

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

**NİŞASTA İÇEREN GIDA İŞLEME ATIKLARINDAN**  
**Escherichia coli'DE BAKTERİYEL HEMOGLOBİN (VHb)**  
**EKSPRESYONUNUN BİYOETANOL ÜRETİMİNE ETKİSİ**

**FATMA SÜMER**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2014**

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

**NİŞASTA İÇEREN GIDA İŞLEME**  
**ATIKLARINDAN Escherichia coli'DE**  
**BAKTERİYEL HEMOGLOBİN (VHb)**  
**EKSPRESYONUNUN BİYOETANOL**  
**ÜRETİMİNE ETKİSİ**

**FATMA SÜMER**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

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

**GEBZE**

**2014**



**GEBZE YÜKSEK  
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.06.2014 tarih ve 2014/36 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/06/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fatma SÜMER'İN tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Doç. Dr. Ferda HACİVELİOĞLU

### ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Bu çalışmada, etanolojenik *E.coli* suşu FBR5'a VHb geninin transferi ile elde edilen TS3 ve TS4 suşları, patates ve mısır işleme atığı içeren besiyerlerinde (HB1 ve HB2) ve bunların kontrol besiyerlerinde (KB1 ve KB2) büyük ve küçük hacimli, yüksek ve düşük havalandırılmalı koşullarda büyütülmüştür. Kültürlerin pH değerleri, hücre yoğunlukları, VHb seviyeleri ve etanol üretimleri 48 saatlik fermantasyon süresi sonunda değerlendirilmiştir.

Elde edilen en yüksek etanol veriminin, TS3 ve TS4 suşları (sırasıyla, % 165 ve % 141) ile büyük hacimli ve düşük havalandırılmalı koşullarda HB2'de olduğu belirlenmiştir.

Etanol artışlarının, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki artışlara bağlı olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelime: Biyoetanol, Gıda işleme atık suyu, *Vitreoscilla* hemoglobini.**

## SUMMARY

In this work, ethanogenic *E.coli* strain FBR5 transferred with VHb gene in two constructs (strain TS3 and TS4) were grown in potato and corn processing waste hydrolyzate containing media (HB1 and HB2) and their control media (KB1 and KB2) at small and large scales, at low and high aeration. Culture pH, cell growth, VHb levels and ethanol production were evaluated after 48 hour fermentation.

The highest yield levels obtained were for strains TS3 and TS4 ( 165 and 141 %, respectively) both at large scale and low aeration in HM2 medium. The increases in ethanol were due to increase in the amount of ethanol produced per unit of cell mass.

**Key Words: Bioethanol, Food processing waste water, *Vitreoscilla* hemoglobin.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, bilimsel bir bakış açısı ile çalışmama yön veren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığının temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Kraft Gıda Sanayi Ticaret A.Ş'ne ve Sn. Ergül GETİZMEN ile Sn. Ömür ATAMAN'a,

Deneylerimin bir bölümünü gerçekleştirdiğim Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü'ndeki kendi laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan öğretim üyesi Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e ve biyokimya laboratuvarı çalışanlarına,

Yüksek lisans çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Uzman Hüseyin BALCI'ya, laboratuvar arkadaşlarım Büşra ÖZÇELİK, Tuğba KÖKÜMER, Kübra HOCAOĞLU, Taner Şar ve Şeyda ÇAĞ'a teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatım süresince maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, beni her koşulda motive eden sevgili annem Vildan SÜMER'e, babam Ali SÜMER'e ve eşim Murat KART'a sonsuz teşekkürler.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyoetanol	4
2.1.1. Dünya'da Biyoetanol	8
2.1.2. Türkiye'de Biyoetanol	10
2.1.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	12
2.1.4. Biyoetanol Üretimi	17
2.1.5. Biyoetanolün Kullanım Alanları	21
2.1.6. Rekombinant Bakteri Soyları ile Biyoetanol Üretiminin Arttırılması	22
2.2. Bakteriyel Hemoglobin	23
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Patates ve Mısır İşleme Atığı Hidrolizi	30
3.2.2. Hidrolizat Besiyeri 1 (HB1) ve Kontrol Besiyeri 1 (KB1)'in Hazırlanması	30
3.2.3. Hidrolizat Besiyeri 2 (HB2) ve Kontrol Besiyeri 2 (KB2)'in	31

Hazırlanması	
3.2.4. Bakteri Soylarına Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması ve Korunması	32
3.2.5. Önkültürlerin Hazırlanması	33
3.2.6. Düşük Havalandırmalı Üreme Koşulları	33
3.2.7. Yüksek Havalandırmalı Üreme Koşulları	33
3.2.8. Kültürlerin Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi	34
3.2.9. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi	34
3.2.10. Fermantasyon Ortamında Oluşan Biyoetanol Miktarının Belirlenmesi	34
3.2.11. Besiyerinde Kalan Şeker Miktarının Belirlenmesi	35
3.2.12. Rekombinant Bakteri Soylarındaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçülmesi	35
3.2.13. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Hidrolizat Besiyeri 1 (HB1)'de Etanol Üretimleri	37
4.1.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	37
4.1.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	39
4.1.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	41
4.1.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	43
4.2. Kontrol Besiyeri 1 (KB1)'de Etanol Üretimleri	46
4.2.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	46
4.2.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	48
4.2.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	50
4.2.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	52
4.3. Hidrolizat Besiyeri 2 (HB2)'de Etanol Üretimleri	55
4.3.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	55
4.3.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	57
4.3.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	59
4.3.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler	61
4.4. Kontrol Besiyeri 2 (KB2)'de Etanol Üretimleri	64
4.4.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	64
4.4.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler	66

4.4.3. Düşük Havalandırılmalı Küçük Hacimli Kùltürler	68
4.4.4. Yüksek Havalandırılmalı Küçük Hacimli Kùltürler	70
5. SONUÇLAR ve YORUMLAR	73
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	87

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
% v/v	: Hacimsel karışım oranı
% w/v	: Ağırlık/Hacim
µl	: Mikrolitre
°C	: Celsius derece
<i>adhb</i>	: Alkol dehidrogenaz II geni
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
B	: Bor
BP	: Brithish Petroleum
C	: Karbon
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum klorür
CH <sub>3</sub> COONa	: Sodyum asetat
CO	: Karbon monoksit
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksit
CoCl <sub>2</sub>	: Kobalt klorür
Cu	: Bakır
CuCl <sub>2</sub>	: Bakır klorür
CH <sub>4</sub>	: Metan
d	: Yoğunluk
E2	: % 2 biyoetanol + % 98 benzin karışımı
E5	: % 5 biyoetanol + % 95 benzin karışımı
E10	: % 10 biyoetanol + % 90 benzin karışımı
E85	: % 85 biyoetanol + % 15 benzin karışımı
EPDK	: Enerji Piyasa Denetleme Kurulu
ETBE	: Etil Tersiyer Bütil Eter
ETOH	: Ethanol
Fe	: Demir
FeSo <sub>4</sub>	: Demir sülfat
g	: Gram

H	:	Hidrojen
HB1	:	Hidrolizat Besiyeri 1
HB2	:	Hidrolizat Besiyeri 2
HCl	:	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	Sülfürik asit
HMF	:	5-hidroksi-metil furfural
K	:	Potasyum
KB1	:	Kontrol Besiyeri 1
KB2	:	Kontrol Besiyeri 2
L	:	Litre
LB	:	Luria Bertani besiyeri
LBK	:	Ksiloz içeren LB besiyeri
<i>ldh</i>	:	Laktat dehidrogenaz
ml	:	Mililitre
MTBE	:	Metil tersiyer bütil eter
Mtep	:	Milyon ton eşdeğer petrol
Mg	:	Magnezyum
MgSO <sub>4</sub>	:	Magnezyum sülfat
Mn	:	Mangan
MnCl <sub>2</sub>	:	Mangan klorür
NaCl	:	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	:	Sodyum ditiyonit
NO	:	Azot oksit
N <sub>2</sub> O	:	Nitröz oksit
NAD <sup>+</sup>	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	:	Hidrojenlenmiş NAD
nm	:	Nanometre
nmol	:	Nanomol
OD	:	Optik yoğunluk
<i>pdc</i>	:	Pürivat dekarboksilaz geni
<i>pfl</i>	:	Pürivat format liyaz geni
pH	:	Potansiyel hidrojen
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı

TLC	:	İnce Tabaka Kromotografisi
<i>vgb</i>	:	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni
VHb	:	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
ZnSO <sub>4</sub>	:	Çinko sülfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyoetanol üretim prosesi.	18
2.2: Glukozun glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması.	19
2.3: Laktat dehidrogenaz ( <i>ldh</i> ) ve pürivat format liyaz ( <i>pfl</i> ) genlerinin susturulması ile elde edilen fermantasyon yolağı.	23
2.4: <i>vgb</i> promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri	24
2.5: <i>vgb</i> içeren <i>E. coli</i> TS4 suşuna ait hücre homojenatında VHB'nin ditiyonit ile indirgenmesi sonucu oluşan absorpsiyon spektrumu.	26
4.1: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	38
4.2: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	38
4.3: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	40
4.4: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	40
4.5: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	42

- 4.6: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de her 42  
ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x  
100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır.  
Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.7: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de üretilen 44  
etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın  
ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ )  
göstermektedir.
- 4.8: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de her 44  
ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x  
100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır.  
Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.9: HB1 içerisinde büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri 45  
(nmol/g yaş ağırlık) A: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli  
koşullarda, B: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda,  
C: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D: Yüksek  
havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın  
ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ )  
göstermektedir.
- 4.10: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen 47  
etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın  
ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ )  
göstermektedir.
- 4.11: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de her ünite 47  
hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100  
ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır.  
Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.12: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen 49  
etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın  
ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ )  
göstermektedir.
- 4.13: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de her 49  
ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x

- 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.14: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 51
- 4.15: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 51
- 4.16: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 53
- 4.17: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 53
- 4.18: KB1 içerisinde büyütülen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 54
- 4.19: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 56
- 4.20: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 56

- 4.21: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol(g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 58
- 4.22: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 58
- 4.23: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 60
- 4.24: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 60
- 4.25: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı(%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 62
- 4.26: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 62
- 4.27: HB2 içerisinde büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 63

- 4.28: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 65
- 4.29: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 65
- 4.30: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 67
- 4.31: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 67
- 4.32: Düşük havalandırılmalı, küçük hacimli, antibiyotikli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 69
- 4.33: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 69
- 4.34: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 71
- 4.35: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 71

- 4.36: KB2 içerisinde büyütilen kültürlerin VHB ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

# TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: Etanol'ün fiziksel ve kimyasal özellikleri.	6
2.2: Etanol'ün yakıt özellikleri.	6
2.3: Biyoetanol-Benzin karışımları.	7
2.4: Bazı ülkelerin yıllara göre biyoetanol üretim miktarları (milyar litre).	9
2.5: Bazı ülkelerin yıllara göre etanol ihtiyacı (milyar litre).	9
2.6: Dünyada 2011 yılındaki etanol üretimi.	10
2.7: Türkiye'de biyoetanol üretimi.	12
2.8: Hammadde kaynakları ve hidroliz ürünleri.	15
2.9: Hammaddelerin 1 litre etanol üretimi için gerekli miktarları ve maliyetleri.	16
2.10: Çeşitli tahılların biyoetanol üretim potansiyelleri.	17
3.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteriler, plazmitler ve özellikleri.	29
3.2: İz element solüsyon içeriği.	32
3.3: Besiyeri ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.	32
4.1: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	38
4.2: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml <sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.	40

- 4.3: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 42
- 4.4: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 44
- 4.5: HB1'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 45
- 4.6: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 47
- 4.7: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 49
- 4.8: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % 51

- v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.
- 4.9: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 53
- 4.10: KB1'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 54
- 4.11: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 56
- 4.12: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 58
- 4.13: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) 60

göstermektedir.

- 4.14: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 62
- 4.15: HB2'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 63
- 4.16: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 65
- 4.17: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 67
- 4.18: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 69

- 4.19: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 71
- 4.20: KB2'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir. 72

# 1.GİRİŞ

Her geçen gün artan canlı popülasyonuna, teknoloji ve sanayinin gelişmesine bağlı olarak enerjiye duyulan ihtiyaç artmaktadır. Kullandığımız enerji kaynaklarının en önde geleni fosil yakıtların tükenmeye başlaması ile yeni ve yenilenebilir alternatif enerji kaynaklarına giderek ihtiyaç duyulmaktadır. Fosil yakıtların çevreye hızla verdiği büyük zarar, Dünya üzerinde hızlı bir tüketim potansiyelinin varlığını gösterir. Tüketim potansiyelinin artışı, yeryüzüne karışacak atıkların miktarında büyük değişimlere sebep olmaktadır. Ekosistem dengesinin bozulmasında büyük payı olan bu durumun engellenmesi amacıyla yeryüzünde yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılması oldukça popüler bir hal almıştır. Brithish Petroleum (BP)'un 2013 yılında yayınladığı bir rapora göre; petrol rezervleri 227 milyar ton, doğal gaz rezervleri 187,3 trilyon metreküp ve kömür rezervleri ise 861 milyar tondur [BP, 2013]. Elde edilen verilere dayanarak petrolün 41, doğal gazın 64, kömürün 155 yıl içerisinde tükeneceği söylenebilir [Goldemberg J, 2007].

Yenilenebilir enerji kaynakları; Güneş, rüzgar, su gücü, biyokütle şeklinde sınıflandırılabilir. Yapısında, karbonhidrat bileşikleri bulunduran hayvansal yada bitkisel kökenli, fosil olmayan organik maddelerin tamamı biyokütle olarak adlandırılır. Biyokütleden elde edilen biyoyakıtlar ise; içeriklerinin hacim olarak en az %80'i son on yılda toplanmış canlı organizmalardan elde edilmiş her türlü yakıt olarak tanımlanmaktadır [Acaroğlu, 2008].

Biyoyakıtlar; genellikle tarımsal biyokütlelerden farklı yöntemlerle üretilmiş, özellikleri standardize edilmiş katı, sıvı yada gaz halinde bulunan yakıtlardır. Katı biyoyakıtlar; biyopelet ve biyobriket, sıvı biyoyakıtlar; biyoetanol ve biyodizel, gaz biyoyakıtlar; biyogaz ve hidrojenidir. Biyopelet ve biyobriket; organik orman atıklarının yüksek basınç altında bağlayıcı madde kullanmaksızın sıkıştırılması ile oluşan katı yakıtlardır [Öğüt, 2006]. Bu yakıtlar; yüksek ısı değere, yüksek yoğunluğa ve homojen yapılarıyla oldukça iyi bir yanma performansına sahiptir. Biyoetanol benzinle birlikte, biyodizel ise motorin yerine kullanıldığında karbondioksit (CO<sub>2</sub>) emisyonunu önemli oranda azaltmaktadır. Biyogaz ise diğer yanıcı gazlardan farklı olarak bitkisel ve hayvansal organik hammaddenin mikroorganizmalar tarafından işlenmesi sonucu elde edilmektedir.

Biyoyakıtların kullanımı; organik ve sürdürülebilir tarımın devamlılığını, ülkedeki enerji ihtiyacının bir kısmının karşılanmasını, sera gazlarının etkisiyle bozulan ekolojik dengenin pozitif yönde hareketini sağlamaktadır.

Biyoetanol, üretimi için gerekli olan hammadde kaynakları bakımından oldukça zengin bir biyoyakıttır. Biyolojik kütlelerden çeşitli mikroorganizmaların kullanılması sonucu elde edilen biyoetanol, yüksek oktanlı bir yakıttır ve benzin ile karıştırıldığında, benzinin oktan seviyesini arttırarak emisyonu azalmakta ve tam bir yanma sağlamaktadır.

Biyoetanol genel olarak; buğday, pirinç, manyok, mısır, patates, şeker pancarı, çotanak ve şeker kamışından fermantasyon yoluyla üretilmektedir.

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin, gıdaların üretim kapasitelerini etkilememesi ve sürdürülebilirlik ile yenilenebilirliğin bir arada olması hassasiyetle dengede tutulması gereken bir durumdur. Alternatif olarak, tarımsal atıkların ve fabrika atıklarının kullanımı sürdürülebilir ve yenilenebilirlik olgusuna hizmet etmektedir. Melas, peynir altı suyu, patates işleme atık suyu, çotanak, mısır küspesi biyoetanol üretimi için kullanılan fabrika atıkları içerisinde yer almaktadır. Tarımsal biyokütlenin etanole dönüştürülerek yakılması atmosfere karbonmonoksit (CO) salınımını azaltacağından tercih edilen bir procestir. Endüstriyel atıkların kullanılması sonucu çevre dostu bir yakıt üretimi oldukça başarılı ve Dünya'mızı yaşanılır kılacak etkin bir çözüm ve yaklaşımdır.

Biyoetanol, hammaddelerin fermente edilmesi sonucu elde edilmektedir. Fermantasyon, çeşitli bakteriler ve mayalar tarafından gerçekleşmektedir. Fermantasyon sonucu oluşan yan ürünler, prosesin ömrünü kısaltmakta ve canlı popülasyonunun devamlılığını tehdit etmektedir. Laktik asit, asetik asit, CO<sub>2</sub>, formik asit, furfural, fenolik bileşikler; fermantasyonu olumsuz etkileyen yan ürünlerden bazılarıdır.

Fermantasyonda; istenilen ürünün, üretim kapasitesini düşüren yan ürünlerin çoğalmaya olan etkisini azaltmak amacıyla, genetik modifikasyon ile *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) eksprese eden *Escherichia coli* (*E.coli*) kullanılmıştır. Etkin miktarlarda fermantasyon ürünü olan biyoetanol üretiminin gerçekleştirilmesi; atıkların giderimi, yenilenebilir enerji kaynaklarının devamlılığı ve küresel ısınmaya pozitif anlamda katkısı ile yenilikçi ve çevreci bir anlayış olarak benimsenmeli, araştırma ve geliştirme çalışmaları genişletilmeli ve uygulama alanları çoğaltılmalıdır.

## 1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı

Fosil yakıtların tükenme tehlikesiyle karşı karşıya geldiğimiz 21. yüzyılda, canlılığın devamlılığı için gerekli olan enerjinin, alternatif enerji kaynaklarından elde edilmesi evrensel bir amaçtır. Biyoetanol içerisinde nişasta bulunduran tüm hammaddelerden üretilebilmektedir. Bu tez çalışmasında, atıkların geri dönüşümünün sağlanması amaçlanarak, patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı kullanılmıştır. Böylece gıda atıklarının kullanımı ile doğa dostu bir yaklaşımla doğadan elde edilenin doğaya zarar vermeden kullanılarak iade edilmesi ve ihtiyaç duyulan enerjinin uzun vadede geri dönüşümlü olarak tekrar kullanılması amaçlanmıştır.

Maya ve fermantasyon yeteneğine sahip bir çok mikroorganizmadan farklı olarak *vgb/VHb* sistemini içeren rekombinant *E. coli* suşları; düşük oksijen konsantrasyonlarında ortamdaki oksijeni bağlayarak terminal solunum enzimlerine aktarır ve bu koşullarda etkin bir üreme ve metabolit üretiminin gerçekleşmesine izin verir [Ramandeep et al., 2001].

Literatürde yer alan bilgiler ışığında, patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı birlikte asit hidrolizi işlemine tabii tutularak besiyeri bileşimine katılmış ve rekombinant *E. coli* soylarının üreme ve etanol üretim miktarındaki değişiklikler belirlenmiştir.

Yapılan tez çalışmasında; genetik mühendisliği ile üretilen rekombinant *E. coli* soylarının, sanayi atığı olan patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığından elde edilen fermente şekerleri kullanarak üreme ve etanol üretim kapasitelerinin artırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında; seçilen ham madde içeriğinde bulunan glukoz ve ksiloz şekerlerini fermente ederek etanol üreten, *vgb/VHb* sistemini içeren rekombinant *E. coli* suşları kullanılarak etanol üretim potansiyelinin belirlenmesi ve artırılmasına olan katkısı araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyoetanol

Tüm dünya ülkelerinde her geçen gün artan enerji talebini karşılamak amacıyla, petrol kökenli enerji kaynaklarının yerine, alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Enerji ihtiyacının karşılanmasına hizmet edecek alternatif enerji kaynaklarının; yenilenebilir, çevreye olumsuz etkisi olmayan, biyolojik kaynaklı, CO<sub>2</sub> ve sera gazlarının atmosferdeki miktarları üzerinde olumlu etkiye sahip, kanserojen etkisi olmayan, kullanım alanlarının yaygın ve geniş bir yelpazeye sahip olması istenmektedir.

Etanol; petrol ve petrol ürünlerinden elde edilebileceği gibi çok çeşitli biyokütlelerden ve nişasta kaynaklarından da elde edilebilen, renksiz, yakıldığında temiz enerji açığa çıkan ve sıvı biyoyakıt sınıfında yer alan alternatif bir enerji kaynağıdır. Petrol ve biyokütleden elde edilen etanolün kimyasal formülü ve yapısı birbirinin aynı ve CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH'dır. Aralarındaki fark, elde edilirken kullanılan yol ve hammaddedir. Etanol; petrol türevli hammaddelerden, doğalgaz ve kömürden petrokimyasal olarak etilenin hidrasyonu ile elde edilirken, biyoetanol; çok çeşitli biyokütlelerden organizmaların fermantasyonu ile elde edilmektedir.

Patates, mısır, buğday, şeker kamışı, şeker pancarı gibi nişasta zengini bitkiler; biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılmakla birlikte gıda endüstrisinde besin maddesi olarak da kullanılmaktadır. Nişasta zengini bu bitkilerin, biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanımının sürekliliği gıda sektöründe büyük bir kriz yaratacağından, tarımsal atıklar, doğa rezidüleri ve endüstriyel gıda atıklarının amaca hizmet etmesi sorunu uzun vadede çözen bir yaklaşım olacaktır.

Biyokütlenin, alternatif enerji kaynağı olarak seçilmesinin nedenlerinden bazıları aşağıda belirtilmiştir [Adıgüzel, 2011].

- Taşıma sektöründe artan enerji ihtiyacı
- Enerjide dışa bağımlılığı azaltmak
- Fosil yakıtların yanması sonucu atmosferde biriken CO<sub>2</sub> miktarının artması
- Enerji kaynağı olarak kullandığımız fosil yakıtların tükenmesi
- Ulusal enerji güvenliği

- Kaynak çeşitliliği sağlama
- Var olan kaynakların değerlendirilmesi
- Çevre kirliliği ve iklim değişikliğinin engellenmesi
- Tarımsal ekonominin geliştirilmesi

Etanolün tarihteki yerine bakıldığında, 20. yüzyılın başlarında Henry FORD ve Nicholas OTTO tarafından üretilen içten yanmalı motorlarda ve yapılan ilk arabalarda kullanıldığı görülmektedir [Melikoğlu vd., 2010]. Popüler bir yakıt olmamasının sebebi ise o tarihlerde benzine göre çok daha maliyetli ve pahalı olmasıdır. Fakat günümüzde ihtiyaç duyulan alternatif enerji kaynaklarından en fazla üretilen biyoetanoldür [Öğüt, 2007].

