniyelik vurma ve 10 saniyelik bekleme süreleri ile 6 defa (toplamda 3 dakika) sonike edildi. Elde edilen hücre homojinatları

4°C sıcaklıkta 4000 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Ardından elde edilen üst sıvılar VHb miktarı tayini için kullanıldı. Kör olarak dityonit ile muamele edilmeyen üst sıvılar kullanıldı. Ölçümler 400-500 nm aralığında yapılarak, VHb'nin ditiyonitle indirgendiğinde karakteristik olarak verdiği 416 ve 430 nm dalga boyları arasındaki fark spektrumundan VHb miktarı nmol/g olarak hesaplandı.

- Etanol ve şeker miktarı ölçümü

İnkübasyon sonrası üretilen etanol miktarı ve besi ortamında kalan şeker yoğunluğu Refraktif İndeks Dedektörü (RID) içeren bir HPLC (Shimadzu, LC-20A, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi, Kyoto, Japonya) sisteminde belirlendi.

Kültür ortamından alınan örnekler, 4°C, 10000 rpm hızda, 10 dakika süre ile santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırıldı. Elde edilen üst sıvı, 0.22 µm por çaplı selüloz filtreden geçirildi ve HPLC viallerine aktarıldı. Yürütücü faz olarak Asetoritril (%60 v/v) solüsyonu kullanıldı ve akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde ayarlandı. 20µL örnek enjeksiyonu ile toplamda 10 dakika süre boyunca, 25°C kolon sıcaklığında ve NH_2 kolonu (Interstil, 5 µm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirildi.

3.8. Verim Hesaplamaları

Fermantasyon sonrası substrat tüketimi ve etanol üretim miktarlarına göre şeker tüketim verimi (%), alkol verimi, teorik alkol verimi (fermantasyon etkinliği, %) ve substrat dönüşüm etkinliği (%) verimleri belirlendi.

Etanol Miktarı (g/L)

$$= \text{Etanol miktarı (\% v/v)} * 7{,}8924 \tag{3.1}$$

Şeker Tütekim Verimi (%) (3.2)

$$= (\text{Tüketilen şeker miktarı (g/L)} \,/\, \text{Toplam şeker miktarı (g/L)}) * 100$$

Alkol Verimi (3.3)

$$= (\text{Etanol miktarı (g/L)} \; / \; \text{Tüketilen şeker miktarı (g/L)}) * 100$$

Teorik Alkol Verimi (Fermantasyon Etkinliği) (3.4)

$$= (\text{Etanol verimi (\%)} / \; 53.8) * 100$$

Substrat Dönüşüm Etkinliği (3.5)

$$= (\text{Etanol miktarı (g/L)} / \; \text{Pat}) * 100$$

Formülde verilen Pat (peynir altı tozu) değeri WP6 için 102.56, WP7 için 128.2, WP8 için 153.84 ve WP9 için ise 192.3 sabit değerleri kullanıldı.

3.9. İstatiksel Analizler

İstatiksel analiz için *P* değerleri Excel 2016 (Microsoft Office) programı kullanılarak belirlendi. *P* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile etanol üretiminin, farklı koşullarda (laktoz konsantrasyonu, inkübasyon süresi, inokulum oranı gibi) *Vitreoscilla* hemoglobini'nin ve immobilizasyonun hem ayrı ayrı hem de bir arada kullanım etkileri ile arttırabileceği hipotezine dayanılarak değerlendirildi. 0.05'e eşit veya 0.05'ten küçük bulunan *p* değerleri anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalkalamalı Kültürlerde Biyoetanol Üretiminde Peynir Altı Tozunun, İmmobilizasyonun ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi

Biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak peynir altı tozunun içerdiği laktoz konsantrasyonlarının etkisinin belirlenmesi için farklı oranlarda peynir altı tozu içeren fermantasyon ortamları hazırlandı. Aynı laktoz konsantrasyonlarına sahip peynir altı tozu içeren besiyerlerine farklı oranlarda (%3 ve %5) maya özütü de ilave edilerek etanol üretiminde maya özütünün etkisi de araştırıldı. Biyoetanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonun etkisinin belirlenmesi için, *E.coli* FBR5 (vgb^-) ve TS3 (vgb^+) suşları, immobilizasyonun etkisinin incelenmesi için ise her 2 suşun serbest ve immobilize formları karşılaştırılarak değerlendirildi. Ayrıca, VHb teknolojisi ve immobilizasyonun bir aradaki kullanımdaki etkisi immobilize TS3 suşu ile belirlendi.

4.1.1. Biyoetanol Üretiminde Peynir Altı Tozu Miktarının (Laktoz Konsantrasyonun) Etkisi

Biyoetanol üretiminde laktoz konsantrasyonun etkisinin belirlenmesi için, %3, %5, %8 ve %15 laktoz konsantrasyonlarında farklı oranlarda peynir altı tozu içeren farklı besi ortamları hazırlandı. %3 laktoz yoğunluğunda (WP1 ve WP2) biyoetanol üretiminin 48 ve 96 saat sonunda genellikle %2 (v/v) oranında olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Laktoz konsantrasyonun artması ile biyoetanol üretiminin de arttığı belirlendi. %5 ile %8 laktoz ortamlarında (WP4 ve WP6) immobilize FBR5 ve TS3 suşları ile 96 saat süre sonunda üretilen etanol miktarının sırasıyla %3.35 ve %3.55 (v/v) olduğu tespit edildi (Şekil 4.1). %5-8 laktoz oranlarında etanol üretimi değerlerinin birbirine yakın olduğu fakat düşük laktoz konsantrasyon ile hazırlanan fermentasyon ortamına göre daha yüksek olduğu belirlendi %8, %10 ve % 12 laktoz konsantrasyonlarında, etanol üretimlerinin birbirine yakın değerler olduğu görüldü. Elde edilen yakın etanol sonuçlarına rağmen %15 laktoz konsantrasyonunda etanol değerlerinin önemli ölçüde azalması nedeni ile çalışmalara %3, %5, %8 ve %15 laktoz konsantrasyonuna sahip peynir altı tozu içeren besiyerleri ile devam edildi.

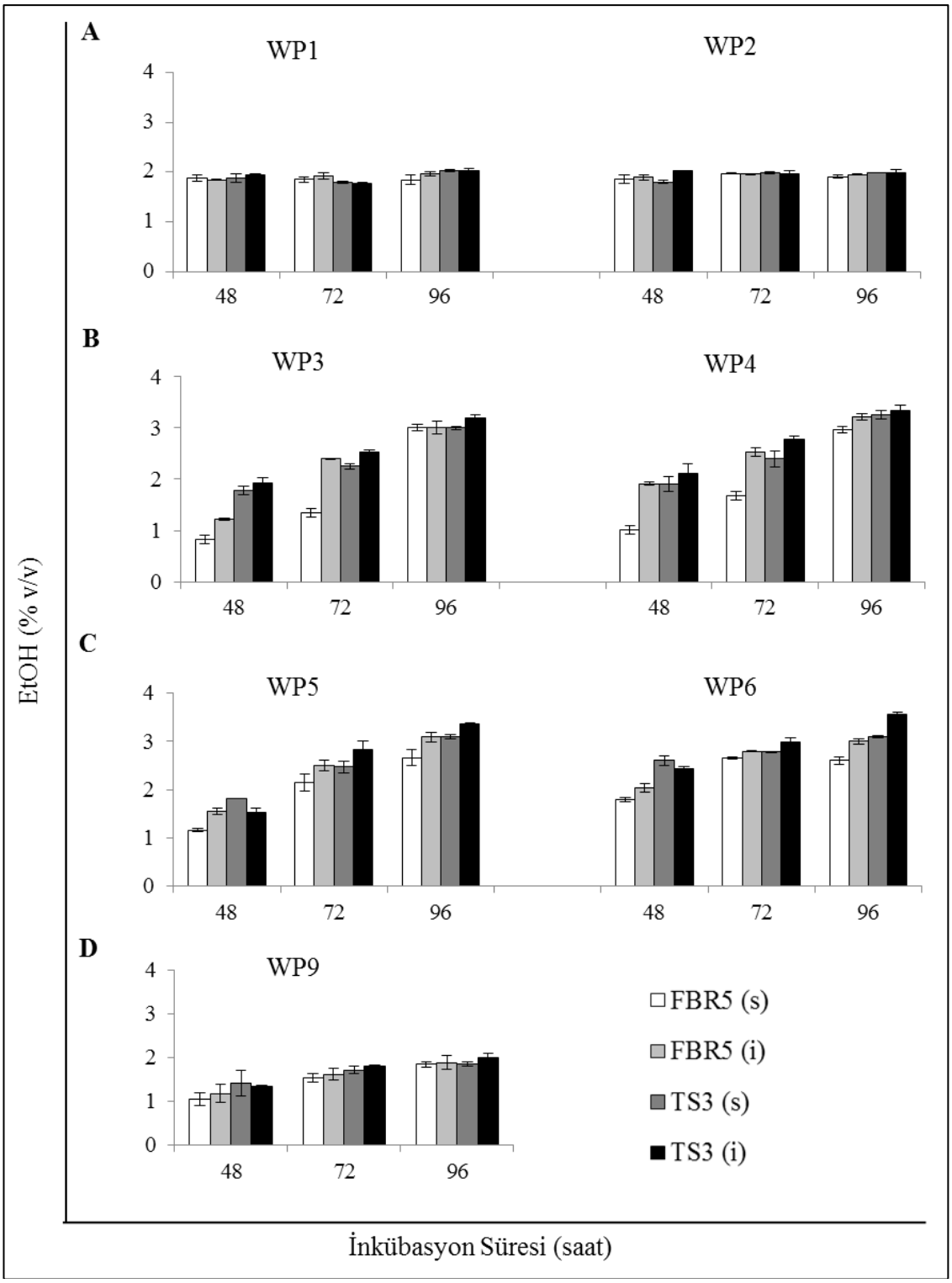
Elde edilen bulgularla, %3-8 laktoz içerecek şekilde hazırlanan besi ortamlarında üretilen etanol seviyeleri ile peynir altı tozunun alternatif bir karbon kaynağı olabileceği belirlendi.

4.1.1.1. Biyoetanol Üretiminde Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında Maya Özütünün Etkisi

Biyoetanol üretiminde laktoz konsantrasyonun etkisinin yanı sıra besiyeri bileşenin etkisi olarak maya özütünün etkisi de incelendi. Maya özütü içermeyen peynir altı besiyerlerinde etanol üretiminin çok düşük olduğu belirlendi (data gösterilmedi). Peynir altı tozu besiyerleri maya özütü ile zenginleştirildiğinde etkili etanol üretiminin gerçekleştiği gözlemlendi. Biyoetanol üretiminde %0.3 ve %0.5 maya özütü konsantrasyonu ilavesinin etkisi incelendiğinde, düşük laktoz (%3) konsantrasyonlarında (WP1-WP2) önemli bir farkın olmadığı belirlendi. %5 ve %8 laktoz konsantrasyonunda ise, %0.5 maya özütü ilavesinin (WP4-WP6) %0.3 ilavesine (WP3 ve WP5) göre biyoetanol üretimini özellikle 48-72 saatlik fermantasyonlarda olumlu etkilediği tespit edildi (Şekil 4.1).

4.1.1.2. Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında Hazırlanan Peynir Altı Tozu İçeren Besiyerlerinde Laktoz Tüketimleri ve Etanol Fermantasyon Verimleri

Düşük laktoz konsantrasyonu (%3; WP1 ve WP2) içerecek şekilde peynir altı tozu ile hazırlanan besi ortamlarında serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile 48 saat fermantasyon sonrasında laktozun tamamen tükendiği belirlendi. Laktoz konsantrasyonu %5 olacak şekilde peynir altı tozu ile hazırlanan WP3 ve WP4 besi ortamlarında serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile ise 96 saat fermantasyon sonrasında laktozun tamamen tükendiği belirlendi. %8 laktoz oranında hazırlanan WP5 ve WP6 besiyerleri ile 96 saat fermantasyon sonrasında laktoz tüketiminin genel olarak %70-80 arasında olduğu belirlendi. Peynir altı tozu ile yüksek laktoz konsantrasyonu (%15, WP9) ile hazırlanan fermantasyon ortamında 96 saat inkübasyon sonrasında laktozun %42-58-oranlarında tükendiği görüldü (Tablo 4.1).



Şekil 4.1: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8 ve D; %15) ve farklı konsantrasyonlarda maya özütü (%0.3 ve %0.5, w/v) içeren besiyerlerinde (WP1-WP6 ve WP9) biyoetanol üretimi. Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Tablo 4.1: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3, %5, %8 ve %15) hazırlanan (WP1-WP6 ve WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası kültürlerin laktoz tüketim verimi değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Laktoz Tüketim Verimi (%)								
Suşlar	Süre (saat)	Besiyeri						
		WP1	WP2	WP3	WP4	WP5	WP6	WP9
FBR5 (s)	48	100 (0)	100 (0)	44 (1)	55 (6)	37 (5)	58 (4)	43 (2)
	72	100 (0)	100 (0)	57 (2)	60 (5)	80 (2)	81 (2)	48 (2)
	96	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	88 (6)	84 (5)	67 (3)
FBR5 (i)	48	100 (0)	100 (0)	45 (0)	65 (6)	41 (2)	48 (1)	42 (3)
	72	100 (0)	100 (0)	87 (1)	88 (2)	67 (1)	80 (0)	51 (4)
	96	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	73 (1)	82 (2)	73 (2)
TS3 (s)	48	100 (0)	100 (0)	64 (0)	72 (1)	34 (1)	55 (0)	51 (3)
	72	100 (0)	100 (0)	75 (7)	74 (3)	58 (2)	59 (2)	57 (4)
	96	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	80 (5)	82 (5)	58 (4)
TS3 (i)	48	100 (0)	100 (0)	60 (0)	82 (2)	35 (1)	53 (0)	43 (4)
	72	100 (0)	100 (0)	77 (1)	91 (1)	54 (1)	56 (1)	56 (2)
	96	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	74 (1)	77 (1)	58 (2)

Peynir altı tozu ile hazırlanan besi ortamları ile biyoetanol üretim etkinliği incelendiğinde, %3 laktoz ortamlarında (WP1 ve WP2) *E.coli* suşları ile laktozun tamamen tükendiği ve etanol üretim etkinliğinin 48, 72 ve 96. saatler sonunda genel olarak %90 ve üzerinde olduğu belirlendi. %5 laktoz ortamlarında (WP3 ve WP4) fermantasyon etkinliğinin inkübasyon süresinin artması ile daha etkin olduğu ve 96 saat fermantasyon süresi sonrasında %90 seviyesine ulaştığı gözlemlendi. %8 laktoz ortamlarında (WP5 ve WP6) da benzer olarak inkübasyon süresinin artması ile fermantasyon veriminin de arttığı belirlendi. Yüksek laktoz konsantrasyonda (%15, WP9) ise teorik alkol veriminin genel olarak düşük olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

%3-8 laktoz konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde (WP3-WP8) bütün *E.coli* suşları ile laktozun tüketilebildiği ve etkin bir şekilde etanol üretiminin gerçekleştiği tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla, biyoetanol üretiminde laktoz kaynağı olarak peynir altı tozunun etkin bir şekilde kullanılabileceği görüldü.

4.1.1.3. Kültürlerin pH Değerleri

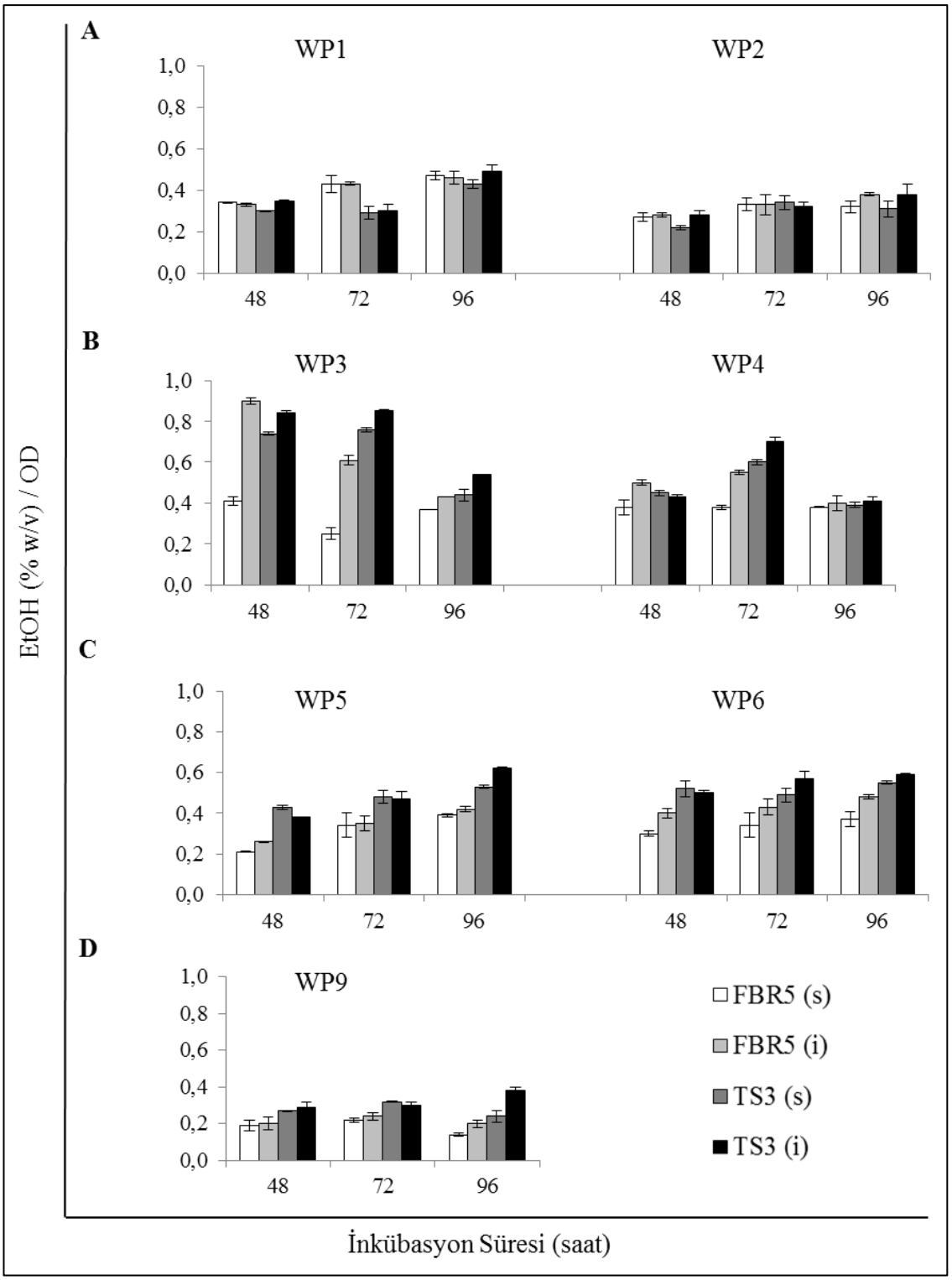
Tüm fermantasyon ortamların başlangıç pH değerleri 10N NaOH ile 7.0 olacak şekilde ayarlandı. Fermantasyon sonrası besi ortamlarının pH değerleri genel olarak 5.00 ile 5.60 arasında olduğu belirlendi (data gösterilmedi).

