

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEYVE İŞLEME ATIĞINDAN ETANOL ÜRETİMİNDE
VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ'NİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

AYŞE GÖKÇE ERMAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEYVE İŞLEME ATIĞINDAN ETANOL
ÜRETİMİNDE VITREOSCILLA
HEMOGLOBİNİ'NİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

AYŞE GÖKÇE ERMAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2017

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

RESEARCHING THE EFFECTS OF
VITREOSCILLA HEMOGLOBIN ON
ETHANOL PRODUCTION FROM FRUIT
PROCESSING WASTE

AYŞE GÖKÇE ERMAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2017

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/06/2017 tarih ve 2017/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 04/07/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ayşe Gökçe ERMAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE

: Yard. Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Ananas atıklarının seyreltilmiş asitle (H_2SO_4 veya HCl) hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlar kullanılarak on farklı besiyeri hazırlandı. Bu besiyerleri içinden yüksek miktarda şeker ihtiva eden beş farklı besiyeri seçilerek etanol üreticisi *E. coli* FBR5 (*vgb-*), TS3 (*vgb+*) ve TS4 (*vgb+*) suşlarıyla 37 °C’de, 180 rpm hızda bir çalkalamalı inkübatörde 48 saat süreyle inkübasyon yapıldı.

En yüksek biyokütle artışı ve etanol üretiminin görüldüğü hidrolizatlardan besiyerinin DHB (%1.82 fruktoz, %1.74 glukoz) olduğu belirlendi. DHB’nin içerdiği oranlarda şeker, maya özütü ve inhibitör madde ihtiva eden kontrol besiyerleriyle yapılan fermentasyonlarda hiçbir suşta biyokütle artışı ve etanol üretimi görülmedi. Ancak sadece ananas hidrolizatı içeren veya hem ananas hidrolizatı hem de maya özütü içeren besiyerlerinde tüm suşlarda biyokütle artışı ve etanol üretimi tespit edildi.

Küçük ölçekli ortamda (100 ml) DHB’de FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan inkübasyon sonucu üretilen etanolün %29; büyük ölçekli ortamda (500 ml) ise FBR5 suşuna göre TS3 suşuyla %14, TS4 suşuyla %35 arttığı belirlendi.

DHB ile büyük ölçekli fermentasyon ortamında ise (500 ml) küçük ölçekli fermentasyon ortamına göre üretilen etanol miktarlarında; FBR5 suşuyla yapılan inkübasyonda %8.5, TS3 suşuyla yapılan inkübasyonda %34.5 ve TS4 suşuyla yapılanda ise %14 artış belirlendi.

Elde edilen veriler meyve sanayi işleme atıklarından etanol üretiminin artırılmasında VHB’nin yararlı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ananas Atığı, Bakteriyel Hemogloblin, *Escherichia coli*, Biyoetanol, Asit Hidrolizi

SUMMARY

In this study, ten different growth media were prepared by using hydrolysates containing pineapple waste hydrolyzed by dilute acid. Five of these media with high sugar concentrations were chosen to carry out fermentation for 48 hours by using ethanologenic *E. coli* FBR5 (*vgb*-), TS3 (*vgb*+) and TS4 (*vgb*+) strains.

The best growth and the highest ethanol production values were obtained by DHB (%1.82 fructose and %1.74 glucose). There were no growth and ethanol production in the control media by containing only sugars, yeast extract and inhibitors as in DHB. However, the growth and ethanol production by were observed only in hydrolysates containing media or yeast extract containing hydrolysate media.

The experiments were referred both in small (100 ml) and large (500 ml) scale incubation at 180 rpm and 37°C for 48 hours. In the small scale with DHB, it was observed that 29% more ethanol was produced by using TS3 and TS4 strains. In the large scale with DHB, TS3 and TS4 strains produced 14% and %35 more ethanol than FBR5, respectively.

According to experimental results, it was determined that more ethanol production at the large scale than small scale fermentation. The rate of increase scale up fermentations were 8.5% by FBR5, 34.5% by TS3 and 14% by TS4 strain.

In the direction of the obtained data, pineapple wastes are appropriate carbon sources for ethanologenic *E. coli* strains FBR5, TS3 and TS4. So the fruit wastes can be adapted at study of ethanol production.

The result showed that VHB could be useful for enhancement of bioethanol production from fruit processing wastes.

Key Words: Pineapple Waste, Bacterial Hemoglobin, *Escherichia coli*, Bioethanol, Acid Hydrolysis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Taner ŞAR ve Gamze ŞEKER'e,

Yardımlarını esirgemeyen Kurtuluş KILIÇ ve Nil TÜRKÖLMEZ'e,

Biyoloji sevgimi pekiştiren, daima beni yüreklendirip bana inanan, örnek alıp layık olmak istediğim saydideğer hocam Jülide ÖZKUM'a,

Her daim maddi ve manevi desteklerini koşulsuz hissettiren, bana cesaret veren çok değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoetanol	3
2.1.1. Biyoetanol Üretim Basamakları	4
2.1.2. Biyoetanol Üretiminde Ham Madde Kaynakları	5
2.1.3. Dünyada ve Türkiye’de Biyoetanol	6
2.1.4. Biyoetanol Üretiminde Ham Maddelere Uygulanan Ön İşlemler	7
2.1.5. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	10
2.2. Ananas	11
2.2.1. Ananas Atıklarından Bromelain Üretimi	14
2.2.2. Ananas Atıklarından Etanol Üretimi	14
2.2.3. Ananas Atıklarından Fenolik Antioksidanların Üretimi	15
2.2.4. Ananas Atıklarının Organik Asit Üretimi	15
2.2.5. Karbon Kaynağı Olarak Ananas	15
2.2.6. Ananas Atıklarından Lif Üretimi	16
2.2.7. Ananas Atıklarıyla Ağır Metallerin Giderimi	16
2.3. <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobini (VHb)	16
2.4. İnhibitörler	19
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	22

3.1. Gereçler	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	22
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları	23
3.2. Yöntemler	24
3.2.1. Ananas Atığının Hazırlanması	24
3.2.2. Ananas Atığı Hidrolizatları ve Besiyerlerinin Hazırlanması	24
3.2.2.1. Metot A	25
3.2.2.2. Metot B	26
3.2.2.3. Metot C	26
3.2.2.4. Metot D	26
3.2.2.5. Metot D1	27
3.2.2.6. Metot E	27
3.2.2.7. Metot F	27
3.2.2.8. Metot G	28
3.2.2.9. Metot H	28
3.2.2.10. Metot I	28
3.2.3. Hidrolizatlý Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerlerinin Hazırlanması	29
3.2.4. Ön Kùltürlerin Hazırlanması	29
3.2.5. Fermentasyon Ortamlarının Hazırlanması	30
3.2.6. Analiz Yöntemleri	30
3.2.6.1. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi	30
3.2.6.2. Şeker, İnhibitör ve Etanol Miktarının Belirlenmesi	30
3.2.6.3. TS3 ve TS4 (<i>vgb</i> geni aktarılmış) Suşlarındaki Hemoglobün Ekspresyonunun Belirlenmesi	31
3.2.6.4. Substrat Tüketimi, Fermentasyon Etkinliği ve Alkol Verimlerinin Hesaplanması	32
3.2.7. İstatiksel Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1. Ananas Atığı Hidrolizatlarındaki Şeker ve İnhibitör İçeriklerinin Belirlenmesi	34
4.1.1. A Hidrolizati	35
4.1.2. B Hidrolizati	35