Etanol, yüksek oktan ve düşük setan sayısına, geniş yanma sınırına, yüksek yanma hızına, düşük buhar basıncı ve benzinden daha yüksek buharlaşma öz ısısına sahiptir. Yüksek basınç oranı ve kısa tutuşma zamanı etanolün kimyasal yapısından kaynaklanan avantajlarındandır. Bununla birlikte etanolün enerji verimi, petrol ve türevi yakıtların enerji veriminden % 44 oranında daha azdır. Yine de sahip olduğu yüksek oksijen içeriği sayesinde, petrol ve petrol türevi yakıtlarla kıyaslandığında sera gazlarının salınımında kayda değer bir düşüş görülmektedir [Balat et al., 2008].

Etanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.1'de, yakıt özellikleri Tablo 2.2'de gösterilmektedir [Adıgüzel, 2011].

Tablo 2.1: Etanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Formül	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
Moleküler Ağırlık	46.1
Karbon ( w/t )	% 52.1
Hidrojen ( w/t )	% 13.1
Oksijen ( w/t )	% 34.7
Karbon / Hidrojen Oranı	4
Steimetrik ( hava / EtOH )	9
Özgül Ağırlık	0.79 kg/dm <sup>3</sup>
Buhar Basıncı	50 mm Hg
Kaynama Sıcaklığı	78.5 °C
Dielektrik Katsayısı	24.3
Suda Çözünme	∞

Tablo 2.2: Etanolün yakıt özellikleri.

Setan Numarası	8
Oktan Numarası	107
Kendiliğinden Ateşleme Sıcaklığı (K)	606
Latent Buharlaşma Öz Isısı (mj/Kg)	0,91
Alt Isı Değeri	26

Petrol ve türevi fosil yakıtların yerine tercih edilen biyoetanolün sağladığı avantajlar aşağıda özetlenmiştir [Adıgüzel, 2011], [Acaroğlu, 2008].

- Yerli, yenilenebilir bir yakıt kaynağıdır.
- Fosil kökenli yakıtlara olan bağımlılığı azaltır.
- Temiz bir yakıt kaynağıdır ve düşük maliyeti ile yakıtın oktan sayısını artırır.
- Üretimi ve muhafaza edilmesi kolay, küçük modifikasyonlar ile bütün araçlarda kullanılabilir bir yakıttır.
- Sera gazı emisyonlarını azaltır. Biyoyakıtlar fosil yakıtlardan % 40-80 daha az sera gazı yayar.

- Ekosistem dengesini korumaya yardımcıdır. Asit yağmurlarını, su kirliliğini, atık oluşumunu azaltır.
- Tarımsal alanda yeni istihdam sağlar.
- Net ve pozitif enerji dengesini yakalar.
- Biyoteknoloji avantajlarını geliştirme imkanına sahiptir.
- Egzoz emisyonlarını azaltır ve doğaya zarar vermeden çözümler sunar.
- Kanserojen etkiye sahip benzen ve bütadin emisyonlarını yarı yarıya azaltır.
- Partikül madde emisyonunda büyük oranda düşüş sağlar.

Biyoetanol yakıt olarak; doğrudan yada belirli oranlarda benzinle karıştırılarak kullanılmaktadır. Biyoetanolün sahip olduğu yüksek oktan sayısı, yüksek alevlenme hızı ve yüksek buharlaşma ısısı sayesinde; içten yanmalı motorlarda benzin ile karıştırılarak kullanıldığında yakıtın kısa sürede yanmasını sağlayarak, benzine göre daha yüksek bir verim ve performans göstermektedir. Etanol % 35 oksijen içeriğine sahip olduğundan benzine kıyasla, yanmak için daha az havaya ihtiyaç duymaktadır [Melikoğlu vd., 2011].

Biyoetanol; nişasta ve selüloz içeren gıda işleme atıklarından üretilebilir ve benzinle belirli oranlarda karıştırılarak çevre dostu bir yakıt haline getirilerek kullanılmaktadır. Biyoetanol % 2 ile % 85 oranına kadar benzin ile karıştırılabilmektedir. En yaygın kullanımları E10 ve E85 olarak bilinmektedir. E10, % 10 biyoetanol % 90 benzin içerir. E85, % 85 biyoetanol % 15 benzin içermektedir. Tablo 2.3'te yakıt olarak kullanılan biyoetanol ve benzin karışımlarının oranları belirtilmiştir. Biyoetanol yakıtlarda oktan artırmak amacı ile kullanılan benzen, metil tersiyer bütül eter (MTBE) gibi kanserojen maddelerin çevreci alternatifi'dir.

Tablo 2.3: Biyoetanol-Benzin karışımları.

E85	% 85 biyoetanol	% 15 benzin
E10	% 10 biyoetanol	% 90 benzin
E5	% 5 biyoetanol	% 95 benzin
E2	% 2 biyoetanol	% 98 benzin

### 2.1.1. Dünya'da Biyoetanol

Dünya'da ihtiyaç duyulan enerji talebini karşılayan enerji kaynaklarının tükenmesi ile yeni ve alternatif enerji kaynaklarının araştırılması oldukça gündemde olan bir araştırma alanıdır. Dünya'da enerji ihtiyacının büyük kısmı petrol, kömür, doğal gaz gibi fosil yakıtlar kullanılarak karşılanmaktadır.

2011 yılında Dünya genelinde kullanılan toplam birincil enerji miktarı 12274.6 milyon ton eşdeğer petrol (Mtep) olarak belirtilmiştir. Enerji kaynaklarının yüzdeleri; % 33.1 petrol, % 30.3 kömür, % 23.7 doğal gaz, % 6.4 hidrolik, % 4.9 nükleer ve % 1.6 yeni alternatif enerji kaynakları şeklindedir [Koç vd., 2013].

Fosil kaynakların Dünya'daki durumuna bakıldığında; petrolün 225.4 milyar ton, doğal gazın 208.4 trilyon m<sup>3</sup>, kömürün 860.94 milyar ton Dünya rezervine sahip olduğu görülmüştür. Dünya rezervlerinin kullanılabilme süreleri ise petrolün 54 yıl, doğal gazın 64 yıl ve kömürün 112 yıldır. Fosil yakıtların tüketim payı; % 38 petrol, % 27.2 doğal gaz ve %34.8 kömürdür [Koç vd., 2013].

Almanya Dünya Nüfus Vakfının raporlarına göre, 1.01.2014 tarihinden itibaren Dünya nüfusu 7.2 milyardır. 50 yıl sonra Dünya nüfusunun 10.7 milyar olacağı tahmin edilmektedir. Yeryüzünde kullanılan enerjinin 12274.6 Mtep olduğu ve büyük bir kısmının fosil yakıt enerjisinden sağlandığı gerçeği alternatif enerji kaynaklarının gelecekte yaşamın devamı için ne kadar önem taşıdığını göstermektedir.

Artan Dünya nüfusu ile paralel şekilde büyüyen enerji ihtiyaçlarını karşılamak için yeni ve alternatif enerjiye duyulan gereklilik bu veriler ışığında oldukça net bir şekilde gözler önüne serilmiştir.

Dünya'da enerji ihtiyacının % 80'i fosil yakıtlardan sağlanmaktadır [Guo et al., 2010]. Tüm dünyada iklim değişiklikleri ve küresel ısınmaya sebep olan sera gazlarının artışından sorumlu fosil yakıtların kullanımı, aynı zamanda doğal kaynakların hızla tükenmesine neden olmaktadır. Uluslararası Enerji Ajansı'nın verilerine göre; 2000 ve 2030 yılları arasında fosil yakıtların enerji üretiminde ki payı % 85, yenilenebilir enerjinin payı ise % 15 oranında olacaktır. Fosil yakıtların % 60'ı petrol ve doğal gazdan elde edilmektedir.

Dünyada 2006 yılında üretilen toplam biyoetanol miktarı 51.056 milyar litredir. Üretilen toplam biyoetanol miktarının 18.376 milyar litresi ABD'de , 16.998

milyar litresi Brezilya'da üretilmiştir. 2005 yılında ise üretilen toplam biyoetanol miktarı 45.988 milyar litredir. Üretilen toplam biyoetanol miktarının 16.139 milyar litresi ABD'de , 15.999 milyar litresi Brezilya'da üretilmiştir [Sanchez et al., 2008].

Amerika birleşik devletleri (ABD) ve Avrupa ülkeleri biyoetanol üretiminde Brezilya ile ilk sıralarda yer almaktadır. Biyoetanol üretiminde önde gelen ülkelerde ve tüm dünyada üretilen biyoetanol miktarları ve ihtiyaç duyulan biyoetanol miktarları yıllara göre Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'te gösterilmiştir [Acaroğlu., 2008].

Tablo 2.4: Bazı ülkelerin yıllara göre etanol üretim miktarları (milyar litre).

Ülke	2003	2005
Brezilya	14.383	15.897
ABD	10.598	13.247
AB	1.892	3.785

Tablo 2.5: Bazı ülkelerin yıllara göre etanol ihtiyacı (milyar litre) .

Ülke	2003	2005	2010
Brezilya	12.869	14.004	17.411
ABD	10.598	13.247	18.925
AB	0.378	0.757	1.514
Kanada	1.514	4.920	12.869
Japonya	0.757	1.892	7.191
Diğerleri	1.514	1.514	2.271
Toplam	27.630	36.336	60.181

2011 yılına geldiğimizde Dünya genelinde üretilen toplam etanol miktarı 86.1 milyar litredir. ABD, 54.2 milyar litre ile 2011 yılının en yüksek etanol üretimi yapan ülkesidir. 21 milyar litre etanol üretimi ile ABD'yi Brezilya takip etmektedir. Tablo 2.6'da 2011 yılında etanol üretimi yapan bazı ülkelerdeki etanol üretim miktarları belirtilmiştir [Koç vd., 2013].

Tablo 2.6: Dünyada 2011 yılındaki etanol üretimi.

Ülke	Etanol ( milyar litre)
ABD	54.2
Brezilya	21.0
Almanya	0.8
Arjantin	0.2
Fransa	1.1
Çin	2.1
Kanada	1.8
Dünya	86.1

Biyoeanol üretiminde ilk sıralarda yer alan Brezilya 495 milyar ton şeker kamışı üretim kapasitesine ulaşmıştır ve üretimin % 80'i güney bölgelerinde, kalanı ise ülkenin geneline yayılmış durumdadır. Brezilya'da elde edilen yıllık şeker kamışı küspesi 186 milyon tondur. 1 milyar litre etanol üretebilmek için 5 milyon ton kuru biyokütle kullanılmaktadır [Soccol et al.,2010].

Dünya ülkeleri biyoeanol üretiminde farklı hammaddeleri tercih etmektedirler. Bunun sebebi ülkelerin sahip oldukları iklim ve toprak koşullarının farklı olmasıdır. ABD biyoeanol üretiminde yüksek oranda mısırı hammadde kaynağı olarak kullanırken, Brezilya şeker kamışını ve Fransa buğdayı kullanmayı tercih etmektedir. Ülkemizde ise biyoeanol üretimi şeker pancarı kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

### 2.1.2. Türkiye'de Biyoeanol

Türkiye, 05.02.2009 tarihinde resmi olarak Kyoto Protokolüne katılmıştır. Kyoto Protokolünün uygulanmasını istediği politika ve önlemler aşağıda belirtilmiştir [Özmen, 2009].

- Enerji verimliliğinin artırılması
- Yenilenebilir enerjinin geliştirilmesi
- Sürdürülebilir tarımın desteklenmesi
- Metan emisyonlarının geri kazanılması
- Sera etkisi yaratan zararlı gazların emisyonlarının (CO<sub>2</sub>, NO gibi) azaltılması

- Orman ve bitki örtüsü gibi sera gazı yutaklarının korunması ve yaygınlaştırılması

Avrupa Birliği'ne aday ülkeler içerisinde yer alan ülkemiz, Avrupa Komisyonunun EC-2003/30 sayılı kararına göre 2020 yılına kadar taşımacılık sektöründe kullanılan yakıtların % 5.75'ini yenilenebilir kaynaklardan elde etmek zorundadır. Türkiye'de buğday hasadının % 4 ve 7'lik kısımları kullanılarak E5 ve E10 üretimi gerçekleştirilebilmektedir [Melikoğlu vd., 2011].

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

Türkiye'de 2008 yılında üretilen etanol miktarı 150.000 tondur. Yasal düzenlemeler sebebiyle ancak 40.000 tonu kullanılabilir. Ülkemiz 8 milyon dekarlık bir alanda şeker pancarı yetiştirebilme kapasitesine sahip iken bu alanın yalnızca 3.5 milyon dekar alanı şeker pancarı üretimi için kullanılmaktadır. Besin değerine sahip ham maddelerden üretilen biyoetanol miktarları ve verimleri kıyaslandığında şeker pancarının en verimli biyoetanol üretim ham maddesi olduğu görülmüştür [Acaroğlu, 2008]. Besin değerine sahip ham madde kaynaklarının kullanımını uzun vadede bir çözüm olmamakla beraber, biyoetanol üretimine henüz başlayan bir ülke için ideal bir seçimdir. Bununla birlikte uzun vadede alternatif enerji kaynaklarının yenilenebilir olma özelliğine sahip olması için araştırmaların ve deneysel çalışmaların sürmesi gerekmektedir.

Türkiye'de biyoetanol üreten fabrikaların kullandığı hammadde ve kapasiteleri Tablo 2.7'de gösterilmiştir [Karaosmanoğlu, 2008].

Tablo 2.7: Türkiye’de biyoetanol üretimi.

Fabrika	Hammadde	Üretim Kapasitesi (milyon lt/yıl)
Çumra Şeker Fabrikası	Şeker Pancarı	21.0
TARKİM (Bursa)	Mısır-Buğday	40.0
TEZKİM (Adana)	Mısır-Buğday	20.0
Eskişehir Alkol Fabrikası	Şeker Pancarı	21.0
Turhal Alkol Fabrikası	Şeker Pancarı	14.0
Malatya Alkol Fabrikası	Şeker Pancarı	12.5
Erzurum Alkol Fabrikası	Şeker Pancarı	12.5

Ülkemizde aktif olarak biyoetanol sektöründe üretim yapan üç üretim tesisi; Çumra Şeker Fabrikası, TARKİM ve TEZKİM bulunmaktadır ve üretim kapasiteleri 149.5 milyon litredir. Ülkemizde kurulu biyoetanol üretim kapasitesi benzin tüketimimizin % 7'sini karşılayabilmektedir. Fakat pazarda yer alan biyoetanol benzin tüketimimizin % 1'inin altındadır [Koç vd., 2013].

Türkiye'de üretilen biyoetanolün büyük bir kısmı, ham madde olarak şeker pancarını kullanılmaktadır. Şeker pancarından farklı olarak, tarımsal ve endüstriyel atıkların biyoetanol üretiminde ham madde olarak kullanımının artırılması gerekmektedir. Şeker ve alkol fabrikalarının yanı sıra, karbonhidrat, nişasta ve selüloz içeren hammaddeleri kaynak olarak kullanan tüm işletmelerin; işleme prosesinde ve işleme sonunda elde edilen atıklarını biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere değerlendirmesi biyoetanol üretim miktarının artışına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır.

### 2.1.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılabilen Hammaddeler

Yapısında şeker bulunduran her türlü biyolojik kaynak, ön işlem uygulanmadan yada uygulanarak biyoetanol üretiminde kullanılabilir. Biyoetanol üretimi; mikroorganizmaların fermantasyon yetenekleri kullanılarak gerçekleştirilir. Mikroorganizmalar farklı şekerleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. Mikroorganizmaların fermantasyon için kullanabildiği substratlar farklı olduğundan, biyoetanol üretiminde kullanılacak hammadde kaynakları oldukça

çeşitlidir. Bu çeşitlilik beraberinde, hammadde kaynaklarının tükenme sorununa doğal bir çözüm oluşturmaktadır.

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler; disakkarit şeker içeren hammaddeler, nişasta içeren hammaddeler ve lignoselülozik materyaller olmak üzere 3 gruba ayrılır.

Şeker kamışı, şeker pancarı, meyve şekerleri, melas, peynir altı suyu gibi disakkarit şekerlerin kullanıldığı fermantasyon ortamları, en çok kullanılan hammadde kaynaklarını oluşturmaktadır. Disakkarit şekerler; mikroorganizmalar tarafından direk fermente edilebildikleri gibi, maliyeti yüksek olmayan ön işlem uygulanarak da fermente edilebilirler. Şeker pancarından şeker üretim prosesinde atık olarak elde edilen melas, direk olarak fermente olabilmektedir. Üretim atığı olarak elde edilen melasın kullanımı sonucu, melas karbon döngüsüne kazandırılmış olmaktadır. Ülkemizde üretilen biyoetanolün büyük çoğunluğu melastan elde edilmektedir. Bir başka üretim proses atığı olan peynir altı suyu, işlenmeden doğaya bırakılması oldukça tehlikeli olan, disakkarit şeker olan laktozu içeren hammadde kaynağıdır. Laktoz metabolizmasına sahip mikroorganizmalar tarafından fermente edilmekte ve biyoetanol üretimi gerçekleştirilmektedir.

Mısır, patates, manyok, tatlı patates, pirinç, buğday, arpa, çavdar biyoetanol üretim potansiyeli yüksek ve günümüz dünyasında biyoetanol üretimi için kullanılan nişasta içeren hammadde kaynaklarından [Melikoğlu vd., 2011]. Nişasta bitkilerde bulunan yapısal bir polisakkarittir. Yapısında; glukoz monomerlerinin  $\alpha$ -1,4 bağlarıyla uç uca eklenmesiyle oluşan amiloz ve glukoz monomerlerinin  $\alpha$ -1,6 bağlarıyla her 24-30 glukoz monomerinde dallanma yaparak bağlanmasıyla oluşan amilopektin mevcuttur. Sahip olduğu bu kompleks yapıdan dolayı nişasta mikroorganizmalar tarafından direkt olarak fermente edilememektedir. Fermantasyondan önce, fermente edilebilen şekerleri elde etmek için hidroliz işlemine gerek duyulmaktadır. Hidroliz işlemi enzim yada asit kullanılarak farklı metotlarla gerçekleştirilebilmektedir. Enzim kullanarak gerçekleştirilen hidroliz işleminin maliyeti oldukça yüksektir. Asit hidrolizi metodu enzim kullanımına göre çok daha az maliyetli bir yöntemdir. Asit hidrolizi metotlarının dezavantajı ise asit hidroliz işlemleri sonucunda fermantasyon inhibitörlerinin oluşumudur [Martin et al., 2007].

Asit hidroliz yöntemi sahip olduğu bu dezavantaja rağmen maliyeti düşük olduğundan ve endüstriyel atıkların etanol üretim potansiyellerini değerlendirmek

amacıyla kullanıma uygun bir yöntemdir. Asit hidrolizinde genellikle HCl ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmaktadır. Asit hidroliz işlemi, yüksek sıcaklık ve basınç varlığında gerçekleştirildiğinde hammaddenin monomerlerine ayrışma oranını yükseltmekte ve daha etkili sonuçlar elde edilmektedir. Seçilen hammaddeye uygulanacak asidin çeşidi, sıcaklığın derecesi ve basınç hammaddenin monomerlerine ayrışma derecesini doğrudan etkilemektedir. Hammadde içeriğinde bulunan nişastanın parçalanmasını sağlamak ve kullanılabilir indirgen şeker elde edebilmek için, seçilen hammaddeye özel asit hidroliz koşulları belirlenmelidir. Onsoy ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; yer elmasının asit hidrolizi ve enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatların etanol üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Asit hidrolizi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 60°C, 80°C ve 100°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta çalışılmıştır. Asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz koşulları karşılaştırıldığında; en yüksek indirgen şeker miktarı 80°C'de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında elde edilmiştir. Elde edilen şeker miktarıyla doğru orantılı olarak *Zymomonas mobilis* ile üretilen en yüksek etanol verimi de 80°C'de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında elde edilmiştir [Onsoy et al., 2007].

Yapılan başka bir çalışmada; tarım sanayinden elde edilen atıkların seyreltilmiş % 2'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 1/10 oranında karıştırılması, 120°C'de 20, 40 ve 60 dakikalık inkübasyonları sonucu elde edilen şeker miktarları ve fermantasyon inhibitörleri karşılaştırılmıştır [Martin et al., 2007]. Bu çalışmada farklı hammadde kaynaklarından alınan en yüksek verim sonuçları farklı sürelerde elde edilmiştir. Böylece hidroliz optimizasyonu gerçekleştirilmekte ve yüksek kapasitede etanol üretimi sağlanmaktadır.

Asit hidrolizi bazı hammadde kaynakları için tek başına yeterli olsa da enzimatik hidroliz ile devam eden hidroliz prosesleri de gerçekleştirilmektedir ve bu yolla daha yüksek verimli bir monomer ayrışması sağlamak mümkün olmaktadır [Bondesson et al., 2013].

Fermantasyon yeteneği olan mikroorganizmalar, hidrolize edilmiş hammadde kaynağını besin olarak kullanmakta ve metabolit üretimini gerçekleştirebilmektedir. Nişasta kaynağı hammaddelerin tamamının gıda işleme prosesinden geçmesi sonucu oluşan, nişastaca zengin gıda işleme atıkları biyoetanol üretimi için kullanılabilir potansiyel üründür. Nişasta kaynağı üretim proses atığı olan patates işleme atık suyu çeşitli hidroliz işlemlerine tabi tutularak, fermente edilen şekerlere dönüştürülür ve mikroorganizmalar tarafından biyoetanol üretimi için kullanılmaktadır.

Lignoselülozik materyaller oldukça geniş çerçeveli, yaşamın kendisiyle var olan ve var olmaya devam edecek olan hammadde kaynaklarıdır. Günümüzde en yaygın kullanıma sahip biyoetanol üretim kaynakları şeker kamışı, nişasta ve mısır olmasına rağmen bu kaynakların azalması ile biyoetanol üretimi lignoselülozik materyallerden kaynak bulacaktır [Gray et al., 2006]. Lignoselülozik materyaller; besin değeri olmayan, yapısında selüloz, hemiselüloz ve lignin bulunduran enerji krizine çözüm olabilecek bir kaynaktır. Selüloz; glukoz monomerlerinin  $\beta$ -1,4 glukozit bağları ile bağlanması sonucu oluşan biyolojik saldırılara oldukça dirençli bir yapısal polisakarittir. Hemiselülozun yapısına bakıldığında; sahip olduğu ksilan omurgasına mannoz, arabinoz, galaktoz gibi çeşitli şekerlerin  $\beta$ -1,4 glukozit bağları ile bağlanması sonucu oluştuğu görülmektedir. Asitler ile kolayca hidrolize olabilen hemiselülozun, sahip olduğu ksilan omurgasına bağlanan şekerler, bitkilerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Lignin ise hemiselüloza ester bağlarıyla ferulik asitin bağlanmasıyla oluşan ve bitki hücre duvarına dayanıklılık kazandıran yapıdır.