4.1.2. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun Etkisi

Biyoetanol üretiminde immobilize hücrelerin etkisinin belirlenmesi için, fermantasyon ortamlarına başlangıç hücre miktarı eşit olacak şekilde serbest ve immobilize formdaki hücreler ayrı ayrı inoküle edildi. Düşük laktoz konsantrasyonlarında etanol üretiminin tüm koşullarda eşit miktarda üretildiğinden dolayı immobilizasyon etkinliği belirlenemedi. Laktoz konsantrasyonu %5 ve %8 oranlarına arttırıldığında, immobilize *E.coli* suşlarının (FBR5 ve TS3) 96 saat süre sonundaki etanol üretimlerinin, serbest hücrelere göre %20'ye varan oranda daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.1). Bu sonuç, immobilizasyonun etanol üretimi için şeker tüketiminin daha etkin olmasını sağladığını ve böylelikle teorik alkol veriminin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 4.1, Tablo 4.2). Ayrıca, birim biyokütle başına düşen etanol miktarının immobilize hücreler ile daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol değerlerinin immobilizasyonla ve artan fermentasyon süresi ile genellikle (WP3 ve WP4 besiyerleri ile bazı fermentasyon süreleri sonunda elde edilenler dışında) arttığı saptandı.

Tablo 4.2: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (%3, %5, %8 ve %15) ile hazırlanan (WP1-WP6, WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası kültürlerin teorik alkol verim değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Teorik Alkol Verimi (%)								
Suşlar	Süre (saat)	Besiyeri						
		WP1	WP2	WP3	WP4	WP5	WP6	WP9
FBR5 (s)	48	91 (4)	89 (4)	54 (2)	54 (7)	58 (1)	56 (6)	24 (4)
	72	89 (3)	95 (0)	69 (5)	82 (3)	48 (1)	61 (1)	32 (3)
	96	98 (5)	93 (1)	84 (2)	87 (2)	56 (8)	69 (2)	26 (5)
FBR5 (i)	48	89 (0)	91 (3)	80 (5)	85 (1)	63 (3)	73 (3)	28 (3)
	72	96 (1)	97 (1)	80 (1)	86 (2)	64 (3)	65 (3)	30 (2)
	96	98 (1)	95 (0)	89 (1)	93 (3)	74 (2)	71 (5)	24 (1)
TS3 (s)	48	91 (1)	87 (1)	80 (0)	78 (1)	97 (4)	87 (1)	28 (2)
	72	87 (3)	97 (3)	87 (3)	95 (8)	78 (1)	86 (1)	30 (3)
	96	99 (2)	97 (0)	87 (4)	95 (2)	71 (2)	76 (5)	32 (3)
TS3 (i)	48	95 (3)	99 (9)	93 (7)	76 (3)	78 (1)	84 (1)	30 (2)
	72	87 (1)	97 (3)	97 (2)	89 (7)	97 (3)	99 (3)	32 (4)
	96	99 (2)	97 (2)	93 (2)	90 (3)	84 (1)	84 (2)	33 (2)



Şekil 4.2: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8, D; %15) hazırlanan (WP1-WP6, WP9) besiyerlerinde fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarları (EtOH (w/v) / OD). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

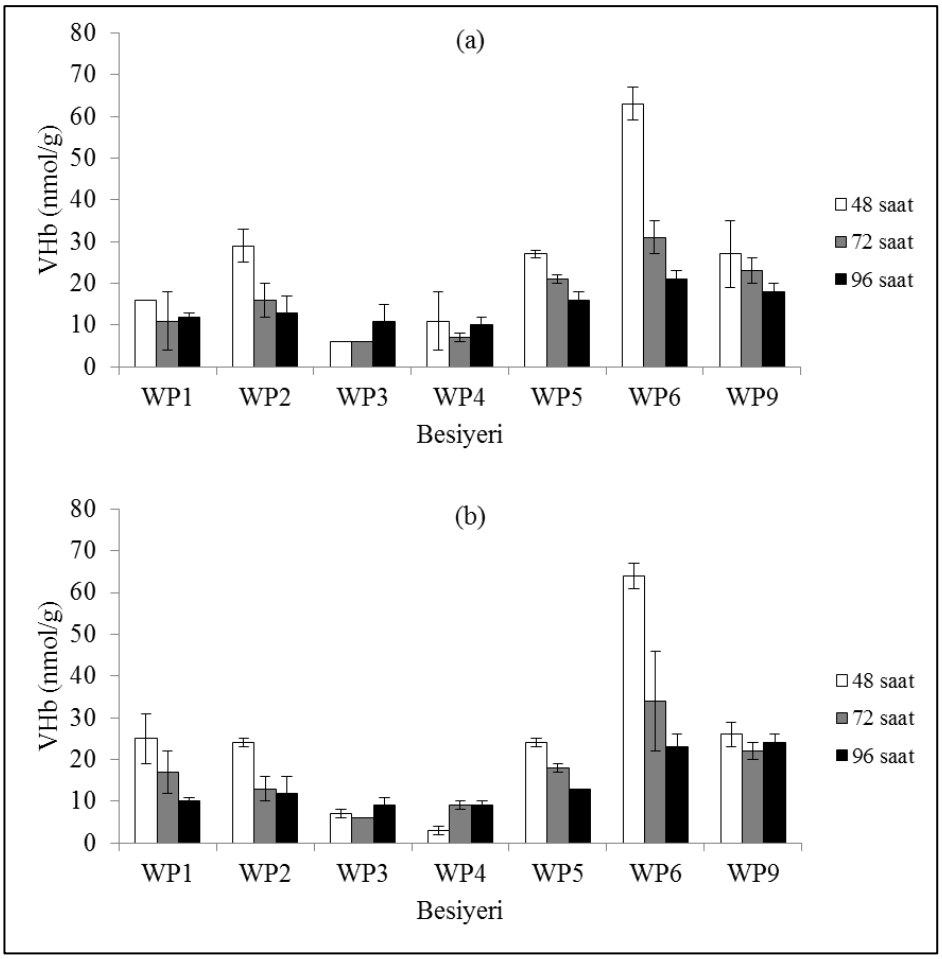
4.1.3. Biyoetanol Üretiminde *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi

E.coli FBR5 ve TS3 suşları ile 96 saat inkübasyon sonrası düşük laktoz (%3 ve %5) yoğunluğunda üretilen biyoetanol miktarları birbirine yakınken, %8 laktoz içeren WP5 ve WP6 besi ortamında etanol üretim miktarının, TS3 suşu (vgb^+) ile genel olarak %8-19 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Birim biyokütle başına düşen etanol miktarlarının da WP5 ve WP6 besiyerlerinde yine TS3 suşu ile genel olarak %23-48 daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.2). Böylece peynir altı tozu ile hazırlanan fermantasyon ortamları ile etanol üretiminde *vgb*/VHb sisteminin de etkili olabileceği belirlendi.

4.1.4. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Etkisi

Farklı fermantasyon ortamları ile biyoetanol üretimi miktarı değerlendirildiğinde, en yüksek etanol üretiminin immobilize *E.coli* TS3 suşu ile sağlandığı tespit edildi. En fazla etanol üretim miktarının, WP6 besiyerinde (%8 laktoz), VHb ekspresyonu yapan TS3 suşu ile 3.55 (v/v) oranında olduğu ve bu etanol miktarının FBR5 suşuna göre %18 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Benzer olarak immobilize *E.coli* TS3 suşu ile birim biyokütle başına düşen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %23 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Genel olarak farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3-8) elde edilen en yüksek teorik alkol verimlerinin hem VHb'nin ekspresyonunun hem de VHb ekspresyonu ile immobilizasyon sisteminin birlikte kullanıldığında (özellikle WP6 besiyerlerinde %99'a varan oranda) sağlandığı belirlendi, (Tablo 4.2). Bu sonuçlar ile biyoetanol üretiminde hem immobilizasyonun hem de *Vitreoscilla* hemoglobininin olumlu etkilerinin olduğu görüldü.

Serbest ve immobilize TS3 suşunun farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3, %5, %8 ve %15) hazırlanan (WP1-WP6, WP9) besiyerlerinde 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyonlar sonrası eksprese edilen VHb miktarları 22-63 nmol/g arasında olduğu tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Serbest (a) ve immobilize (b) TS3 suşu ile farklı laktoz konsantrasyonlarında (A; %3, B; %5, C; %8, D; %15) hazırlanan (WP1-WP6; WP9) besiyerlerinde 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyonlar sonundaki eksprese edilen VHb miktarları (nmol/g). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.2. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyonun Kullanım Etkinliğinin İncelenmesi

4.2.1. İmmobilize Hücrelerin Biyoetanol Üretiminde Farklı Laktoz Konsantrasyonlarının Etkisi

İmmobilize *E.coli* soylarının artan laktoz konsantrasyonlarında etanol üretim değerlerinin ve birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarlarının arttığı belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2). İmmobilize hücrelerin 96 saat fermantasyon sonrası %3 laktoz ortamında serbest hücrelerle eşit bir şekilde (%2 oranında) etanol üretebildiği, %5 laktoz ortamında serbest hücrelere göre etanol üretiminde %3 ile %10 arasında artış sağladığı, %8 laktoz ortamında ise yine serbest hücrelere göre

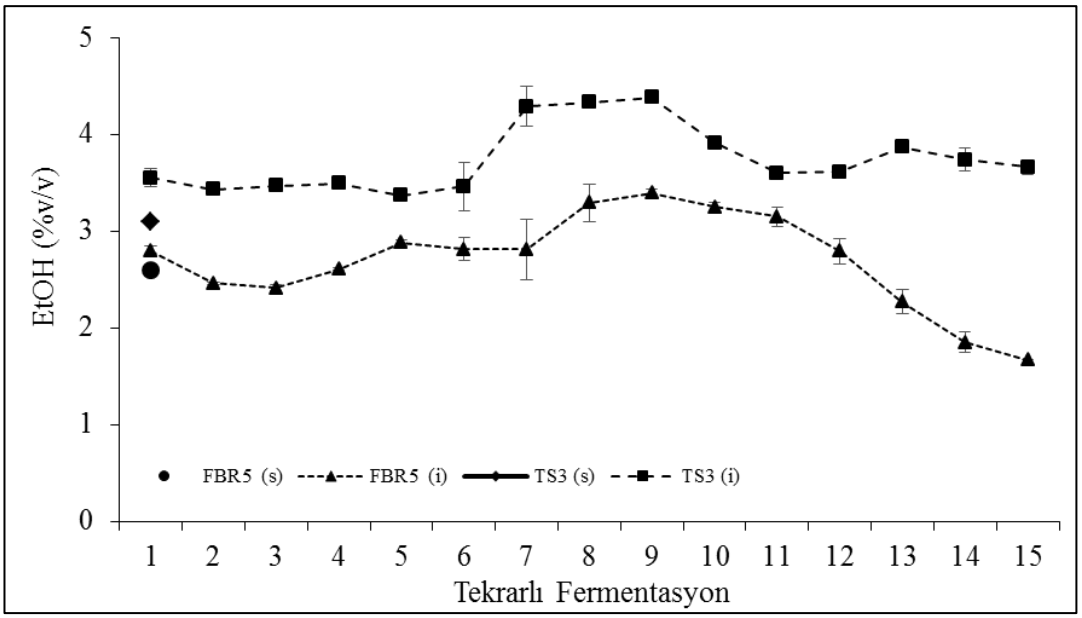
%17 oranına varan etanol üretimi artışı sağladığı saptandı. Laktoz oranının artması ile immobilize hücrelerin serbest hücrelere göre daha etkin etanol ürettiği tespit edildi. Laktoz oranının %15'e arttırılması ile etanol üretiminin önemli ölçüde azaldığı yine de immobilize hücrelerin serbest hücrelere göre %2-%8 daha fazla etanol ürettiği belirlendi (Şekil 4.1).

Farklı laktoz ortamlarında FBR5 ve TS3 suşları ile etanol üretiminin immobilizasyon ile daha fazla olduğu belirlendi. Ayrıca immobilize *E.coli* suşları ile etanol üretim miktarları ve serbest hücrelere göre etanol üretiminin artış değerleri incelendiğinde en etkili besi ortamının %8 laktoz içeren WP6 olduğu belirlendi. Bu nedenle, immobilize hücrelerin tekrarlı kullanımı ve depo edilebilir özellikleri gibi immobilizasyonun kullanım etkinliğinin incelenmesi için yapılan sonraki çalışmalar WP6 besi ortamı kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.2. İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Fermantasyonda Kullanımı

İmmobilize hücrelerin tekrarlı fermantasyondaki etkilerinin belirlenmesi için, FBR5 ve TS3 suşları, erlenmayerler kullanılarak WP6 besiyerinde 96 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası immobilize boncuklar toplanarak steril distile su ile yıkandı ve yeniden taze WP6 besiyerine aktarıldı. Bu şekilde, immobilize hücreler kullanılarak toplam 15 tekrarlı fermantasyon gerçekleştirildi (Şekil 4.4). Ayrıca, immobilize hücreler, iki farklı saklama solüsyonunda 60 gün süre +4°C'de depo edilerek, farklı sürelerde ve iki farklı saklama solüsyonunda depo edilen immobilize hücrelerin etanol üretimindeki etkinlikleri incelendi.

Tekrarlı fermantasyon denemelerinin ilk altı fermantasyonunda, hem FBR5 (%2.41-%2.88, v/v) hem de TS3 (%3.37-%3.55, v/v) suşların etanol üretimlerinin birinci inkübasyon sonrası üretilen etanol değerine yakın ve stabil olduğu görüldü. Yedinci fermantasyon sonrasında her 2 suşun da etanol üretiminin arttığı ve etanol üretiminin FBR5 suşu ile %3.39 (v/v), TS3 suşu ile ise %4.38 (v/v) değerine ulaştığı belirlendi. Elde edilen bu etanol miktarlarının birinci fermantasyon değerlerine göre sırasıyla %30 ve %40 daha fazla olduğu belirlendi. On birinci fermantasyon sonrası ise FBR5 suşunun etanol üretiminin kademeli olarak azaldığı (%3.25'den %1.67'ye, v/v), TS3 suşunun etanol üretiminin değişmediği (%3.60-%3.67, v/v) ve ilk 6 fermantasyon değerleri ile benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı. Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

15 tekrarlı fermantasyon denemeleri sonrasında, TS3 suşunun FBR5 suşuna göre daha fazla etanol ürettiği (%14-%119 daha fazla olacak şekilde) görüldü. Benzer olarak TS3 suşunun alkol veriminin de FBR5 suşuna göre %7-%95 kadar daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 4.3). Substrat dönüşüm verimi ile EtOH/OD değerlerinin VHb eksprese eden *E.coli* TS3 suşu ile daha yüksek olduğu görüldü. On beş tekrarlı fermantasyon sonucunda FBR5 suşuna göre TS3 suşunun teorik alkol veriminin %5-%93 daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.3, Tablo 4.4).

Tekrarlı fermantasyon sonrası elde edilen sonuçlar ile biyoetanol üretiminde immobilize *E.coli* suşları ile 15 tekrarlı fermantasyonun gerçekleşebildiği ve biyoetanol üretiminde immobilizasyonun etkin olarak kullanılabileceği belirlendi.

Tablo 4.3: İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Tekrarlı Fermantasyon	Substrat Dönüşüm Verimi (%)		Teorik Alkol Verimi (%)	
	FBR5	TS3	FBR5	TS3
1	23 (1)	27 (1)	71 (5)	84 (2)
2	19 (0)	26 (0)	50 (0)	71 (1)
3	19 (0)	27 (0)	50 (0)	71 (2)
4	20 (0)	27 (0)	53 (1)	72 (0)
5	22 (0)	26 (0)	59 (2)	69 (2)
6	22 (1)	27 (2)	58 (1)	71 (6)
7	22 (0)	33 (2)	56 (0)	88 (6)
8	25 (1)	33 (0)	67 (6)	90 (1)
9	26 (0)	34 (0)	68 (0)	89 (0)
10	25 (0)	30 (0)	65 (0)	75 (1)
11	24 (1)	28 (0)	67 (5)	72 (0)
12	21 (1)	28 (0)	65 (1)	71 (1)
13	17 (1)	30 (0)	66 (2)	75 (1)
14	14 (1)	29 (4)	39 (3)	76 (9)
15	13 (1)	28 (1)	39 (4)	76 (3)

Tablo 4.4: İmmobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besiyerinde 15 tekrarlı fermantasyonda kullanımı sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşu ile VHb ekspresyon miktarları (nmol/g). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Tekrarlı Fermentasyon	EtOH (w/v, %) / OD		VHb (nmol/g)
	FBR5	TS3	TS3
1	0.48 (0.03)	0.59 (0.07)	23 (3)
2	0.29 (0.01)	0.56 (0.06)	16 (2)
3	0.29 (0.01)	0.44 (0.01)	11 (4)
4	0.29 (0.01)	0.44 (0.01)	8 (2)
5	0.36 (0.02)	0.52 (0.03)	14 (2)
6	0.39 (0.03)	0.67 (0.12)	13 (0)
7	0.37 (0.01)	0.67 (0.08)	8 (2)
8	0.43 (0.03)	0.63 (0.09)	9 (0)
9	0.58 (0.03)	0.61 (0.04)	7 (2)
10	0.32 (0.05)	0.45 (0.04)	10 (5)
11	0.38 (0.00)	0.53 (0.04)	13 (4)
12	0.54 (0.05)	0.59 (0.04)	16 (4)
13	0.28 (0.02)	0.53 (0.05)	8 (0)
14	0.29 (0.03)	0.43 (0.08)	8 (2)
15	0.25 (0.09)	0.43 (0.00)	7 (1)

4.2.3. İmmobilize Hücrelerin Uzun Süreli Depo Edilmesi

İmmobilize hücrelerin uzun süre depo edilebilme özelliğinin belirlenmesi için, FBR5 ve TS3 suşları, 2 farklı saklama solüsyonunda (SS1: maya özütü ve glukoz; SS2: $CaCl_2$) 60 gün süre ile +4°C'de depo edildi. Uzun süre depo edilen immobilize hücrelerin etanol üretim etkinliklerinin belirlenmesi için, depo edilen suşlarla 15 gün aralıklar ile WP6 besi ortamında 96 saat süre ile fermentasyon denemeleri gerçekleştirildi.