4.1.3. C Hidrolizati	36
4.1.4. D Hidrolizati	36
4.1.5. D1 Hidrolizati	36
4.1.6. E Hidrolizati	36
4.1.7. F Hidrolizati	37
4.1.8. G Hidrolizati	37
4.1.9. H Hidrolizati	37
4.1.10. I Hidrolizati	37
4.2. Küçük Ölçekte Biyoetanol Üretimi	40
4.2.1. Farklı Ananas Atığı Hidrolizatları Kullanılarak TS3 Suşu ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamları	40
4.2.2. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizati Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamları	42
4.2.2.1. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizati Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Etanol Artışının (%) Belirlenmesi	46
4.2.2.2. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizati Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Biyoetanol Miktarının Belirlenmesi	47
4.2.2.3. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizati Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarlarındaki Artışın (%) Belirlenmesi	49
4.2.3. Hidrolizatlý Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerleri ile Biyoetanol Üretimi	50
4.2.3.1. Hidrolizatlý Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerleri ile Üretilen Etanol Artışının (%) Belirlenmesi	54
4.2.3.2. Hidrolizatlý Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerlerindeki Kültürlerde Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarının Belirlenmesi	55
4.2.3.3. Hidrolizatlý Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerlerindeki Kültürlerde Birim Hücre	56

Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarındaki Artışların (%) Belirlenmesi	
4.3. Büyük Ölçekte Biyoetanol Üretimi	57
4.3.1. DH Besiyerinde Hazırlanan Kültürler	57
4.3.1.1. DH Besiyerinde Biyoetanol Üretim Artışının (%) Belirlenmesi	59
4.3.1.2. DH Besiyerinde Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarlarının Belirlenmesi	60
4.3.1.3. DH Besiyerinde Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarlarındaki Artışların (%) Belirlenmesi	61
4.4. Küçük Ölçekli Kültürlerdeki Bakteriyel Hemoglobin (VHb) Ekspresyonu	62
4.4.1. Yüksek Şeker Oranına Sahip Hidrolizatlı Besiyerleri ile Hazırlanan Kültürler	62
4.4.2. Hidrolizatlı Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerleri ile Hazırlanan Kültürler	63
4.5. Büyük Ölçekli Kültürlerdeki VHb Ekspresyonları	64
4.5.1. DH Besiyerinde Büyük ve Küçük Ölçekli İnkübasyon Ortamlarında VHb Ekspresyonları	64
4.6. DH Besiyerlerinde Büyük ve Küçük Ölçekli Fermentasyon Ortamında Substrat Tüketimi, Fermentasyon Etkinliği ve Alkol Verimleri	65
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	69

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklamalar</u>
°C	: Santigrat derece
Cu	: Bakır
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
CO	: Karbonmonoksit
C ₂ H ₅ OH	: Etanol
CH ₂	: Metilen
CH ₂ OH	: Bütandiol
CH ₃ -CH ₂ -OH	: Etilalkol
CH ₃ COOH	: Asetik asit
Ag	: Gümüş
CO ₂	: Karbondioksit
Fe	: Demir
H	: Hidrojen
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
HCOOH	: Formik Asit
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
K	: Potasyum
Na	: Sodyum
NaOH	: Sodyumhidroksit
C ₆ H ₁₂ O ₆	: Glukoz
NO _x	: Azotoksit türevi
O ₂	: Oksijen
Mo	: Molibdenum
Sn	: Kalay
SO ₂	: Sülfür Dioksit
OH	: Hidroksi

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
g	: Gram
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
<i>adhb</i>	: Alkol dehidrogenaz II geni
AHB	: A Hidrolizati İçeren Besiyeri
ASB	: A Hidrolizatının Şekerlerini İçeren Besiyeri
Arab	: Arabinoz
ATCC	: Amerikan Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin 5'trifosfat
BHB	: B Hidrolizati İçeren Besiyeri
BSB	: B Hidrolizatının Şekerlerini İçeren Besiyeri
BOD	: Biyokimyasal Oksijen İsteği
CHB	: C Hidrolizati İçeren Besiyeri
CSB	: C Hidrolizatının Şekerlerini İçeren Besiyeri
COD	: Kimyasal Oksijen İsteği
D1HB	: D1 Hidrolizati İçeren Besiyeri
D1SB	: D1 Hidrolizatının Şekerlerini İçeren Besiyeri
DHB	: D Hidrolizati İçeren Besiyeri
DSB	: D Hidrolizatının Şekerlerini İçeren Besiyeri
E10	: Yüzde on biyoetanol ve yüzde doksan benzin karışımı
E85	: Yüzde seksenbeş biyoetanol ve yüzde onbeş benzin karışımı
EHB	: E Hidrolizati İçeren Besiyeri
EtOH	: Etanol
FHB	: F Hidrolizat İçeren Besiyeri
Fru	: Fruktoz
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
G3P	: Gliseraldehit-3-fosfat
GHB	: G Hidrolizati İçeren Besiyeri
Glu	: Glukoz
HHB	: H Hidrolizat İçeren Besiyeri
HMF	: 5- hidroksimetil-2-furaldehit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IHB	: I hidrolizati İçeren Besiyeri
KDa	: Kilodalton
L	: Litre
LB	: Luria Bertani Besiyeri
Malt	: Maltoz
mM	: Milimetre
mM	: Milimolar
nmol	: Nanomol
OD	: Optik Densite
<i>oxyR</i>	: Hidrojen peroksit indüklenme geni
<i>pdC</i>	: Pürivat dekarboksilaz geni
pH	: Potansiyel Hidrojen
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Suc	: Sukroz
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UV	: Ultra viole
v/v	: Hacimsel Karışım Oranı
<i>vgb</i>	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni
VHb	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
w/v	: Ağırlık/ Hacim Karışım Oranı
Xyl	: Ksiloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Lignoselülozik materyallerden etanol üretim basamakları.	5
2.2: Lignoselülozik atıkların asit yöntemi ile hidrolizi.	8
2.3: Ön uygulamaların lignoselülozik yapıya potansiyel etkisi.	9
2.4: <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobini'nin üç boyutlu yapısı.	17
2.5: Lignoselülozik materyallerin asit hidroliziyle açığa çıkan inhibitörler.	20
4.1: Farklı hidrolizatlarda ve hidroliz edilmeyen ananas kabuğu atığında bulunan şeker içeriğinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirlenmesi.	34
4.2: DHB'de FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen etanol üretim artışı (%).	47
4.3: DHB'de <i>E. coli</i> suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g/ 100 ml).	48
4.4: DHB'de, FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol (g/ 100ml) miktarlarındaki artış (%).	50
4.5: DSB' de <i>E. coli</i> suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g/100 ml).	56
4.6: DHB'de 500 ml ölçekte FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen etanol artışı (%).	60
4.7: DHB'de 500 ml ölçekte <i>E. coli</i> suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (%).	61
4.8: DHB'de 500 ml ölçekte FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarındaki artış (%).	62
4.9: DHB'de, 100 ml'lik ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen VHb konsantrasyonları (nmol/g).	63

4.10:	DSB’de 100 ml’lik ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen VHb konsantrasyonları (nmol/ g).	64
4.11:	DHB’de büyük ve küçük ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen VHb konsantrasyonları (nmol/ g).	65
4.12:	DHB’de 100 ml ölçekte <i>E. coli</i> suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen substrat tüketimi (%), fermentasyon etkinliği (%) değerleri.	66
4.13:	DHB’de 500 ml ölçekte <i>E. coli</i> suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen substrat tüketimi (%), fermentasyon etkinliği (%) değerleri.	67