Tablo 2.8'de etanol üretiminde kullanılan hammadde kaynakları ve hidroliz ürünleri belirtilmiştir [Web 1, 2014].

Tablo 2.8: Hammadde kaynakları ve hidroliz ürünleri.

Karbonhidrat türü	Hammadde	Hidroliz ürünleri
Selüloz	Tarımsal atıklar	Glukoz
	Şehirsal atıklar	Mannoz
	Odun	Galaktoz
	Odun atıkları	Arabinoz - Ksiloz
Laktoz	Peynir altı suyu	Galaktoz - Glukoz
Nişasta	Kasava	Glukoz
	Mısır	Maltoz
	Patates	Dekstrin
Sakkaroz	Şeker pancarı	Glukoz
	Şeker kamışı	Fruktoz

Lignoselülozik materyallerde genel kuru ağırlık profili; selüloz % 40 ve 60, hemiselüloz % 20 ve 40, lignin % 10 ve 25, ekstrakt ve mineral bileşenleri % 10 olacak şekildedir [Adıgüzel, 2011].

Lignoselülozik materyaller; saman, ağaç kabukları, ot, zirai atıklar, orman atıkları, kentsel katı atıklar, evsel atıklar, bitkisel atıklar ve endüstriyel atıklardan oluşmaktadır.

Tüm Dünya'da her yıl tonlarca lignoselülozik materyal üretilmektedir. ABD Tarım ve Enerji Bakanlığı'nın 2005 yılı verilerine göre; orman kaynaklı 368 milyon ton , tarım kaynaklı 933 milyon ton lignoselülozik biyokütle üretimi gerçekleştirilmektedir. ABD bu rakamlarla birinci sırada yer alırken, Kanada ikinci sırada yer almaktadır. Kanada'da yıllık olarak üretilen toplam lignoselülozik biyokütle 200 milyon ton, bu oran Çin'de 1 milyon ton, Hindistan'da ise 0.2 milyon tondur [Zhang, 2008].

Günümüzde lignoselülozik materyaller ile biyoetanol üretimi optimize edilememiştir. Gelecekte enerji ihtiyacını karşılamak için oldukça kıymet kazanacak ve teknolojinin ilerlemesine paralel olarak kimyasallar ve yakıtların biyokütleden üretimi uygun maliyetle gerçekleştirilecektir. Gelişen teknoloji ile düşük maliyetli termokimyasal ön işlem, yüksek etkili selüloz ve hemiselüloz, etkili ve dirençli fermantatif mikroorganizmaların kullanımı mümkün kılınacaktır [Gray et al., 2008].

Biyoetanol üretiminde kullanılan kaynaklardan 1 litre etanol üretimi için gerekli olan hammaddelerin maliyet karşılaştırması yapıldığında, en yüksek verimli maliyete sahip olan hammaddeler mısır ve şekerpancarıdır. Tablo 2.8'de yoğun olarak kullanılan hammaddelerin litredeki maliyeti ve hammadde miktarı belirtilmiştir [Koçtürk vd., 2013].

Tablo 2.9: Hammaddelerin 1 litre etanol üretimi için gerekli miktarları ve maliyetleri.

Hammadde	Hammadde miktarı (kg)	Hammadde maliyeti (tl)
Şeker pancarı	10	1.10
Buğday	3	1.74
Arpa	4	2.16
Mısır	3	1.32
Patates	10	2.10

Dünya genelinde çeşitli tahıllardan biyoetanol üretim potansiyeli değerlendirildiğinde, en yüksek verimin mısırdan elde edildiği görülmüştür. 1 ton

mısırdan 360 litre biyoetanol üretimi gerçekleştirilebilir. Tablo 2.9'da çeşitli tahılların biyoetanol üretme potansiyelleri belirtilmiştir [Melikoğlu vd., 2011].

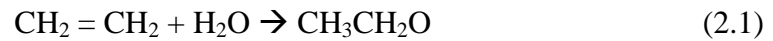
Tablo 2.10: Çeşitli tahılların biyoetanol üretim potansiyelleri.

Hammadde	Biyoetanol üretim potansiyeli (litre/ton)
Arpa	250
Mısır	360
Patates	110
Şeker pancarı	110
Buğday	340

#### 2.1.4. Biyoetanol Üretimi

Biyoetanol üretimi; fermantasyon, etilen hidrasyonu ve asetaldehitin indirgenmesi olmak üzere 3 farklı yoldan elde edilebilir.

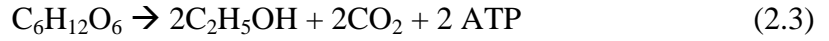
Petrol ürünü olan etilenin hidrasyonu ile etanol üretimi endüstriyel üretimde kullanılmaktadır fakat oluşan yan ürünlerin insan sağlığına zarar verdiği bilinmektedir. Aşağıda etilenin hidrasyonu ile etanol üretim reaksiyonu görülmektedir.



Asetaldehitin hidrojenlenerek etanol üretimi, nikel katalizörlüğünde 100<sup>0</sup>C - 130<sup>0</sup>C arasında gerçekleştirilir. Aşağıda asetilenden elde edilen asetaldehitin hidrojenlenerek etanol üretim reaksiyonu görülmektedir.



En çok tercih edilen etanol üretim prosesi fermantasyondur. Fermantasyon, bakteri ve mayaların şekerleri kullanarak enerji elde etme yöntemidir. Bu reaksiyon gerçekleşirken oluşan ürünlerden biri etanoldür. Aşağıda basit bir etil alkol fermantasyon denklemi görülmektedir.

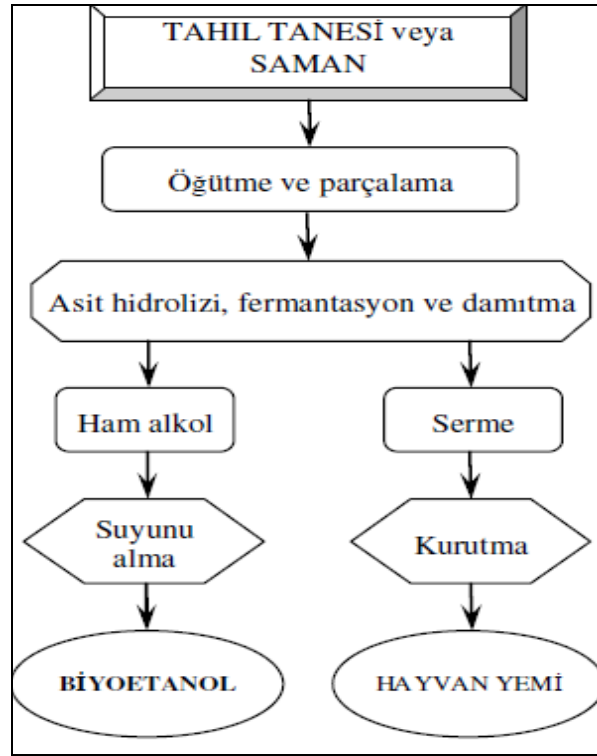


Fermantasyon; 18. yüzyılın sonlarında Lavosier'in, şekerin anaerob koşullarda mikroorganizmalar tarafından parçalanması sonucu etanol ve karbondioksit oluştuğunu gözlemlemesi ile keşfedilmiştir. 1815 yılında Gay ve Lussac fermantasyon denklemini çözümlenmiştir.

Fermantasyon ile biyoetanol üretim basamakları;

- Kullanılacak organizmanın üremesi ve büyümesi için uygun besiyeri içeriğinin belirlenmesi
- Fermantasyonda kullanılacak materyallerin ve besiyeri bileşiminin sterilizasyonunun sağlanması
- Yeterli miktarda aktif ve saf kültürün besiyeri bileşimine inokülasyonu
- Seçilen organizmanın büyüme, gelişme ve ürün oluşturması için uygun ortam koşullarının sağlanması
- Fermantasyon için gerekli olan süre ve koşulda inkübasyonun gerçekleştirilmesi
- Oluşan ürünlerin ortamdaki ayrılması ve saflaştırılması şeklindedir [Stanbury et al., 1995].

Biyootanolün üretim prosesi Şekil 2.1'de özetlenmiştir [Demirbaş, 2009].



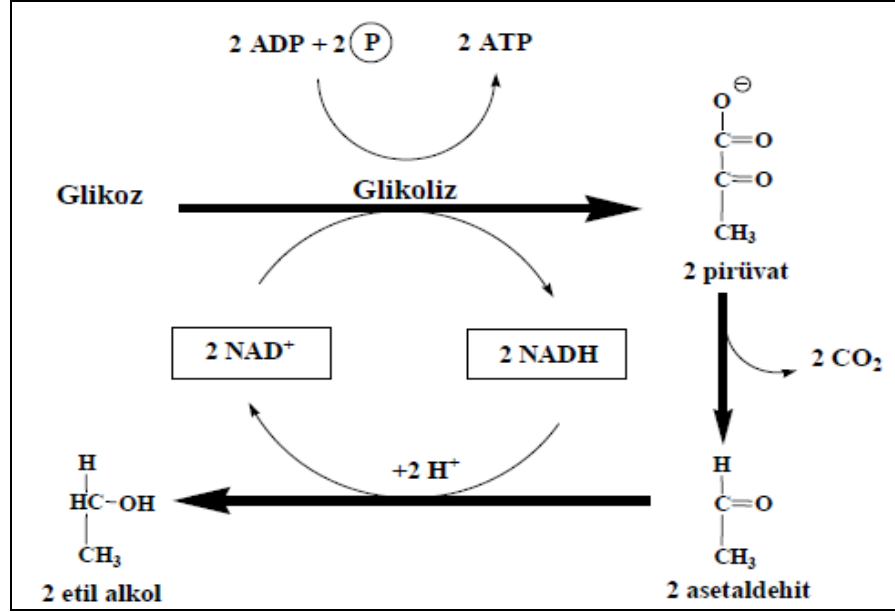
Şekil 2.1:Biyoetanol üretim prosesi.

Fermantasyon koşulları seçilen mikroorganizmaya ve hammadde kaynağına göre farklılık göstermektedir. Fermantasyon prosesi, seçilen mikroorganizmanın en etkili şekilde ve en kısa sürede kullanabildiği hammadde seçilerek optimize edilmelidir. Mikroorganizmanın büyüme ve gelişmesi için uygun bir besiyeri ortamı;

- Mikroorganizmanın yapısında bulunan C, N, H, O gibi elementler
- Mikroorganizmanın yaşamsal fonksiyonlarında yer alan reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan Mg, S, P, K gibi elementler
- Mikroorganizmaların yaşamsal fonksiyonlarında yer alan enzim aktivitelerinde görevli vitaminler
- Mikroorganizmaların çoğalmak için ihtiyaç duyduğu Fe, Zn, Cu, Mn, B gibi eser elementler içermelidir [Stanbury et al., 1995].

Canlıların enerji elde etmek için gerçekleştirdikleri solunum reaksiyonlarında ortak olan metabolik döngü glikolizdir. Fermantasyon reaksiyonunun ilk aşaması olan glikoliz de, glukoz 2 pürivata kadar parçalanır ve 2 net ATP üretilir. Pürivat

enzimler aracılığıyla asetaldehite parçalanırken CO<sub>2</sub> açığa çıkar. Asetaldehitin hidrojenlenmesi sonucu etanol oluşmaktadır. Şekil 2.2'de glukozun glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması gösterilmiştir [Yiğitoğlu vd., 2012].



Şekil 2.2: Glukozun glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması.

Mikroorganizmalardan etanol üretiminde kesikli, yarı-kesikli ve sürekli olmak üzere 3 farklı fermantasyon yöntemi kullanılmaktadır. Kesikli fermantasyonda; fermantöre besiyeri aktarılır ve seçilen mikroorganizmaların inokülasyonu gerçekleştirilir. Uygun şartlarda fermantasyon gerçekleştirilir ve fermantasyon tamamlandığında fermantör boşaltılır, temizlenir ve yeni bir fermantasyon işlemi için steril edilir. Kesikli fermantasyonda mikroorganizmaların gelişimi; lag fazı, log fazı, duraklama fazı ve ölüm fazı basamaklarından oluşmaktadır. Yarı kesikli fermantasyonda; fermantasyon ortamına yavaş yavaş taze besiyeri ilave edilerek oluşan ürünler belirli aralıklarla fermantörden alınmaktadır. Sürekli fermantasyonda ise kültür koşulları ve substrat konsantrasyonu sabit tutularak, mikroorganizmanın sürekli olarak logaritmik fazda bulunması amaçlanmaktadır. Kısa aralıklarla mikroorganizmanın yeni bir besiyerine aktarılması ve diğer taraftan da aynı miktarda mikroorganizma süspansiyonunun alınması ile bu koşullar sağlanmaktadır.

Fermantasyon süresinin sonunda elde edilen ürünün ayrıştırılması gerekmektedir. Kültür içerisinden % 10 ve 12 oranında etanol elde edilmesi hedeflenir [Web 2, 2014]. Etanol kültürden, distilasyon yöntemi ile

ayrıştırılmaktadır. Distilasyon; birbiri içerisinde dağılmış iki yada daha fazla maddenin ısıtma ve soğutma yoluyla sıvı yada buhar karışımlarının saflaştırılması işlemidir. Distilasyon sonrasında % 95 ve 96 oranında saflaştırılmış etanol elde edilir. Safsızlığı artırmak için moleküler elek teknolojisi kullanılarak saflaştırma oranı % 99.80'e kadar yükseltmek mümkündür.

### **2.1.5.Biyoetanolün Kullanım Alanları**

Biyoetanol, tıptan ulaşım sektörüne kadar oldukça geniş yelpazesi olan bir kullanım alanına sahiptir. Ulaştırma sektöründe; benzin ile karıştırılarak, dizel motorlarda katkı maddesi olarak, hibrit ve yakıt araçlarda, tarım makinelerinde kullanılmaktadır. Tıp alanında sterilizasyon amaçlı kullanımı söz konusudur. Kojenerasyon ünitelerinde; fosil yakıtlı tesislerdeki NO emisyonlarının azaltılması, CO<sub>2</sub> ticareti, buhar enjeksiyonlu gaz tribünleri, kombine çevrili güç santralleri, dizel güç jeneratörleri, küçük kojenerasyon sistemleri, suyun tuzluluğunun giderimi için kullanımı gerçekleştirilmektedir. Küçük ev aletlerinde; fırınlarda, aydınlatma sektöründe, ısıtma ve soğutma aygıtlarında, besinlerin muhafaza edilmesinde kullanılmaktadır. Bir diğer kullanım alanı olan kimyasal ürün sektöründe; etilen, hidrojen, glikol eter, etil akrilat, asetik asit, asetaldehit, etil eter, etil klorür ve etil asetat üretiminde kullanılmaktadır [Web 2, 2014].

Biyoetanolün bir diğer kullanım şekli, sentetik olarak üretilen ETBE (etil-tersiyer-butil-eter) maddesine katılarak kullanılmaktadır. ETBE, akaryakıtın oktan sayısını yükseltmekte, yanmayı iyileştirmektedir. ETBE, çevre kirletici ve karsinojen etkili olduğu bilinen MTBE (metil-tersiyer-butil-eter) maddesinin yerine alternatif olarak kullanılmaktadır. ETBE'nin % 45'ini biyoetanol oluşturmaktadır.

Biyoetanol; alkol üretim sanayinde, kozmetik sektöründe, ilaç sanayinde, patlayıcı madde ve boya sanayinde, bilim alanında çözelti şeklinde kullanım alanına sahiptir.

## 2.1.6. Rekombinant Bakteri Soyları ile Biyoetanol Üretiminin Arttırılması

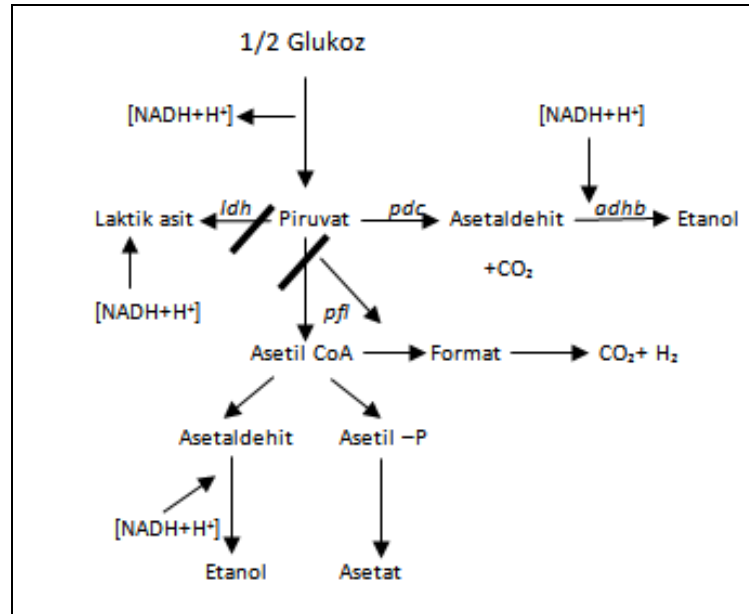
Tükenmekte olan biyoetanol üretim kaynaklarına yeni alternatiflerin bulunması ve bu kaynaklara uygun fermantasyon yeteneğine sahip mikroorganizmaların geliştirilmesi, gelecekte ihtiyaç duyulacak enerjinin elde edilmesini sağlayacaktır.

Fermantasyonda bakteri, maya ve mantar gibi pek çok mikroorganizma kullanılabilir. Geçmişte, en çok kullanılan organizmalar ise mayalar olmuştur. Daha özgün olarak ise en çok kullanılan organizma *S.cerevisiae*'dir. *S.cerevisiae*, gıda ve içki üretiminde kullanılmaktadır. *S.cerevisiae*'nin inhibitörlere olan toleransları ise geniştir. Bakterilerden ise biyoetanol üretimi için en çok araştırılan ve kullanılan organizma *Zymomonas mobilis*'tir. *S. cerevisiae*'den daha özgül biyoetanol aktivitesi ve ürün sağlamaktadır. Biyoetanol üretimi için kullanılan bir diğer organizma ise genetik olarak modifiye edilmiş *Escherichia coli*'dir. Bu bakteriler ise bir çok şeker çeşidini fermente edebilirler, kompleks büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar ve bir çok endüstriyel alanda öncü olarak kullanılırlar. Biyoetanol üretiminde fermantasyon basamağında kullanılmak üzere yukarıdaki organizmalar dışında anaerobik termofilik bakteri ve bazı funguslar da çalışılmıştır. Fakat bu organizmalardan elde edilen ürün miktarı oldukça azdır [Adıgüzel, 2011].

Günümüzde ticari olarak, sükröz ve nişastayı besin olarak kullanan *Saccharomyces cerevisiae* etanol üretimini gerçekleştirmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi bir çok maya ve bakteri farklı şekerleri metabolize edebilme yeteneğine sahip değildir. Biyokütleden elde edilen şekerlerin fermantasyonda kullanımını ve fermantasyonun verimini artırmak amacıyla, mayalara ve etanolojenik bakterilere genetik müdahale ile pentoz ve heksoz metabolit yollarının ilavesi gerçekleştirilebilmektedir.

Mikroorganizmalar arasında *Escherichia coli* geniş spektrumlu şekerleri metabolize edebilmesine rağmen, diğer şekerlere göre glukozu tercih etmektedir. Etanol üretiminde, *E.coli*'nin metabolik mühendisliği etanol üretimi için karbon kaybına neden olan doğal fermentasyon yollarının susturulması ile gerçekleştirilmiştir. Metabolik mühendisliğin ilk başarılı çalışmalarından birinde, *Zymomonas mobilis*'in etanol fermantasyon yolizinde bulunan pürivat dekarboksilaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerini kodlayan genlerin pLOI297 plazmiti üzerinde, *E.coli*'ye aktarımı gerçekleştirilmiştir [Ingram et al., 1987]. Bir başka çalışmada

yolizlerinden birinde piruvat laktata, laktat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla çevirilmektedir. *E.coli* NZN111 suşu, *ldh* (laktat dehidrogenaz) ve *pfl* (piruvat format liyaz) genlerinin içine homolog rekombinasyonla antibiyotik direnç genlerinin eklenerek susturulması ile elde edilmiştir [Dien et al., 2000]. Bu suş, glikolizisten oluşan NADH dengesi için, piruvattan NAD<sup>+</sup>'yi elde edemediği ve bunun sonucu olarak da anaerobik üremeyi sürdüremediği belirtilmiştir (Şekil 2.3). Anaerobik olarak NZN111 suşu'nun üreyebilmesi, bu suşun lac promotorunun kontrol ettiği *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli *pdc* (piruvat dekarboksilaz) ve *adhb* (alkol dehidrogenaz II) genlerini taşıyan pLOI297 plazmidi ile transformasyonu ile sağlanmıştır. *E. coli* NZN111:pLOI297 suşu FBR5 suşu olarak ifade edilmiştir [Dien et al., 2000].



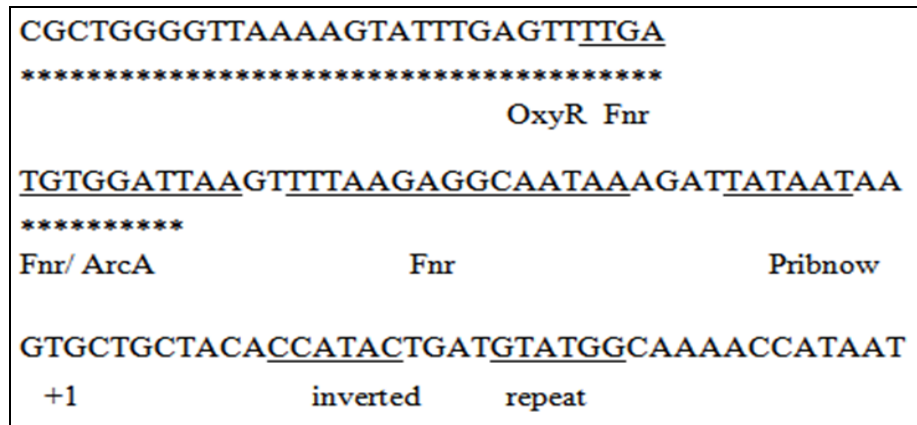
Şekil.2.3: Laktat dehidrogenaz (*ldh*) ve pürivat format liyaz (*pfl*) genlerinin susturulması ile elde edilen fermantasyon yolağı.