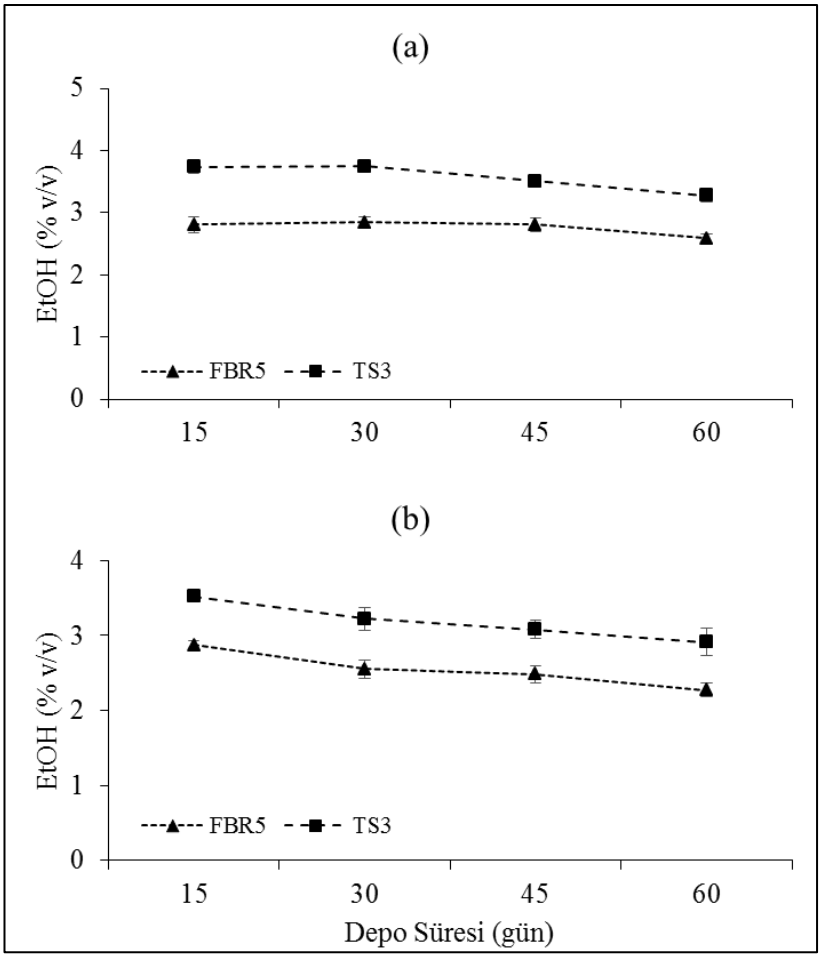
Depo edilen immobilize hücreler ile etanol üretim değerleri incelendiğinde, SS1 solüsyonunda depo edilen FBR5 ve TS3 suşlarının SS2' solüsyonunda depo edilen kültürlere göre etanol üretiminde daha etkin olduğu görüldü (Şekil 4.5).

SS1 solüsyonunda 15 ve 30 gün süre ile depo edilen *E.coli* FBR5 (sırasıyla %2.81 ve %2.85, v/v) ve TS3 (sırasıyla %3.74 ve %3.75, v/v) suşlarının ürettiği etanol miktarının, depo edilmeden kullanılan immobilize FBR5 ve TS3 suşlar ile üretilen etanol değerlerine (sırasıyla %3.00 ve %3.55, v/v) yakın olduğu (p>0.05) görüldü. 45 ve 60 gün süre ile depo edilen immobilize kültürlerin etanol üretim değerlerinde ise, FBR5 suşunda %16, TS3 suşunda ise %8 oranında bir azalma olduğu (p>0.05) belirlendi. Tüm koşullarda gerçekleşen etanol üretimlerinin önceki sonuçlara benzer olarak TS3 suşu ile %26-36 daha fazla olduğu (p<0.05) tespit edildi (Şekil 4.5).

SS2'de depo edilen *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının ürettiği etanol miktarları incelendiginde 15 gün süre ile depo edilen immobilize hücrelerin (FBR5 %2.87 ve TS3 %3.52, v/v) hiç depo edilmeden kullanılan immobilize suşlar ile üretilen etanol değerlerine yakın olduğu (p>0.05) görüldü. 30, 45 ve 60 gün süre ile depo edilen immobilize kültürlerin etanol üretim değerlerinde ise hem FBR5 suşu ile (sırasıyla %18, %21 ve %32 azalma; p<0.05) hem de TS3 suşu ile (sırasıyla %10, %15 ve %22 azalma; p>0.05) kademeli azalmaların olduğu belirlendi. Tüm saklama süreleri sonrası kullanılan immobilize hücreler ile gerçekleşen etanol üretimlerinin FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile %23-28 daha fazla olduğu (p<0.05) tespit edildi (Şekil 4.5).

İmmobilize TS3 suşu ile etanol üretimine benzer olarak, birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarında ortalama %45, substrat dönüşümü verimi ve teorik alkol verimi değerlerinin ise genel olarak %30-35 daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.5, Tablo 4.6).

Her 2 saklama (SS1 ve SS2) solüsyonunda 60 gün süre ile depo edilen immobilize TS3 suşu ile eksprese edilen VHb miktarının 6-20 nmol/g arasında olduğu belirlendi (Tablo 4.6).



Şekil 4.5: SS1 (a) ve SS2 (b) solüsyonlarında farklı sürelerde depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik fermantasyon sonrası etanol üretim değerleri (% v/v). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Tablo 4.5: SS1 ve SS2 solüsyonlarında 60 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik fermantasyon sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

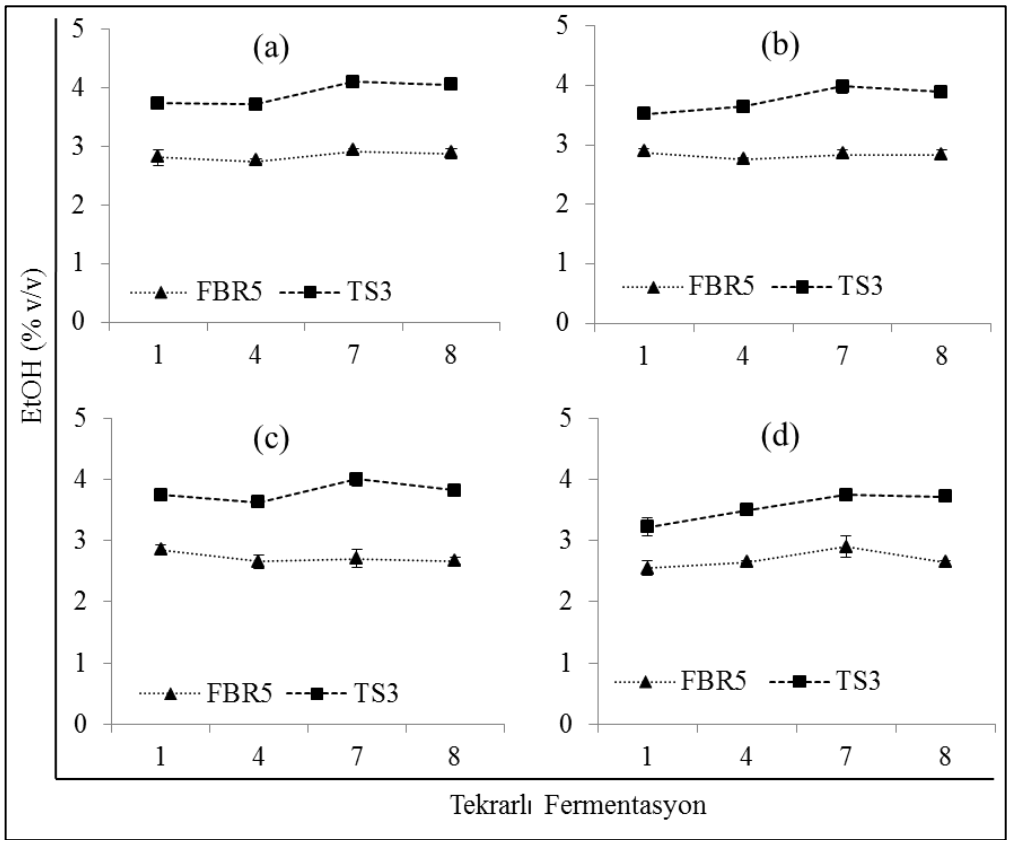
Saklama Solüsyonu	Depo Süresi (gün)	Substrat Dönüşüm		Teorik Alkol	
		FBR5	TS3	FBR5	TS3
SS1	15	22 (1)	28 (3)	55 (4)	75 (6)
	30	22 (2)	29 (4)	57 (2)	77 (1)
	45	21 (1)	25 (0)	56 (2)	68 (1)
	60	20 (1)	25 (1)	52 (1)	69 (6)
SS2	15	22 (1)	27 (4)	57 (7)	72 (2)
	30	20 (3)	25 (3)	52 (3)	63 (2)
	45	19 (1)	24 (3)	49 (8)	64 (1)
	60	17 (1)	22 (2)	45 (1)	61 (4)

Tablo 4.6: SS1 ve SS2 solüsyonlarında 60 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşunun VHb ekspresyon miktarları (nmol/g). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Saklama Solüsyonu	Depo Süresi (gün)	EtOH (w/v, %) / OD		VHb (nmol/g)
		FBR5	TS3	TS3
SS1	15	0.36 (0.04)	0.55 (0.09)	15 (1)
	30	0.36 (0.04)	0.53 (0.08)	17 (2)
	45	0.35 (0.08)	0.57 (0.09)	20 (1)
	60	0.34 (0.04)	0.53 (0.09)	6 (2)
SS2	15	0.31 (0.01)	0.50 (0.04)	16 (2)
	30	0.37 (0.03)	0.52 (0.07)	8 (1)
	45	0.34 (0.09)	0.56 (0.03)	15 (2)
	60	0.29 (0.00)	0.51 (0.04)	8 (3)

İmmobilize hücrelerin her 2 saklama (SS1 ve SS2) solüsyonunda depo edilerek saklanabildiği ve depo sonrası etkin olarak etanol üretebildiği belirlendi. Özellikle 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize hücrelerin daha etkin etanol ürettiği belirlendi. 15 ve 30 gün süre ile depo edilen *E.coli* soylarının tekrarlı fermantasyon ile etanol üretim etkinliğinin belirlenmesi için WP6 besi ortamında yeniden kullanılarak 8 tekrarlı fermantasyon gerçekleştirildi.

15 ve 30 gün süre ile iki saklama (SS1 ve SS2) solüsyonunda depo edilen *E.coli* soylarının tekrarlı fermantasyon denemeleri gerçekleştirildiğinde de etanol üretim sonuçlarının stabil olduğu, yedinci tekrarlı fermantasyon sonrasında ise arttığı tespit edildi (Şekil 4.6). Etanol sonuçları ile fermantasyon ve substrat dönüşüm etkinliği verimleri ve EtOH/OD değerlerinin her iki ortamda da depo edilen TS3 suşu ile daha fazla olduğu ve bu değerlerin yedinci ve sekizinci fermantasyonda daha da fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.7, Tablo 4.8). Böylelikle, depo edilen immobilize VHb eksprese eden TS3 suşunun tekrarlı fermantasyonda da etkili olarak kullanılabileceği belirlendi.



Şekil 4.6: SS1 (a, 15 gün; c, 30 gün) ve SS2 (b, 15 gün; d, 30 gün) solüsyonlarında depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası etanol üretimi değerleri (% v/v). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Tablo 4.7: SS1 ve SS2 solüsyonlarında, 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası substrat dönüşüm ve teorik alkol verim degerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Saklama Solüsyonu	Depo Süresi (gün)	Tekrarlı Fermentasyon	Substrat Dönüşüm Verimi (%)		Teorik Alkol Verimi (%)	
			FBR5	TS3	FBR5	TS3
SS1	15	1	22 (1)	28 (3)	55 (4)	75 (6)
		4	21 (1)	28 (2)	57 (6)	75 (7)
		7	22 (3)	32 (5)	61 (4)	85 (5)
		8	22 (2)	31 (5)	61 (3)	85 (4)
	30	1	22 (2)	29 (4)	57 (2)	77 (1)
		4	20 (1)	28 (4)	55 (5)	76 (4)
		7	21 (4)	31 (6)	57 (4)	83 (6)
		8	21 (2)	30 (3)	57 (3)	78 (2)
SS2	15	1	22 (1)	27 (4)	57 (7)	72 (2)
		4	21 (1)	28 (5)	57 (4)	75 (7)
		7	22 (3)	31 (3)	60 (7)	83 (5)
		8	22 (2)	30 (5)	61 (5)	81 (9)
	30	1	20 (3)	25 (3)	52 (3)	63 (2)
		4	20 (2)	27 (4)	55 (2)	69 (7)
		7	20 (4)	29 (7)	63 (8)	76 (6)
		8	20 (2)	29 (4)	57 (4)	76 (3)

Tablo 4.8: SS1 ve SS2 solüsyonlarında, 15 ve 30 gün süre ile depo edilen immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının WP6 besi ortamında 96 saat sürelik 8 tekrarlı fermantasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol (EtOH (w/v) / OD) ve TS3 suşu ile VHb ekspresyon miktarları (nmol/g). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Saklama Solüsyonu	Depo Süresi (gün)	Tekrarlı Fermantasyon	EtOH (w/v, %) / OD		VHb (nmol/g)
			FBR5	TS3	TS3
SS1	15	1	0.36 (0.04)	0.55 (0.09)	15 (1)
		4	0.37 (0.06)	0.54 (0.11)	25 (2)
		7	0.38 (0.02)	0.56 (0.07)	10 (2)
		8	0.38 (0.03)	0.58 (0.08)	6 (2)
	30	1	0.36 (0.04)	0.53 (0.08)	17 (2)
		4	0.36 (0.09)	0.52 (0.06)	4 (1)
		7	0.37 (0.08)	0.58 (0.06)	11 (1)
		8	0.38 (0.05)	0.56 (0.10)	14 (3)
SS2	15	1	0.31 (0.01)	0.50 (0.04)	16 (2)
		4	0.35 (0.06)	0.50 (0.07)	17 (1)
		7	0.34 (0.03)	0.53 (0.04)	9 (2)
		8	0.34 (0.04)	0.54 (0.12)	4 (1)
	30	1	0.37 (0.03)	0.52 (0.07)	8 (1)
		4	0.30 (0.07)	0.55 (0.13)	4 (1)
		7	0.34 (0.09)	0.47 (0.09)	11 (2)
		8	0.28 (0.06)	0.47 (0.06)	15 (4)

4.3. Biyoetanol Üretiminde Hücrelerin Fermantasyon ve Biyokütle Dönüşüm Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Düşük laktoz seviyesinde (%3, WP1 ve WP2) serbest ve immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonrası teorik alkol verimlerinin birbirlerine yakın olduğu belirlendi. Laktoz seviyesinin %5'e arttırılması ile immobilize FBR5 ve TS3 suşlarının teorik alkol verimlerinde özellikle 72 ve 96 saat inkübasyon sonrasında önemli farklılıkların olduğu görüldü. WP3 ve WP4 besi ortamlarında, immobilize suşlarla elde edilen teorik alkol verimlerinin 72 saat fermantasyon sonrası en az %80, 96 saat fermantasyon sonrası ise en az %89 olduğu belirlendi. Bununla beraber, %8 laktoz ortamında (WP5 ve WP6) 72 saatlik

fermentasyon sonunda FBR5 suşunun %65, TS3 suşunu ise %99'a varan teorik alkol üretimlerinin gerçekleştiği gözlendi. 96 saat fermantasyon sonrası ise, aynı besiyerlerinde etanol üretim etkinliği immobilize FBR5 suşu ile %71 ve %74 arasında, immobilize TS3 suşu ile %84 olduğu belirlendi. WP6 ortamında, immobilize TS3 suşu ile 72 ve 96 saatlik fermantasyonlar sonrası elde edilen teorik alkol verimlerinin sırasıyla serbest TS3 suşu ile elde edilene göre %15 ve %10, immobilize FBR5 suşuna göre ise %52 ve %18 daha fazla olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar ile etanol üretiminde özellikle WP6 besi ortamında immobilizasyonun etkin olduğu, immobilizasyonun *Vitreoscilla* hemoglobini ile daha da etkili olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

WP6 besi ortamında immobilize hücrelerin tekrarlı fermantasyonda kullanılmasında ise teorik alkol verimlerinin immobilize FBR5 suşu ile %39 ve %71 arasında olduğu, immobilize TS3 suşu ile ise %69 ve %90 arasında olduğu belirlendi. TS3 suşunun 15 tekrarlı fermantasyon sonrası belirlenen teorik alkol veriminin FBR5 suşuna göre %7 ile %95 arasında olacak şekilde daha fazla olduğu belirlendi. Benzer şekilde tekrarlı fermentasyonlarda, TS3 suşu ile substrat dönüşümü verimlerinin de FBR5 suşuna göre %30-100 daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

İmmobilize *E.coli* suşlarının 60 gün süre boyunca +4 derecede depo edildikten sonra 96 saat süre ile fermantasyonda kullanımı sonrası teorik alkol verimlerinin SS1'de depo edilen hücreler ile daha fazla olduğu görüldü. Her 2 saklama solüsyonunda depo edilen TS3 suşunun teorik alkol verimi FBR5 suşuna göre genel olarak %21-36 oranında daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.5). Depo edilen *E.coli* suşlarının tekrarlı fermantasyonda kullanımı sonrası, substrat dönüşüm verimlerinin immobilize FBR5 suşu ile genel olarak %20 olduğu, immobilize TS3 suşu ile ise genel olarak %25-30 arasında olduğu tespit edildi (Tablo 4.5). Her 2 saklama solüsyonunda (SS1 ve SS2) depo edilen *E.coli* suşlarının substrat dönüşüm etkinlikleri incelendiğinde teorik alkol verimlerine benzer olarak TS3 suşu ile daha fazla (genel olarak %20-30 arasında) olduğu tespit edildi (Tablo 4.5).