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Ananas atığının kimyasal içeriği.	13
3.1: Ananas atığının seyreltik asitler ile hidroliz yöntemleri.	25
3.2: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.	29
4.1: D Hidrolizatı ve aynı oranlarda, sadece şeker içeren besiyerinde <i>E. coli</i> suşlarının üreme özellikleri	35
4.2: Ananas atığının farklı seyreltik asitler kullanılarak hidrolizi ile elde edilen hidrolizatların şeker ve inhibitör içerikleri (%).	39
4.3: Ananas atığı hidrolizatları ile hazırlanan besiyerlerinde <i>E. coli</i> TS3 suşu ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD _{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).	41
4.4: Şeker oranları en yüksek olan hidrolizatlı besiyerlerinde 100 ml ölçekte <i>E.coli</i> suşları ile 24 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu(OD _{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).	44
4.5: Şeker oranları en yüksek olan hidrolizatlı besiyerlerinde 100 ml ölçekte <i>E.coli</i> suşları ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD _{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).	45
4.6: Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan besiyerlerinde <i>E. coli</i> suşları ile 24 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD _{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).	52
4.7: Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan <i>E. coli</i> suşları ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD _{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).	53
4.8: DSB'de 100 ml ölçekte <i>E. coli</i> suşları ile 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen alkol verimi (%) değerleri.	58
4.9: DHB'de 500 ml ölçekte <i>E. coli</i> suşları ile 24 saatlik inkübasyon	60

sonunda elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

- 4.10: DHB’de 500 ml ölçekte *E. coli* suşlarıyla 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%). 60
- 4.11: DHB’de 100 ml ve 500 ml ölçekte *E. coli* suşlarıyla 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen alkol verimi (%) değerleri. 69

1. GİRİŞ

Son yıllarda ciddi oranda artış gösteren küresel ısınma iklim değişikliğinin temel nedeni olarak görülmektedir. Küresel ısınmaya katkı yapan insan kaynaklı faaliyetlerin başında ise petrol ve doğal gaz gibi fosil yakıtların özellikle motorlu araçlarda, enerji üretiminde ve ısınmada her geçen gün daha fazla tüketilmesi gelmektedir. Zira yeryüzünde petrol ve doğal gaz gibi enerji kaynaklarına gereksinim duyan insan sayısı gittikçe artmaktadır.

Dünya nüfusunda gözlenen artış ve bu bağlamda enerji ihtiyacının artması, geleneksel enerji kaynaklarının azalması tehlikesini beraberinde getirmektedir. Söz konusu enerji kaynaklarının azalmasının yanı sıra bunların kullanımının bir sonucu olarak ortaya çıkan ve kimi ülkelerde ciddi tehdit boyutlarına ulaşan çevre kirliliği ile sera gazı etkisini azaltmak amacıyla fosil yakıtlara alternatif olabilecek yakıtlar araştırılmaya başlanmıştır. Biyogaz, biyodizel, biyoetanol olarak adlandırılan ve çevre dostu bu alternatif yakıtlar çeşitli mikroorganizmalarca üretilen, temiz ve biyolojik olarak bozunabilen bitkisel kökenli kaynaklardır.

Geleneksel enerji kaynaklarının büyük bir kısmı ulaşım ve taşıma ihtiyacının karşılanması amacıyla kullanılmaktadır. Bu kaynaklara alternatif olabilecek biyoyakıtların kimi ülkelerde ulaşım araçlarında değerlendirilmesi ümit verici sonuçlar ortaya çıkarmaya başlamıştır. Ulaşım araçlarında alternatif yakıt olarak biyoetanol kullanımı ekonomik sonuçlar doğurmasının yanı sıra bahse konu yakıtın yüksek oktan sayısı sayesinde zararlı gazların emisyonunu azaltması ile dikkati çekmektedir.

Biyoetanol üretiminde tercih edilen ham madde kaynaklarının geniş bir yelpazeye yayıldığı görülmektedir. Bu ham maddeler; şeker kamışı, şeker pancarı, çeşitli meyveler, şeker içeren materyaller olabileceği gibi odun, saman, meyve atıkları gibi lignoselülozik materyaller de olabilir. Ayrıca nişasta içeren buğday, mısır, arpa ve pirincin yanı sıra kirlilik oluşturan diğer gıda endüstrisi atıkları (peynir altı suyu, peynir altı suyu tozu, meyve ve sebze atıkları vb.) da biyoetanol üretiminde kullanılabilen ham maddeler arasında yer almaktadır.

Tropikal bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen ananas meyvesi de biyoetanol üretiminde kullanılan ham maddelerden biridir. Özellikle taze olarak tüketildiğinde ya da endüstriyel kullanımında büyük oranda atık oluşturan bir meyvedir. Ananas

yüksek miktarlarda şeker (fruktoz, ksiloz, glukoz vb.), protein ve inorganik maddeler ihtiva etmektedir. Lignoselülozik ham maddelerden olan ananasın atıklarının mikroorganizmalarca fermente edilebilecek hale getirilmesiyle biyoetanol üretimi sağlanabilmektedir. Bu sayede çürümüş ananas atıklarının oluşturacağı çevre kirliliği önlediği gibi, çok düşük maliyetlerde alternatif enerji kaynaklarından biyoetanol üretimi sağlanmış olmaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Dünya nüfusunun hızla artması ve enerji rezervlerinin azalmasına yol açmıştır. Enerji kaynaklarının azalmasının yanı sıra fosil yakıtların kullanımıyla artan çevre kirliliği ve sera gazı etkisi özellikle insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuz etkilerden mümkün olduğunca az zarar görmek için alternatif enerji kaynakları aranmaya başlanmıştır.

Alternatif enerji kaynaklarından olan biyoetanol (etil alkol, C_2H_5OH , CH_3-CH_2-OH , ETOH) çeşitli mikroorganizmaların birçok katı ham madde ve gıda işleme atıklarını fermente etmesi sonucu üretilen çevre dostu bir yakıttır [Akbaş vd., 2013].

Biyoetanol üretiminde şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker içeren materyaller olduğu gibi; odun, saman, meyve atıkları gibi lignoselülozik materyaller de ham madde olarak kullanılabilir. Ayrıca nişasta içeren buğday, mısır, arpa ve pirinç; bunun yanı sıra kirlilik oluşturan diğer gıda sanayi işleme atıkları (peynir altı suyu, peynir altı suyu tozu, meyve ve sebze atıkları vb.) da biyoetanol üretiminde kullanılabilen ham maddeler arasındadır.

Yapılan bu tez çalışmasında çevre kirliliğine neden olan gıda atıklarından, ananas atıkları asit hidrolizi ön uygulaması sonrasında ham madde olarak kullanılarak *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile biyoetanol üretilmiştir. Çalışmada gıda atıklarının çevreye ve insan sağlığına yaptığı negatif etkilerin ortadan kaldırılması ve bu atıkların ihtiva ettiği yüksek orandaki inorganik maddelerden yararlanılarak etanol üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada seçilen ham maddeler içinde bulunan glukoz ve fruktoz şekerlerini fermente ederek etanol üreten *E. coli* FBR5 ve *vgb* geni taşıyan *E. coli* TS3 ile TS4 suşları kullanılarak etanol üretim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoetanol

Dünya üzerinde nüfusun hızlı artmasıyla fosil yakıt kaynaklarının azalması, bu kaynakların çevre kirliliğini ve sera gazı etkisini; CO₂, SO₂ ve NO_x'nin oksidasyonuna neden olarak arttırmıştır [Lin and Tanaka, 2006]. Bu durum özellikle insan sağlığını etkilemektedir. Örneğin; CO'nun yüksek dozlarda salınması kalp hastalıklarına ve sinir sisteminde ölümcül arazlara neden olmaktadır. World Watch Institute'e göre; 1850-1970 yılları arasında insan popülasyonu üç katına çıkmış ve enerji tüketimi %12'den fazla artmıştır. Ayrıca 2002-2015 yılları arasında popülasyon %68, enerji tüketimi ise %73 artmıştır. 1970 yılındaki enerji krizi ve tüm diğer nedenlerden ötürü yeni alternatif enerji kaynaklarına yönelinmiştir.