## 2.2. Bakteriyel Hemogloblin

Bakteriyel hemoglobin olarak bilinen *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb), 1966 yılında Dale WEBSTER tarafından keşfedilmiştir [Webster and Hackett, 1966]. Gram negatif aerobik bir bakteri olan *Vitreoscilla*'da bulunan *Vitreoscilla* hemoglobini, keşfedilen ilk bakteriyel hemoglobindir. Bilinen hemoglobinden farklı olarak, tek globülin molekülü içermektedir.

İlk olarak VHB molekülünü bakteriyel sitokrom oksidaz ile olan benzerliğinden dolayı çözümlenir sitokrom o olarak tanımlanmıştır [Webster and Hackett, 1966]. 1986 yılında amino asit sekanslarının belirlenmesi ile hemoglobin ile olan benzerliği farkedilmiş, tek globülün molekülü içerdiği ve bilinen hemoglobinin aksine ek olarak yapısal elementlerin bulunmadığı belirtilmiştir [Stark et al., 2011]. VHB'nin bilinen hemoglobine olan benzerliği üç boyutlu yapıları karşılaştırılarak incelenmiştir. VHB, *vgb* geni ile üretilmiş ve 1988 yılında klonlanmıştır [Dikshit and Webster, 1988].

*Vgb* promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru ( $P_{vgb}$ ) oksijene duyarlı bir promotordur. Promotorun oksijene duyarlılığı üzerinde taşıdığı ve global düzenleyici proteinlere, yani Fnr ve ArcA ve OxyR proteinlerine özgü dizilerden kaynaklanır [Yang et al., 2005] (Şekil 2.5). *E. coli*'de *vgb* promotoru mikroaerobik koşullar altında (% 2 den daha az çözümlenmiş oksijen seviyelerinde) maksimum düzeyde indüklenirken [Kroneck et al., 1991] *E. aerogenes*'de aynı şartlar altında böyle bir indüklenme olmadığı belirlenmiştir [Hart et al., 1994]. Bu da *E. coli* ve *E. aerogenes* gibi iki birbirine yakın enterik bakteride bu genin farklı düzenlendiğini ve farklı düzenleyici mekanizmaların kullanıldığını ifade etmektedir. Ayrıca Fnr bakımından mutant *E. coli* hücrelerinin mikroaerobik koşullar altında *vgb* promotorunu aktive edemedikleri belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Diğer çalışmalarda da *vgb*'nin oksijene duyarlı promotor aktivitesinin olduğunu ve genin proteininin, yani VHB'nin, ifadesinin Fnr tarafından sağlandığı gösterilmiştir [Kiley and Reznikoff, 1991].



Şekil 2.4: *vgb* promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri.

VHb geni (*vgb*) *E. coli* [Khosla and Bailey, 1988], *Enterobacter aerogenes* [Dikshit et al., 1989], *Streptomyces* türleri [Magnolo et al., 1991] ve tütün bitkisi [Farres and Kallio, 2002] gibi farklı sistemlere klonlanarak, hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb hemen hemen bütün klonlanmış olduğu hücrelere daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken, bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçlar gösterilmiştir [Wei et al., 1998], [Liu et al., 1995], [Hardison, 1998].

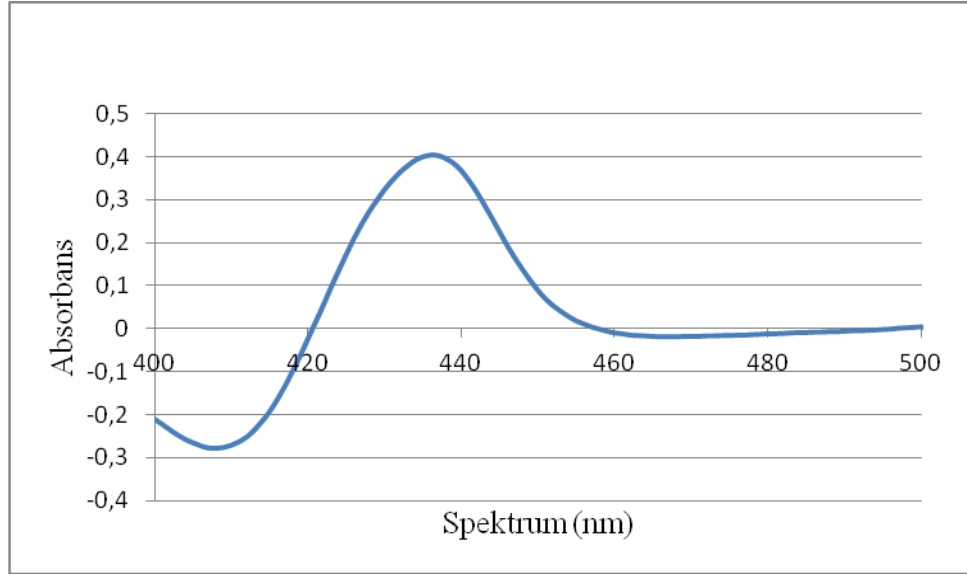
*Vgb* oksijenle düzenlenmekte, mikroaerofilik şartlarda maksimum derecede uyarılmakta ve VHb'nin hücre içi konsantrasyonu 40-50 kat yükselmektedir [Dikshit ve Webster, 1992; Chen et al., 1994; Geckil et al., 2004]. Özellikle düşük oksijen içeren ortamlarda; VHb'nin ortamdaki oksijen değişimlerine karşı bir tampon görevi görerek, hücrelerin metabolik aktivitelerini düzenlediği, onların büyüme ve çoğalmasında önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir [Wei et al., 1998].

VHb, 15.775 Da molekül ağırlığına sahip, sitoplazmik ve periplazmik bölgede yoğunlaşan, homodimer (iki özdeş alt ünite) yapısı gösteren bir proteindir ve her bir alt ünite 146 aminoasitten oluşmuştur [Wakabayashi et al., 1986]. Her alt ünite bir adet hem grubu ( $Fe^{2+}$ ) içermektedir. Hem grubundaki demir ökaryotik hemoglobinlerde olduğu gibi ferrus ( $Fe^{2+}$ ) ve ferrik ( $Fe^{3+}$ ) olmak üzere iki farklı formda bulunabilmektedir. Bu iki formdan sadece ferrus ( $Fe^{2+}$ ) oksijen bağlayabilmektedir [Kroneck et al., 1991].

Düşük oksijen konsantrasyonlarının negatif etki yarattığı birçok biyüretim olayında VHb'nin potansiyelinin olabileceği ileri sürülmüştür. Ekstrasellüler oksijenin düşük olduğu durumlarda bu proteinin sentezinin arttığı ve bağlandığı oksijeni ökaryotik hücrelerde olduğu gibi serbest bıraktığı bildirilmiştir [Boerman et al., 1982].

Oksijen kaynağı olarak rol alan *Vitreosilla* hemoglobinin, mikroaerobik koşullar altında çözülmüş oksijen konsantrasyonunda intrasellüler etkisi artmakta ve çözülmüş oksijendeki artış hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d* aktivitesini arttırmaktadır. Öte yandan sitokrom *o* spesifik aktivitesi sitokrom *d*'den daha hızlı bir şekilde arttırarak proton pompasında artışa sebep olmaktadır. Böylece sitoplazmadaki *ATPaz* yoluyla bu proton gradiyenti sayesinde ATP üretilmektedir [Kallio et al., 1994].

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



Şekil 2.5: *vgb* içeren *E. coli* TS4 suşuna ait hücre homojenatında VHb'nin ditiyonit ile indirgenmesi sonucu oluşan absorpsiyon spektrumu.

Bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, VHb'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir. Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin olarak ortaya konmamışsa da,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ve  $\text{ADP}/\text{ATP}$  oranlarında olan önemli değişimlerin esas teşkil ettiği sanılmaktadır. VHb içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenmektedir. Dolayısı ile  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ve  $\text{ADP}/\text{ATP}$  oranlarında meydana gelen farklılıklar hücrenin karbon bileşiklerini kullanım yollarında önemli değişimlere neden olur. Bu bağlamda VHb ekspresyonu yapan *E. aerogenes*'de gözlenen % 80 artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [Roos et al., 2004], [Geckil vd., 2004].

Yapılan başka bir çalışmada ise *vgb* klonlanmış *Burkholderia sp.*'de dinitrotoluen yıkımında artış sağladığı bildirilmiştir [Patel et al., 2000]. *Vgb* klonlanmış bakterilerde rekombinant protein sentezi artmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda *vgb*'nin mayalarda antibiyotik ve etanol üretimini

arttırdığı tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise *vgb* 'nin bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin bütandiol ve asetoin üretimini arttırdığını gösterilmiştir [Brünker et al., 1998].

Rekombinant protein üretiminden, çeşitli antibiyotiklerin üretimine ve zararlı aromatiklerin parçalanmasına benzer birçok proste bu proteinin klonlanmış hücrelere önemli avantaj kazandırdığı saptanmıştır. Dolayısı ile son yıllarda literatüre girmiş olan “metabolik mühendislik” terimi kullanıldığında bu protein ilk sırada bahsedilen potansiyel alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. VHb geninin çeşitli bakteri ve fungusa transformasyonu ile büyüme ve üretimlerinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, aerobik bakterilerde toksik aromatik bileşiklerin biyoremediyasyonunu artırarak “VHb teknolojisi”nin bu alanda da kullanılabilirliği belirlenmiştir [Liu et al., 1996], [Patel et al., 2000].

## **3.GEREÇLER ve YÖNTEMLER**

### **3.1.Gereçler**

#### **3.1.1.Kullanılan Cihazlar**

Bu tez çalışmasında hücrelerin büyüme süreci için, Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya ve Edmund Bühler GmbH (çalkalamalı), TH15, Hechingen, Almanya inkübatörleri kullanıldı. Hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (Optik Density; OD) Bio-Rad, SmartSpec™ 3000, Philadelphia, A.B.D. spektrofotometresi ile ölçüldü. Hidrolizat besiyeri bileşenlerini çöktürmek amacıyla Beckman Coulter, Allegra™ 25R Centrifuge, Almanya ve hücreleri çöktürmek için Labogene, Scanspeed 1580R, Lynge, Danimarka santrifüjleri kullanıldı. pH değerleri, Hanna Instruments, pH 211 Micropr<sup>o</sup> Cessor, Michigan, A.B.D. ile belirlendi. Hemoglobin ekstraksiyonu amacıyla hücrelerin parçalanması için, Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D. kullanıldı. Hemoglobin ölçümü ise Shimadzu, UV-3600 UV-VIS NIR, Kyoto, Japonya UV spektroskopisi ile ölçüldü. Besiyerinde bulunan şeker miktarları TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D. kullanılarak ölçüldü. Sarf malzemeleri, patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı ise deneylerden önce Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya otoklavı kullanılarak steril edildi.

#### **3.1.2.Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerinden disodyum EDTA, çinko sülfat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ), manganez klorür ( $MnCl_2$ ), demir sülfat ( $FeSO_4$ ), bakır klorür ( $CuCl_2$ ), kobalt klorür ( $CoCl_2$ ), tiamin (vitamin B<sub>1</sub>), sodyum ditiyonit ( $Na_2S_2O_4$ ), NaCl, HCl, glukoz, ksiloz, agar, pepton, maya özütü, sodyum asetat ( $CH_3COONa$ ),  $Na_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_2PO_4$ , magnezyum sülfat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), asetonitril, alfa naftol, etanol, streptomisin sülfat, ampisilin sodyum ve gentamisin sülfat antibiyotikleri Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edildi. Sodyum hidroksit (NaOH) ise Sigma, Oakville, Kanada'dan sağlandı. 0.2 µm por çaplı şırınga

filtresi Whatman, Maidstone, İngiltere ve 0.2 µm por çaplı 500 ml'lik vakum filtre Nalgene, Supor MarchV, Rochester, New York, A.B.D.'den temin edildi. Etanol ölçümü için kullanılan EnzyChrom Etanol Assay Kit, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya'dan, şeker ölçümünde kullanılan ince tabaka kromatografisi plakaları ise, Whatman, TLC Plates Partisil® K5, Maidstone, İngiltere'den temin edildi.

### 3.1.3.Kullanılan Bakteri Soyları

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

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteriler, plazmidler ve özellikleri.

Bakteri Soyları	Özellikler
NZN111	<i>E. coli</i> [F+ λ <sup>-</sup> <i>rpoS</i> 396(Am) <i>rph</i> -1 Δ <i>pflB</i> ::Cam Δ <i>ldhA</i> ::Kan]
FBR5	<i>pdc</i> ve <i>adhb</i> taşıyan pLOI297 plazmidi ile transforme edilmiş NZN111 suşu
FBR5/pTS3 (TS3 suşu)	<i>vgb</i> taşıyan pKT230 plazmidi (pTS3) ile transforme edilmiş FBR5 suşu
FBR5/pTS4 (TS4 suşu)	<i>vgb</i> taşıyan pBBR1MCS-5 plazmidi (pTS4) ile transforme edilmiş FBR5 suşu

Bu tez çalışmasında, *vgb*<sup>-</sup> *E. coli* FBR5 suşu ve *vgb*<sup>+</sup> rekombinant *E. coli* suşları (TS3 ve TS4) VHb'nin etanol üretimindeki etkilerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılan bu rekombinant suşlar farklı havalandırma koşullarında (yüksek ve düşük), asit hidrolizi ile gıda işleme atıklarından elde edilen Hidrolizat

Besiyeri 1 (HB1, % 2 glukoz, % 1 ksiloz w/v) ile Hidrolizat Besiyeri 2 (HB2, % 1 glukoz, % 0.5 ksiloz w/v) içerisinde, saf şeker olarak glukoz ve ksiloz içeren Kontrol Besiyeri 1 (KB1, % 2 glukoz, % 1 ksiloz w/v) ile Kontrol Besiyeri 2 (KB2, % 1 glukoz, % 0.5 ksiloz w/v) içerisinde üretilerek, hücrelerin üreme özellikleri, etanol üretimleri ve VHB ekspresyon seviyeleri incelendi.

## **3.2.Yöntem**

### **3.2.1. Patates ve Mısır İşleme Atığı Hidrolizi**

Patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı Kraft, Türkiye'den temin edildi. Hidroliz için, 500 g mısır işleme atığı ve 500 ml patates işleme atık suyu ile 56 ml 6 N HCl karıştırıldı. Karışım 115°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile otoklavlandı. Steril karışım 85°C sıcaklıkta 48 saat süre ile bir inkübatörde inkübe edildi.

### **3.2.2. Hidrolizat Besiyeri 1 (HB1) ve Kontrol Besiyeri 1 (KB1)'in Hazırlanması**

Hidrolizat-fosfat tamponu karışımı 1 için, hazırlanan hidrolizatın 800 ml'si 200 ml 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile karıştırıldı. Bu karışım 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile otoklavlandı. Elde edilen steril karışım 4000 rpm hızında 20 dakika süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı alınarak membran filtre ile (0.45 µm) vakumla filtre edildi. Elde edilen hidrolizat 1'in % 12 (v/v) toplam şeker (% 8 glukoz, % 4 ksiloz) sahip olduğu İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography-TLC) yöntemi ile belirlendi.

HB1 (pH 7.0), Davis et al. (2006)'dan modifiye edilerek hazırlandı. Bunun için, 180 ml pepton ve maya özütü karışımı (12 g pepton ve 6g maya özütü içeren), 10 ml Na asetat (% 10 w/v), 125 ml 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 10 ml MgSO<sub>4</sub> (% 30 w/v), 5 ml iz element solüsyonu (Tablo 3.1), [Guimaraes et al., 1992], 1 ml tiamin (% 0.1 w/v) ve 494 ml steril distile su karıştırıldı. Karışım, 375 ml hidrolizat-fosfat tamponu karışımına ilave edilerek 1200 ml HB1 elde edildi. HB1'in toplam şeker içeriği İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography-TLC) yöntemi ile % 3 (w/v, % 2 glukoz ve % 1 ksiloz) olarak belirlendi.

Kontrol besiyeri 1 (KB1, pH 7.0, % 2 glikoz ve % 1 ksiloz, w/v) için; 180 ml pepton ve maya özütü (12 g pepton ve 6 g maya özütü içeren), 10 ml sodyum asetat (% 10 w/v), 200 ml sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 10 ml MgSO<sub>4</sub> (% 30 w/v), 5 ml iz element solüsyonu (Tablo 3.1), [Guimaraes et al., 1992], 1 ml tiamin (% 0.1 w/v) ve 494 ml steril distile su, 200 ml (% 12, w/v) glukoz ve 100 ml (% 12, w/v) ksiloz ile karıştırıldı.

### **3.2.3. Hidrolizat Besiyeri 2 (HB2) ve Kontrol Besiyeri 2 (KB2)'nin Hazırlanması**

Hidrolizat-fosfat tamponu karışımı 2 için, hazırlanan hidrolizatın 300 ml'si 200 ml 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile karıştırıldı. Bu karışım 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile otoklavlandı. Elde edilen steril karışım 4000 rpm hızında 20 dakika süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı alınarak membran filtre ile (0.45 µm) vakumla filtre edildi. Elde edilen hidrolizat 2'nin % 6 (v/v) toplam şekere (% 4 glukoz ve % 2 ksiloz) sahip olduğu İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography-TLC) yöntemi ile belirlendi.

HB2 (pH 7.0), Davis et al (2006)'dan modifiye edilerek hazırlandı. Bunun için, 180 ml pepton ve maya özütü karışımı (12 g pepton ve 6g maya özütü içeren), 10 ml Na asetat (% 10 w/v), 10 ml MgSO<sub>4</sub> (% 30 w/v), 5 ml iz element solüsyonu (Tablo 3.1), [Guimaraes et al., 1992], 1 ml tiamin (% 0.1 w/v), 494 ml steril distile su karıştırıldı. Karışım, 500 ml hidrolizat-fosfat tamponu karışımına ilave edilerek 1200 ml HB2 elde edildi. HB2'nin toplam şeker içeriği İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography-TLC) yöntemi ile % 1.5 (w/v, % 1 glukoz ve % 0.5 ksiloz) olarak belirlendi.

Kontrol besiyeri 2 (KB2, pH 7.0, % 1 glikoz ve % 0.5 ksiloz, w/v) için; 180 ml pepton ve maya özütü (12 g pepton ve 6 g maya özütü içeren), 10 ml sodyum asetat (% 10 w/v), 200 ml sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 10 ml MgSO<sub>4</sub> (% 30 w/v), 5 ml iz element solüsyonu (Tablo 3.1), [Guimaraes et al., 1992], 1 ml tiamin (% 0.1 w/v) ve 494 ml steril distile su, 200 ml (% 6, w/v) glukoz ve 100 ml (% 6, w/v) ksiloz ile karıştırıldı.

Tablo 3.2: İz element solüsyon içeriği.

Bileşen	Miktar (g/L)
Disodyum EDTA(C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O)	5
Çinko Sülfat (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.00022
Kalsiyum Klorür (CoCl <sub>2</sub> )	0.5
Manganez Klorür (MnCl <sub>2</sub> )	0.5
Demir Sülfat (FeSO <sub>4</sub> )	0.5
Bakır Klorür (CuCl <sub>2</sub> )	0.16
Kobalt Klorür (CoCl <sub>2</sub> )	0.16

HB1, HB2, KB1 ve KB2 besiyerlerine kullanılan rekombinant bakteri soylarına göre belirtilen oranlarda (Tablo 3.2) uygun antibiyotikler eklendi.

Tablo 3.3 : Besiyeri ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.

Bakteri Soyu	Antibiyotikler
FBR5	100 µg/ml Ampisilin
FBR5/pTS3 (TS3)	100 µg/ml Ampisilin ve 50 µg/ml Streptomisin
FBR5/pTS4 (TS4)	100 µg/ml Ampisilin ve 5 µg/ml Gentamisin

### 3.2.4. Bakteri Soylarına Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması ve Korunması

Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan bakteri soylarının, Luria Bertani besiyerinde üremesi ve muhafaza edilmesi sağlanmıştır. Luria Bertani (LB) besiyerinde litrede; 10 g pepton, 5 g maya özütü, 5 g NaCl, 80 g ksiloz, 15 g agar bulunmaktadır. Ksiloz hariç tüm besiyeri bileşenlerinin, belirtilen miktarlarda 800 ml distile su içerisinde çözünmesi sağlandı. Ksiloz ise 200 ml % 40'lık bir çözelti

halinde hazırlandı. Hazırlanan 2 çözeltilerde 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklavdan çıkarılan ksiloz çözeltisi bir miktar soğuduktan sonra, Luria Bertani besiyerinin bileşimine eklendi. Hazırlanan besiyerinin sıcaklığı 50°C sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra, her bir rekombinant bakteri soyu için belirtilen uygun oranlarda farklı antibiyotikler ilave edilerek, petrilere döküldü (Tablo 3.2).

Kullanılan bakteri soylarının; ksiloz ve uygun antibiyotikleri içeren LB (LBK) besiyerlerine öze ile inoküle edilerek, 37°C'de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Rekombinant bakteri soyları, her hafta katı besiyerine pasajlanarak çalışma boyunca aktif bir üreme ve büyüme potansiyeli elde edildi.

### **3.2.5. Önkültürlerin Hazırlanması**

HB1, KB1, HB2 ve KB2 ortamlarının her birine; FBR5, TS3, TS4 bakteri soylarından, 50 ml'lik erlenlerde 5 ml uygun besiyeri olacak şekilde, bir kaç koloni öze ile inoküle edilerek, çalkalamalı inkübatörde, 180 rpm hızında 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi.

### **3.2.6. Düşük Havalandırmalı Üreme Koşulları**

Yapılan bu tez çalışmasında; düşük havalandırmalı üreme koşulları 1000 ml'lik (büyük) ve 100 ml'lik (küçük) erlenlerde, erlenlerin 4/5'i besiyeri ile dolu olacak şekilde gerçekleştirildi. Hazırlanan bir gecelik önkültürlerden, optik yoğunlukları 0.06 olacak şekilde HB1, KB1, HB2 ve KB2 besiyerlerine inokülasyon yapıldı. Erlenlerin ağzı parafilm ile sıkıca kapatılarak, CO<sub>2</sub> çıkışını sağlamak amacıyla steril iğne ile delinerek çalkalamalı bir inkübatörde 180 rpm hızında 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirildi.