15 ve 30 gün süre ile depo edilen *E.coli* suşlarının 8 tekrarlı fermantasyon etkinlikleri incelendiğinde de benzer olarak TS3 suşunun FBR5 suşuna göre etanol üretiminde daha etkin (genel olarak %20-40 arasında) olduğu görüldü. Özellikle her 2 suşun yedinci fermantasyon sonrası etanol üretimlerinin artması ile teorik alkol verimlerinin de arttığı belirlendi (Tablo 4.7).

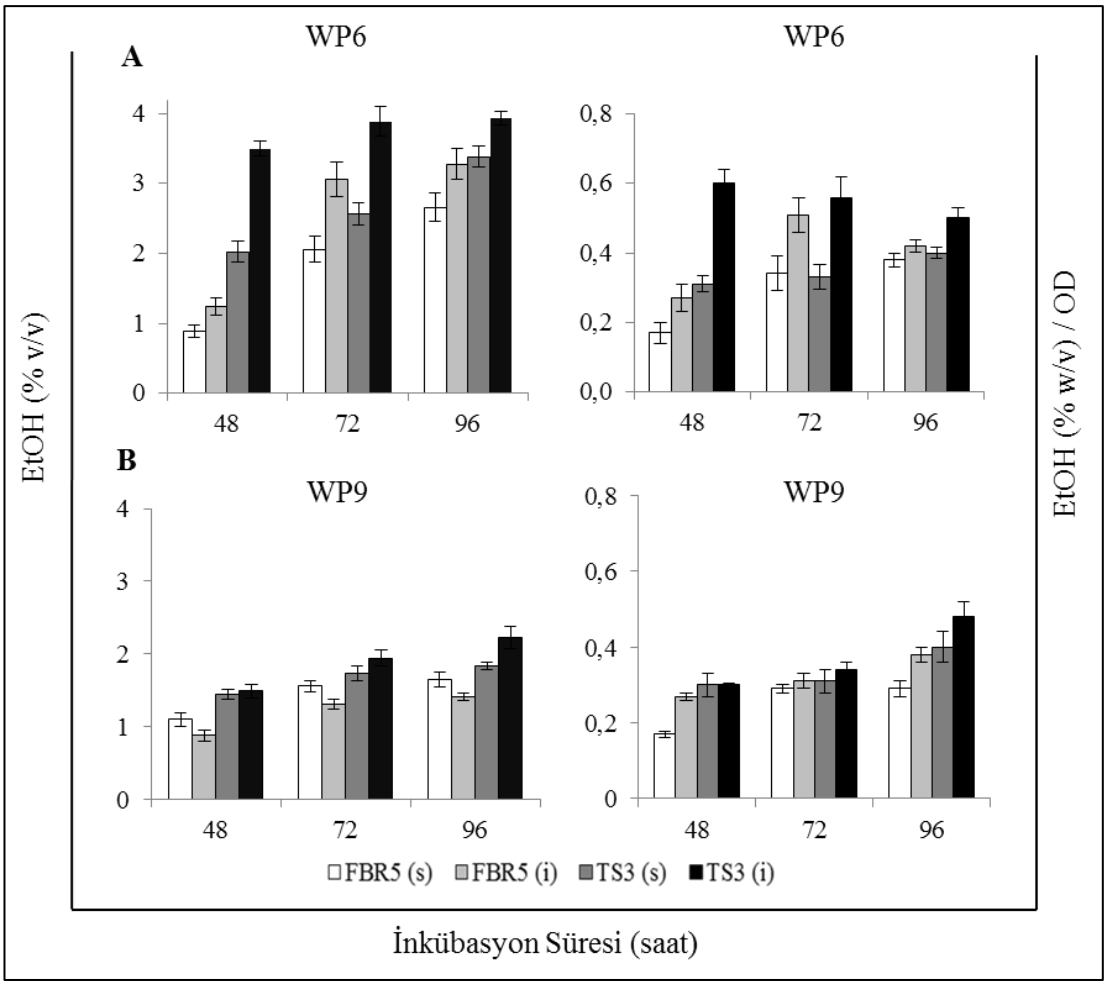
4.4. Fermentörde Biyoetanol Üretimi

Fermentör şartlarında biyoetanol üretimi incelendiğinde, en yüksek etanol üretiminin erlenmayerlerde yapılan önceki denemelere benzer olarak immobilize TS3 suşu ile gerçekleştiği belirlendi. Erlenmayerler kullanılarak WP6 besiyeri ile 96 saatlik fermantasyon süresi sonunda belirlenen etanol üretim değerinin (%3.55, v/v) fermentör ortamında 48 saat gibi daha da kısa sürede (%3.50, v/v) gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.7). Ayrıca, fermentör ortamında üretilen alkol miktarının 96 saat sonunda immobilize TS3 suşu ile 3.93 (v/v) seviyesine ulaştığı belirlendi (Şekil 4.7).

Fermentör ortamında 96 saat inkübasyon sonrası üretilen alkol miktarının immobilize FBR5 suşuna göre %20, serbest TS3 suşuna göre ise %16 daha fazla olduğu tespit edildi. Bu artış değerlerinin, 48 saatlik fermantasyon sonrasında daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.7). 48-96 saat inkübasyon sonrası *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile laktoz tüketimlerinin hem immobilize hem de serbest hücreler ile benzer olduğu ancak bu oranların genellikle WP6 besiyerinde WP9'a göre daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 4.9). 48 ve 96 saatlik fermantasyon sonrasında immobilize TS3 suşu ile teorik alkol verimlerinin immobilize FBR5 suşuna göre %43, serbest TS3 suşuna göre ise %6 daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.10).

Fermentör ortamında yüksek laktoz konsantrasyonu ile (WP9) etanol üretiminin düşük olduğu fakat yine de serbest veya immobilize TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre daha etkin olduğu görüldü (Şekil 4.7). Elde edilen bu sonuçlar ile biyoetanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonun ve immobilizasyonun birlikte kullanılmasının daha etkili olduğu belirlendi. Ayrıca, fermentör ortamı gibi kontrollü ortam şartlarında daha kısa sürede daha etkin etanol üretiminin gerçekleştiği görüldü.

Serbest ve immobilize *E.coli* TS3 suşu ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamlarında 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyon sonrası eksprese edilen VHb miktarları genel olarak 20-46 (nmol/g) arasında olduğu belirlendi. Bu değerlerin erlenmayerlerde elde edilen hemoglobin değerlerine benzer oldugu görüldü (Şekil 4.3, Tablo 4.11).



Şekil 4.7: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 (A) ve WP9 (B) ortamları ile biyoetanol üretimi ve birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol miktarları (EtOH (w/v) / OD). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Tablo 4.9: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamları ile 48, 72 ve 96 saatik fermantasyon sonrası kültürlerin laktoz tüketim verimleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Süre (saat)	Besiyeri	Laktoz Tüketim Verimi (%)			
		FBR5 (s)	FBR5 (i)	TS3 (s)	TS3 (i)
48	WP6	32 (5)	36 (6)	57 (4)	89 (2)
	WP9	51 (3)	41 (3)	42 (5)	40 (4)
72	WP6	58 (3)	58 (3)	70 (6)	91 (3)
	WP9	59 (2)	45 (3)	50 (4)	52 (3)
96	WP6	61 (4)	74 (2)	83 (3)	97 (2)
	WP9	75 (6)	63 (5)	57 (4)	61 (4)

Tablo 4.10: Serbest ve immobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamları ile 48, 72 ve 96 saatik fermantasyon sonrası kültürlerin teorik alkol verimleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Süre (saat)	Besiyeri	Teorik Alkol Verimi (%)			
		FBR5 (s)	FBR5 (i)	TS3 (s)	TS3 (i)
48	WP6	50 (4)	63 (3)	65 (3)	72 (1)
	WP9	20 (5)	20 (4)	33 (3)	35 (3)
72	WP6	65 (5)	97 (2)	67 (4)	78 (1)
	WP9	26 (4)	28 (4)	33 (3)	37 (3)
96	WP6	80 (4)	82 (2)	74 (4)	74 (1)
	WP9	22 (2)	22 (2)	32 (3)	35 (2)

Tablo 4.11: Serbest ve immobilize *E.coli* TS3 suşu ile fermentör koşullarında WP6 ve WP9 ortamlarında 48, 72 ve 96 saatlik fermantasyon sonrası eksprese edilen VHb miktarları (nmol/g). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Süre (saat)	Besiyeri	VHb (nmol/g)	
		TS3 (s)	TS3 (i)
48	WP6	46 (13)	45 (12)
	WP9	26 (2)	26 (5)
72	WP6	32 (15)	23 (10)
	WP9	32 (1)	28 (1)
96	WP6	25 (5)	20 (8)
	WP9	26 (2)	26 (2)

4.5. Biyoetanol Üretiminde İmmobilizasyon ve *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin Birlikte Kullanım Etkinliğinin Arttırılması

Bu tez çalışmasının önceki bölümlerinde, peynir altı tozu ile biyoetanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini'nin ve immobilizasyonun potansiyel etkileri belirlendi. Bu bölümde ise, etanol üretiminde immobilize hücrelerin optimum inokulum miktarı araştırıldı. Ayrıca, farklı laktoz ve inokulum oranları ile etanol üretiminde VHb teknolojisinin etkisi de incelendi. Tezin önceki bölümlerinde %3, %5 ve %8 laktoz oranları içeren besiyerileri (WP1-WP6) ile elde edilen biyoetanol üretimi ve fermantasyon verimi değerleri ile en iyi besi ortamının WP6 olduğu belirlendi. Bundan dolayı peynir altı tozu kullanılarak WP6 besiyeri (%8 laktoz içeren) ile birlikte artan laktoz konsantrasyonlarında (WP7, %10; WP8, %12 ve

WP9, %15) 4 farklı besi ortamı (WP6-WP9) hazırlandı. Bu besiyerleri ile *Vitreoscilla* hemoglobini'nin potansiyel etkisini belirlemek için immobilize *E.coli* FBR5 (vgb^-) ve TS3 (vgb^+) suşları ve immobilize hücrelerin inokulum miktarının etkisi için ise %5, %10, %20 ve %30 inokulum oranları kullanıldı.

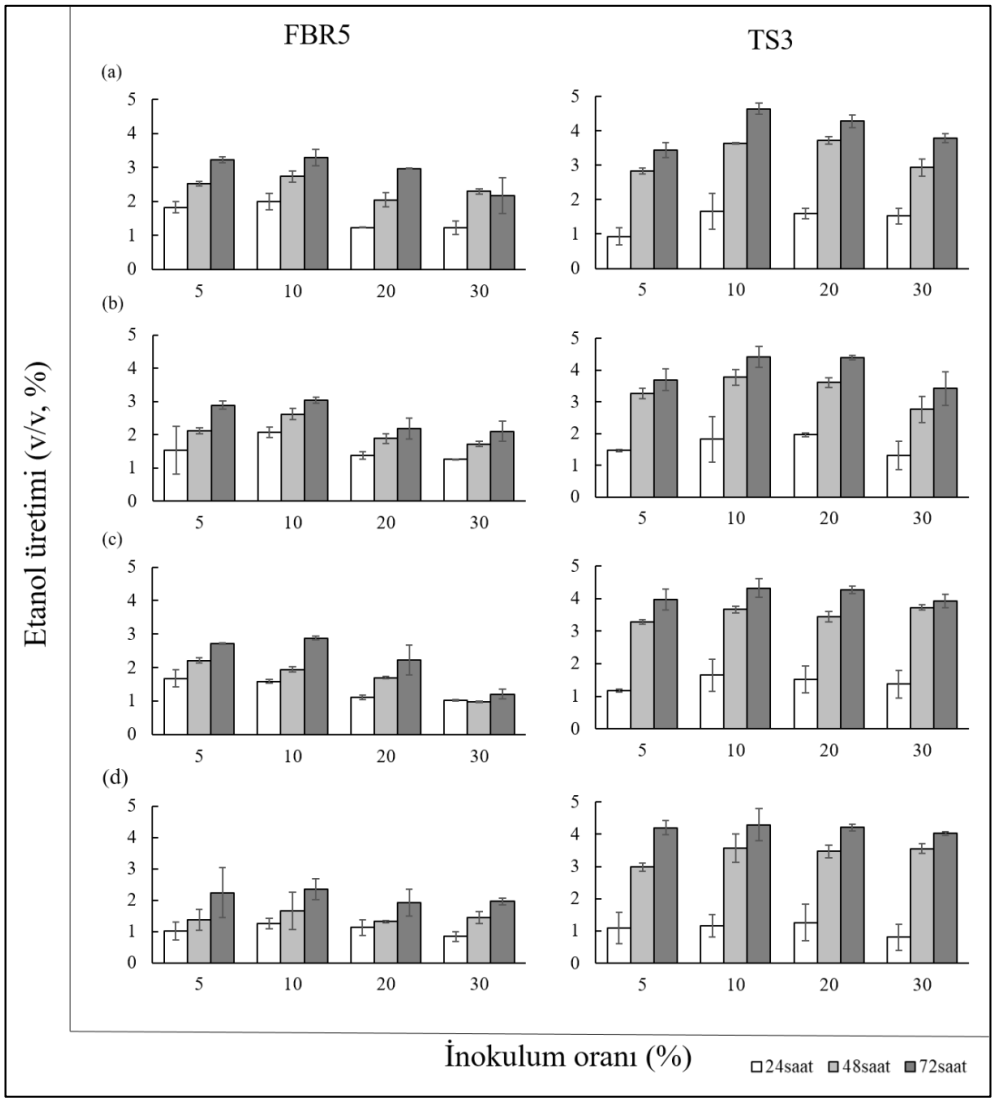
4.5.1. İmmobilize Hücrelerin İnokulum Miktarının Etkisi

İmmobilize *E.coli* suşlarının (FBR5 ve TS3) etanol üretiminde, inokulum etkisi incelendiğinde, inokulum oranının %5'den %10'a arttırılması ile her 2 suş ile de etanol üretiminin önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Özellikle WP6 ve WP7 besiyerlerinde 72 saatlik fermantasyon sonucuna göre, %10 inokulum oranı ile TS3 suşunun etanol üretiminin FBR5 suşuna göre daha fazla artış (p=0.01) gösterdiği belirlendi. Her 2 suş ile dört farklı laktoz konsantrasyonunda da inokulum oranının %20 ve %30 seviyelerine arttırılmasıyla etanol üretiminin azaldığı görüldü. Bu azalma oranlarının FBR5 suşu ile daha fazla iken, TS3 suşu ile az olduğu tespit edildi (Şekil 4.8). Elde edilen bulgular en etkili etanol üretiminin %10 inokulum oranı ile elde edildiğini gösterdi.

4.5.2. Farklı Laktoz Konsantrasyonlarının Etkisi

Dört farklı besiyerinde (%8, %10, %12 ve %15 laktoz; WP6-WP9) biyoetanol üretimleri incelendiğinde, immobilize FBR5 suşu ile etanol üretiminin laktoz konsantrasyonun artması ile kademeli olarak azaldığı tespit edildi. En yüksek etanol üretiminin, immobilize TS3 suşu ile %8 laktoz (WP6) yoğunluğunda (%10 inokulum oranında) %4.64 (v/v) seviyesinde %99 teorik verim yani fermantasyon etkinliği ile olduğu görüldü (Şekil 4.8, Tablo 4.12). İmmobilize TS3 suşu ile etanol üretiminde, immobilize FBR5 suşu ile üretilenin aksine laktoz konsantrasyonun artması ile önemli bir azalma gözlemlenmedi. Farklı laktoz konsantrasyonlarında ve inokulum oranlarında, VHb eksprese eden immobilize TS3 suşunun immobilize FBR5 suşuna göre daha fazla etanol ürettiği belirlendi. İnkübasyon suresinin ise 24 saatten 72 saate arttığında etanol üretiminin önemli oranda arttığı belirlendi (Şekil 4.8). Benzer olarak laktoz tüketiminin ve substrat dönüşüm veriminin de fermantasyon süresinin artması ile hem FBR5 hem de TS3 suşu ile arttığı belirlendi. Laktoz konsantrasyonun artması

ile ise hem laktoz tüketiminin hem de substrat dönüşüm veriminin FBR5 suşunda daha fazla olmak üzere her iki suş içinde azaldığı saptandı (Tablo 4.13).



Şekil 4.8: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranlarında (%5-30) 72 saat süre ile biyoetanol üretimi. Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.5.3. Biyoetanol Üretiminde Hücrelerin Fermantasyon ve Biyokütle Dönüşüm Etkinliklerinin Karşılaştırılması

İmmobilize formda *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile en yüksek etanol üretimlerinin, 72 saatlik fermantasyon sonrasında %8 laktoz (WP6) konsantrasyonunda %10 inokulum oranı ile sırasıyla %3.39 (v/v) ve %4.64 (v/v) olduğu belirlendi (Şekil 4.8). Bu sonuçlar ile, TS3 suşu ile etanol üretiminin FBR5

suşuna göre %37 daha fazla olduğu belirlendi. Ayrıca, FBR5 ve TS3 suşlarının fermantasyon etkinliği verimi sırasıyla %72 ve %99, biyokütle dönüşüm etkinliği verimi ise yine sırasıyla %25 ve %36 olduğu belirlendi (Tablo 4.12, Tablo 4.13).