Kyoto protokolü, fosil kaynaklı yakıtların kullanımını gibi nedenlerden artan sera gazı etkisini ve küresel ısınmayı kontrol altında tutmayı amaçlayan bir protokoldür. Bu protokolü imzalayan ülkelere verilmiş bazı yükümlülükler sayesinde atmosfere salınan karbon miktarlarının 1990 yılı seviyesinde tutulması amaçlanmıştır. Günümüzde 160 ülkenin onayladığı protokol, 2004 yılında yürürlüğe girmiştir. Ülke bazlı yapılan karbon salınımı kısıtlamalarıyla, aksi durumlarda vergi artışlarıyla yaptırımı büyük bir protokoldür. Ayrıca yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelimini de teşvik etmektedir. Ülkemiz de bu protokol 2002 yılında yürürlüğe girmiştir; ancak gelişmekte olan ülke statüsünde olduğundan dolayı, karbon salınımını azaltmak ile ilgili bir yükümlülük bulunmamaktadır [Çınar vd., 2012; Şar, 2013].

Biyodizel, biyogaz ve biyoetanol doğaya dost ve fosil yakıtlara alternatif kaynaklardır.

Biyoetanol (etil alkol, C₂H₅OH, CH₃-CH₂-OH, EtOH) en yaygın kullanılan alternatif sıvı yakıt olup çeşitli mikroorganizmaların birçok katı ham madde ve gıda işleme atıklarını fermente etmesi sonucu üretilmektedir [Akbaş vd., 2013]. Renksiz bir sıvı olan biyoetanol kimyasal bileşiminin ağırlıkça %35'i oksijenden oluşur ve oktan derecesi 113, donma derecesi ise -114°C'dir. Biyoetanol petrol türevi olan benzinler ile homojen olarak karışır. Biyoetanol benzin ile harmanlanarak araç yakıtı olarak kullanıldığında karbonmonoksit (CO) ve azot oksit (NO_x) gibi zehirli maddelerin salınımının azalmasını sağlar. Petrole kıyasla daha yüksek sıkıştırma

oranına sahiptir. Bu özellikler oktan sayısı, daha geniş yanma sınırı ve buharlaşma hızının daha iyi olmasından ileri gelir. Biyoetanol temiz ve yenilenebilir bir enerji kaynağı olmasının yanında, benzinle karıştırıldığında donmayı önlemesi ve motor ısının artması, enjektörlerin kirlenmesini engellemesi gibi özellikleriyle de tercih edilebilirliğini artırmıştır [Şar, 2013].

Yakıt olarak biyoetanol kullanımında en yaygın karışım; %85 biyoetanol ve %15 benzin içeren ve E85 olarak adlandırılan uygulamadır. Ancak bu karışımının kullanılabilmesi için uygun olarak geliştirilmiş araçlar kullanılmaktadır. ABD ve farklı birçok ülke %90 benzin ve %10 biyoetanol içeren E10 kodlu karışımı kullanmakta, bunun yanı sıra Brezilya'da ise %76 benzin ve %24 oranında etanol içeren karışım da kullanılmaktadır [Balat vd., 2008].

Biyoetanol üretim nedenleri genel olarak şu şekildedir :[Web 1, 2017]

- Fosil yakıtların neden olduğu çevresel etkilerin azaltılması,
- Enerji konusunda yurtdışına bağımlılığı azaltacak olması,
- CO₂ emisyon değerlerinin düşük olması.

1 litre biyoetanol üretimi, şeker pancarının yetişmesinden enerji olarak kullanımına kadar olan süreçte 2.9 kg CO₂ salınımını engellemektedir. Şeker pancarı, aynı alandaki çam ormanından üç kat daha fazla oksijen üretmektedir [Web 1, 2017].

- Fosil yakıt kaynaklarının tükenme sürecine girmesi,
- Şeker pancarından üretildiği için tarımsal kalkınmayı geliştiriyor olması,
- Tarımsal ürün fazlalık riskini enerji tarımına yönlendirerek sürdürülebilir tarımı desteklemesi şeklindedir.

2.1.1. Biyoetanol Üretim Basamakları

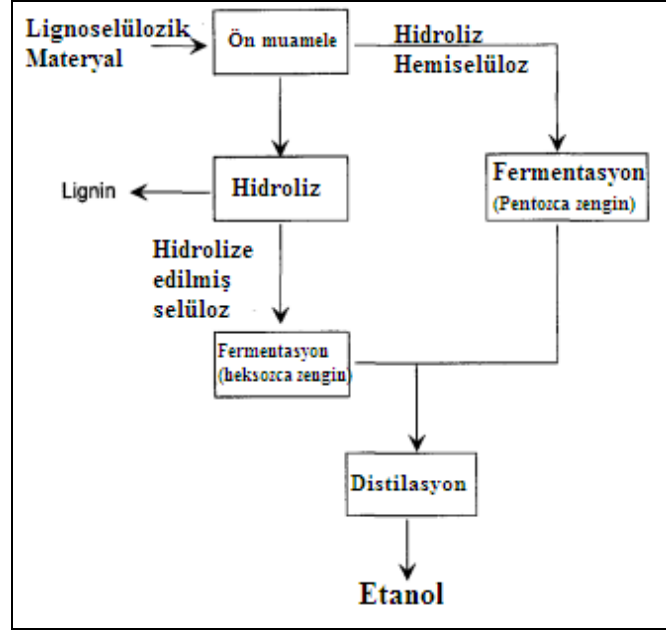
Biyoetanol üretimi,

• Mikroorganizmalarca fermente edilebilir şekerleri içeren besiyerinin hazırlanması,

- Basit şekerlerin fermentasyonu ile biyoetanol üretimi,
- Üretilen biyoetanolün saflaştırılması,

basamaklarından oluşur [Sileveria vd., 2005].

Ollson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1996) bu basamaklar şekildeki gibi sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Lignoselülozik materyallerden etanol üretim basamakları.

2.1.2. Biyoetanol Üretiminde Ham Madde Kaynakları

Biyoetanol üretiminde kullanılan ham maddeler: mısır, şeker kamışı, şeker pancarı, odun, patates, buğday, pirinç ve çeşitli meyveler gibi materyallerin yanı sıra, bu materyallerin kullanımıyla oluşan gıda, tarım ve kâğıt sanayi atık ürünleridir.

Biyoetanol üretiminde direkt olarak besinlerin kullanılması bu besinlerin nüfusa dağılımını etkiler. Ayrıca besin maddelerinin yiyecek olarak tüketilmesi ve biyoetanol üretiminde ham madde olarak kullanılması iki seçenek arasında rekabete neden olur [Hahn-Hägerdal et al., Zacchi, 2006; Field et al., 2008]. Biyoetanol üretimi için ham madde kaynağı oluşturmak amacıyla oluşturulan ormanlar ve otlak alanların düzensiz artışı, bitki örtüsü yayılımında değişikliğe neden olacağından dolayı sera gazı etkisinde artış meydana gelir [Farrell et al., 2006; Searchinger et al., 2008]. Tüm bu sebeplerden dolayı biyoetanol üretiminde kullanılacak ham maddelerin gıda, tarım ve yan sanayi işleme atıklarından seçilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca atık ürünlerin kullanımı çevre temizliği ve geri dönüşüm adına da

büyük bir yatırımdır. Atıklardan etanol üretimi “ikinci jenerasyon” biyoetanol üretimidir [Galbe and Zacchi, 2007; Merino and Cherry, 2007; Sakai et al., 2007; Hu et al., 2008; Goh et al., 2010].