### **3.2.7. Yüksek Havalandırmalı Üreme Koşulları**

Yapılan bu tez çalışmasında; yüksek havalandırmalı üreme koşulları 1000 ml'lik (büyük) ve 100 ml'lik (küçük) erlenlerde, erlenlerin 1/5'i besiyeri ile dolu olacak şekilde gerçekleştirildi. Hazırlanan bir gecelik önkültürlerden, optik yoğunlukları 0.06 olacak şekilde HB1, KB1, HB2 ve KB2 besiyerlerine inokülasyon

yapıldı ve çalkalamalı bir inkübatörde 180 rpm hızında 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirildi.

### **3.2.8. Kültürlerin Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi**

Rekombinant bakteri soylarının, farklı havalandırma koşullarında ve farklı besiyeri ortamlarında 48 saatlik inkübasyonu sonucu kültürlerin toplam hücre sayımı, spektrofotometre cihazı (Bio-Rad, SmartSpec™ 3000, Philadelphia, A.B.D.) ile gerçekleştirildi. Her bir kültürün A<sub>600</sub> nm'deki optik yoğunluğu ölçülürken; kör olarak steril besiyeri kullanıldı. Her bir kültür steril besiyeri içerisinde, uygun bir şekilde seyreltilerek kendi körüne karşılık okutuldu.

### **3.2.9. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Rekombinant bakteri soylarının, farklı havalandırma koşullarında ve farklı besiyeri ortamlarında 48 saatlik inkübasyonu sonucu kültürlerin pH değerleri bir pH metre (Hanna Instruments, pH 211 Micropr<sup>o</sup> Cessor, Michigan, A.B.D.) ile ölçüldü.

### **3.2.10. Fermantasyon Ortamında Oluşan Biyoetanol Miktarının Belirlenmesi**

Farklı havalandırma koşullarında ve farklı besiyeri ortamlarında gerçekleştirilen rekombinant bakteri soylarının 48 saatlik inkübasyonu sonucu, kültürlerin içerdikleri biyoetanol miktarı (% w/v; % v/v) EnzyChrom Etanol Assay Kit ile ölçülerek belirlendi. Bunun için, kültürlerden alınan 50 ml örnek, 4000 rpm hızında +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvı, mikrofüj tüplerine aktarıldı. Pelet ise Vhb ölçümleri için, kurutulularak -20°C'de muhafaza edildi. Mikrofüj tüplerine aktarılan üst sıvı etanol ölçümü için kullanıldı. Kitin çalışma prensibi; etanolun NAD ile alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla asetaldehite oksitlenmesiyle oluşan asetaldehitin, aldehit dehidrogenazla asetik aside oksitlenmesine ve böylece oluşan NADH'nin 340 nm'de oluşturduğu absorbans farkının ölçülmesine dayanmaktadır.

### 3.2.11. Besiyerinde Kalan Şeker Miktarının Belirlenmesi

Farklı havalandırma koşullarında ve farklı besiyeri ortamlarında gerçekleştirilen rekombinant bakteri soylarının 48 saatlik inkübasyonu sonucu, besiyerinde kalan şeker miktarı İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography-TLC) yöntemi ile belirlendi. Uygulanan bu yöntemde standart olarak % 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.8 oranında glukoz, ksiloz ve arabinoz kullanıldı. İnkübasyon sonucu besiyerinden alınan örnekler, şeker standartlarının arasında kalacak şekilde seyreltilti.

Standartlar ve seyreltilmiş örnekler, TLC plakaları üzerine mikro şırınga ile miktarı 1 µl olacak şekilde damlatılmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra % 85'lik (v/v) asetonitril çözeltisi içerisine hafif bir eğim ile bırakılarak, şekerlerin yürümesi için bekletildi. Plakalar kurutulduktan sonra işlem bir kez daha tekrarlanmış ve tekrar kurutulan plakalar alfa naftol (% 0.5 v/v) çözeltisine daldırılarak boyandı. Şeker noktalarının görünür hale gelmesi için TLC plaka ısıtıcısında 120°C sıcaklıkta 10 dakika süre ile plakalar yakıldı.

Besiyerinde kalan şeker miktarları, TLC görüntüleme densitometresinde (Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D.) TLC plakaların okutulması sonucu hacim hesaplamaları yapılarak belirlendi. R<sup>2</sup> değeri 0.920 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edildi.

### 3.2.12. Rekombinant Bakteri Soylarındaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçülmesi

Yapılan denemelerde kullanılan vgb içeren rekombinant organizmaların (TS3 ve TS4) ürettikleri VHb miktarı, UV-3600 Shimadzu UV-VIS NIR Spectro vasıtasıyla, dityonit (sodyum hidrosülfat) eklenerek indirgenmiş-indirgenmemiş fark spektrasıyla ölçülerek belirlendi (Webster and Liu, 1974). Bunun için farklı kültür besi ortamlarında 48 saat süren inkübasyon sonunda üretilen hücre kültürleri 4000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile santrifüj edilerek (Labogene Scanspeed 1580R, Danimarka) hücrelerin çökmesi sağlandı. Daha sonra pelletlerin yaş ağırlıkları belirlendi ve -20°C sıcaklıkta en az bir gece boyunca muhafaza edildi. Daha sonra 30 ng/ml olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5) ile sulandırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonları bir sonikatör (Branson Ultrasonic Corporation,

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

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

### **3.2.13. İstatistiksel Analizler**

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

## 4.BULGULAR

### 4.1. Hidrolizat Besiyeri 1 (HB1)'de Etanol Üretimleri

#### 4.1.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB1'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS3 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 119 ( $p = 0.02$ ) ve TS4 suşu % 59 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.1).

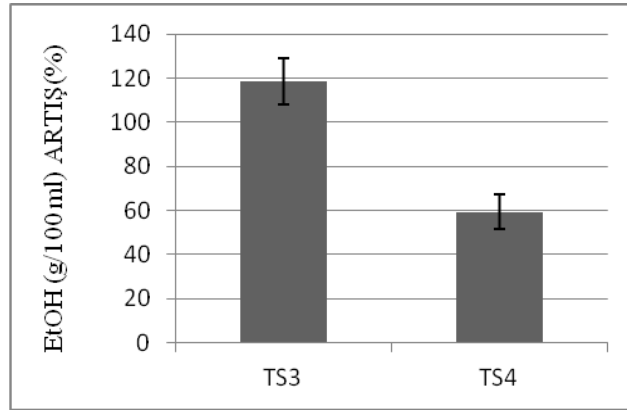
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD$ ) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 159 ( $p = 0.01$ ) ve TS4 suşu ile % 97 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.2)

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 53, TS3 suşu ile % 116 ve TS4 suşu ile % 84 olarak belirlendi (Tablo 4.1). Tablo 4.5'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

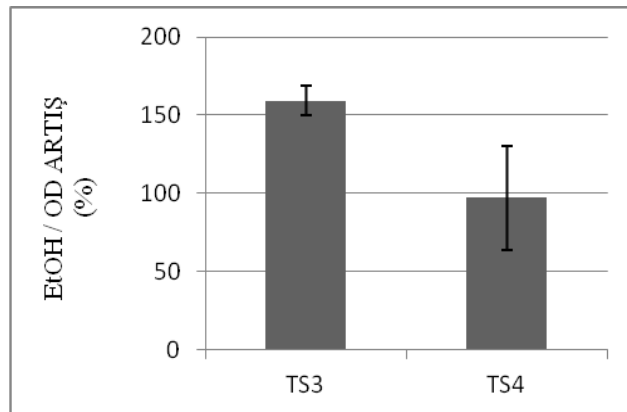
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 205 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.1: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.37 (0.13)	4.64 (0.33)	0.81 (0.13)	1.02 (0.18)	0.17 (0.01)	52.94 (8.78)
PTS3	6.31 (0.01)	3.92 (0.24)	1.77 (0.21)	2.24 (0.27)	0.45 (0.02)	115.68(13.87)
PTS4	6.44 (0.08)	3.76 (0.08)	1.29 (0.28)	1.64 (0.35)	0.34 (0.08)	84.31 (18.02)



Şekil 4.1: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.2: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.1.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB1'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 81 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 21 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.3).

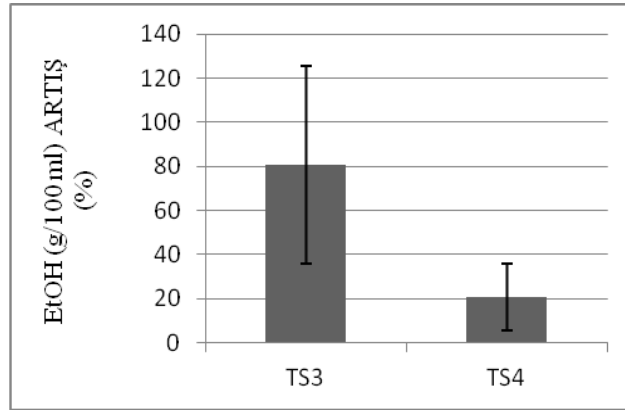
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu % 165 ( $p = 0.05$ ) ve TS4 suşu % 61 ( $p = 0.02$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.4).

Etanol verimi FBR5 suşu ile % 47, TS3 suşu ile % 85 ve TS4 suşu ile % 57 olarak belirlendi (Tablo 4.2). Tablo 4.5'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

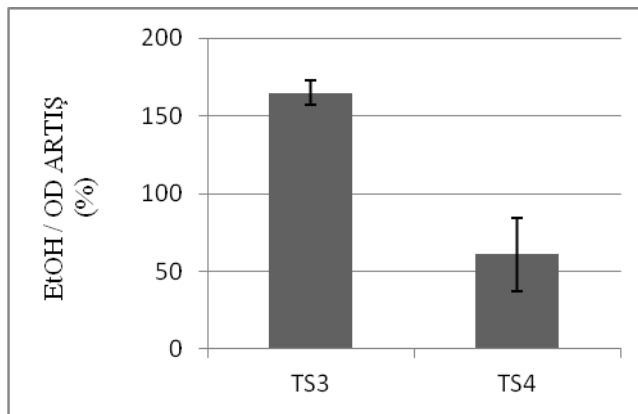
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 179 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.2: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	5.73 (0.78)	8.79 (0.26)	0.72 (0.19)	0.91 (0.23)	0.08 (0.02)	47.05(12.48)
PTS3	6.49 (0.26)	5.97 (1.43)	1.30 (0.04)	1.64 (0.04)	0.22 (0.06)	84.9(2.31)
PTS4	6.44 (0.21)	6.61 (1.88)	0.87 (0.13)	1.11 (0.16)	0.13 (0.03)	56.86(8.32)



Şekil 4.3: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.4: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.1.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB1'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS4 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v); FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 100 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 52 ( $p = 0.04$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.5)

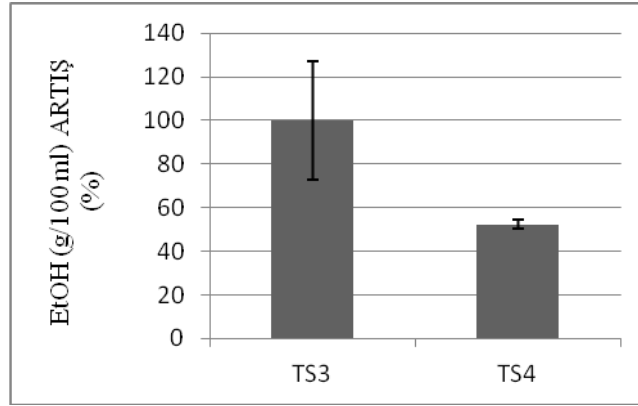
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 91 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 12 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.6)

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 27, TS3 suşu ile % 55 ve TS4 suşu ile % 42 olarak belirlendi (Tablo 4.3). Tablo 4.5'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

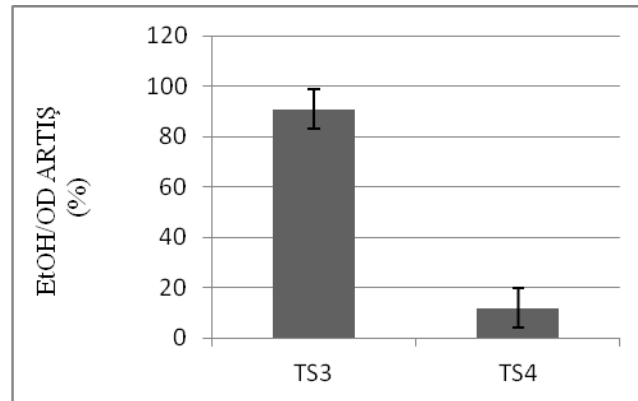
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 660 nmol/g olduğu belirlendi (Tablo 4.9). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.3: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.18 (0.14)	3.86 (0.21)	0.42 (0.05)	0.75 (0.07)	0.11 (0.01)	27.45 (3.24)
PTS3	6.41 (0.07)	4.04 (0.04)	0.84 (0.21)	1.02 (0.33)	0.21 (0.05)	54.90(13.87)
PTS4	6.18 (0.01)	5.26 (2.21)	0.64 (0.08)	0.8 (0.11)	0.12 (0.03)	41.83 (5.55)



Şekil 4.5: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.6: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.1.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB1'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla  $OD_{600}$  nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (%w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 144 ( $p = 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 37 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.7).

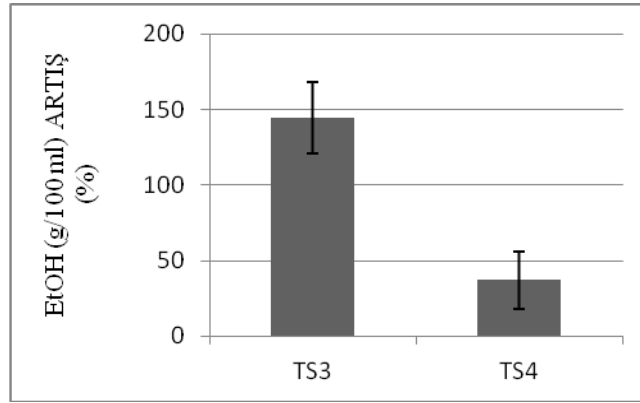
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x  $100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 20 ( $p = 0.04$ ) ve TS4 suşu ile % 13 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.8).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 18, TS3 suşu ile % 43 ve TS4 suşu ile % 24 olarak belirlendi (Tablo 4.4). Tablo 4.5'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

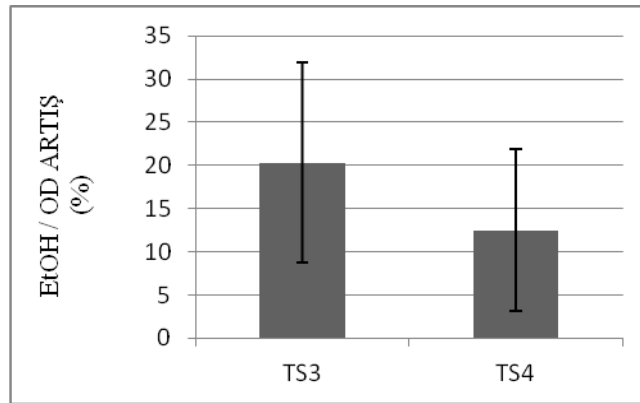
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 426 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.4: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren HB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

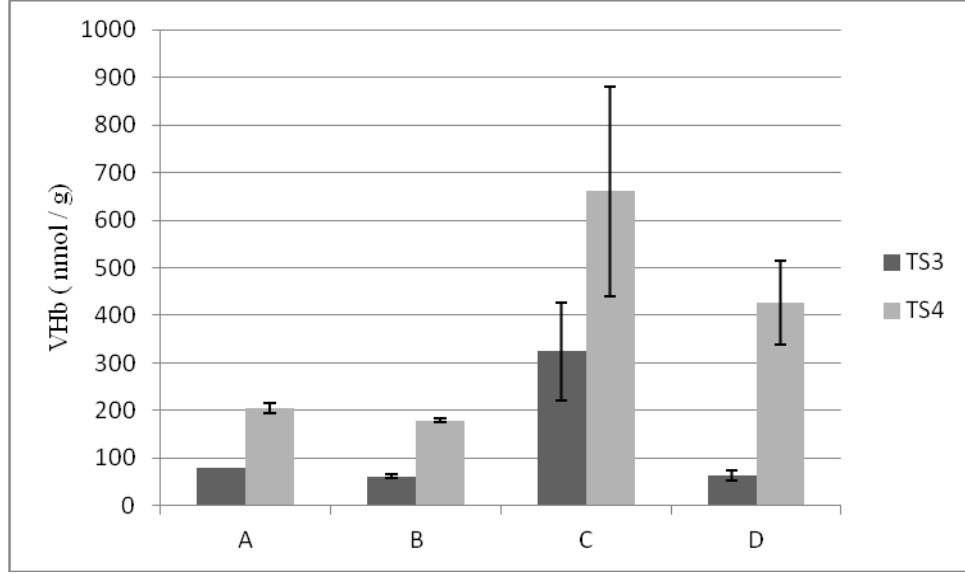
Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	5.66 (0.47)	4.23 (0.15)	0.27 (0.01)	0.30 (0.04)	0.06 (0.01)	17.64 (0.93)
PTS3	6.58 (0.19)	8.52 (0.93)	0.66 (0.10)	0.83 (0.12)	0.08 (0.00)	43.13 (6.47)
PTS4	5.84 (0.67)	5.09 (0.10)	0.37 (0.07)	0.39 (0.03)	0.07 (0.01)	24.18 (4.62)



Şekil 4.7: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.8: Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.9: HB1 içerisinde büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A) Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B) Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C) Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D) Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Tablo 4.5: HB1'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Koşullar	Etanol Verim Artışı (%)	
	TS3	TS4
Düşük havalandırılmalı büyük hacimli	119 (10)	59 (8)
Yüksek havalandırılmalı büyük hacimli	81 (45)	21 (15)
Düşük havalandırılmalı küçük hacimli	100 (27)	52 (2)
Yüksek havalandırılmalı küçük hacimli	145 (24)	37 (19)

## 4.2. Kontrol Besiyeri 1 (KB1)'de Etanol Üretimleri

### 4.2.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB1'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS3 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS4 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 37 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 7 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.10).

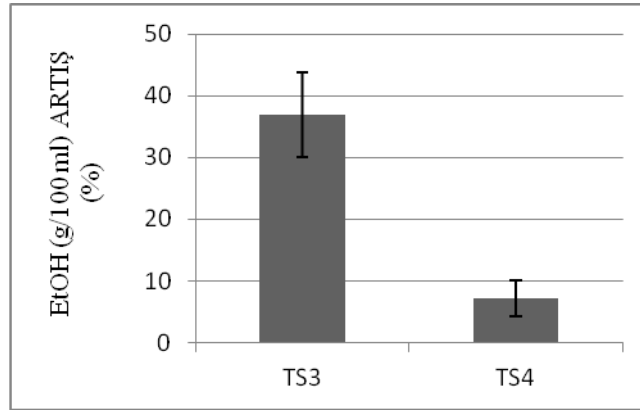
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 43 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 7 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.11)

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 55, TS3 suşu ile % 75 ve TS4 suşu ile % 59 olarak belirlendi (Tablo 4.6). Tablo 4.10'da, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

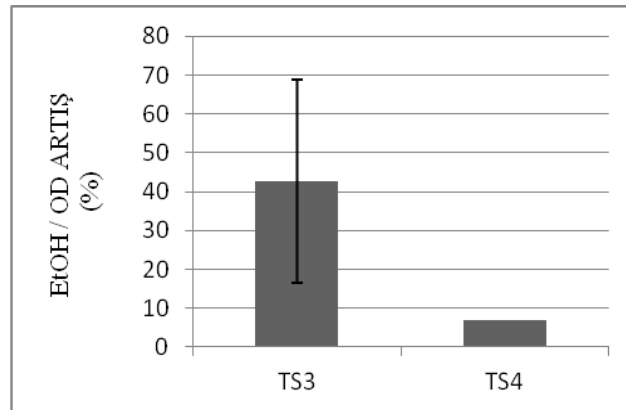
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 768 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.18). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.6: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.11 (0.06)	6.92 (0.71)	0.84 (0.06)	1.07 (0.07)	0.12 (0.02)	54.9 (3.70)
PTS3	6.03 (0.01)	6.97 (0.95)	1.15 (0.13)	1.46 (0.16)	0.16 (0.00)	75.16 (8.78)
PTS4	6.21 (0.06)	7.61 (0.98)	0.90 (0.08)	1.19 (0.18)	0.12 (0.01)	58.82 (5.54)



Şekil 4.10: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.11: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.2.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB1'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 22 ( $p = 0.01$ ) ve TS4 suşu ile % 3 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.12).

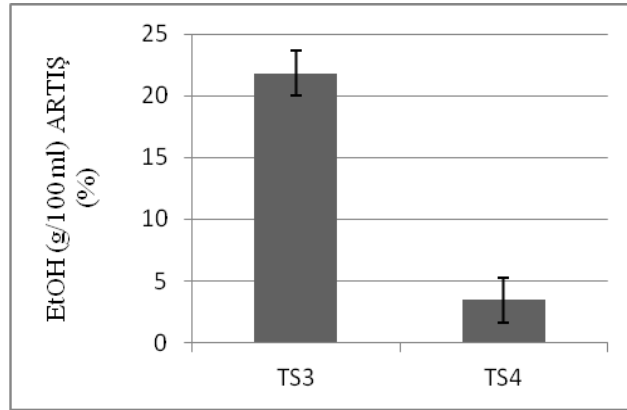
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 15 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 3 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.13).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile %57, TS3 suşu ile % 69 ve TS4 suşu ile % 59 olarak belirlendi (Tablo 4.7). Tablo 4.10'da, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

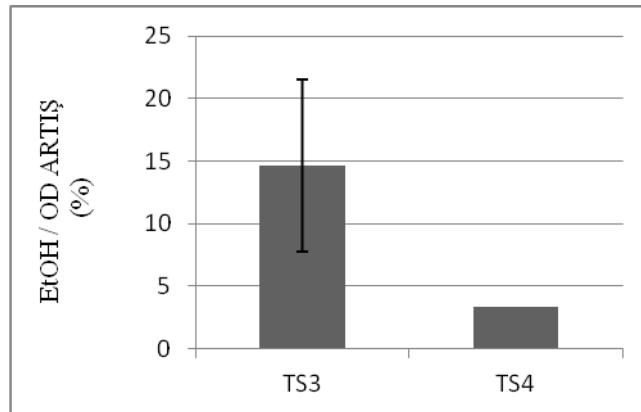
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 998 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.18). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.7: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.00 (0.02)	9.68 (0.59)	0.87 (0.04)	1.10 (0.05)	0.09 (0.01)	56.86 (2.77)
PTS3	6.19 (0.06)	10.36 (1.13)	1.06 (0.04)	1.37 (0.01)	0.10 (0.01)	69.28 (2.31)
PTS4	6.11 (0.06)	9.81 (0.01)	0.90 (0.03)	1.14 (0.03)	0.09 (0.00)	58.82 (1.85)



Şekil 4.12: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.13: Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.2.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB1'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 81 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 66 ( $p = 0.03$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.14).