Elde edilen sonuçlar, dört farklı laktoz konsantrasyonunda ve farklı inokulum oranlarında da TS3 suşunun FBR5 suşuna göre daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Laktoz konsantrasyonun %8'den %15'e arttırılması ile %5, %10, %20 inokulum ilavelerinde FBR5 suşunun ürettiği etanol miktarının yaklaşık %30 oranında (p=0.02) azaldığı ancak %30 inokulum ilavesi ile etanol üretimin %10 oranında (p>0.05) azaldığı belirlendi. Yine aynı koşullarda TS3 suşunun ürettiği alkol miktarı ise tüm inokulum oranlarında en fazla %7 oranında (%10 inokulum, p=0.18) azaldığı görüldü. Yüksek laktoz seviyesinde üretilen etanol miktarı FBR5 suşunun TS3 suşuna göre %83 daha az (p<0.05) olduğu belirlendi. Elde edilen bu sonuç *Vitreoscilla* hemoglobini'nin yüksek laktoz konsantrasyonunda da etkili olduğunu gösterdi.

Tablo 4.12: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15)) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranları (%5-30) ile 24, 48 ve 72 saatlik fermantasyon sonrası teorik alkol verim değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Besiyeri	İnokulum (%)	Teorik Alkol Verimi (%)					
		24 saat		48 saat		72 saat	
		FBR5	TS3	FBR5	TS3	FBR5	TS3
WP6	5	74 (1.89)	55 (3.25)	67 (1.02)	69 (0.02)	64 (1.26)	67 (1.71)
	10	81 (4.00)	71 (6.51)	84 (9.42)	85 (2.98)	72 (4.14)	99 (0.94)
	20	56 (3.33)	46 (0.39)	56 (6.18)	77 (0.96)	59 (0.04)	86 (3.76)
	30	57 (1.61)	44 (4.30)	64 (0.35)	76 (0.25)	48 (7.56)	73 (0.70)
WP7	5	32 (1.23)	38 (2.80)	41 (2.73)	62 (0.25)	46 (0.59)	59 (43)
	10	65 (0.82)	58 (3.38)	53 (2.07)	62 (2.19)	47 (1.58)	71 (4.43)
	20	49 (2.62)	49 (1.90)	61 (2.32)	67 (0.51)	48 (5.82)	74 (0.68)
	30	36 (0.08)	53 (8.37)	59 (7.86)	69 (2.20)	46 (5.43)	70 (3.12)
WP8	5	48 (5.24)	28 (2.47)	36 (1.00)	48 (0.06)	38 (1.36)	45 (6.43)
	10	51 (1.26)	33 (1.44)	34 (0.67)	53 (3.18)	42 (0.89)	54 (0.75)
	20	40 (1.61)	27 (1.40)	31 (0.37)	56 (2.51)	35 (3.14)	61 (0.65)
	30	30 (1.51)	29 (0.13)	16 (0.39)	52 (1.13)	22 (2.78)	57 (0.77)
WP9	5	25 (7.01)	17 (0.43)	16 (0.01)	45 (2.36)	33 (0.58)	43 (1.23)
	10	31 (1.71)	14 (0.51)	24 (6.61)	37 (0.88)	28 (3.24)	50 (1.27)
	20	27 (3.16)	18 (0.18)	17 (0.39)	41 (1.87)	22 (5.10)	44 (0.72)
	30	17 (1.70)	15 (0.40)	19 (2.53)	39 (2.68)	23 (1.72)	47 (0.80)

Tablo 4.13: İmmobilize *E.coli* FBR5 ve TS3 suşlarının farklı laktoz konsantrasyonları (a; %8, b; %10, c; %12, d; %15) içeren WP6-WP9 besiyerlerinde farklı inokulum oranları (%5-30) ile 24, 48 ve 72 saatlik fermantasyon sonrası substrat dönüşüm verimi değerleri (%). Her değer en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Besiyeri	İnokulum (%)	Substrat Dönüşüm Verimi (%)					
		24 saat		48 saat		72 saat	
		FBR5	TS3	FBR5	TS3	FBR5	TS3
WP6	5	14 (1.24)	7 (1.94)	19 (0.54)	22 (0.63)	25 (0.68)	26 (1.70)
	10	15 (1.85)	13 (4.06)	21 (1.27)	28 (0.14)	25 (0.77)	36 (1.25)
	20	10 (0.12)	12 (1.62)	16 (3.78)	29 (0.82)	23 (0.13)	33 (1.44)
	30	9 (0.51)	12 (1.75)	18 (0.59)	23 (1.96)	17 (4.08)	29 (1.02)
WP7	5	9 (4.48)	9 (0.24)	13 (0.59)	20 (1.00)	18 (0.76)	23 (2.09)
	10	13 (1.01)	11 (4.46)	16 (1.03)	23 (1.48)	19 (0.52)	27 (2.01)
	20	8 (0.67)	12 (0.45)	12 (0.88)	22 (0.69)	13 (1.92)	27 (0.39)
	30	7 (0.04)	8 (2.74)	11 (0.47)	17 (0.70)	13 (1.88)	21 (3.23)
WP8	5	8 (1.30)	6 (0.18)	11 (0.44)	17 (0.32)	14 (0.09)	20 (1.63)
	10	8 (0.25)	8 (0.72)	10 (0.37)	19 (0.52)	15 (0.30)	22 (1.47)
	20	5 (0.39)	8 (0.86)	9 (0.18)	18 (0.86)	11 (1.31)	22 (1.12)
	30	5 (0.14)	7 (0.61)	5 (0.08)	19 (0.41)	6 (0.77)	20 (1.04)
WP9	5	4 (1.17)	5 (1.99)	6 (1.36)	12 (0.52)	9 (3.25)	17 (0.87)
	10	5 (0.66)	5 (1.45)	7 (2.42)	15 (1.79)	10 (1.38)	18 (2.05)
	20	5 (1.00)	5 (0.21)	5 (0.17)	14 (1.13)	8 (1.77)	17 (0.45)
	30	3 (0.64)	3 (0.16)	6 (0.80)	15 (0.64)	8 (0.44)	17 (0.22)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, *E.coli* FBR5 ve TS3 suşları ile biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak peynir altı suyu tozunun kullanım potansiyeli incelendi. Biyoetanol üretiminde, peynir altı tozunun etkisinin belirlenmesi için farklı laktoz (%3-15) konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlanan fermantasyon ortamları hem çalkalamalı inkübatör hem de fermentör ortam koşullarında değerlendirildi. Etanol üretiminin arttırılmasında, immobilizasyonun ve VHb teknolojisinin hem ayrı ayrı hem de birlikte etkileri araştırıldı. İmmobilize hücrelerin 15 tekrarlı fermantasyonda kullanılması ile immobilizasyonun etanol üretiminde kullanım etkinliği incelendi. Ayrıca immobilize boncuklar +4°C'de 60 gün süre ile iki farklı saklama solüsyonunda depo edilerek, etanol üretiminde hem saklama solüsyonun etkisi hem de depo süresinin etkisi incelendi. Depo edilen immobilize hücrelerin etanol üretim etkinliği tekrarlı fermantasyon ile yeniden değerlendirildi. İmmobilizasyonun VHb teknolojisi ile birlikte kullanım potansiyeli ayrıca incelendi. Ayrıca bu kapsamda immobilize hücrelerin etanol üretiminde en etkin inokulum miktarının farklı konsantrasyonlarda laktoz içeriğe sahip besi ortamlarında araştırılması yine VHb teknolojisinin katkısı ile birlikte değerlendirildi.

- Peynir altı tozunun kullanımı

Fermantasyon ortamlarında biyoetanol üreticisi olarak genellikle *S.cerevisiae* kullanılmasına rağmen, peynir altı suyu tozunun laktoz içermesi ve bu mikroorganizmanın laktozu hidrolize edememesi nedeni ile laktozdan etanol üretimi oldukça kısıtlı bir uygulamadır. *Kluveromyces* ve türleri ise, laktozu fermente edebilmesine rağmen, bu mikroorganizma ile laktozdan etanol üretiminde teorik alkol verim değerleri düşük seviyededir. *Zymomonas mobilis* ise glukoz, sukroz ve fruktoz şekerlerini fermente edebilirken, ksiloz ve arabinozu kullanamaktadır [Zhang et al., 1995]. *E.coli* ise, laktoz dahil farklı şekerleri fermente edebilmesinden dolayı, *S.cerevisiae* ve diğer mikroorganizmalara göre avantajılıdır. Bu doğrultuda, peynir altı suyu ve tozu ile yapılan bir çalışmada *E.coli* suşları ile etkili etanol üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir [Akbas et al., 2014].

- Laktoz konsantrasyonun etkisi

Bu çalışmada farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3-15, w/v) olacak şekilde peynir altı tozu ile farklı besi ortamları hazırlanmıştır. %3 laktoz olacak şekilde hazırlanan besiyerlerinde (WP1 ve WP2) 48 saat süre sonunda laktozun tamamen tükendiği ve etanol üretiminin %2 (v/v) oranında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuca benzer olarak, %3.5-5 (w/v) oranında laktoz içeren peynir altı suyundan da benzer oranda etanol üretimi gerçekleşmiştir [Akbas et al., 2014]. Düşük laktoz konsantrasyonlarında özellikle kısa süreli fermantasyonlarda, substrat tüketiminin (18-50 saat) %70 ile %100 arasında olmasına rağmen, etanol üretimi düşük orandadır (2.1-20 g/L) [Kourkoutas et al., 2002], [Zafar and Owais, 2006], [Ozmihci and Kargi, 2008], [Sansonetti et al., 2011]. Peynir altı suyu %4-5 oranında laktoz içermesinden dolayı elde edilen düşük etanol miktarı (%2, v/v) da distilasyon maliyeti göz önünde bulundurulduğunda ekonomik açıdan uygulanabilir değildir [Siso, 1996], [Ozmihci and Kargi, 2008], [Guimarães et al., 2010]. Bu çalışmada, etanol miktarının arttırılması için laktoz konsantrasyonunun %5 (w/v) oranına arttırılması ile etanol üretiminin %3 seviyesine ulaştığı, %8 (w/v) laktoz oranına arttırılması ile ise %3.5 seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Farklı bir çalışmada ise, çalkalamalı inkübatör koşulları ile elde edilen bu etanol miktarına benzer olarak 100g/L laktoz yoğunluğunda peynir altı tozu kullanıldığında sürekli beslemeli fermentör ortamında etanol üretiminin %3.7 (v/v) olduğu belirlenmiştir [Ozmihci and Kargi, 2007]. Bu çalışma ile fermentör ortamında gerçekleştirilen etanol üretiminin ise, 80g/L laktoz konsantrasyonunda %3.9 (v/v) seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Laktoz oranının %15'e arttırılması ile hem çalkalamalı kültür koşullarında hem de fermentör denemelerinde, etanol üretiminin daha düşük oranlarda olduğu görülmüştür (genellikle %2 (v/v) seviyesinde). Benzer şekilde önceki bir çalışmada da, yüksek laktoz konsantrasyonunda, etanol üretim çalışmalarında da benzer olarak etanol üretiminin düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir [Saini et al., 2017]. Bunun nedeni, yüksek oranda substrat (100g/L-200g/L) kullanımı ile oluşan yüksek ozmotik basıncın mikroorganizma üzerinde inhibe edici etkisinin olması dolayısı ile şeker tüketimini ve etanol verimini olumsuz etkilemesi olabilir [Ozmihci and Kargi, 2007a], [Ozmihci and Kargi, 2007b], [Gabardo et al., 2014].

- Besiyeri bileşenlerin etkisi

Ön çalışmalarda maya özütü ilave edilmeden hazırlanan peynir altı tozu besi ortamlarında bakteriyel üremenin ve etanol üretiminin zayıf olduğu belirlenmiştir. Peynir altı besi ortamları nitrojen kaynağı olarak maya özütü ile zenginleştirildiğinde hem üremenin hem de etanol üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Leite ve arkadaşlarının (2000) yapmış oldukları bir çalışmada, peynir altı suyu ile herhangi bir bileşen olmadan hazırlanan ortamda teorik olarak etanol üretiminin %38 olduğu, fakat LB besiyeri bileşenleri eklendiğinde ise etanol veriminin %96 oranında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, maya özütü veya pepton ile zenginleştirilen besiyerlerinde şeker tüketiminin ve etanol üretim miktarının arttığı çeşitli çalışmalarca bildirilmiştir [Ortiz-Muñiz et al., 2010], [Pérez-Carrillo et al., 2011], [Harde et al., 2014]. Bununla beraber peptonun çeşitli aminoasitleri ve peptidleri içermesine rağmen besiyeri bileşeni olarak kulanıldığında besiyeri maliyetini arttırdığı ve üretilen etanol maliyetini de arttırdığı rapor edilmiştir [Li et al., 2017]. Besiyeri maliyetinin daha düşük olması için, bu çalışmada maya özütünün iki farklı konsantrasyonu denenmiştir. Maya özütü konsantrasyonun etkisi incelendiğinde ise, %0.5 maya özütü ilavesinin %0.3 maya özütü ilavesine göre hem %5 hem de %8 laktoz ortamlarında etanol üretimini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Peynir altı tozu besiyerleri ile fermantasyon sonrası immobilize boncukların eridiği saptanmıştır. Önceki çalışmalarda, sodyum aljinat ile immobilize edilen boncuklara mekanik destek sağlaması ve fermantasyon sonrası boncukların tekrardan kullanılması için besi ortamlarına kalsiyum iyonu içeren $CaCl_2$ [Cheong et al., 1993], [Gilson and Thomas, 1995], [Chang et al., 1996] veya $CaCO_3$ [Singh et al., 2012] ilavesi yapılmıştır. Bu nedenle, aljinat boncukların yapısının korunması ve hücre salınımının önemli ölçüde engellenmesi için peynir altı tozu besiyerleri $CaCl_2$ (%0.5, w/v) ile zenginleştirilmiştir [Chang et al., 1996]. Ayrıca besiyeri bileşeni olarak $CaCl_2$ gibi kalsiyum iyonlarının kullanılmasının etanol üretimini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür [Azam et al., 2014].

- Havalandırma koşulların etkisi

Bu çalışma, VHb ekspresyonunun düşük oksijenli koşullarda daha etkin olması [Stark et al., 2011], [Stark et al., 2012] nedeniyle düşük havalandırmalı ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Havalandırmanın arttırılması ile laktoz kaynağının etanol üretimi yerine tercihen hücre büyümesi için kullanıldığı ve dolayısıyla etanol üretiminin

azaldığı görülmüştür [Ghaly and El-Taweel, 1995]. Benzer olarak *E.coli* suşları ile peynir altı suyundan etanol üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, düşük havalandırma koşullarında üretilen etanol miktarının yüksek havalandırma koşullarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [Akbas et al., 2014]. Laktoz fermantasyonunun anaerobik koşullar altında gerçekleştirildiğinde ise substrat kullanımının nadiren yavaş olduğu belirtilmiştir [Kargi and Ozmihci, 2006], [Ozmihci and Kargi, 2007b].

- *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin etkisi

Etanol üretimi dahil pek çok metabolit üretiminin arttırılmasında *Vitreoscilla* hemoglobini teknolojisi kullanılmıştır [Frey and Kallio, 2003], [Zhang et al., 2007], [Stark et al., 2011], [Stark et al., 2012], [Stark et al., 2015]. Daha önceki yapılan çalışmalarda, mısır atığı, atık patates işleme endüstrisi atığı, mısır ve patates içeren nişastalı işleme atık suyu, şeker pancarı melası hidrolizatları gibi farklı şeker kaynakları ile etanol üretiminde VHb ekspresyonunun etanol üretimini arttırıcı etkileri belirlenmiştir [Sanny et al., 2010], [Abanoz et al., 2012], [Akbas et al., 2014], [Sumer et al., 2015]. Yapılan bu çalışmada da, peynir altı tozu ile hazırlanan besiyerlerinde etanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonu ile artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, etanol üretimi gibi birim hücre biyokütlesi başına düşen etanol üretiminin de yine VHb eksprese eden TS3 suşu ile daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, VHb'nin solunum zincirinde yer alan oksijenin taşınmasını hızlandırması ile ATP ve NADH üretiminin arttırması, enerji kazanımını sağlaması ve buna bağlı olarak üremeyi ve böylece metabolit üretiminin arttırılmasındandır [Stark et al., 2011 [Stark et al., 2012].

Vitreoscilla hemoglobini'nin *Pichia pastoris* ile *β*-galaktosidaz enziminin üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, VHb ekspresyonu ile düşük oksijenli koşullarda enzim üretiminin arttığı bildirilmiştir [Wu and Fu, 2012]. Bu çalışmada enzim aktivitesi değerlendirilmemesine rağmen, etanol üretim etkinliğinin *E.coli* FBR5 suşuna (vgb^-) göre TS3 suşunda (vgb^+) daha yüksek olması, TS3 suşu ile laktozun daha etkili kullanıldığı ve laktozdan etanol üretiminde *vgb*/VHb'nin olumlu etkisinin olduğu görülmüştür.

Peynir altı tozundan biyoetanol fermantasyonu sonrası *E.coli* TS3 suşunun VHb ekspresyon seviyelerinin 6-64 nmol/g olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu değerlerin, bir önceki çalışmada yine TS3 suşu ile LB materyali ile zenginleştirilmiş

peynir altı tozu besiyeri ile de benzer olduğu (27-47 nmol/g) tespit edilmiştir [Akbas et al., 2014]. Düşük havalandırma koşullarında *E.coli,* TS3 suşunun farklı şeker (mısır hidrolizi, peynir altı suyu, patates ve mısır işleme atık suyu) içeren ortamlarda VHb ekspresyon seviyeleri ise 14-300 nmol/g arasında değişmektedir [Sanny et al., 2010, [Abanoz et al., 2012], [Akbas et al., 2014], [Sumer et al., 2015]. Düşük VHb ekspresyonun ise yüksek VHb ekspresyonuna göre daha avantajlı olduğu çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir [Sanny et al., 2010], [Abanoz et al., 2012], [Sumer et al., 2015]. Bu çalışmada da düşük VHb ekspresyon seviyesinden (6-64 nmol/g) dolayı VHb teknolojisi avantajlı olmuştur.