Dünyadaki biyoetanol üretiminin %95’i tarımsal ürünlerdendir [Rosillo-Calle et al., 2006]. Kullanılan tarımsal ürünlerin %60’ı patates gibi nişasta içeren ham maddeler, %40’ı ise şeker kamışı, şeker pancarı gibi şeker içeren ham maddelerdir. Bunlar kendi aralarında; şeker içeren biyokütle, lignoselülozik biyokütle ve nişasta içeren biyokütle olarak adlandırılabilir. Şeker içeren biyoküteller herhangi bir kimyasal veya biyolojik ön uygulamaya gerek duyulmaksızın kullanılabilir. Nişastalı biyoküteller mikrobiyal fermentasyon öncesi ön uygulamalarla parçalanır ve mikroorganizmanın fermente edebileceği şeker haline dönüştürülür. Meyve-sebze işleme atıkları ve kâğıt endüstrisi işleme atıkları gibi lignoselülozik biyoküteller ise hemiselüloz, selüloz ve lignin ihtiva ettiğinden parçalanması en zor biyokütellerdir [Antonio et al., 2015]. Genellikle lignoselülozik materyaller %35-55 selüloz, %20-40 hemiselüloz, %10-25 lignin içerirler [Tinoi and Rakariyatham, 2015]. Selüloz ve hemiselülozdaki fermente edilebilir şekerlerin oranı genellikle; %49 glukoz, %18 ksiloz, %3 arabinoz şeklindedir [Zaldivar et al., 2001; Mohagheghi et. al, 2006]. Atık maddelerden hem lignoselüloz hem nişasta hem de şeker içerenler de vardır. Örneğin; mısır ve patates cipsleri yapımında oluşan atık maddeler ve bu materyallerin işleme suları şeker, nişasta ve lignoselülozik maddeler içerir ve biyoetanol üretiminde maliyeti düşürmek için potansiyel bir ham madde olarak değerlendirilebilir [Sümer vd., 2015].

2.1.3. Dünyada ve Türkiye’de Biyoetanol

Dünyada biyoetanol üretiminde Brezilya ve ABD ön sıradadır. Ağırlıklı olarak biyoetanol üretimi için şeker pancarı kullanılmaktadır. ABD’de 2011 yılında yaklaşık 84.6 milyar litre etanol üretilmiştir ve biyoetanol üretiminde ham madde olarak çoğunlukla mısır tercih edilmektedir [RFA, 2012]. 2014 yılı kayıtlarına göre dünyada üretilen biyoetanolün %60’ı ABD’de %40’ı ise Brezilya’da üretilmiştir [RFA, 2015]. Kendi biyoyakıtlarını üretebilen ülkeler ise Brezilya, ABD, Kanada, Japonya, Hindistan, Çin ve Avrupa Birliği ülkeleridir [Mussatto et al., 2010].

Türkiye’de biyoetanol çoğunlukla şeker pancarı işleme atığı olan melastan üretilmekle birlikte buğday ve mısır atıkları da kullanılmaktadır. Ülkemizde 01.01.2014 tarihi itibariyle piyasadaki benzin türlerinde etanol içeriğinin en az %3 olması gerekmektedir.

Ülkemizde biyoetanol üretimi yapan firmalar:

- Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş. Çumra Şeker Fabrikası

Bu tesislerden Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş. 'de üretilen biyoetanol akaryakıt katkısı olarak kullanılabilirdiği gibi matbaalarda da kullanıma elverişlidir. Bu biyoetanol tesisinin ülke ekonomisine katkısı yaklaşık 15.5 milyon \$’dır.

- Tezkim Tarımsal Kimya İnş. ve Tic. A.Ş.
- Tarımsal Kimya Teknolojileri (Tarkim) San. ve Tic. A.Ş.

Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. işlenmiş şeker pancarı atıklarının (melas) değerlendirilmesi için biyoetanol üretim tesisleri oluşturmuştur. Bu tesisler; Erzurum, Tokat, Malatya’da bulunmaktadır.

2.1.4. Biyoetanol Üretiminde Ham Maddelere Uygulanan Ön İşlemler

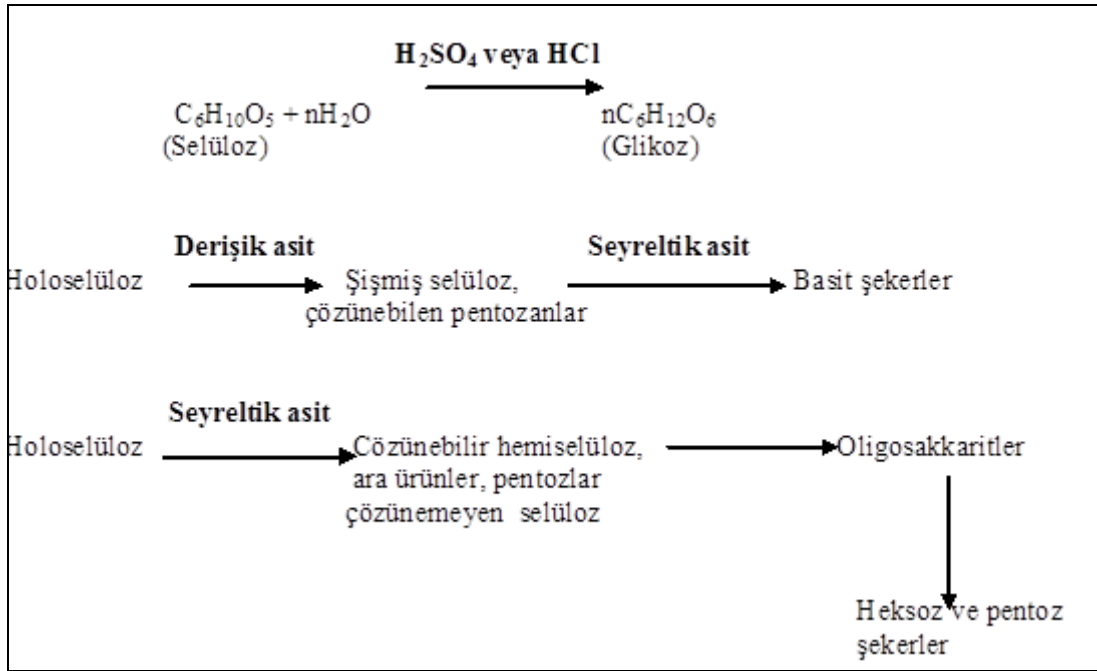
Biyoetanol üretiminde ham madde olarak kullanılan materyallerin bazıları (nişasta içeren ham maddeler, lignoselülozik ham maddeler) organizmalarca fermente edilebilir büyüklükte değildir. Bu materyallerin parçalanması için en çok uygulanan ön işlemler; enzim ile hidroliz ve asit hidrolizidir. Ancak bu ön işlemler tercih edilirken aşağıdaki hususlar göz önünde bulundurulmalıdır:

- Ön işlemler ile elde edilen hidrolizatlarda organizmalarca fermente edilebilir şeker konsantrasyonunu arttırmalı,
- Ön işlemlerin maliyeti uygun olmalı,
- Ön işlemler fermente edilebilir şekerlerin degradasyonuna ve kaybına neden olmamalı,
- Ön işlemler fermentasyonu etkileyecek inhibitör maddeleri oluşturmamalı veya en az miktarda oluşturmalıdır [Sun and Cheng, 2002].

Lignoselülozik materyallerin fermente edilebilir şekerlere dönüştürülme süreci temel olarak biyokimyasal ve termokimyasal dönüşüm olmak üzere iki farklı yolla yapılır. Biyokimyasal dönüşüm yollarında ağırlıklı olarak enzimler kullanılmakla birlikte mikrobiyal hidroliz yollarından da yararlanılmaktadır. Termokimyasal dönüşümde ise; sıcaklık, basınç ve farklı kimyasallarla muamele etme gibi biyolojik olmayan ayrıştırma yöntemleri bulunur.