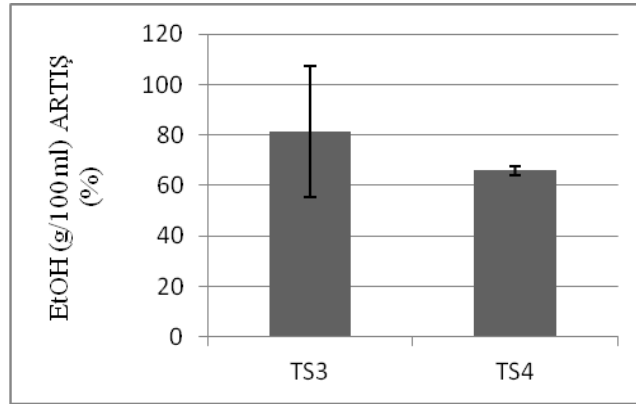
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 98 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 105 ( $p = 0.01$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.15).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 35, TS3 suşu ile % 63 ve TS4 suşu ile % 58 olarak belirlendi (Tablo 4.8). Tablo 4.10'da, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

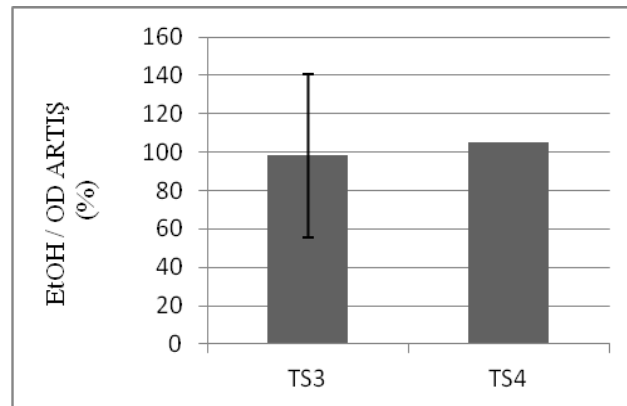
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 938 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.18). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.8: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.07 (0.01)	9.42 (0.34)	0.53 (0.05)	0.67 (0.06)	0.06 (0.00)	34.64 (3.24)
PTS3	6.18 (0.01)	8.64 (0.34)	0.96 (0.23)	1.22 (0.28)	0.11 (0.02)	62.74(14.79)
PTS4	6.11 (0.01)	7.63 (0.98)	0.88 (0.09)	1.11 (0.11)	0.12 (0.00)	57.51 (6.00)



Şekil 4.14: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.15: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.2.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB1'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 47 ( $p = 0.02$ ) ve TS4 suşu ile % 12 ( $p = 0.04$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.16).

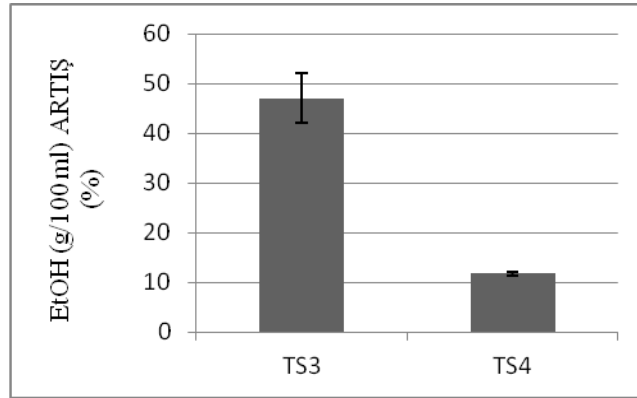
. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 43 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 17 ( $p = 0.03$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.17).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 22, TS3 suşu ile % 33 ve TS4 suşu ile % 25 olarak belirlendi (Tablo 4.9). Tablo 4.10'da, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

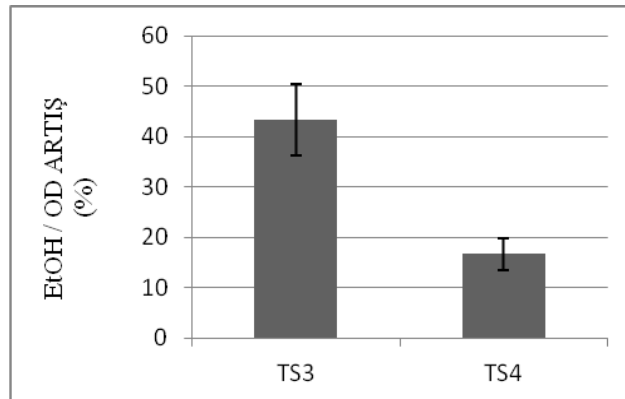
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 897 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.18). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.9: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 2 (w/v) glukoz, % 1 (w/v) ksiloz içeren KB1'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

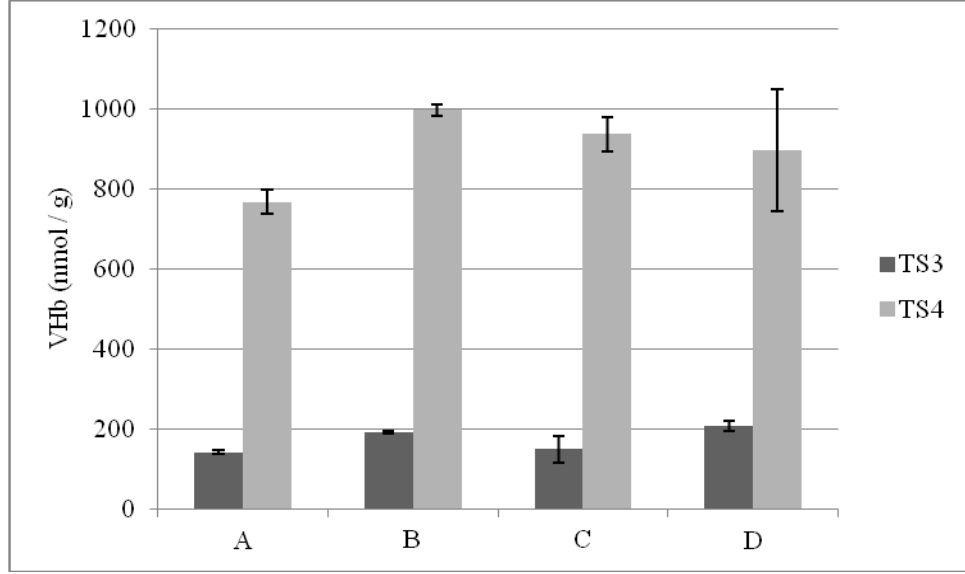
Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.71 (0.03)	10.99 (1.03)	0.34 (00.6)	0.43 (0.08)	0.03 (0.01)	22.22 (4.16)
PTS3	6.81 (0.11)	11.4 (1.27)	0.50 (0.08)	0.63 (0.09)	0.04 (0.01)	32.67 (5.08)
PTS4	6.87 (0.08)	10.65 (0.95)	0.38 (0.07)	0.49 (0.09)	0.04 (0.01)	24.84 (4.62)



Şekil 4.16: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.17: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB1'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.18: KB1 içerisinde büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A) Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B) Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C) Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D) Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Tablo 4.10: KB1'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Koşullar	Etanol Verim Artışı (%)	
	TS3	TS4
Düşük havalandırılmalı büyük hacimli	37 (7)	7 (3)
Yüksek havalandırılmalı büyük hacimli	22 (2)	3 (2)
Düşük havalandırılmalı küçük hacimli	81 (26)	66 (2)
Yüksek havalandırılmalı küçük hacimli	47 (5)	12 (0)

## 4.3. Hidrolizat Besiyeri 2 (HB2)'de Etanol Üretimleri

### 4.3.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB2'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 103 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 74 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.19).

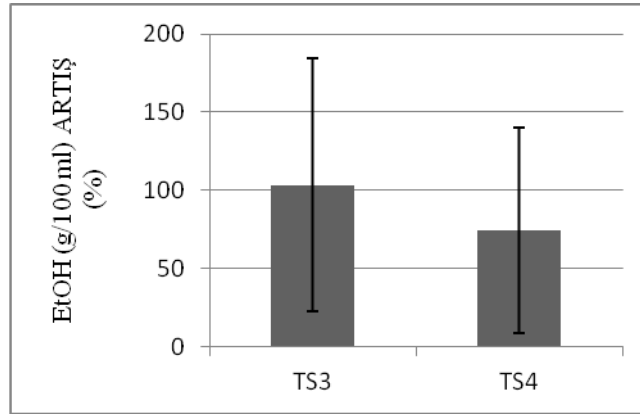
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi ( $\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$ ) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 145 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 138 ( $p = 0.01$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.20).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 81, TS3 suşu ile % 165 ve TS4 suşu ile % 141 olarak belirlendi (Tablo 4.11). Tablo 4.15'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

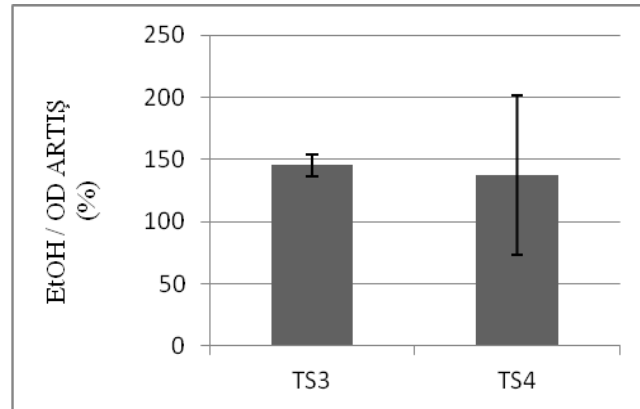
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 698 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.27). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.11: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	5.72 (0.02)	6.97 (0.04)	0.62 (0.25)	0.77 (0.32)	0.09 (0.04)	81.04 (17.56)
PTS3	5.94 (0.06)	5.82 (1.75)	1.26 (0.07)	1.58 (0.08)	0.21 (0.08)	164.70 (9.24)
PTS4	5.98 (0.05)	5.03 (0.18)	1.08 (0.08)	1.36 (0.11)	0.21 (0.03)	141.17(11.09)



Şekil 4.19: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda KB1'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.20: Düşük havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.3.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB2'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 77 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 65 ( $p = 0.02$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.21).

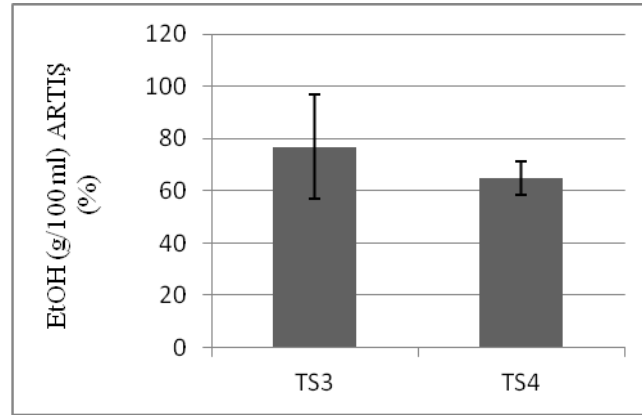
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 150 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 72 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.22).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 85, TS3 suşu ile % 150 ve TS4 suşu ile % 140 olarak belirlendi (Tablo 4.12). Tablo 4.15'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

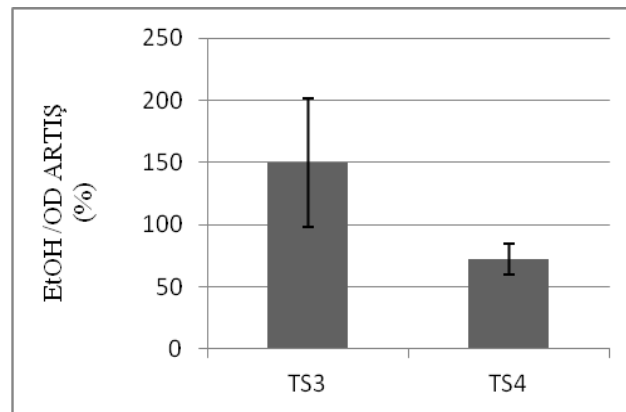
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu 404 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.27). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.12:Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.05 (0.06)	8.45 (2.52)	0.65 (0.12)	0.81 (0.13)	0.08 (0.01)	84.96 (13.87)
PTS3	6.02 (0.11)	6.04 (0.93)	1.15 (0.32)	1.47 (0.4)	0.19 (0.02)	150.32(41.60)
PTS4	5.72 (0.00)	8.12 (2.23)	1.07 (0.13)	1.35 (0.71)	0.13 (0.02)	139.86(17.56)



Şekil 4.21: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol(g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.22: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.3.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB2'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 148 ( $p = 0.01$ ) ve TS4 suşu ile % 107 ( $p = 0.01$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.23).

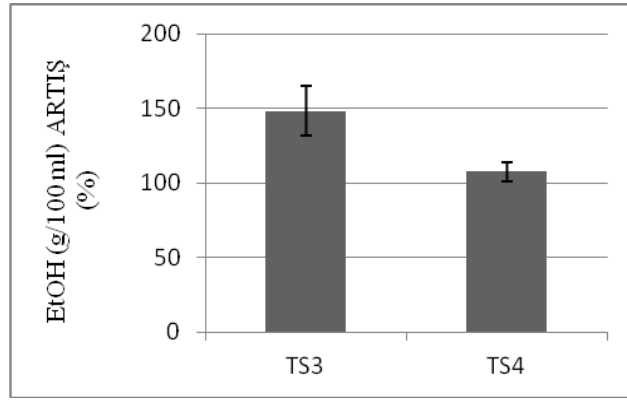
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 255 ( $p = 0.00$ ) ve TS4 suşu ile % 145 ( $p = 0.03$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.24).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 35, TS3 suşu ile % 84 ve TS4 suşu ile % 73 olarak belirlendi (Tablo 4.13). Tablo 4.15'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

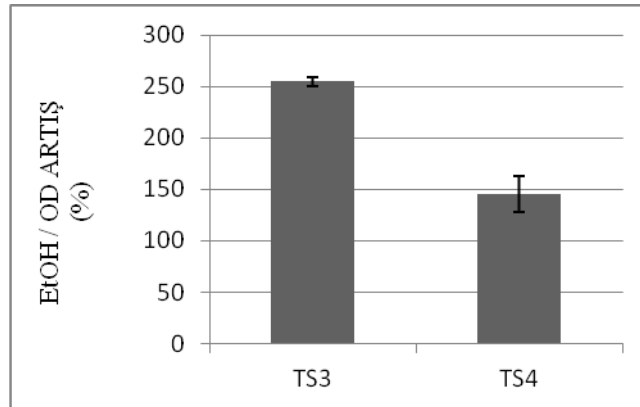
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu 695 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.27). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.13:Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.31 (0.02)	6.29 (0.54)	0.27 (0.02)	0.34 (0.03)	0.04 (0.00)	35.29 (2.78)
PTS3	6.77 (0.01)	4.29 (0.06)	0.64 (0.01)	0.81 (0.01)	0.15 (0.00)	83.66 (0.939)
PTS4	6.40 (0.02)	5.44 (0.62)	0.56 (0.03)	0.71 (0.04)	0.10 (0.01)	73.20 (3.70)



Şekil 4.23: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.24: Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.3.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren HB2'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 54 ( $p = 0.01$ ) ve TS4 suşu ile % 15 ( $p = 0.00$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.25).

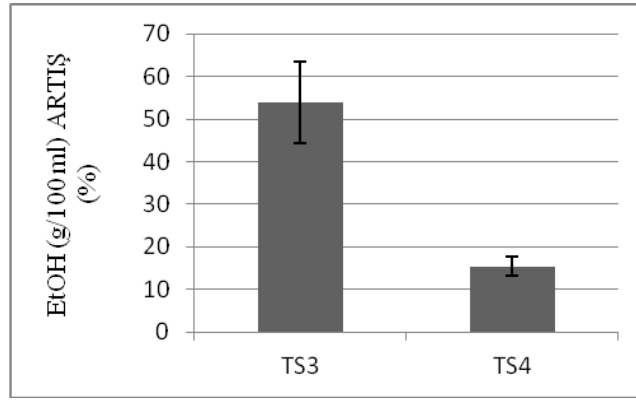
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 93 ( $p = 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 34 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.26).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 51, TS3 suşu ile % 78 ve TS4 suşu ile % 59 olarak belirlendi (Tablo 4.14). Tablo 4.15'te, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

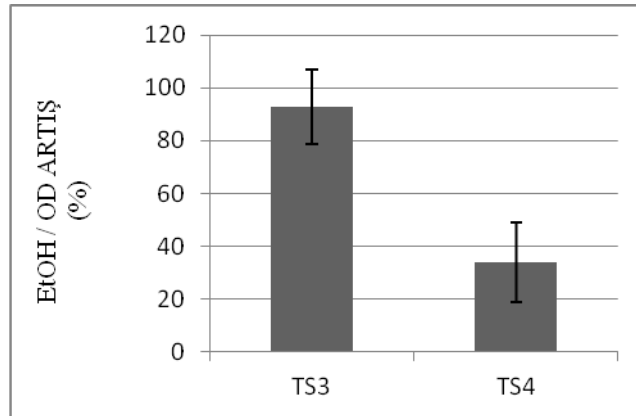
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu 1099 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.27). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.14:Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren HB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

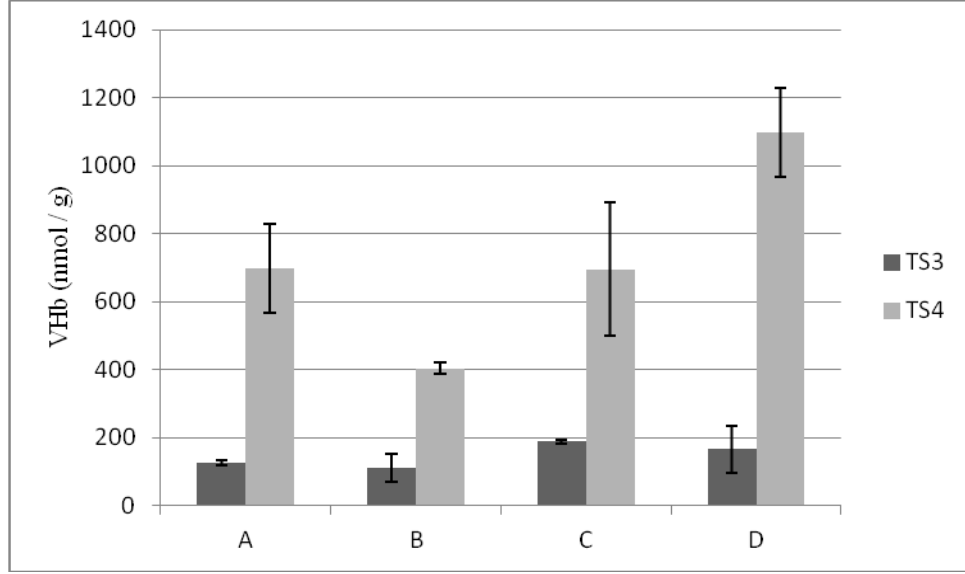
Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.71 (0.02)	9.44 (1.56)	0.39 (0.06)	0.50 (0.07)	0.04 (0.01)	50.98 (7.39)
PTS3	6.71 (0.03)	7.51 (0.18)	0.60 (0.05)	0.76 (0.06)	0.08 (0.01)	78.43 (6.47)
PTS4	6.49 (0.04)	8.1 (0.08)	0.45 (0.06)	0.62 (0.01)	0.06 (0.00)	58.82 (7.40)



Şekil 4.25: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı(%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.26: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda HB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.27: HB2 içerisinde büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A) Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B) Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C) Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D) Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Tablo 4.15: HB2'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Koşullar	Etanol Verim Artışı (%)	
	TS3	TS4
Düşük havalandırılmalı büyük hacimli	103 (50)	74 (38)
Yüksek havalandırılmalı büyük hacimli	77 (20)	65 (6)
Düşük havalandırılmalı küçük hacimli	137 (17)	107 (6)
Yüksek havalandırılmalı küçük hacimli	54 (10)	15 (2)

## 4.4. Kontrol Besiyeri 2 (KB2)'de Etanol Üretimleri

### 4.4.1. Düşük Havalandırmalı Büyük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB2'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS3 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS4 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 112 ( $p = 0.04$ ) ve TS4 suşu ile % 78 ( $p = 0.02$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.28)

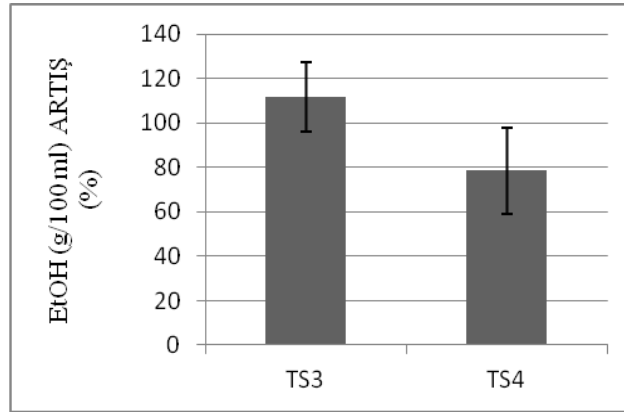
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi ( $\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}$ ) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu % 217 ( $p = 0.04$ ) ve TS4 suşu % 83 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.29)

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 67, TS3 suşu ile % 141 ve TS4 suşu ile % 119 olarak belirlendi (Tablo 4.16). Tablo 4.20'de, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

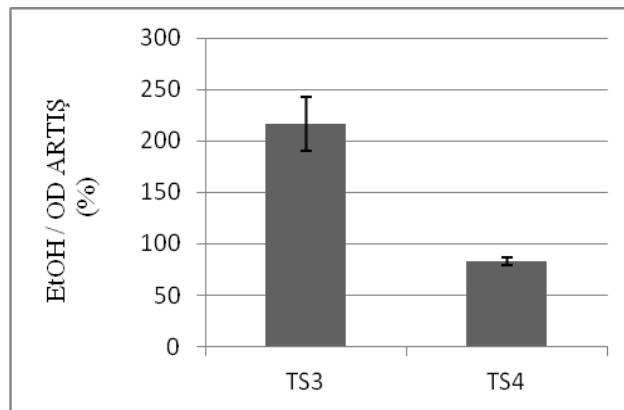
VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 743 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.36). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.16: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.48 (0.06)	7.73 (0.58)	0.51 (0.16)	0.64 (0.20)	0.06 (0.02)	66.66 (20.34)
PTS3	6.32 (0.03)	5.73 (0.10)	1.08 (0.25)	1.37 (0.31)	0.19 (0.04)	141.17(33.28)
PTS4	6.40 (0.06)	7.66 (0.42)	0.91 (0.18)	1.16 (0.23)	0.11 (0.04)	118.95(24.03)



Şekil 4.28: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.29: Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.4.2. Yüksek Havalandırmalı Büyük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değęerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB2'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değęerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 55 ( $p = 0.02$ ) ve TS4 suşu ile % 47 ( $p = 0.04$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.30).