- İmmobilizasyonun etkisi

Fermantasyon teknolojisinde hücre immobilizasyonu sıklıkla uygulanan bir yöntemdir. Bu kapsamda, biyoetanol üretimi çalışmalarında immobilize hücrelerin serbest hücrelere göre daha etkin olması birçok farklı çalışmalar ile belirlenmiştir [Behera et al., 2010], [Behera et al., 2011]. Metabolit üretiminin arttırılmasının yanı sıra hücre immobilize sistemleri ile fermantasyonda lag fazının kısalması, hücrelerin inhibitör ürünlere ve osmotik basınca daha dayanıklı olması ve besleyici ek materyallerin daha kolay kullanımı gibi pek çok avantaj sağlanmaktadır [Wendhausen, 1998], [Peinado et al., 2006], [Yu et al., 2010], [Yao et al., 2011]. Razmovski ve Vucurovic (2012) yapmış oldukları bir çalışmada, immobilize *S.cerevisae*'nin inhibitörlerden korunduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, şeker pancarı melası ve meyve suyundan etanol üretiminin ise immobilize hücreler ile en az 3 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. *S.cerevisae* ile yapılan diğer bir çalışmada ise, substrat tüketiminin (%96) immobilizasyon ile daha yüksek olduğu bildirilmiştir [Ghorbani et al., 2011]. Yapılan bu çalışmada da serbest hücrelere göre immobilize hücreler ile etanol üretimi ile ilgili verimlerin daha yüksek (%20) olduğu belirlenmiştir.

- Tekrarlı fermantasyonda immobilizasyonun etkisi

Hücre immobilizasyonu etanol üretimini arttırmasının yanı sıra uzun ve tekrarlı döngüler boyunca etanol üretim kararlılığının sağlamasından dolayı avantajlıdır [Duarte et al., 2013], [Kirdponpattara and Phisalaphong, 2013]. Bu çalışmada, her iki immobilize *E.coli* suşu (FBR5 ve TS3) ile WP6 besi ortamında 96 saat süreli 15 tekrarlı fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Tekrarlı fermantasyonlardan ilk 8

fermantasyonda, etanol üretiminde her 2 suş ile de azalmanın olmadığı, yedinci ve sekizinci tekrarlı fermantasyonlarda ise her 2 suşun da etanol üretiminin arttığı saptanmıştır. *S.cerevisiae* ile yapılan farklı bir çalışmada, karbon kaynağı olarak tatlı sorgum ile hazırlanan besiyerinde immobilize hücreler ile etanol üretiminde ilk tekrarlı 8 fermantasyon süresince azalmanın olmadığı bildirilmiştir [Ariyajaroenwong et al., 2012]. Farklı bir çalışmada, immobilize *K.marxianus* ve *S.cerevisae* ile yapılan tekrarlı fermantasyonlarda 8 tekrarlı fermantasyon süresince üretilen etanol miktarının kararlı olduğu bildirilmiştir [Guo et al., 2010]. İmmobilize *S.cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda ise, tekrarlı fermantasyonlar sonrası etanol üretiminin arttığı veya fermantasyon süresinin kısaldığı raporlanmıştır [Rattanapan et al., 2011], [Ercan et al., 2013]. *Z.mobilis* ile yapılan başka bir çalışmada da özellikle dördüncü ve sekizinci tekrarlı fermantasyonlarda etanol üretiminin arttığı bildirilmiştir [Santos and Cruz, 2016]. Yine benzer bir şekilde, Mariam ve arkadaşları (2009) yapmış oldukları bir çalışmada ise, immobilize *S.cerevisiae* ile 6 tekrarlı biyoetanol üretiminde en fazla etanol üretiminin dördüncü tekrarlı fermantasyonda gerçekleştiği ve dördüncü fermantasyon sonrası ise etanol üretiminin azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında da on birinci fermantasyon sonrası hem FBR5 hem de TS3 suşunun etanol üretimlerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu tekrarlı fermantasyonlarda TS3 suşu ile üretilen etanol miktarının başlangıç etanol miktarına yakın ve kararlı olduğu belirlenirken, FBR5 suşunun ürettiği etanol miktarında önemli ölçüde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak 15 tekrarlı fermantasyonda VHb eksprese eden TS3 suşunun FBR5 suşuna göre daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, immobilize *E.coli* soylarının peynir altı tozu ile etanol üretiminde tekrarlı kullanılabildiği ve tekrarlı fermantasyonlarda *Vitreoscilla* hemoglobini'nin önemli etkisinin olduğunu göstermektedir.

- İmmobilize hücrelerin uzun süre depo edilmesinin etkisi

İmmobilize *E.coli* suşları (FBR5 ve TS3) iki farklı saklama solüsyonunda (SS1, glukoz ve maya özütü; SS2, $CaCl_2$) +4°C'de 60 gün süre ile depo edilerek, etanol üretebilme yetenekleri araştırılmıştır. Uzun süre depo edilen *E.coli* suşları 15 gün aralıklar ile taze WP6 besiyerine aktarılarak etanol üretimleri incelendiğinde, her 2 saklama solüsyonun da kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Özellikle glukoz ve maya özütü içeren SS1 solüsyonunda depo edilen *E.coli* suşlarının etanol üretim

miktarlarının daha yüksek olması nedeniyle SS1 solüsyonunun daha kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Melzoch ve arkadaşlarının (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, *S. cerevisiae* hücrelerinin suda saklanan ortam koşullarına göre %60 sukroz içeren saklama solüsyonunda depo edilmesi ile etanol üretiminin daha fazla olduğu ve saklama solüsyonun içeriğinin önemli bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Etanol üretiminde depo süresi incelendiğinde ise özellikle 15 ve 30 gün depo edilen immobilize hücrelerinin etanol üretimlerinin, depo edilmeden kullanılan immobilize suşlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 45 ve 60 gün süre ile depo edilen immobilize suşlarının etanol üretimleri ise, depo edilmeyen immobilize suşlarının etanol üretimlerine benzer olduğu belirlenmiştir. Depo sonrası inkübe edilen immobilize suşlar ile üretilen etanol en fazla TS3 suşu ile edildiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile immobilizasyonun depo edilebilir özelliğinin incelenmesi ile saklama solüsyonun içeriği ve depo süresinin önemli birer parametre olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, immobilize hücrelerin depo edilmesinde *Vitreoscilla* hemoglobini'nin önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir.

15 ve 30 gün süre ile depo edilen *E.coli* suşlarının 8 tekrarlı fermantasyonda etanol üretimleri incelendiğinde, tekrarlı fermantasyonlar süresince etanol üretiminde azalmanın olmadığı ve yedinci fermantasyon sonrasında etanol üretim miktarının arttığı görülmüştür. Depo edilen immobilize kültürlerin tekrarlı fermantasyonda kullanım etkinliği, depo edilmeden kullanılan immobilize kültürler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

- *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin ve immobilizasyonun bir arada kullanımının etkisi

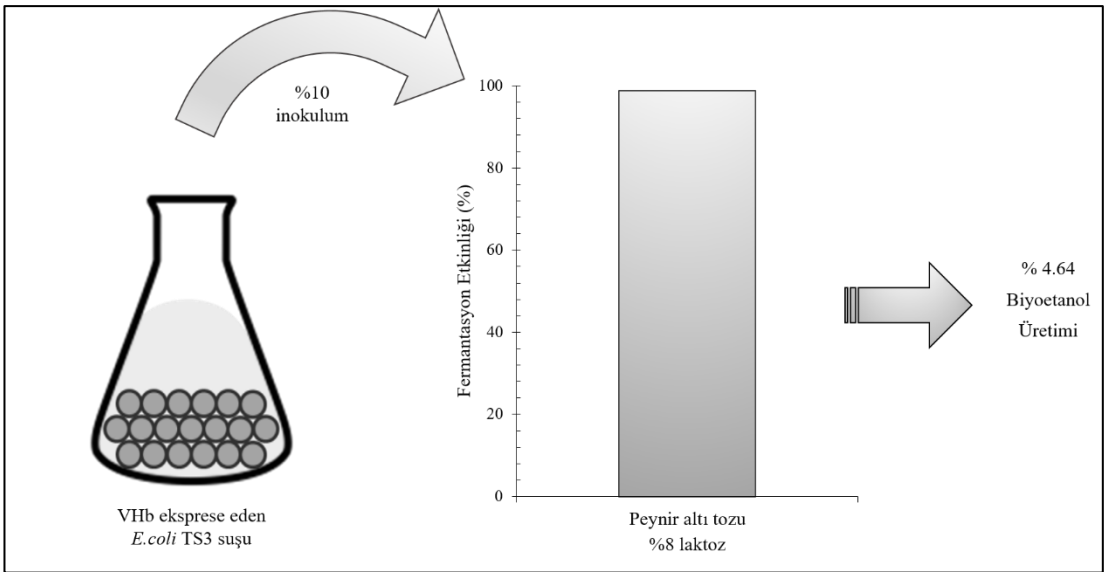
Bu çalışmada hem çalkalamalı inkübatör hem de fermentör ortam koşullarında gerçekleşen etanol üretimleri değerlendirildiğinde en yüksek etanol üretiminin WP6 (%8 laktoz) besi ortamında immobilize TS3 suşu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. İmmobilize TS3 suşu ile 96 saat inkübasyon sonrası çalkalamalı inkübatör ve fermentör ortamında üretilen etanol miktarı sırasıyla %3.55 (v/v) ve %3.93 (v/v) olduğu görülmüştür. İmmobilize TS3 suşu ile üretilen bu etanol değerlerinin serbest FBR5 suşuna göre, çalkalamalı inkübatör koşullarında %37 ve fermentör ortamında %47 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile, *Vitreoscilla* hemoglobini'nin ve immobilizasyonun bir arada kullanılması ile etanol üretiminde önemli artışın olduğu tespit edilmiştir.

- Etanol üretiminde inokulum miktarının etkisi

Etanol üretiminde immobilize hücrelerin %5-30 arasında olacak şekilde farklı inokulum oranlarında inkübe edildiğinde, etanol üretiminin %5 inokulum oranından %10 inokulum oranına artması ile arttığı, %10 inokulum oranından daha yüksek oranlarda ise azaldığı saptanmıştır. WP6 besi ortamında, immobilize TS3 suşunun daha düşük inokulum oranı (%0.2) ile inkübasyonu gerçekleştirildiğinde 96 saat süre sonunda elde edilen etanol miktarı %3.55 (v/v) iken, aynı suşun daha yüksek inokulum oranı (%10) ile inkübe edildiğinde etanol üretiminin 72 saat süre sonunda %4.64 (v/v) seviyesine yükseldiği belirlenmiştir. İnokulum oranının artması ile hem etanol üretim miktarının önemli bir oranda arttığı hem de fermantasyon süresinin 96 saatten 72 saate kısaldığı belirlenmiştir.

Farklı inokulum oranları ile etanol üretimleri incelendiğinde başlangıç laktoz konsantrasyonun da etkili bir parametre olduğu belirlenmiştir. %8 laktoz seviyesi ile üretilen etanol miktarının, daha yüksek laktoz seviyelerinde üretilen etanol miktarlarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Laktoz miktarının artması ile elde edilen etanol miktarlarında, %8 laktoz içeren WP6 besi ortamı ile elde edilen etanol miktarına göre belirlenen azalma oranlarının VHb eksprese etmeyen FBR5 suşu ile %28, VHb eksprese eden TS3 suşu ile %8 daha az olduğu tespit edilmiştir. Özellikle %15 laktoz konsantrasyonunda hazırlanan WP9 besiyerinde düşük inokulum oranı ile inkübe edilen *E.coli* suşları ile etanol üretiminin çok düşük (%2 seviyelerinde) olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* suşları daha yüksek inokulum oranları ile inkübe edildiğinde ise, etanol üretiminin düşük inokulasyona göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı laktoz konsantrasyonları ile farklı inokulum oranlarında gerçekleşen etanol üretimlerinin TS3 suşu ile daha fazla olduğu ve elde edilen bu sonuçlar ile etanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini'nin olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Farklı laktoz konsantrasyonlarında (%8-15, w/v) ve farklı inokulum oranları (%5-30, v/v) ile en iyi koşulun immobilize TS3 suşu ile 72 saat fermantasyon sonrasında, %99 fermantasyon etkinliği %4.64 (v/v) etanol üretimi ile olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Farklı laktoz oranları ile elde edilen en iyi etanol üretimi ortam koşulu; WP6 besi ortamında %10 inokulum oranında immobilize TS3 suşu ile 72 saat süreli fermantasyon.

- Sonuç ve sonraki yapılabilecek çalışmalar

Bu tez çalışmasında, farklı laktoz konsantrasyonlarında (%3-15) olacak şekilde peynir altı tozu ile hazırlanan besi ortamlarında etanol üretiminin incelenmesi ve arttırılması için immobilizasyonun ve *Vitreoscilla* hemoglobini'nin potansiyel etkileri hem ayrı ayrı hem de bir aradaki etkileri incelenmiştir. Çalkalamalı inkübatör koşullarında en iyi etanol üretiminin %8 laktoz içeren WP6 besiyerinin olduğu ve en fazla etanol üretiminin immobilize TS3 suşu ile %3.55 (v/v) seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Etanol üretimi fermentör koşulunda gerçekleştirildiğinde ise, en yüksek etanol üretiminin yine immobilize TS3 suşu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Fermentör koşullarında üretilen etanol miktarının (96 saat süre sonunda %3.93, v/v) çalkalamalı inkübatör koşullarına göre hem daha yüksek olduğu hem de etanol üretiminin daha kısa sürede gerçekleştiği (48 saat süre sonunda %3.50, v/v) belirlenmiştir. Etanol üretiminde immobilizasyonun potansiyel etkilerinin belirlenmesi için, immobilize boncukların tekrarlı fermantasyonda ve uzun süre depo edilerek fermantasyondaki kullanım etkileri incelenmiştir. *E.coli* suşlarının immobilizasyonu ile etanol üretiminde tekrarlı olarak ve uzun süre depo edilerek fermantasyonda etkili olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Farklı laktoz konsantrasyonları ile immobilizasyonun kullanım etkinliğinin tespiti için gerçekleştirilen etanol üretimlerinde, VHb eksprese eden TS3 suşunun daha fazla etanol ürettiği ve *Vitreoscilla* hemoglobini'nin olumlu etkisinin olduğu görülmüştür.

Etanol üretiminde immobilize hücrelerin optimum inokulum oranının (%5-30, v/v) belirlenmesi için yapılan sonraki çalışmada ise yine farklı oranlarda laktoz (%8-15, w/v) içeren peynir altı tozu besiyerleri değerlendirilmiştir. Çalkalamalı inkübatör koşullarında gerçekleşen fermantasyon sonrası, en yüksek etanol üretimi immobilize TS3 suşu ile %10 inokulum oranında ve 72 saat inkübayon sonrasında % 4.64 (v/v) seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Çalkalamalı inkübatör ortamında belirlenen bu ortam koşulunun fermentör ortamında da değerlendirilmesi uygun olacaktır. Ayrıca, etanol üretimi taze besiyeri ile farklı akış oranlarında besleme yapılarak sürekli fermantasyon gerçekleştirilebilir.

Bu tez çalışması ile belirlenen ortam koşulları ve elde edilen veriler, sanayide büyük ölçekli etanol üretiminin gerçekleştirilebilmesi için gerekli ön çalışmaları sunmaktadır. Bu çalışma, sanayide karbon kaynağı olarak peynir altı tozunun ve etkin etanol üretimi için immobilizasyon/VHb teknolojisinin potansiyel olarak kullanılabileceği ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

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 (6), 436-443.

Abnisa F., Arami-Niya A., Daud W. W., Sahu J. N., & Noor I. M., (2013), “Utilization of oil palm tree residues to produce bio-oil and bio-char via pyrolysis”, Energy Conversion and Management, 76, 1073-1082.

Abrams J. J., & Webster D. A., (1990), “Purification, partial characterization, and possible role of catalase in the bacterium Vitreoscilla”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 279(1), 54-59.

Acaroğlu M., (2003), “Alternatif Enerji Kaynaklar”, Istanbul: Atlas Yayın ve Dağıtım.

Acaroğlu M., & Aydoğan H., (2012), “Biofuels energy sources and future of biofuels energy in Turkey”, Biomass and Bioenergy, 36, 69-76.

Aditiya H. B., Mahlia T. M. I., Chong W. T., Nur H., & Sebayang A. H., (2016), “Second generation bioethanol production: A critical review”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 66, 631-653.

Akbas M. Y., Sar T., & Ozcelik B., (2014), “Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “Vitreoscilla hemoglobin expressing” Escherichia coli”, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78(4), 687-694.

Akbas M., Doruk T., Ozdemir S., & Stark B., (2011), “Further investigation of the mechanism of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) protection from oxidative stress in Escherichia coli”, Biologia, 66(5), 735-740.

Al-Fetlawi H. A., & Hadi A. M., (2018), “Enhanced electricity generation by using cheese whey wastewater in a single-chamber membrane less microbial fuel cell”, Journal of University of Babylon, 26(3), 138-145.

Al-Hasan M., (2003), “Effect of ethanol–unleaded gasoline blends on engine performance and exhaust emission”, Energy Conversion and Management, 44(9), 1547-1561.

Amado I. R., Vázquez J. A., Pastrana L., & Teixeira J. A., (2016), “Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus”, Food Chemistry, 198, 54-61.

Anand A., Duk B. T., Singh S., Akbas M. Y., Webster D. A., Stark B. C., & Dikshit K. L., (2010), “Redox mediated interactions of VHb (Vitreoscilla hemoglobin) with

OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress", Biochemical Journal, 426, 271-280.