Kimyasal parçalama; alkali, asidik veya ozonla muamele yapılır. Yapısında yoğun olarak lignin içeren ham maddelerin parçalanması için alkali hidrolizi yolu tercih edilir. Bu yöntemde bazı bazik (NaOH gibi) çözeltiler ısıtılarak uygulanır ve böylelikle ham maddedeki bağların çözülmesi sağlanır [Wu ve ark., 2011; Egeman ve ark., 2005]. Kireçle yapılan ön uygulama alkali ön uygulamalara örnektir.

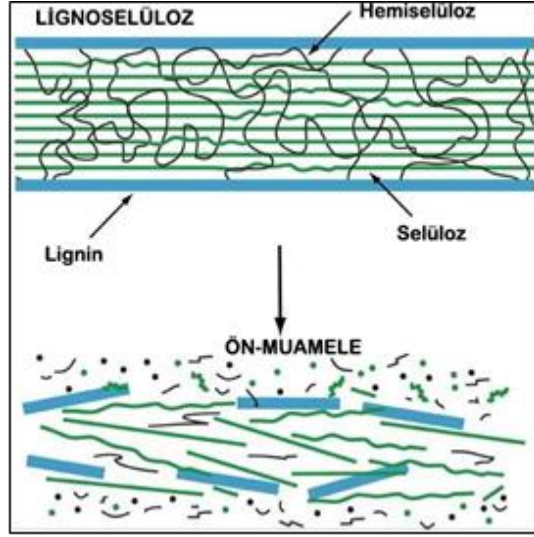
Asit kullanılarak yapılan parçalama işlemlerinde yoğun veya seyreltilmiş asit kullanılabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Lignoselülozik atıkların asit yöntemi ile hidrolizi.

Yoğun asit kullanıldığında ekstra bir ısıtma veya basınç işlemlerine ihtiyaç azalır ve maliyet düşer. Asit hidrolizi uygulamalarında genellikle sülfirik asit, nitrik asit ve hidroklorik asit tercih edilmektedir. Ancak asit uygulamalarında mikrobiyal üremeyi ve biyoetanol oluşumunu engelleyecek toksik maddeler meydana gelebilir. Genel

olarak açığa çıkan bu inhibitörler furfural, 5-hidroksimetil furfural, formik asit, levulinik asit ve asetik asittir. Enzimle yapılan hidroliz çalışmaları bu inhibitörlerin oluşmaması nedeniyle daha verimli ancak maliyeti yüksektir. Bu sebepten ham maddelerin asitle hidrolizi daha çok tercih edilmektedir [Talebnia et al., 2010; Liu et al., 2012; Adıgüzel, 2013] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Ön uygulamaların lignoselülozik yapıya potansiyel etkisi.

Asit hidrolizi ile yapılan çalışmalara Onsoy ve arkadaşları tarafından yapılan yer elması çalışması (2007) iyi bir örnektir. Bu çalışmada yer elmasına 60°C, 80°C ve 100°C'da H₂SO₄ ile uygulama yapılmış ve en yüksek şeker miktarı 80°C'da 139.38 g/L olarak belirlenmiştir.

Martin ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ise tarım sanayi atıklarının asit hidrolizi ile kullanıma hazırlanması araştırılmıştır. Çalışmada pirinç kabuğu, yer fıstığı kabuğu, şeker kamışı küspesi, manyok sapının %2 (v/v)'lik H₂SO₄ ile 120°C sıcaklıkta 20, 40 ve 60 dakika uygulama yapılmıştır. Asit hidrolizatı ile pirinç kabuğundaki ve şeker kamışı küspesindeki hemiselülozun parçalanması ve yüksek miktarda şeker eldesi sağlanmıştır. Yapılan çalışmada 60 dakika sonunda en yüksek miktarda şeker eldesi ve inhibitör oluşumu gözlenerek pirinç kabuğu hidrolizatında 33.5 g/L glukoz, şeker kamışı küspesinde ise 19.1 g/L ksiloz elde edilmiştir.

Maynard ve arkadaşlarının (2015) bir çalışmasında ananas kabuğu atıklarına % 5 (v/v)'lik H₂SO₄ ile 90°C'da 2 saat süreyle ön uygulama yapılmasıyla % 0.3 (w/v) oranında şeker azalması (inhibitör maddeye dönüşümü) gözlemlenmiştir.

Antonio ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2015), ananas kabuğu atıkları 1:10 sulandırım oranı ile %5 (v/v)'lik H₂SO₄ kullanılarak 120 dakika boyunca 90°C'da hidrolizat hazırlanmıştır. Hidrolize edilmemiş atıkların başlangıçtaki şeker miktarının %1 (w/v) oranında azaldığı belirlenmiştir.

2.1.5. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Lignoselülozik atıklardan etanol üretiminde kullanılan bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae* ve bir bakteri türü olan *Zymomonas mobilis*' in tüm monosakkaritleri fermente edememesinden dolayı, bu açıdan çok daha avantajlı olabilecek *Escherichia coli*'ye ilgi artmıştır [Dien et al., 2013]. Lignoselülozik atıkların hidrolizatlarında yüksek oranda glukoz ve ksiloz bulunmaktadır. *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis* lignoselülozik hidrolizatlardan elde edilen glukozu fermente edebilirken; ksiloz ve arabinozu doğal yollarla kullanamazlar; ancak *E. coli* suşlarının çoğu ise tüm monosakkaritleri fermente edebilmektedir. Bununla beraber *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis* ile yapılan genetik mühendislik çalışmalarıyla etanol üretiminde alternatif monosakkaritleri fermente edebilecek hale getirilmiştir [Dien et al., 2010].

Ayrıca *E. coli*'de etanol üretim yollarında verimliliği artırmak ve son ürünün sadece etanol olmasını sağlamak için genetik mühendisliği çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda *E. coli*'de etanol üretimi sırasında karbon kaybına neden olan yolları susturulmuş ve *Z. mobilis*'in etanol üretim yolağındaki genler eklenmiştir [Ingram and Conway,1988].

Z. mobilis'ten *E. coli*'ye aktarılan iki gen bir enterik promotörün kontrolü altında olan *pet* operonuyla düzenlenmiştir. Bu genler piruvat dekarboksilaz (*pdh*) ve alkol dehidrogenazII (*adhB*) genleri olup *E. coli* kromozomunda piruvat format-lyaz (*pfl*) geninin yanına klonlanmıştır. *E. coli* FMJ39 suşu pLOI295 ve pLOI297 plazmidleriyle transforme edilmiş, FBR1 ve FBR2 suşları oluşturulmuştur. *E. coli* FMJ39 suşu ksilozu metabolize edememektedir [Dien et al., 1998; Saha and Cotta, 2012]. Bu nedenle *E. coli* FMJ39 suşunun ksiloz fermentasyonu yapabilmesini sağlamak için pLOI297 plazmidine transformasyonu sağlanmış ve FBR3 suşu elde edilmiştir. Farklı antibiyotik türleri için direnç markırı içeren genlerin pLOI297 plazmidine aktarımıyla ve sonrasında gerçekleştirilen transformasyonla FBR4 ve

FBR5 suşları geliştirilmiştir. *E. coli* NZN111'den genetik mühendislik yollarıyla üretilen ve ampisilin, kanamisin, tetrasiklin, kloramfenikol direncine sahip FBR5 suşunun mısır püskülü hidrolizatlarından etanol üretiminde FBR4 suşundan daha iyi olduğu kaydedilmiştir [Dien et al., 1998; Saha and Cotta, 2012].

pTS2 plazmidi, pBR322 plazmidinden alınan tetrasiklin rezistans geninin, *vgb* taşıyan pUC8:16 plazmidine aktarımıyla meydana gelmiştir [Dikshit and Webster 1988; Liu et al., 1994].

pTS3 plazmidi, pTS2'den alınan *vgb* ve tetrasiklin rezistans genlerinin pKT230 vektörüne eklenmesiyle oluşturulmuştur [Bagdasarian et al., 1987]. pTS4 ise; aynı şekilde, *vgb* ve tetrasiklin rezistans genlerini içeren kasetin pBBR1MCS-5 vektörüne eklenmesiyle elde edilmiştir [Kovach et al., 1995]. TS3 ve TS4 suşları pTS3 ve pTS4 kullanılarak FBR5'in transformasyonu ile elde edilmiştir. TS4 suşunda *vgb* gen kopya sayısı TS3'e göre daha fazladır [Sanny et al., 2010].