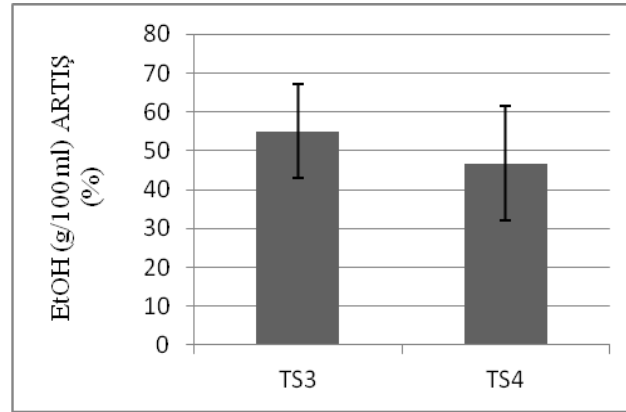
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 83 ( $p > 0.05$ ) ve TS4 suşu ile % 50 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.31).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile %78, TS3 suşu ile % 122 ve TS4 suşunda % 115 olarak belirlendi (Tablo4.17). Tablo 4.20'de, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

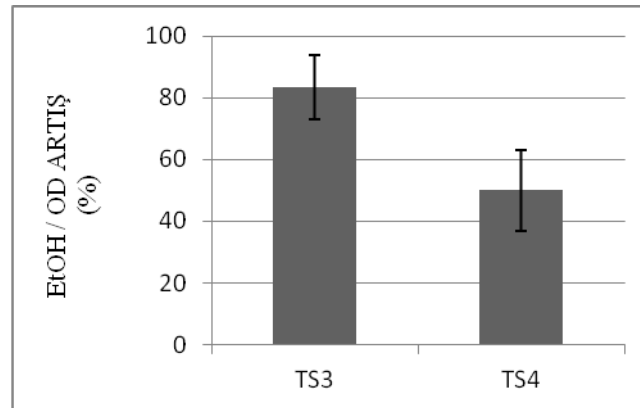
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 1633 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.36). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.17: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.41 (0.02)	9.09 (0.04)	0.60 (0.08)	0.76 (0.11)	0.06 (0.01)	78.43(10.17)
PTS3	6.65 (0.02)	8.26 (0.08)	0.93 (0.05)	1.18 (0.06)	0.11 (0.01)	121.56(6.48)
PTS4	6.48 (0.04)	8.99 (0.13)	0.88 (0.03)	1.12 (0.04)	0.09 (0.00)	115.03(3.70)



Şekil 4.30: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.31: Yüksek havalandırmalı ve büyük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

### 4.4.3. Düşük Havalandırmalı Küçük Hacimli Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren düşük havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB2'de, düşük havalandırmalı koşulda büyütülen kültürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma FBR5 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 33 ( $p = 0.02$ ) ve TS4 suşu ile % 15 ( $p = 0.04$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.32).

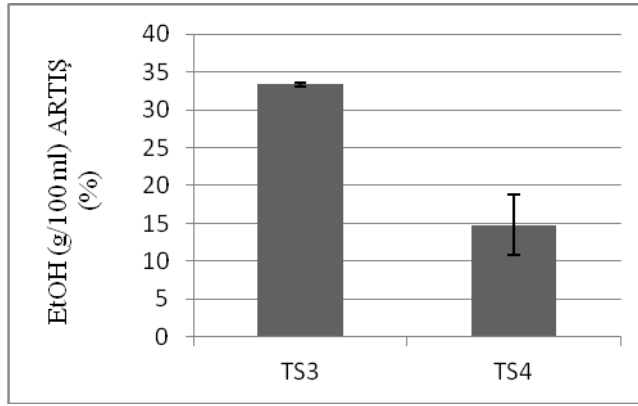
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi ( $\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 10 ( $p = 0.03$ ) ve TS4 suşu ile % 8 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı görüldü (Şekil 4.33)

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 35, TS3 suşu ile % 47 ve TS4 suşu ile % 41 olarak belirlendi (Tablo 4.18). Tablo 4.20'de, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

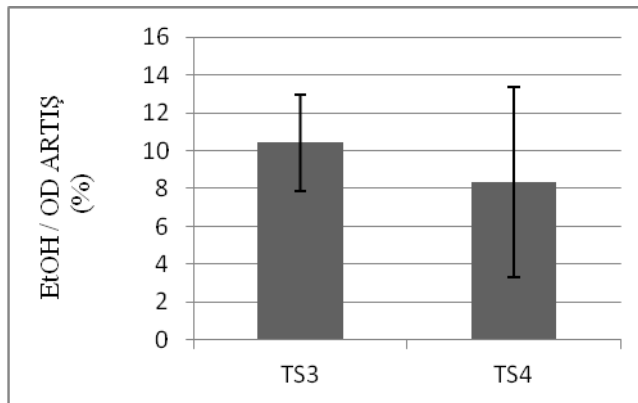
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 1018 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.36). Kültür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.18: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.41 (0.13)	5.59 (0.07)	0.27 (0.02)	0.34 (0.03)	0.05 (0.00)	35.29 (2.78)
PTS3	6.59 (0.01)	6.85 (0.04)	0.36 (0.03)	0.46 (0.04)	0.05 (0.00)	47.05 (3.70)
PTS4	6.66 (0.06)	6.16 (0.03)	0.31 (0.01)	0.39 (0.01)	0.05 (0.00)	40.52 (1.85)



Şekil 4.32: Düşük havalandırmalı, küçük hacimli, antibiyotikli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.33: Düşük havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

#### 4.4.4. Yüksek Havalandırmalı Küçük Hacimli Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları ( $OD_{600}$ ), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), Vhb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2 (pH 7.0) ile uygun antibiyotikleri içeren yüksek havalandırmalı koşullar altında, 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren KB2'de, yüksek havalandırmalı koşulda büyütölen kùltürlerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki pH değerlerinde en fazla azalma TS4 suşunda gözlemlendi. Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS4 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü.

Etanol üretiminin (% w/v), FBR5 suşuna göre TS3 suşu ile % 69 ( $p = 0.04$ ) ve TS4 suşu ile % 62 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.34).

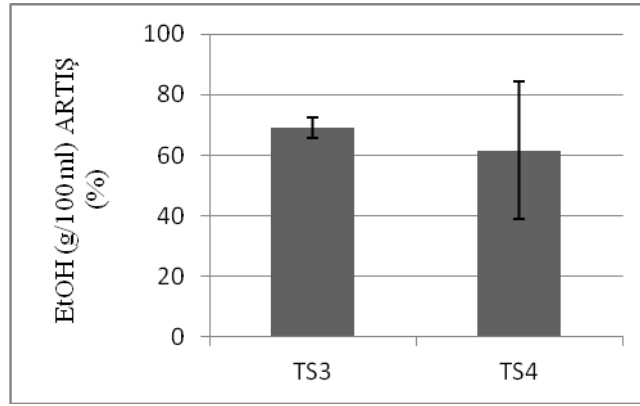
Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ( $g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$  besiyeri / OD) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 69 ( $p = 0.04$ ) ve TS4 suşu ile % 38 ( $p > 0.05$ ) oranında arttığı göröldü (Şekil 4.35).

Etanol verimi; FBR5 suşu ile % 17, TS3 suşu ile % 29 ve TS4 suşu ile % 27 olarak belirlendi (Tablo 4.19). Tablo 4.20'de, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarının etanol verim artışları (%) belirtildi.

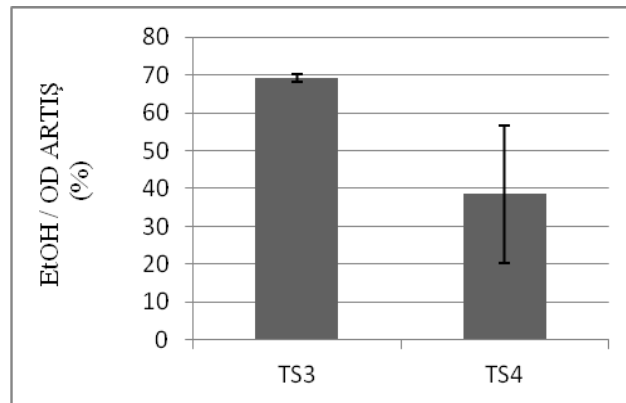
Vhb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 760 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.36). Kùltür ortamlarında bulunan toplam şekerin tamamının bütün suşlar ile üremenin 48. saati sonunda tükendiği belirlendi.

Tablo 4.19: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 1 (w/v) glukoz, % 0.5 (w/v) ksiloz içeren KB2'de 48 saatlik inkübasyon sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v), her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) ve etanol verimi (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

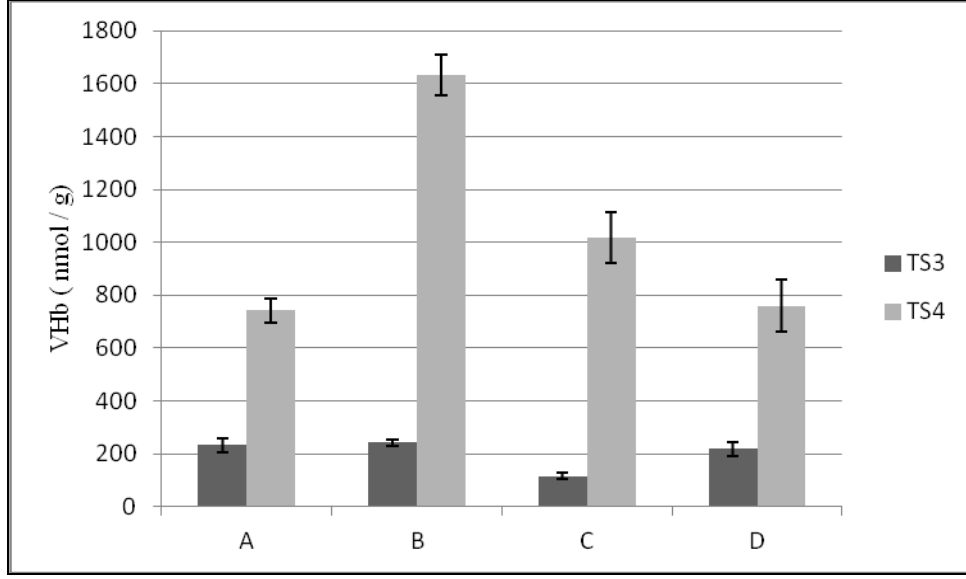
Suşlar	pH	OD (600nm)	EtOH (g/100ml)	EtOH (% v/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)	Verim (%)
FBR5	6.34 (0.01)	9.99 (0.27)	0.13 (0.01)	0.17 (0.01)	0.01 (0.00)	16.99 (1.85)
PTS3	6.39 (0.02)	10.06 (0.31)	0.22 (0.03)	0.28 (0.03)	0.02 (0.00)	28.75 (3.70)
PTS4	6.28 (0.03)	11.29 (0.24)	0.21 (0.01)	0.27 (0.01)	0.02 (0.00)	27.45 (0.93)



Şekil 4.34: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de üretilen etanol (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri) artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.35: Yüksek havalandırmalı ve küçük hacimli koşullarda KB2'de her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki (g etanol x 100 ml<sup>-1</sup> besiyeri / OD) artış (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.



Şekil 4.36: KB2 içerisinde büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık) A) Düşük havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, B) Yüksek havalandırılmalı ve büyük hacimli koşullarda, C) Düşük havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda, D) Yüksek havalandırılmalı ve küçük hacimli koşullarda. Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Tablo 4.20: KB2'de etanol verim artışı (%). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları ( $\delta_{n-1}$ ) göstermektedir.

Koşullar	Etanol Verim Artışı (%)	
	TS3	TS4
Düşük havalandırılmalı büyük hacimli	112 (15)	78 (19)
Yüksek havalandırılmalı büyük hacimli	55 (12)	47 (15)
Düşük havalandırılmalı küçük hacimli	33 (0)	15 (4)
Yüksek havalandırılmalı küçük hacimli	69 (3)	62 (23)

## 5. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Bu tez kapsamında, *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) ve bu suşlardan *pdh*, *adh* ve *vgb* içerecek şekilde geliştirilen TS3 ve TS4 suşlarının; hidrolizat besiyeri 1 (HB1), kontrol besiyeri 1 (KB1), hidrolizat besiyeri 2 (HB2) ve kontrol besiyeri 2 (KB2) içerisinde uygun antibiyotiklerin bulunduğu farklı havalandırma ve hacim koşullarında biyoetanol üretimi ve hemogloblin ekspresyonu ile biyoetanol üretiminin ilişkisi incelenmiştir.

Asit hidrolizi ile gıda işleme atıklarından elde edilen indirgen şekerlerin etanol üretiminde kullanımı sonucu atıkların geri kazanımı ve etanol üretimine hammadde kaynağı temin edilmiştir. Etanol üretiminde maliyetin en aza indirilmesini amaçlayarak gerçekleştirilen bu çalışmanın sonucunda endüstride kullanılmak üzere geliştirilebilir veriler elde edilmiştir. Bununla birlikte VHB'nin gıda işleme atıklarından biyoetanol üretimindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında, VHB ekspresyonunun farklı havalandırma koşullarında mısır işleme atığı ve patates işleme atık suyu hidrolizatı içeren besiyerlerinde biyoetanol üretimini arttırdığı görülmüştür.

HB1'de, uygun antibiyotikleri içeren büyük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, düşük havalandırma koşullarında TS3 suşu (1.77 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 119 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, yüksek havalandırma koşullarında TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 165 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırma koşullarında TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 119 olduğu belirlenmiştir.

HB1'de, uygun antibiyotikleri içeren küçük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, yüksek havalandırma koşullarında TS3 suşu (0.66 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 144 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, düşük havalandırma koşullarında TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 91 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise yüksek havalandırma koşullarında TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 145 olduğu belirlenmiştir.

KB1'de, uygun antibiyotikleri içeren büyük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, düşük havalandırma

koşullarda TS3 suşu (1.15 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 37 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 43 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 37 olduğu belirlenmiştir.

KB1'de, uygun antibiyotikleri içeren küçük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu (0.96 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 81 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, düşük havalandırılmalı koşullarda TS4 suşu ile FBR5 suşuna göre % 105 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 81 olduğu belirlenmiştir.

HB2'de, uygun antibiyotikleri içeren büyük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu (1.26 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 103 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, yüksek havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 150 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 103 olduğu belirlenmiştir.

HB2'de, uygun antibiyotikleri içeren küçük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu (0.64 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 148 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 255 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 137 olduğu belirlenmiştir.

KB2'de, uygun antibiyotikleri içeren büyük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu (1.08 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 112 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 217 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise düşük havalandırılmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 112 olduğu belirlenmiştir.

KB2'de, uygun antibiyotikleri içeren küçük hacimli koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda, en yüksek etanol üretimi artışının, yüksek havalandırmalı koşullarda TS3 suşu (0.22 g/100 ml) ile FBR5 suşuna göre % 69 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimlerinin en fazla, yüksek havalandırmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 69 daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol verim artışının ise yüksek havalandırmalı koşullarda TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 69 olduğu belirlenmiştir.

Martin ve arkadaşları (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; tarım sanayinden elde edilen bazı hammadde kaynaklarının asit hidrolizi ile parçalanması, açığa çıkan fermantasyon inhibitörleri ve etanol üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmada, şeker kamışı küspesi, pirinç kabuğu, yerfıstığı kabuğu ve manyok sapı kullanılarak; %2'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 120°C sıcaklıkta 20, 40 ve 60 dakika sürelerle olmak üzere her hammadde için ayrı ayrı uygulanmıştır. Asit hidroliz yöntemiyle elde edilen ve besiyeri olarak kullanılacak ortamın içerisine; maya özütü (1 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g/L), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.025 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (1.38 g/L) ve glukoz (20 g/L) ilave edilmiştir. Çalışmada etanolojenik organizma olarak *S.cerevisiae* (1 g/L) kullanılmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen en yüksek şeker miktarları; şeker kamışı küspesi (60') ile 19.1 g/L ksiloz ve pirinç kabuğu (60') ile 33.5 g/L glukozdur. Fermantasyon inhibitörleri değerlendirildiğinde tüm hammadde kaynaklarından elde edilen fermantasyon inhibitörlerinin 60. dakikada en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. Oluşan toplam fermantasyon inhibitörlerinin miktarı; kamışı küspesi ile 3.71 g/L, pirinç kabuğu ile 1.86 g/L, yerfıstığı kabuğu ile 2.53 g/L ve manyok sapı ile 2.4 g/L olarak belirtilmiştir. Asit hidrolizi ile elde edilen hidrolizatlardan; şeker kamışı küspesi ve pirinç kabuğunda bulunan hemiselülozun parçalanması ile elde edilen şekerlerin oldukça verimli olduğu belirtilmiştir.

Onsoy ve arkadaşları (2007), yer elmasının asit hidrolizi (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile parçalanmasını ve bundan etanol üretim potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada, 60, 80 ve 100°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen asit hidrolizi ile elde edilen en yüksek şeker miktarı 80°C sıcaklıkta 139.38 g/L olarak belirtilmiştir. Araştırmacılar başlangıç pH'sı 5 olan hidrolizat besiyerinde, inokulant miktarı % 10 olan *Zymomonas mobilis* ile gerçekleştirilen kesikli fermantasyon sonucu en yüksek etanol verimi % 92.75 olarak belirtilmişlerdir.

İlgili diğer bir çalışmada, Bondenson ve arkadaşları (2013), lignoselülozik hammadde kaynağı olan kurutulmuş mısır yapraklarının, asit hidrolizi ve ardından

enzimatik hidroliz ile parçalanması sonucu oluşturulan hidrolizat kullanılarak *S.cerevisiae*'nın etanol üretim potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada, 200°C sıcaklıkta 10 dakika H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile asit hidrolizi ardından enzimatik hidrolizin gerçekleştirilmesi sonucu en yüksek etanol veriminin %78 olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada asit hidrolizinin tek başına yeterli olmaması ve enzimatik hidroliz ile birlikte uygulanması hammaddenin hemiselülozik yapısından kaynaklanmıştır.

Asit hidrolizi ile indirgen şekerlerin elde edilmesi sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, basınç, kullanılan hammadde çeşidine, asit çeşidi ve miktarına göre spesifik olarak optimize edilmelidir. Bu tez çalışmasında patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı eşit oranlarda bir araya getirilerek, farklı koşullarda asit hidrolizi metodları denenmiştir. Bunlar arasından, besiyeri hazırlanırken, en yüksek şeker miktarının elde edildiği 2 basamaklı asit hidroliz metodu tercih edilmiştir.

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları kullanılmış ve düşük havalandırılmalı koşullarda, % 8 (w/v) glukoz, % 8 (w/v) ksiloz, % 8 (w/v) arabinoz ve % 20 mısır hidrolizatı içeren Luria Bertani (LB) besiyerinde antibiyotikli ve antibiyotiksiz koşullarda etanol üretim potansiyelleri ve buna bağlı olarak Vhb üretiminde gözlenen değişimler incelenmiştir. TS4 suşu ile kıyaslandığında düşük seviyede Vhb ekspresyonu yapan TS3 suşu tarafından, glukoz, ksiloz ve mısır hidrolizatı içeren kültür ortamlarında FBR5 suşuna göre daha fazla etanol üretilebildiği belirtilmiştir. Arabinoz içeren kültür ortamında ise TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre etanol üretiminde artış olmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, düşük havalandırılmalı koşullarda, (% 8, w/v) glukoz içeren antibiyotikli LB besiyerinde TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre en yüksek artış miktarını % 30, (% 8, w/v) ksiloz içeren antibiyotiksiz LB besiyerinde TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre en yüksek artış miktarını % 119 ve mısır hidrolizatı (% 20, w/v) içeren antibiyotiksiz LB besiyerinde TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre en yüksek artış miktarını % 59 olarak belirlemişlerdir. Çalışmanın devamında 2 litrelik fermentörlerde, TS3 suşu ile FBR5 suşundan glukoz ve ksiloz içeren ortamlarda sırası ile % 10 ve % 15 oranında etanol üretiminin arttırıldığı belirtilmiştir. Vhb ekspresyonuna sahip rekombinant suşların, etanol üretimini en fazla ksiloz varlığında arttırdığı, ksilozdan daha az miktarda, glukoz varlığında da arttırdığı belirtilmiştir.

İlgili diğer bir çalışmada, Arnaldos ve arkadaşları (2012), % 8 (w/v) ksiloz içeren ve Luria Bertani (LB) besiyeri bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda (2X LB, 1X LB, 0.5X LB, 0.25X LB), FBR5 suşu ve

*Vitreoscilla* hemoglobininin eksprese edildiği TS3 suşu'nun, mısır hidrolizati ile karşılaştırmalı olarak etanol üretim kapasitelerini araştırmıştır. % 8 ksiloz içeren LB besiyeri konsantrasyonları içerisinde, en yüksek etanol verimi 2X LB (30 g/L) ile elde edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, 2X LB ile farklı oranlarda mısır hidrolizati (% 20, % 40, % 80) bir araya getirilerek oluşturulan besiyeri ile etanol üretimi incelenmiştir. En yüksek etanol üretimi % 80 mısır hidrolizati içeren 2X LB besiyerinde (6.5 g/L) gerçekleşmiştir. En yüksek etanol verimi ise % 20 mısır hidrolizati içeren 2X LB besiyerinde (% 70) elde edilmiştir.