Appleby C. A., (1969), "Electron transport systems of Rhizobium japonicum. II. Rhizobium haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 172(1), 88-105.

Ariyajaroenwong P., Laopaiboon P., Jaisil P., & Laopaiboon L., (2012), "Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by Saccharomyces cerevisiae immobilized on sweet sorghum stalks", Energies, 5(4), 1215-1228.

Arnaldos M., Kunkel S. A., Wang J., Pagilla K. R., & Stark B. C., (2012), "Vitreoscilla hemoglobin enhances ethanol production by Escherichia coli in a variety of growth media", Biomass and Bioenergy, 37, 1-8.

Azam M. M., Ezeji T. C. & Qureshi N., (2014), "Novel technologies for enhanced production of ethanol: Impact of high productivity on process economics", European Chemical Bulletin, 3(9), 904-910.

Bai Y., (2015), "Genetic modification of Paenibacillus utilizing Vitreoscilla hemoglobin to improve biodesulfurization" Doctoral Thesis, Illinois Institute of Technology.

Balat M., (2011), "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review", Energy Conversion and Management, 52(2), 858-875.

Bayrakci A. G., (2009), "Değişik biyokütle kaynaklarından biyoetanol'ün elde edilmesi üzerine bir araştırma", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.

Bayrakci Ozdingis A. G., & Kocar, G., (2018), "Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 81, 2196-2203.

Bayraktar H. (2005), "Experimental and theoretical investigation of using gasoline–ethanol blends in spark-ignition engines", Renewable Energy, 30(11), 1733-1747.

Behera S., Kar S., Mohanty R. C., & Ray R. C., (2010), "Comparative study of bio-ethanol production from mahula (Madhuca latifolia L.) flowers by Saccharomyces cerevisiae cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices", Applied Energy, 87(1), 96-100.

Behera S., Mohanty R. C., & Ray R. C., (2011), "Ethanol production from mahula (Madhuca latifolia L.) flowers with immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae in Luffa cylindrica L. sponge discs", Applied Energy, 88(1), 212-215.

Bipasha D., Monami D., Sangita B., & Chiranjib B., (2017), "Ethanol production from deproteinized cheese whey powder in a batch fermentation process: optimization of process and kinetic modelling", Desalination and Water Treatment, 64, 198-206.

Boerman S. J., & Webster D. A., (1982), “Control of heme content in Vitreoscilla by oxygen”, The Journal of General and Applied Microbiology, 28(1), 35-43.

Casal E., Montilla A., Moreno F. J., Olano A., & Corzo N., (2006), “Use of chitosan for selective removal of β-lactoglobulin from whey”, Journal of Dairy Science, 89(5), 1384-1389.

Champagne C. P., & Goulet J., (1988), “Growth of bakers' yeast (Saccharomyces cerevisiae) in lactose-hydrolyzed cheese whey ultrafiltrate”, Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 21(5), 545-548.

Chang H. N., Seong G. H., Yoo I. K., Park J. K., Seo J. H., (1996), “Microencapsulation of recombinant Saccharomyces cerevisiae cells with invertase activity in liquid core alginate capsules”, Biotechnology and Bioengineering, 51, 157-162.

Chen R., & Bailey J. E., (1994), “Energetic effect of Vitreoscilla hemoglobin expression in Escherichia coli: An online 31P NMR and a saturation transfer study”, Biotechnology Progress, 10(4), 360-364.

Cheong S. H., Park H. K., Kim B. S., & Chang H. N., (1993). “Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane”, Biotechnology Techniques, 7, 879-84.

Christman M. F., Morgan R. W., Jacobson F. S., & Ames B. N., (1985), “Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat -shock proteins in Salmonella typhimurium”, Cell, 441, 753-762

Colombo B., Sciarria T. P., Reis M., Scaglia B., & Adani F., (2016), “Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture”, Bioresource Technology, 218, 692-699.

Deng F., Pan Y., Chang F., Fang W., Fang Z., & Xiao Y., (2018), “Co-expression of β-glucosidase and Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli”, Chinese Journal of Biotechnology, 34(3), 379-388.

Dien B. S., Nichols N. N., O'bryan P. J., & Bothast R. J., (2000), “Development of new ethanologenic Escherichia coli strains for fermentation of lignocellulosic biomass”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 84(1-9), 181-196.

Díez-Antolínez R., Hijosa-Valsero M., Paniagua A. I., & Gómez X., (2016), “Very-high-gravity fermentation of non-supplemented cheese whey permeate by immobilized Kluyveromyces marxianus”, Chemical Engineering Transactions, 49, 529-534.

Dikshit K. L., Dikshit R. P., & Webster D. A., (1990), “Study of Vitreoscilla globin (vgb) gene expression and promoter activity in E. coli through transcriptional fusion”, Nucleic Acids Research, 18(14), 4149-4155.

Dikshit R. P., 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.

Domingues L., Guimarães P. M., & Oliveira C., (2010), “Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for lactose/whey fermentation”, Bioengineered Bugs, 1(3), 164-171.

Dragone G., Mussatto S. I., de Silva J. B. A., & Teixeira J. A., (2011), “Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by Kluyveromyces fragilis from cheese whey powder”, Biomass and Bioenergy, 35(5), 1977-1982.

Duarte J. C., Rodrigues J. A. R., Moran P. J., Valença G. P., & Nunhez J. R., (2013), “Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation”, AMB Express, 3(1), 31.

Duk B. T., (2007), “Exploration of protein-protein interactions between Vitreoscilla hemoglobin (VHb) and E. coli Fnr, OxyR, and CydA”, Doctoral Thesis, Illinois Institute of Technology.

Duvernay W. H., Chinn M. S., & Yencho G. C., (2013), “Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol”, Industrial Crops and Products, 42, 527-537.

El-Dalatony M. M., Kurade M. B., Abou-Shanab R. A., Kim H., Salama E. S., & Jeon B. H., (2016), “Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized Saccharomyces cerevisiae”, Bioresource Technology, 219, 98-105.

Ercan Y., Irfan T., & Mustafa K., (2013), “Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized Saccharomyces cerevisiae cells in a stirred tank bioreactor”, Bioresource Technology, 135, 365-371.

Erenler S. O., Gencer S., Geckil H., Stark B. C., & Webster D. A., (2004), “Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Enterobacter aerogenes: effect on cell growth and oxygen uptake”, Applied Biochemistry and Microbiology, 40(3), 241-248.

Frey A. D., & Kallio P. T., (2003), “Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology”, FEMS Microbiology Reviews, 27(4), 525-545.

Frey A. D., Fiaux J., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J. E., & Kallio P. T., (2001), “Dissection of Central Carbon Metabolism of Hemoglobin-Expressing Escherichia coli by 13C Nuclear Magnetic Resonance Flux Distribution Analysis in Microaerobic Bioprocesses”, Applied and Environmental Microbiology, 67(2), 680-687.

Gabardo S., Rech R., Rosa C. A., & Ayub M. A. Z., (2014), “Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of Kluyveromyces marxianus in batch and continuous bioreactors”, Renewable Energy, 69, 89-96.

Gancedo J. M., (1998), “Yeast carbon catabolite repression”, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(2), 334-361.

Geckil H., Gencer S., Kahraman H., & Erenler S. O., (2003), “Genetic engineering of Enterobacter aerogenes with the Vitreoscilla hemoglobin gene: cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress”, Research in Microbiology, 154(6), 425-431.

Gekas V., & Lopez-Leiva M., (1985), “Hydrolysis of lactose: A literature review”, Process Biochemistry, 20(1), 2-12.

Ghaly A. E., & El-Taweel A. A., (1995), “Effect of micro-aeration on the growth of Candida pseudotropicalis and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey”, Bioresource Technology, 52(3), 203-217.

Ghasemi M., Ahmad A., Jafary T., Azad A. K., Kakooei S., Daud W. R. W., & Sedighi M., (2017), “Assessment of immobilized cell reactor and microbial fuel cell for simultaneous cheese whey treatment and lactic acid/electricity production”, International Journal of Hydrogen Energy, 42(14), 9107-9115.

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.

Gilson C. D., & Thomas A., (1995), “Calcium alginate bead manufacture: with and without immobilised yeast. Drop formation at a two- fluid nozzle”, Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology, 62(3), 227-232.

Gong T., Xu X., Dang Y., Kong A., Wu Y., Liang P., ... & Yang C. (2018). “An engineered Pseudomonas putida can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamates”, Science of The Total Environment, 628, 1258-1265.

Gryta M., (2002), “The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system”, Desalination, 142(1), 79-88.

Guadix A., Sørensen E., Papageorgiou L. G., & Guadix E. M., (2004), “Optimal design and operation of continuous ultrafiltration plants”, Journal of Membrane Science, 235(1-2), 131-138.

Guimarães P. M., 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(3), 375-384.

Guldhe A., Singh P., Kumari S., Rawat I., Permaul K., & Bux F., (2016), “Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized Aspergillus niger whole cell lipase biocatalyst”, Renewable Energy, 85, 1002-1010.

Guo M., Song W., & Buhain J., (2015), “Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 42, 712-725.

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.

Guo Z., Tan H., Lv, Z., Ji Q., Huang Y., Liu J., ... & Zhang L., (2018), “Targeted expression of Vitreoscilla hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in Hyoscyamus niger hairy roots”, Scientific Reports, 8(1), 17969.

Gupta A., & Verma J. P., (2015), “Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 41, 550-567.

Guy E. J., & Bingham E. W., (1978), “Properties of β-galactosidase of Saccharomyces lactis in milk and milk products”, Journal of Dairy Science, 61(2), 147-151.

Hamouda R. A., Sherif S. A., & Ghareeb M. M., (2018), “Bioethanol production by various hydrolysis and fermentation processes with micro and macro green algae”, Waste and Biomass Valorization, 9(9), 1495-1501.

Hara T., & Tanoue K., (2006), “Laminar flame speed of ethanol, n-heptane, iso-octane air mixtures”, JSAE paper, 20068518.

Harde S. M., Bankar S. B., Ojamo H., Granström T., Singhal R. S., & Survase S. A., (2014), “Continuous lignocellulosic ethanol production using Coleus forskohlii root hydrolysate”, Fuel, 126, 77-84.

Hausladen A., Privalle C. T., Keng T., DeAngelo J., & Stamler J. S., (1996), “Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR”, Cell, 86(5), 719-729.

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.

Isarankura-Na-Ayudhya C., Panpumthong P., Tangkosakul T., Boonpangrak S., & Prachayasittikul V., (2008), “Shedding light on the role of Vitreoscilla hemoglobin on cellular catabolic regulation by proteomic analysis”, International Journal of Biological Sciences, 4(2), 71.

Iuchi S., (1993), Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase

in sensor protein ArcB of Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 268(32), 23972-23980.

Iuchi S., & Lin E. C., (1992), "Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of Escherichia coli", Journal of Bacteriology, 174(17), 5617-5623.

Jeong J. W., Park K. M., Chung M., & Won J. I., (2015), "Influence of Vitreoscilla hemoglobin gene expression on 2, 3-butanediol production in Klebsiella oxytoca", Biotechnology and Bioprocess Engineering, 20(1), 10-17.

Jin Y. L., & Speers R. A., (1998), "Flocculation of Saccharomyces cerevisiae", Food Research International, 31(6-7), 421-440.

Joshi M. S., Gowda L. R., & Bhat S. G., (1987), "Permeabilization of yeast cells (Kluyveromyces fragilis) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide", Biotechnology Letters, 9(8), 549-554.

Juodeikiene G., Zadeike D., Bartkiene E., & Klupsaite D., (2016), "Application of acid tolerant Pedioccocus strains for increasing the sustainability of lactic acid production from cheese whey", LWT-Food Science and Technology, 72, 399-406.

Kahraman H., & Geckil H., (2016), "Growth in the presence of organic solvents in Pseudomonas aeruginosa and its Vitreoscilla Hemoglobin (Vhb) recombinant strain (Pajc)", Fırat University Turkish Journal of Science & Technology, 11(2), 1-5.

Kallio P. T., Jin Kim D., Tsai P. S., & Bailey J. E., (1994), "Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters Escherichia coli energy metabolism under oxygen- limited conditions", European Journal of Biochemistry, 219(1- 2), 201-208.

Kar Y., & Deveci H., (2006), "Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels", Energy Sources Part A, 28(10), 909-921.

Karel S. F., Libicki S. B., & Robertson C. R., (1985), "The immobilization of whole cells: engineering principles", Chemical Engineering Science, 40(8), 1321-1354.

Kargi F., & Ozmıhcı S., (2006), "Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters", Enzyme and Microbial Technology, 38(5), 711-718.

Kaya D., & Kilic F. C., (2015), "New markets for renewable industries: Developing countries-Turkey, its potential and policies", Journal of Energy in Southern Africa, 26(1), 25-35.

Khosla C., & Bailey J. E., (1988), Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant Escherichia coli", Nature, 331(6157), 633.

Khosla C., & Bailey J. E., (1989), "Evidence for partial export of Vitreoscilla hemoglobin into the periplasmic space in Escherichia coli: implications for protein function", Journal of Molecular Biology, 210(1), 79-89.

Kiley P. J., & Storz G., (2004), “Exploiting thiol modifications”, PLoS Biology, 2(11), e400.

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

Kosaric N., & Asher Y. J., (1985), “The utilization of cheese whey and its components”, In Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering, Springer, Berlin, Heidelberg.

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.

Koushki M., Jafari M., & Azizi M., (2012), “Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains”, Journal of Food Science and Technology, 49(5), 614-619.

Kundu P. K., Chakma A., & Feng X., (2013), “Modelling of multicomponent gas separation with asymmetric hollow fibre membranes-methane enrichment from biogas”, The Canadian Journal of Chemical Engineering, 91(6), 1092-1102.

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J., (1999), “Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 77(1-3), 91-103.

Lebeau T., Moan R., Turpin V., & Robert J. M., (1998), “Alginate-entrapped Haslea ostrearia as inoculum for the greening of oysters”, Biotechnology Techniques, 12(11), 847-850.

Leite A. R., Guimarães W. V., Araújo E. F. D., & Silva D. O., (2000), “Fermentation of sweet whey by recombinant Escherichia coli K011”, Brazilian Journal of Microbiology, 31(3), 211-214.

Li H., Wu M., Xu L., Hou J., Guo T., Bao X., & Shen Y., (2015), “Evaluation of industrial Saccharomyces cerevisiae strains as the chassis cell for second- generation bioethanol production”, Microbial Biotechnology, 8(2), 266-274.

Liu D., Wan N., Zhang F., Tang Y. J., & Wu S. G., (2017), “Enhancing fatty acid production in Escherichia coli by Vitreoscilla hemoglobin overexpression”, Biotechnology and Bioengineering, 114(2), 463-467.

Liu M., Li S., Xie Y., Jia S., Hou Y., Zou Y., & Zhong C., (2018), “Enhanced bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus via expression of Vitreoscilla hemoglobin and oxygen tension regulation”, Applied Microbiology and Biotechnology, 102(3), 1155-1165.

Lynd L. R., (1996), “Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy”, Annual Review of Energy and The Environment, 21(1), 403-465.

Mariam I., Manzoor K., Ali S., & Ul-Haq I., (2009), “Enhanced production of ethanol from free and immobilized Saccharomyces cerevisiae under stationary culture”, Pakistan Journal of Botany, 41(2), 821-833.

Markou G., & Monlau F., (2019), “Nutrient recycling for sustainable production of algal biofuels”, In Biofuels from Algae, Elsevier.

Martinez D., Feiden A., Bariccatti R., & de Freitas Zara K., (2018), “Ethanol Production from Waste of Cassava Processing”, Applied Sciences, 8(11), 2158.

Mawson A. J., (1994), “Bioconversions for whey utilization and waste abatement”, Bioresource Technology, 47(3), 195-203.

Mayfield S., (2011), “Micro-algae for the production of biofuels and bio-products”, Journal of Phycology, 47, 5-6.

Mejía A., Luna D., Fernández F. J., Barrios-González J., Gutierrez L. H., Reyes A. G., ... & Kelly S., (2018), “Improving rifamycin production in Amycolatopsis mediterranei by expressing a Vitreoscilla hemoglobin (VHb) gene fused to a cytochrome P450 monooxygenase domain”, 3 Biotech, 8(11), 456.

Melzoch K., Rychtera M., & Hábová V., (1994), “Effect of immobilization upon the properties and behaviour of Saccharomyces cerevisiae cells”, Journal of Biotechnology, 32(1), 59-65.

Michalopoulos I., Chatzikonstantinou D., Mathioudakis D., Vaiopoulos I., Tremouli A., Georgiopoulou M., ... & Lyberatos G., (2017), “Valorization of the liquid fraction of a mixture of livestock waste and cheese whey for biogas production through high-rate anaerobic co-digestion and for electricity production in a microbial fuel cell (MFC)”, Waste and Biomass Valorization, 8(5), 1759-1769.

Milessi T. S., Antunes F. A., Chandel A. K., & da Silva S. S., (2015), “Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of Scheffersomyces stipitis: Effect of cell concentration and stirring”, Bioengineered, 6(1), 26-32.

Mishra A., Sharma A. K., Sharma S., Bagai R., Mathur A. S., Gupta R. P., & Tuli D. K., (2016), “Lignocellulosic ethanol production employing immobilized Saccharomyces cerevisiae in packed bed reactor”, Renewable Energy, 98, 57-63.

Mu T., Yang M., Zhao J., Sharshar M. M., Tian J., & Xing J., (2017), “Improvement of desulfurizing activity of haloalkaliphilic Thialkalivibrio versutus SOB306 with the expression of Vitreoscilla hemoglobin gene”, Biotechnology Letters, 39(3), 447-452.

Munjal N., Mattam A., Pramanik D., Srivastava P., & Yazdani S. S., (2012), “Modulation of endogenous pathways enhances bioethanol yield and productivity in Escherichia coli”, Microbial Cell Factories, 11(1), 145.

Murari C. S., da Silva D. C. M. N., Schuina G. L., Mosinahti E. F., & Del Bianchi V. L., (2019), “Bioethanol production from dairy industrial coproducts”, BioEnergy Research, 12(1), 112-122.