2.2. Ananas

Ananas tropikal iklime sahip ülkelerde geniş çaplı üretilen bir meyvedir. Latince adı *Ananas comosus* olup Bromeliaceae ailesinin üyesidir. 75-150 cm uzunluğundadır.

İğneli yapraklara ve lifli yapıya sahip olan ananas bitkisi dünyada en çok Tayland'da yetiştirilmektedir. Bunu Filipinler ve Brezilya takip eder. Dünyada ananasın %20'si taze meyve olarak, %80'i endüstriyel ürün (konserve ananas, ananas suyu vb.) olarak tüketilmektedir. Tayland yılda 640 bin ton konserve ananas ve 140 bin ton ananas suyu ihraç etmektedir. Kosta Rika'da üretilen ananasın %75'inden konserve, meyve suyu ve jelibon üretilir.

İlk zamanlar daha çok taze meyve olarak kullanımı tercih edilen ananas; şurup, meyve suyu, konserve, sirke ve şarap endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Dünyada portakal suyu, elma suyundan sonra en çok tercih edilen üçüncü meyve suyudur [Cabrera et al., 2000]. Ayrıca bromealin ekstraksiyonu, etanol üretimi, fenolik antioksidan, organik asit ve lif üretimi için tercih edilmektedir.

Ananas atıkları kabuk gövde bölgesi ve posa olarak ayrılmaktadır. Ananas endüstrisinde ve taze tüketimde oluşan atıklar oldukça fazladır. Bu miktar, taze

meyvenin %55'idir [Nunes et. al, 2009]. Oluşan endüstriyel atıkların birikimi çevre sağlığını tehdit etmektedir.

Atık sularının sahip olduğu BOD (Biochemical Oxygen Demand)/COD (Chemical Oxygen Demand) oranının %0.5' ten az olması, bu atığın biyolojik olarak çözünebilir olma derecesini ifade etmektedir. Ananas atıklarının yıkımı yüksek BOD ve COD değerleri sebebiyle zordur. Araştırmacılar farklı meyve ve sebzelerle birlikte ikili veya çoklu parçalamaya odaklanmışlardır. Mikrobiyal bozunmalar sonucu ortaya çıkabilecek patlamaların, çürümelerin engellenmesi için ananas atıklarından çok çeşitli alanlarda yararlanılır. Üretim alanları dışında gübre olarak kullanımda çok tercih edilmemekle beraber solucanlarla kompostlama yapıldığında düşük pH nötre yaklaşır ve zararlı etki azaltılmış olur. Ananas atıkları hemiselüloz, lignin ve selüloz içerdiğinden lignoselülozik ham madde olarak kullanılmaktadır [Marinoo et al., 2009].

Ananas atıklarında kuru madde oranı %10 olup bununun %96'sı organik, %4'ü inorganik maddelerdir [Abdullah, 2007]. Kuru maddenin yaklaşık %37'si karbonhidrattan oluşur. Ananas atıkları genellikle; Fe, Cu, Sn, Mn, Ag, Mo, Zn, P, Ca, Mg, S, Na, B gibi inorganik madde içermektedir [Hossain and Fazliny, 2010]. Upadhyay ve arkadaşlarının da yaptığı bir çalışmada (2010), kurutulan atıklar maliyet ve etkinlik açısından daha etkili olup ucuz ve çevre dostu olmaları sebebiyle önemlidir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Ananas atığının kimyasal içeriği.

Parametre	Depodaki Meyve	Taze Meyve	Kuru Meyve	Meyve Atığı	Tüm Meyve	Kabuk	Taç	Posa
%Nem	72.49	71.07	27.43	92.2	-	-	-	-
%Toplam katı	27.51	29.03	72.57	7.80	-	-	-	-
%Uçucu Kısım	87.12	96.12	95.9	89.4	-	-	-	-
%pH	4.00	4.70	4.70	-	-	-	-	-
%Kül	12.88	3.88	4.10	10.6	0.70	0.60	0.40	0.20
% Kuru Materyal								
Selüloz	9.00	11.2	12.0	19.8	19.4	14.0	29.6	14.3
Hemiselüloz	4.70	7.00	6.50	11.7	22.4	20.2	23.2	22.1
Pektin	5.10	6.70	7.10	-	-	-	-	-
Çözünür eter	4.00	6.10	6.70	-	-	-	-	-
Protein	0.91	3.13	3.30	-	4.40	4.10	4.20	4.60
Azalan Şeker Miktarı	5.00	25.8	27.8	-	6.50	-	-	-
Değişmeyen Şeker Miktarı	1.70	5.70	4.90	-	5.20	-	-	-
Toplam Şeker	-	-	-	-	11.7	-	-	-
Lignin	9.00	11.5	11.0	-	4.70	1.50	4.50	2.30

Konserve ananas atığı genellikle %81.3-83.4 g/L şeker (sukroz, glukoz, fruktoz) içerir [Nigam, 2000]. Diğer ananas atıklarında; glukoz, üronikasit, ksiloz, mannoz ve arabinoz olduğu bulunmuştur. Bununla beraber ananas kabuklarından elde edilen kullanılabilir şeker miktarları uygulanan fiziksel ve kimyasal ayrıştırma yöntemlerine göre değişmektedir [Choonut et al., 2014].

2.2.1. Ananas Atıklarından Bromealin Üretimi

Ananas atıklarının en önemli yararlanılabilir ürünü proteolitik bir enzim olan bromealindir. Atığın kök kısmından elde edilir ve kök bromealin olarak da bilinir Meyvede ve az miktarda atık olarak ayrılan kısımda da bulunmaktadır. 1891’de Marcano tarafından tanımlanmıştır [Balls et al., 1945]. Bromealin farmasötikal madde ve gıda ek maddesi olarak kullanılabilir [Hebbar et al., 2008]. Ancak olgunlaşmış meyve de çok azdır. Bromealin enzimi antiinflamatuvar, antitrombotik ve ödem atımını destekleyen bir enzimdir. İn vitro ve in vivoda etkinlik gösterir [Bhuii et al., 2009]. Fibrinolitik aktiviteleri sayesinde potansiyel bir antikanser ajanıdır [Chobotova et al., 2009]. Gıda endüstrisinde eti yumuşatıcı etken madde olarak kullanılabilir [Maurer, 2001].

Kökten bromealin ekstraksiyonu; jel filtrasyonu, iyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat fraksiyonu kullanılarak yapılabilir [Murachi et al., 1964]. Sterilizasyonun zor koşullarda olması proteolitik aktiviteyi negatif etkilediği için bromealin stabilizasyonu önem taşımaktadır. Kök bromealin immobilizasyonu histidin ilişkili metal afiniteyle desteklenir ve termal stabilizasyon iyileştirilir.