Abanoz ve arkadaşlarının (2012) yaptığı başka bir çalışma da ise % 8 (w/v) glukoz içeren küçük hacimli ve büyük hacimli Luria Bertani (LB) besiyerinde etanol üretiminin genellikle TS3 suşu ile FBR suşuna göre %13 daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ancak patates işleme atık suyu hidrolizati içeren besiyeri ile küçük hacimli ve düşük havalandırmalı denemelerde, VHb ekspresyonunun, TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık % 16 etanol üretimini arttırdığını; her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ise en fazla TS4 suşu ile yaklaşık % 36 oranında arttığını saptamışlardır. Çalışmada, patates işleme atık suyu hidrolizati besiyeri ile büyük ölçekli düşük ve yüksek havalandırmalı denemelerde, yine FBR5 suşuna göre, TS3 ve TS4 suşları ile yaklaşık % 18 oranında etanol üretimini arttırdığını ancak her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin en fazla, yine TS4 suşu ile % 48 oranında arttırdığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında ise en fazla etanol üretiminin, düşük havalandırmalı küçük hacimli HB2'de, TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 148 ve düşük havalandırmalı büyük hacimli HB1'de, TS3 suşu ile FBR5 suşuna göre % 119 oranında arttırıldığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında elde edilen etanol artışlarının Abanoz ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi daha yüksek seviyede VHb eksprese eden TS3 suşu ile olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan besiyerlerinin (HB1, KB1, HB2 ve KB2) şeker içeriği çok daha az olmasına rağmen (HB1 için % 3, HB2 için % 1.5) artışlarının çok daha fazla olmasının nedeninin, besiyeri içeriğinde bulunan farklı besleyici bileşenlerin (mineral ve vitamin) veya az miktarda da olsa ksilozun varlığı olabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, Şar (2013) tarafından; % 2.4 (w/v) indirgen şeker içeren melas hidrolizati ve % 5.5 laktoz içeren peynir altı tozu ile antibiyotikli ve antibiyotiksiz, düşük havalandırmalı koşullarda gerçekleştirilen çalışmada, melas hidrolizati ile antibiyotik içeren ortamlarda en yüksek etanol üretiminin FBR5 suşuna

göre TS4 suşu ile % 90, TS3 suşu ile % 48 ve peynir altı tozu ile antibiyotik içeren ortamlarda en yüksek etanol üretiminin TS3 suşu ile ise FBR5 suşuna göre % 360 daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Özçelik (2013) tarafından; % 4 (w/v) laktoz içeren peynir altı suyu ile hazırlanan besiyerinde, VHb ekspresyonuna sahip olan TS3 ve TS4 suşları ile etanol üretiminin FBR5 suşuna göre, küçük hacimli ve büyük hacimli antibiyotikli koşullarda gözlenen artış miktarları çalışılmıştır. Çalışmada en fazla etanol üretimi, büyük ölçekli peynir altı suyu içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren düşük havalandırılmalı koşullarda inkübasyonu sonunda, FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 174 (2.22 g/100ml) ve TS4 suşu ile % 39 (1.13 g/100ml) daha fazla olacak şekilde sağlanmıştır. Benzer şekilde büyük ölçekli peynir altı suyu içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren yüksek havalandırılmalı koşullarda inkübasyon sonunda, FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 419 (2.18 g/100ml) daha fazla olacak şekilde sağlanmıştır. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi için ise en yüksek değerler, büyük ölçekli peynir altı suyu içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren yüksek havalandırılmalı koşullarda inkübasyonun sonunda, yine FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 160 ve TS4 suşu ile % 27 daha fazla olarak belirlenmiştir. Küçük hacimli kültürler ile büyük hacimli kültürlerin etanol üretimleri (w/v) karşılaştırıldığında, küçükten büyük hacime geçişte etanol üretimlerinde artış gözlenmektedir. Bu tez çalışmasında da; küçük hacimli koşullar büyük hacimli koşullar ile karşılaştırıldığında, kültür ortamlarında gerçekleştirilen hacimsel büyümenin etanol üretiminin arttırılmasına katkı sağladığı görülmüştür.

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli olan, *pdc* (piruvat dekarboksilaz) ve *adhb* (alkol dehidrogenaz II) genlerinin, bu genleri taşıyan bir plazmit ile *E. coli*'ye aktarımı sağlanmıştır [Ingram et al., 1988]. Bu genlerin *E. coli*'ye transfer edilmesiyle geliştirilen, etanolojenik bir mikroorganizma olan *Escherichia coli* K011 suşu ile glukoz, laktoz ve ksiloz şekerlerinden etanol üretiminin gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir [Alterthum et al., 1989]. Leite ve arkadaşları (2000) rekombinant *Escherichia coli* K011 suşunun büyütüldüğü peynir altı suyu ortamına etanol üretiminin arttırılması amacıyla nitrojen kaynağı olan maya özütü ve iz elementler ilave ederek etanol üretim potansiyelinde gözlenen değişimleri incelemişlerdir. Besiyerine litreye % 0.05'den % 0.5'e kadar dört farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ve en verimli sonuç

% 0.5 oranında maya özütü ilave edilmesiyle, 36 saatlik fermentasyon sonucunda alınmıştır.

Guimaraes ve arkadaşları (1992) ise, KO11 suşu ile peynir altı suyu içeren LB besiyerinde, iz elementlerin ve tiaminin etanol üretimine arttırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek alkol üretimini besiyerine, iz elementlerden  $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mn^{++}$  ve tiamin ilavesiyle elde etmişlerdir.

Literatürde yer alan çalışmalara göre, bu tez çalışmasında HB1, KB1, HB2 ve KB2 içerisine; maya özütü (5 g/L), iz element solüsyonu (4.16 g/L) ve tiamin (0.83 g/L) ilave edilmiştir.

Önceki çalışmalarda, VHb'nin oksijeni terminal oksidazlara transfer eden bir araç olarak iş gördüğü belirlenmiştir. VHb sitokrom *o* ubikinol oksidazın 1 nolu alt ünitesine bağlanır, oksijeni transfer eder ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretimini özellikle düşük oksijenli koşullarda sağlar. [Park et al., 2002]. *E. coli*'de VHb eksprese eden suşlar VHb eksprese etmeyen yabancı suşlara göre daha yüksek büyüme oranı ve daha az glukoz tüketim oranı göstermişlerdir ki bu da glikolizisten daha etkin ATP ve NADH oluşumu ile ilişkilidir [Tsai et al., 1995]. VHb'nin, NADH/NAD<sup>+</sup> ve ATP/ADP oranlarındaki değişiklikleri indükleyici bir rol oynadığı sanılmaktadır. VHb'nin hücre içeriğini daha oksidize bir hale getirdiği ve böylece metabolik yollarda karbon akış şemasını değiştirdiği düşünülmektedir [Dikshit et al., 1992]. VHb ekspresyonunun, *E. coli*'de, düşük havalandırılmalı koşulda NADH miktarının azalmasına ve de ATP miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Arnaldos ve arkadaşlarının (2012) TS3 ve FBR5 suşları ile yapmış olduğu bir çalışmada, NAD<sup>+</sup>, NADH ve ATP seviyeleri, VHb'nin etanol üretimi üzerindeki biyokimyasal etkilerinin anlaşılması açısından incelenmiştir. Fermentasyonun erken evrelerinde NADH/NAD<sup>+</sup> oranı TS3 suşu için FBR5 suşuna göre daha az iken, büyümenin geç evrelerinde bu oranın arttığı görülmüştür [Arnaldos et al., 2012]. Hücreler, düşük havalandırılmalı koşullarda, anaerobik metabolizmalarından çok aerobik metabolizmalarını kullanarak sahip oldukları karbon kaynaklarından maksimum düzeyde fayda sağlayarak, daha az karbon kaynağından daha çok enerji üretebilmektedirler [Tsai et al., 1996]. Bu sistem ile *vgb* taşıyan rekombinant organizmaların geliştirilmesi, enerji kullanımının verimli ve maksimum seviyeye çıkarılması sayesinde, çeşitli karbon kaynakları kullanılarak yüksek miktarlarda metabolit üretimini sağlayabilir.

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, % 20 (v/v) mısır hidrolizati içeren LB besiyerinde yüksek seviyede eksprese olan VHb ile etanol üretimi arasında ters bir orantı olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda *E.coli*'de VHb ekspresyonunun mikroaerobik koşullarda etanol üretimini azalttığı belirlenmiştir [Tsai et al., 1996]. Genel olarak oluşan tabloya bakıldığında; hem yüksek havalandırılmalı hem düşük havalandırılmalı koşullarda, TS3 suşlarındaki VHb ekspresyon seviyeleri ile TS4 suşlarındaki VHb ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında TS3 suşlarının VHb ekspresyon seviyeleri TS4 suşlarına göre oldukça düşüktür. TS3 suşunda bulunan pTS3 plazmidi, TS4 suşunda bulunan pTS4 plazmidinden daha düşük kopya sayısına sahip olduğundan, VHb ekspresyonları arasındaki bu farkın nedeninin gen doz etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, tüm kültür koşullarında, TS4 suşlarının TS3 suşlarına göre daha yüksek VHb ekspresyonuna sahip olduğu bildirilmektedir. Büyük hacimli kültürlerden elde edilen etanol miktarları, küçük hacimli kültürlerle oranla daha fazla iken VHb ekspresyon miktarları, küçük hacimli kültürlerde büyük hacimli kültürlerle oranla daha fazladır. Böylelikle belirli bir düzeyde VHb ekspresyonunun etanol üretiminin artırılmasında büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. Kültür ortamlarında; VHb ekspresyonu ile birlikte, TS3 suşunda, hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin arttığı ve ortamdaki indirgen şekerlerin 48 saatlik fermantasyon süresi sonunda tamamen tükendiği belirlenmiştir.

HB1 ve HB2, sırasıyla KB1 ve KB2 ile içerdikleri şeker oranlarının, eşit olmasına rağmen patates işleme atık suyu ve mısır işleme atığı içerisinde var olabilecek mineral, vitamin ve besleyici bileşenlerden dolayı toplam hücre sayısı, üretilen etanol miktarı ve VHb ekspresyonunun HB1 ve HB2 kültürlerinde sırasıyla KB1 ve KB2 kültürlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Etanol oluşumu her ne kadar fermentatif bir olay ise de, optimum sentezi belli kritik seviyede oksijene gereksinim duymaktadır. Bununla birlikte, VHb ile arttırılmış etanol üretim etkinliği *E.coli* hücrelerinin arttırılmış biyosentetik kapasitesi ile ilgili olabilir. Daha fazla enerji, etkin hücre büyümesi ve diğer metabolik işlemlerin (örneğin metabolik enzimlerin biyosentezi) çoğalmasına neden olarak hücrelerin biyosentetik kapasitelerinin artmasına yol açmaktadır. Wu ve arkadaşları (2011), VHb ile  $\beta$ -galaktosidazın *Pichia pastoris*'in sitoplazmasında birlikte ekspresyonun hücrelerin üremesini, canlılığını, solunumunu  $\beta$ -galaktosidaz üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında da, VHb ekspresyonunun

etanol sentez yol izindeki enzimlerin aktivitesini arttırmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *E.coli*'de VHB ekspresyonunun ribozom ve tRNA seviyelerini yükselttiği ve böylece hücrelerin biyosentetik kapasitelerini arttırdığı tahmin edilmektedir. *E.coli*'de VHB'nin 308 genin transkripsiyonunu etkilediği belirlenmiştir [Roos et al., 2004]. Böylece VHB hücrenin düşük oksijenli ortamlara uymasını bu koşullarda biyokütle artışı ve artmış VHB düzeyi ile sağladığı tespit edilmiştir [Tsai et al., 1996].

Bütün kültür ortamlarında pH değerlerinde azalmalar belirlenmiştir. Bu azalmalar fermantasyon sırasında CO<sub>2</sub> oluşumundan ileri gelebilir. Ancak daha düşük pH değerleri ile daha yüksek etanol değerleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

VHB ekspresyonu düşük oksijenli koşullarda artmaktadır [Webster, 1987]. Bu tez çalışmasında da diğer çalışmalara benzer şekilde [Abanoz et al., 2012], [Şar, 2013], [Özçelik, 2013] VHB ekspresyonları düşük havalandırmalı koşullarda çok daha fazla olmuştur. VHB ekspresyonunun oksijen difüzyonunu kolaylaştırdığı ve aerobik metabolizmayı geliştirdiği öne sürülmüştür [Khosla et al., 1990].

Çalışmada 48 saatlik fermantasyon sonucu, tüm kültürlerde bulunan glukoz ve ksilozun tamamının tükendiği görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan besiyeri ve bakteri soyları ile 48 saatlik fermantasyonun etkili ve ekonomik olacağını göstermiştir.

HB1 ve KB1 besiyerlerinin şeker içeriği, HB2 ve KB2 besiyerlerinin şeker içeriğinin 2 katı olduğundan etanol üretiminin de daha fazla olduğu bulunmuştur. En fazla verimin TS3 ve TS4 suşu ile % 165 ve % 141 olarak büyük hacimli düşük havalandırmalı koşullarda HB2 besiyeri ile elde edildiği görülmüştür. Verim artışlarının maksimum teorik verimden (0.519) fazla olmasının nedeninin, besiyeri içerisinde bulunan pepton ve maya özütü olabileceği düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda [Abanoz et al., 2012], [Şar, 2013], [Özçelik, 2013] etanol artışının, hem etanol/biyokütle hemde sadece biyokütlenin artışından dolayı gerçekleştiği görülmüştür. Bu çalışmada da benzer artışlar görülmesine rağmen etanol artışının tamamen her ünite hücre biyokütlesinin (etanol/biyokütle) ürettiği etanol artışından ileri geldiği görülmüştür.

Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen veriler, *vgb/VHB* sisteminin ucuz karbon kaynağı olarak patates ve mısır işleme atığı hidrolizatının, biyoetanol üretiminde verimli olarak kullanabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

Abanoz K., (2012), “Vitreoscilla Hemoglobini ile Patates İşleme Atık Suyundan Biyoetanol Üretiminin Arttırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Abanoz K., Stark B. C., Akbas M. Y., (2012), “Enhancement of ethanol production from potato processing waste water by engineering *Escherichia coli* using Vitreoscilla hemoglobin”, *Letter Applied Microbiology*, 55, 436-443.

Acaroğlu M., (2008), “Türkiye'de biyokütle-biyoetanol ve biyomotorin kaynakları ve biyoyakıt enerjisinin geleceği”, 7. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES'2008, 7, 351-362, Konya, Türkiye, 17-18 Aralık.

Adıgüzel A. O., (2011), “Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi”, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi.

Adıgüzel A. O., (2013), “Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları”, *Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.

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 & Bioenergy*, 37, 1-8.

Balat M., Balat H., Öz C., (2008), “Progress in bioethanol processing”, *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (5), 551-573.

BP, (2013), “British Petroleum statistical review of world energy 2013”, British Petroleum Company.

Brünker P., Minas W., Kallio P. T., Bailey J. E., (1998), “Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene (vhb)”, *Microbiology Applied*, 144, 2441–2448.

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

Bondensson P. M., Galbe M., Zacchi G., (2013), “Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid”, *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 11-12.

Chen W., Hughes D. E., Bailey J. E., (1994), “Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnology Progress*, 10, 308–13.

Davis L., Rogers P., Pearce J., Peiris P., (2006), “Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolyzed waste starch stream”, *Biomass and Bioenergy*, 30, 8-9, 809-814.

Demirbaş A., (2009), “Biofuels from agricultural biomass”, *Energy Sources Part A*, 31, 1573-1582.

Dien B. S., Nichols N. N., OBryan P. S., Bothast R. J., (2000), “Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocelulosic biomass”,

Applied Biochemical Biotechnology, 84, 181-196.

Dikshit K. L., Spaulding D., Braun A., Webster D. A., (1989), "Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*", The Journal of General and Applied Microbiology., 135, 2601-2610.

Dikshit K. L., Webster D. A., (1988), "Cloning characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*", Gene, 70, 377-386.

Dikshit R. P., Dikshit K. L., Liu Y., and Webster D. A., (1992), "The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidase", Archives of Biochemistry and Biophysics, 293, 241-245.

Farres J., Kallio P. T., (2002), "Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin dagger", Biotechnology Progress, 2, 229-233.

Geckil H., Gencer S., (2004), "Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake", Applied Microbiology and Biotechnology, 63(6), 691-697.

Goldemberg J., (2007), "Ethanol for a sustainable energy future", Science Direct, 315, 808-810.

Gray K. A., Zhao L., Emptage M., (2006), "Bioethanol", Science Direct, 10, 141-146.

Guimaraes W. V., Dudgey G. L., Ingram, L. O., (1992), "Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*", Biotechnology and Bioengineering, 40, 41-42.

Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J. P., (2010), "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation", International Journal of Hydrogen Energy, 35(19), 10660-10673.

Hardison R., (1998), "Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression", The Journal of Experimental Biology, 201, 1099-1117.

Hart R. A., Kallio P. T., Bailey J. E., (1994), "Effect of biosynthetic manipulation of heme on insolubility of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli*", Applied Environmental Microbiology, 60(7), 2431-2437.

Ingram L. O., Conway T., Clark D. P., Sewell G. W., Preston J. F., (1987), "Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*", Applied Environmental Microbiology, 53(10), 2420-2425.

Ingram L. O., Conway T., (1988), "Expression of different levels of ethanologen enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*", Applied Environmental Microbiology, 54, 397-404.

Kallio P. T., Kim D. J., Tsai P. S., Bailey J. E., (1994), "Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygenlimited conditions", European Journal of Biochemistry, 219, 201-8.

Karaosmanoğlu F., (2008), "Yakıt Alkolü: Mevcut Durumu ve Geleceği", Su ve Çevre Teknolojileri, 1, 54-60.

Khosla C., Bailey J. E., (1988), "The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*", Molecular Genetics and Genomics, 214, 158-61.

- Khosla C., Curtis J. E., DeModena J., Rinas U., Bailey J. E., (1990), "Expression of intracellular hemoglobin improve protein synthesis in oxygen limited *Escherichia coli*", *Nature Biotechnology*, 8, 849-853.
- Kiley P., Reznikoff W. S., (1991), "fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen", *Journal of Bacteriology*, 173, 16-22.
- Koç E., Şenel M. C., (2013), "Dünya'da ve Türkiye'de Enerji Durumu-Genel Değerlendirme", *Mühendis ve Makina*, 54(639), 32-44.
- Koçtürk D., Avcioğlu A. O., (2013), "Benzin-Biyometanol karışımlarının motor yakıtı olarak kullanılmasında performans ve ekonomikliğinin incelenmesi" *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(2), 37-44.
- Kroneck P. M. H., Jakob W., Webster D. A., DeMaio R., (1991), "Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*", *Biolog of Metals*, 4(2), 119-125.
- Leite A. R., Guimaraes W. V., Araujo E. F., Silva D. O., (2000), "Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11" *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(3), 211-215.
- Liu S. C., Webster D. A., Wei M. L., Stark B. C., (1995), "Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhanced degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*", *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 101-105.
- Martin C., Alriksson B., Sjöde A., Nilvebrant N. O., Jönsson L. J., (2007), "Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140, 339-352.
- Melikoğlu M., Albostan A., (2011), "Türkiye'de biyometanol üretimi ve potansiyeli", *Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26(1), 151-160.
- Onsoy T., Thanonkeo P., Thanonkeo S., Yamada M., (2007), "Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation", *KMITL Science Technology Journal*, 7-S1, 55-60.
- Öğüt H., (2007), "Enerji Güvenliğinin Sağlanmasında Biyoyakıtların Rolü", *Elektrik Mühendisleri Odası İç Anadolu Enerji Forumu*, Nevşehir Türkiye, 29 Haziran.
- Öğüt H., Oğuz H., (2006), "3. Milenyumun Yakıtı: Biyodizel", *Nobel Yayınları*, Ankara.
- Özçelik B., (2013), "Vitreoscilla hemoglobini'nin peynir altı suyundan biyometanol üretimine etkisinin araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Özmen M. T., (2009), "Sera gazı-Küresel ısınma ve Kyoto protokolü", *Türkiye Mühendislik Haberleri Dergisi*, 453, 43-46.
- 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 Biology Chemical*, 277, 33334-33337.
- Patel S. M., Stark B. C., Hwang K. W., Dikshit K. L., Webster D. A., (2000), "Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia* sp. Strain DNT for enhancement of 2,4 -dinitrotoluene degradation", *Biotechnology Progress*, 16, 26-30.

Ramandeep, 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*, 276(27), 24781-24789.

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

Sanchez O. J., Cardona C. A., (2008), "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks", *Science Direct*, 99, 5270-5295.

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

Sanny T., Arnaldos M, Kunkel S. A., Pagilla K. R., and Stark B. C., (2010), "Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose", *Applied Microbiology Biotechnology*, 88(5), 1103-1112.

Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S. J., (1995), "Principles of Fermentation Technology", 2nd edition, Pergamon.

Stark B. C., Dikshit K. L., Pagilla K. R., (2011), "Recent advance in understanding the structure, function and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla*", *Biotechnology Letters*, 33,1705-1714.

Soccol C. R., Vandenberghe L. P. S., Medeiros A. B. P., Karp S. G., Buckeridge M., Ramos L. P., Pitarelo A. P., Leitao V. F., Gottschalk L. M. F., Ferrara M. A., Bon E. P. S., Moraes L. M. P., Araujo J. A., Torres F. A. G., (2010), "Bioethanol from lignocelluloses: status and perspective in Brazil", *Bioresource Technology*, 101(13), 4820-4825.

Şar T., (2013), "Farklı gıda işleme atıklarından biyoetanol üretiminde *Vitreoscilla* hemoglobini'nin kullanım potansiyelinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Tsai P. S., Rao G., Bailey J. E., (1995) "Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential", *Biotechnology and Bioengineering*, 47(3), 347-354.

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.

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

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

Webster D. A., Liu C. Y., (1974), "Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome o reductase associated with cytochrome o purified from *Vitreoscilla*", *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 4257-4260.

Wei M. L., Webster D. A., Stark B. C., (1998), "Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: Alterations in fermentation pathways", *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 640-646.

Wu J. M., Hsu T. A., Lee C. K., (2003), "Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves  $\beta$ -galactosidase production in a recombinant *Pichia pastoris*", *Biotechnology Letters*, 25(17), 1457-1462.

Yang W., Bai U., Li Y., Sun D., (2005), "Amperometric nitrite sensor based on hemoglobin/colloidal gold nanoparticles immobilized on a glassy carbon electrode by a titania sol-gel film", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 44-50.

Yiğitoğlu M., İnal M., Gökğöz M., (2012), "Alternatif bir enerji kaynağı olarak biyoetanol", *Kırıkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1, 11-21.

Zhang Y. H. P., (2008), "Reviving The Carbohydrate Economy Via Multi-Product Lignocellulose Biorefineries", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 367-375.

Web 1 (2014), <http://www.eia.gov/countries/cab.cfm?fips=br>, ( Erişim Tarihi: 15/04/2014).

Web 2 (2014) , [http://www.vetenergy.com/tr/hizmetlerimiz/yenilenebilir\\_enerji-kaynaklari/biyoenerji/biyoetanol](http://www.vetenergy.com/tr/hizmetlerimiz/yenilenebilir_enerji-kaynaklari/biyoenerji/biyoetanol), (Erişim Tarihi: 18/03/2014).

## ÖZGEÇMİŞ

Fatma SÜMER, 26 Eylül 1989 yılında İzmir'de doğdu. 2007 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümünde üniversite eğitime başladı. 2011 yılında uygulamalı bitirme tezini tamamlayarak Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2012 yılının Ocak ayında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.