Naik S. N., Goud V. V., Rout P. K., & Dalai A. K., (2010), “Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2), 578-597.

Najafpour G., Younesi H., & Ismail K. S. K., (2004), “Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using Saccharomyces cerevisiae”, Bioresource Technology, 92(3), 251-260.

Nigam P. S., & Singh A., (2011), “Production of liquid biofuels from renewable resources”, Progress in Energy and Combustion Science, 37(1), 52-68.

Nikolić S., Mojović L., Pejin D., Rakin M., & Vukašinović M., (2010), “Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus”, Biomass and Bioenergy, 34(10), 1449-1456.

Nilsson M., Kallio P. T., Bailey J. E., Bülow L., Wahlund K. G., (1999), “Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study”, Biotechnology Progress, 15, 158-163.

Norton S., & D'Amore T., (1994), “Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing”, Enzyme and Microbial Technology, 16(5), 365-375.

Nwufo O. C., Nwafor O. M. I., & Igbokwe J. O., (2016), “Effects of blends on the physical properties of bioethanol produced from selected Nigerian crops”, International Journal of Ambient Energy, 37(1), 10-15.

Orii Y., & Webster D. A., (1986), “Photodissociation of oxygenated cytochrome o (s) (Vitreoscilla) and kinetic studies of reassociation”, Journal of Biological Chemistry, 261(8), 3544-3547.

Ortiz- Muñiz B., Carvajal- Zarrabal O., Torrestiana- Sanchez B., & Aguilar- Uscanga M. G., (2010), “Kinetic study on ethanol production using Saccharomyces cerevisiae ITV- 01 yeast isolated from sugar cane molasses”, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 85(10), 1361-1367.

Ozmihci S., & Kargi F., (2007c), “Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution”, Letters Applied Microbiology, 44(6), 602-606.

Ozmihci S., & Kargi F., (2007a), “Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP)”, Enzyme Microbial Technology, 41, 876-80.

Ozmihci S., & Kargi F., (2007b), “Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation”, Enzyme Microbial Technology, 41, 169-74.

Ozmihci S., & Kargi F., (2007d), “Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations”, Bioresource Technology, 98, 2978-84

Ozmihci S., & Kargi F., (2007e), “Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: Effects of hydraulic residence time”, Bioprocess and Biosystems Engineering, 30(2), 79-86.

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.

Ozmihci S., & Kargi F., (2009), “Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed- column bioreactor: effects of feed sugar concentration”, Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 84(1), 106-111.

Pacheco A. M., Gondim D. R., & Gonçalves L. R. B., (2010), “Ethanol production by fermentation using immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae in cashew apple bagasse”, Applied biochemistry and Biotechnology, 161(1-8), 209-217.

Pal P., & Nayak J., (2016), “Development and analysis of a sustainable technology in manufacturing acetic acid and whey protein from waste cheese whey”, Journal of Cleaner Production, 112, 59-70.

Palmqvist E., & Hahn-Hägerdal B., (2000), “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition”, Bioresource Technology, 74(1), 25-33.

Panesar P. S., Kennedy J. F., Gandhi D. N., & Bunko K., (2007), “Bioutilisation of whey for lactic acid production”, Food Chemistry, 105(1), 1-14.

Park J. K., & Chang H. N., (2000), “Microencapsulation of microbial cells”, Biotechnology Advances, 18(4), 303-319.

Park K. W., Kim K. J., 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(36), 33334-33337.

Pasotti L., Zucca S., Casanova M., Micoli G., de Angelis M. G. C., & Magni P., (2017), “Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered Escherichia coli”, BMC Biotechnology, 17(1), 48.

Peinado R. A., Moreno J. J., Villalba J. M., González-Reyes J. A., Ortega J. M., & Mauricio J. C., (2006), “Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications”, Enzyme and Microbial Technology, 40(1), 79-84.

Pérez-Carrillo E., Cortés-Callejas M. L., Sabillón-Galeas L. E., Montalvo-Villarreal J. L., Canizo J. R., Moreno-Zepeda M. G., & Serna-Saldivar S. O., (2011), “Detrimental effect of increasing sugar concentrations on ethanol production from maize or decorticated sorghum mashes fermented with Saccharomyces cerevisiae or Zymomonas mobilis”, Biotechnology Letters, 33(2), 301-307.

Phukoetphim N., Salakkam A., Laopaiboon P., & Laopaiboon L., (2017), “Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes”, Electronic Journal of Biotechnology, 26, 84-92.

Pickett J., Anderson D., Bowles D., Bridgwater T., Jarvis P., Mortimer N., ... & Woods J., (2008), “Sustainable biofuels: prospects and challenges”, The Royal Society, London, UK.

Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A., & Russell I., (1998), “Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review”, Journal of the Institute of Brewing, 104(1), 19-31.

Prinz W. A., Åslund F., Holmgren A., & Beckwith J., (1997), “The role of the Thioredoxin and Glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm”, Journal of Biological Chemistry, 272(25), 15661-15667.

Ramakrishna S. V., & Prakasham R. S., (1999), “Microbial fermentations with immobilized cells”, Current Science, 87-100.

Ramandeep D., Hwang K. W., Raje M., Kim K. J., Stark B. C., Dikshit K. L., & Webster D.A., (2001), “Vitreoscilla hemoglobin: intracellular localization and binding to membranes”, The Journal of Biological Chemistry, 277, 24781-24789.

Ramos L. R., & Silva E. L., (2018), “Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor”, International Journal of Hydrogen Energy, 43(29), 13081-13089.

Rattanapan A., Limtong S., & Phisalaphong M., (2011), “Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons”, Applied Energy, 88(12), 4400-4404.

Razmovski R., & Vučurović V., (2011), “Ethanol production from sugar beet molasses by S. cerevisiae entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix”, Enzyme and Microbial Technology, 48(4-5), 378-385.

Razmovski R., & Vučurović V., (2012), “Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using Saccharomyces cerevisiae immobilized on maize stem ground tissue”, Fuel, 92(1), 1-8.

Remón J., Laseca M., García L., & Arauzo J., (2016), “Hydrogen production from cheese whey by catalytic steam reforming: Preliminary study using lactose as a model compound”, Energy Conversion and Management, 114, 122-141.

ResGaz 1, (2012), Benzin Türlerine Etanol Harmanlanması Hakkında Tebliğ, 7 Temmuz 2012 tarih ve 28346 sayılı Resmî Gazete.

RFA, 2015. Renewable Fuels Association (RFA). Going global-2015 ethanol industry outlook. Washington DC.

Rizza L. S., Smachetti M. E. S., Do Nascimento M., Salerno G. L., & Curatti L., (2017), “Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol”, Algal Research, 22, 140-147.

Rodionova M. V., Poudyal R. S., Tiwari I., Voloshin R. A., Zharmukhamedov S. K., Nam H. G., Zayadan B. K., Bruce B. D., Hou H. J. M., Allakhverdiev S. I., (2017), “Biofuel production: challenges and opportunities”, International Journal of Hydrogen Energy, 42(12), 8450-8461.

Rodríguez L. A., Toro M. E., Vazquez F., Correa-Daneri M. L., Gouiric S. C., & Vallejo M. D., (2010), “Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation”, International Journal of Hydrogen Energy, 35(11), 5914-5917.

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

Saini P., Beniwal A., Kokkiligadda A., & Vij S., (2017), “Evolutionary adaptation of Kluyveromyces marxianus strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol”, Process Biochemistry, 62, 69-79.

Sanny T., (2009), “Increased ethanol production efficiency by genetic engineering of Escherichia coli to express Vitreoscilla hemoglobin”, Doctoral 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.

Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., & Iorio G., (2009), “Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source”, Biomass and Bioenergy, 33(12), 1687-1692.

Sansonetti S., Hobley T. J., Calabrò V., Villadsen J., & Sin G., (2011), “A biochemically structured model for ethanol fermentation by Kluyveromyces marxianus: A batch fermentation and kinetic study”, Bioresource Technology, 102(16), 7513-7520.

Santana Á. L., & Meireles M. A. A., (2014), “New starches are the trend for industry applications: a review”, Food and Public Health, 4(5), 229-241.

Santos V. A. Q., & Cruz C. H. G., (2017), “Zymomonas mobilis immobilized on loofa sponge and sugarcane bagasse for Levan and ethanol production using repeated batch fermentation”, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 34(2), 407-418.

Sar T., Stark B. C., & Yesilcimen Akbas M., (2017a), “Effective ethanol production from whey powder through immobilized E. coli expressing Vitreoscilla hemoglobin”, Bioengineered, 8(2), 171-181.

Sar T., Seker G., Erman A. G., Stark B. C., & Yesilcimen Akbas M., (2017b), “Repeated batch fermentation of immobilized E. coli expressing Vitreoscilla hemoglobin for long-term use”, Bioengineered, 8(5), 651-660.

Sarris D., & Papanikolaou S., (2016), “Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and Technologies”, Engineering in Life Sciences, 16(4), 307-329.

Sasaki Y., Takagi T., Motone K., Shibata T., Kuroda K., & Ueda M., (2018), “Direct bioethanol production from brown macroalgae by co-culture of two engineered Saccharomyces cerevisiae strains”, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 82(8), 1459-1462.

Schnepf R., & Yacobucci B. D., (2013), “Renewable fuel standard (RFS): overview and issues”, Library of Congress, Congressional Research Service.

Sembiring K. C., Mulyani H., Dahnum D., & Sudiyani Y., (2013), “Rice flour and white glutinous rice flour for use on immobilization of yeast cell in ethanol production”, Energy Procedia, 32, 99-104.

Sharma D., Beniwal A., Saini P., Kapil S., & Vij S., (2018), “Engineering microbial cell factories for ımproved whey fermentation to produce bioethanol. Microbial Cell Factories, 353-370.

Singh A., Sharma P., Saran A. K., Singh N., & Bishnoi N. R., (2013), “Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized Saccharomyces cerevisiae on various matrices”, Renewable Energy, 50, 488-493.

Singh P. K., Deol P. K., & Kaur I. P., (2012), “Entrapment of Lactobacillus acidophilus into alginate beads for the effective treatment of cold restraint stress induced gastric ulcer”, Food & Function, 3(1), 83-90.

Sirajunnisa A. R., & Surendhiran D., (2016), “Algae- A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 66, 248-267.

Siso M. G., (1996), “The biotechnological utilization of cheese whey: a review”, Bioresource Technology, 57(1), 1-11.

Soam S., Kapoor M., Kumar R., Borjesson P., Gupta R. P., & Tuli D. K., (2016), “Global warming potential and energy analysis of second generation ethanol production from rice straw in India”, Applied Energy, 184, 353-364.

Stark B. C., Dikshit K. L., & Pagilla K. R., (2011), “Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium Vitreoscilla”, Biotechnology Letters, 33(9), 1705.

Stark B. C., Dikshit K. L., & Pagilla K. R., (2012), “The biochemistry of Vitreoscilla hemoglobin”, Computational and Structural Biotechnology Journal, 3(4), e201210002.

Stark B. C., Pagilla K. R., & Dikshit K. L., (2015), “Recent applications of Vitreoscilla hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation”, Applied Microbiology and Biotechnology, 99(4), 1627-1636.

Storz G., & Imlayt J. A., (1999), “Oxidative stress”, Current Opinion in Microbiology, 2(2), 188-194.

Sulfahri, Amin, M., Sumitro S. B., & Saptasari M., (2016), “Bioethanol production from algae Spirogyra hyalina using Zymomonas mobilis”, Biofuels, 7(6), 621-626.

Sumer F., Stark B. C., & Yesilcimen Akbas M., (2015), “Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using E. coli engineered to express Vitreoscilla haemoglobin”, Environmental Technology, 36(18), 2319-2327.

TAPDK, (2015), Alkol piyasası, Resmi istatikler. http://www.tapdk.gov.tr/tr/piyasa-duzenlemeleri/alkol-piyasasi/resmiistatistikler.aspx, [Erişim Tarihi: 10 Şubat 2016].

Tomaszewska M., & Białończyk L., (2016), “Ethanol production from whey in a bioreactor coupled with direct contact membrane distillation”, Catalysis Today, 268, 156-163.

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.

Turkozu B., Ozen D. N., & Altinisik K., (2010), “The energy efficiency utilization of the Cumra sugar factory with exergy analysis”, Isı Bilimi ve Tekniği Dergisi-Journal of Thermal Science and Technology, 30(2), 77-83.

Upadhyay A., Lama J. P., & Tawata S., (2010), “Utilization of pineapple waste: a review”, Journal of Food Science and Technology Nepal, 6, 10-18.

Vanhala P., Bergström I., Haaspuro T., Kortelainen P., Holmberg M., & Forsius M., (2016), “Boreal forests can have a remarkable role in reducing greenhouse gas emissions locally: land use-related and anthropogenic greenhouse gas emissions and sinks at the municipal level”, Science of the Total Environment, 557, 51-57.

Vohra M., Manwar J., Manmode R., Padgilwar S., & Patil S., (2014), “Bioethanol production: feedstock and current Technologies”, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2(1), 573-584.

Wakabayashi S., Matsubara H., & Webster D. A., (1986), “Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla”, Nature, 322(6078), 481.

Wang M., Han J., Dunn J. B., Cai H., & Elgowainy A., (2012), “Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use”, Environmental Research Letters, 7(4), 045905.

Wang Q., Yu H., Wang M., Yang H., & Shen Z., (2018), “Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered Bacillus subtilis through promoter replacement and Vitreoscilla hemoglobin co-expression”, Process Biochemistry, 70, 36-44.

Web 1, 2019. https://www.endswasteandbioenergy.com/article/1493985/eu-biofuel-consumption-92?bulletin=ewb-daily&utm_medium=EMAIL&utm_campaign=eNews%20Bulletin&utm_source=20180926&utm_content=ENDS%20Waste%20and%20Bioenergy%20Daily%20(152)::&email_hash= (Erişim Tarihi: 16/01/2019).

Web 2, 2019. http://konyaseker.com.tr/tr/icerik/detay/2085/biyoetanol-uretim-tesisi (Erişim Tarihi: 25/06/2019).

Webster D. A., (1987), “Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins”, Eichorn G.C. & Marzilli LG (eds), Advances in Inorganic Biochemistry, Elsevier, New York.

Webster D. A., & Hackett, D. P., (1966), “The purification and properties of cytochrome o from Vitreoscilla”, Journal of Biological Chemistry, 241(14), 3308-3315.

Webster D. A., & Liu C. Y., (1974), “Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome o reductase associated with cytochrome o purified from Vitreoscilla evidence for an intermediate oxygenated form of cytochrome o”, Journal of Biological Chemistry, 249(13), 4257-4260.

Wendhausen Jr R., Moran P. J., Joekes I., & Rodrigues J. A. R., (1998), “Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on chrysotile fibers”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 5(1-4), 69-73.

Wu J. M., & Fu W. C., (2012), “Intracellular co-expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances cell performance and β-galactosidase production in Pichia pastoris”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(3), 332-337.

Yang S. T., Zhu H., Li Y., Hong G., (1994), “Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor”, Biotechnology and Bioengineering, 43, 1124-1130.

Yao W., Wu X., Zhu J., Sun B., Zhang Y. Y., & Miller C., (2011), “Bacterial cellulose membrane - A new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation”, Process Biochemistry, 46, 2054-2058.

Yao C., Yang X., Roy Raine R., Cheng C., Tian Z., & Li Y., (2009), “The effects of MTBE/ethanol additives on toxic species concentration in gasoline flame”, Energy & Fuels, 23(7), 3543-3548.

Yu J., Yue G., Zhong J., Zhang X., & Tan T., (2010), “Immobilization of Saccharomyces cerevisiae to modified bagasse for ethanol production”, Renewable Energy, 35, 1130-1134.

Zabed H., Faruq G., Sahu J. N., Azirun M. S., Hashim R., & Nasrulhaq Boyce A., (2014), “Bioethanol production from fermentable sugar juice”, The Scientific World Journal, 1-11.

Zabed H., Sahu J. N., Suely A., Boyce A. N., & Faruq G., (2017), “Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 71, 475-501.

Zafar S., & Owais M., (2006), “Ethanol production from crude whey by Kluyveromyces marxianus”, Biochemical Engineering Journal, 27(3), 295-298.

Zafar S., Owais M., Saleemuddin M., & Husain S., (2005), “Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey”, International Journal of Food Science & Technology, 40(6), 597-604.

Zhang H., Kang X., Xiao N., Gao M., Zhao Y., Zhang B., & Song Y., (2019), “Intracellular expression of Vitreoscilla haemoglobin improves lipid production in Yarrowia lipolytica”, Letters in Applied Microbiology, 68(3), 248-257.

Zhang L., Li Y., Wang Z., Xia Y., Chen W., & Tang K., (2007), “Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering”, Biotechnology Advances, 25(2), 123-136.

Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., & Picataggio S., (1995), “Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis”, Science, 267(5195), 240-243.

Zhang Z., Li W., Li H., Zhang J., Zhang Y., Cao Y., ... & Li Z., (2015), “Construction and characterization of Vitreoscilla Hemoglobin (VHb) with enhanced

peroxidase activity for efficient degradation of textile dye", Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(9), 1433-1441.

Zhao T. X., Li M., Zheng X., Wang C. H., Zhao H. X., Zhang C., & Xing X. H., (2017), "Improved production of trans-4-hydroxy-L-proline by chromosomal intergration of the Vitreoscilla hemoglobin gene into recombinant Escherichia coli with expression of proline-4-hydroxylase", Journal of Bioscience and Bioengineering, 123(1), 109-115.

Zhao J., & Xia L., (2010), "Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells", Biochemical Engineering Journal, 49(1), 28-32.

Zheng M., Fredrik Å., & Gisela S., (1998), "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation", Science, 279(5357), 1718-1722.

Zhou X., Hua X., Huang L., & Xu Y., (2019), "Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess", Bioresource Technology, 272, 70-76.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji opiyonundan mezun oldu. 2013 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2018 yılında İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İklim Değişikliği programında ikinci yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2018-2019 eğitim ve öğretim döneminde Borås Üniversitesi (İsveç), Resource Recovery laboratuvarında misafir araştırmacı olarak çalışmalarda bulundu. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı ve 2019 yılında doktora eğitimini tamamladı.