2.2.2. Ananas Atıklarından Etanol Üretimi

Ananas atıkları hemiselüloz, lignin ve selüloz içerdiğinden lignoselülozik ham madde olarak kullanılmaktadır [Tinoi and Rakariyatham, 2015]. Yüksek oranda karbonhidrat içermesinden ve farklı besin maddelerini ihtiva etmesinden dolayı özellikle biyoetanol üretimi için ilgi çekici bir ham maddedir. Bu kullanım, çevre kirliliğine neden olan atıkların uzaklaştırılmasındaki maliyeti ve sera etkisini azaltır [Demirbaş 2006, Ünal ve Alibaş 2007, İkılıc ve Yücesu 2008]. Ananas atıklarının ham madde olarak kullanımı sayesinde sıkışmış ananas atığının mikrobiyal bozunması sonucunda ortaya çıkabilecek patlamalar da engellenmiş olur.

Z. mobilis ATCC 10988 suşu ile pH ayarı yapılmadan yürütülen bir çalışmada ananas konserve atıkları kullanılmıştır ve etanol üretimi 59.0 g/L olarak belirlenmiştir [Tanaka et al., 1999].

Meyve atıklarından biyogaz üretiminde meyve atık karışımı içerisinde ananas olması üretimi kolaylaştırmaktadır [Lane, 1984; Prema et al., 1992].

2.2.3. Ananas Atıklarından Fenolik Antioksidanların Üretimi

Ananas atıklarından %50 aseton ve %70 alkolle ekstraksiyon yapıldığında en iyi fenolik bileşik eldesi sağlanmaktadır [Allothman et al., 2009]. Ananas atıklarından yüksek miktarda (%30.2'ye varan) fenolik bileşik elde edilebilir. Ananas kabuğundan elde edilen fenolik bileşikler myricetin, salisilik asit, tannik asit, trans sinamik asit ve p-koumarik asittir [Larrauri et al., 1997]. Sinamik ve koumarik asitlerden fungusit olarak faydalanılmaktadır.

Ananas yapraklarından elde edilen fenolik bileşikler diyabetik sıçanlarda kan şekeri yükselmesini engellediği belirlenmiştir [Xie et al., 2005].

2.2.4. Ananas Atıklarından Organik Asit Üretimi

Ananas atıklarından genel olarak sitrik asit, ferulik asit ve laktik asit üretilmektedir.

Gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan sitrik asit asitliği sağlayıcı ve lezzet arttırıcı olarak tercih edilmektedir [Kumar vd., 2003]. Sitrik asitten farmasötik madde yapımında da yararlanır. Yapılan bir çalışmada kuru ananas atığından *A. niger* tarafından sitrik asit üretilmiştir. Kilogramda 202.35 gram sitrik asit eldesi gözlenmiştir [Kumar vd., 2003]. Ananas atıklarından *Lactobacillus lactis* ile laktik asit üretimi öncesinde, atıkta var olan sukrozu parçalamak için invertaz enzimi kullanılmış; açığa çıkan fruktoz ve glukozun fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Karbon Kaynağı Olarak Ananas

Ananas atıkları kullanılarak metan ve uçucu yağ asitleri elde edilebilir. Ayrıca karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılabilen ananas atıklarından hidrojen gazı da elde edilmektedir [Wang et al., 2006]. Selüloz üretimi yapan *Acetobacter xylinum*'da ananas atıklarını karbon kaynağı olarak kullanarak selüloz üretebilmektedir [Kurosumi et al., 2009].

2.2.6. Ananas Atıklarından Lif Üretimi

Ananas atıklarından elde edilen liflerin %70'i diyet lifidir. Ananas yaprak liflerinden ise tekstilden vida yapımına kadar pek çok farklı alanda yararlanılmaktadır ve bu maddeler gerilip uzama bükülebilme özelliklerine sahiptir. Selülozik içerikli olduklarından güçlendirici olarak da kullanılırlar [Tran, 2006].

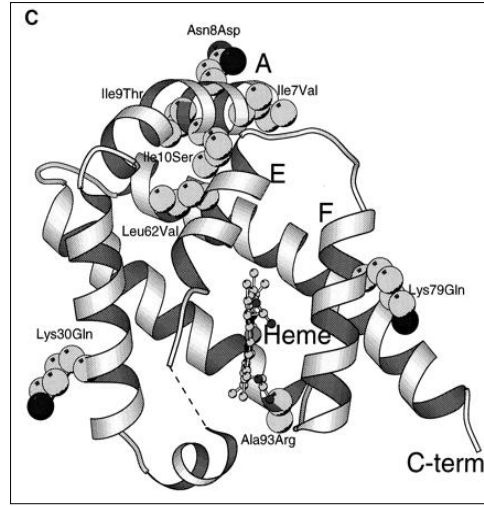
2.2.7. Ananas Atıklarıyla Ağır Metallerin Giderimi

Ananas atıkları çinko, kadmiyum, nikel, bakır, kurşun gibi toksik metallerin gideriminde kullanılır [Senthilkumaar et al., 2000]. Bu giderim mikroorganizmaların ürettiği sitrik asitle yapılmaktadır.

2.3. *Vitreoscilla* Hemoglobini (VHb)

1966'da ilk bakteriyel hemoglobin, Gram negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla*'da keşfedilmiştir. 1966 ve 1986 yılları arasında tanımlanan bu proteinin bir terminal solunum oksidazı veya bir sitokrom olduğuna inanılmış ve ilk önceleri "çözünebilir sitokrom o" olarak isimlendirilmiştir [Stark et al., 2012; Webster and Hackett, 1966]. İlerleyen çalışmalarla, homodimerik yapılı bir hemoglobin olduğu keşfedilerek *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) olarak adlandırılmıştır.

Hemoglobin veya hemoglobin benzeri proteinler ökaryotlardan; yüksek bitkilerde, omurgalılarda ve omurgasızlarda da bulunur. VHb'nin kristal yapısı globine benzemektedir ve alt üniteler 15.7 kDa'dur. Joshi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1998), hemoglobinin üç boyutlu yapısındaki önemli aminoasit birimleri B10, CD1, E7, E11 ve F8 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin üç boyutlu yapısı.

Vitreoscilla hemoglobini (VHb) ile yapılan çalışmalarda tütün bitkisi, insan hücresi, maya (*S. cerevisiae*) gibi ökaryotik canlıların yanı sıra *E. coli* gibi prokaryotik canlılar da kullanılmıştır [Frey and Kallio, 2003; Zhang et al., 2007; Stark et al., 2008].

Bakteriyel hemoglobinin temel görevi O_2 'yi bağlamak ve taşımaktır. Tek globin domain yapısındaki VHb bakteriyel hemoglobini üretimi düşük oksijenli fermentasyon ortamlarında uyarılmaktadır [Dikshil et al., 1992]. Bakteriyel hemoglobin oksijeni bağlayarak onu direkt olarak terminal respiratör oksidaza göndermektedir [Park et al., 2002; Duk et al., 2007]. VHb proteinin bu özelliğini periplazmada gerçekleştirir [Khosla and Bailey, 1989]. Ayrıca VHb; hücrede enerji akışını hızlandırmak, biyolojik nitrojen fiksasyonu, redoks seviyelerinin ayarlanması, oksijen ve nitrojen seviyelerine duyarlılıkla ilgili tepkimelerde de görev almaktadır [Poole et al., 1996; Potts et al., 1992; Webster et al., 1987].

VHb ekspresyonunun *E. aerogenes*'te asetoin ile bütandiol ve *E. coli*'de poli β -hidroksibütirat oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir [Yu et al., 2002].

Etanol üreten *E. coli* FBR5 suşuna *vgb* geni aktararak VHb eksprese etme özelliği kazandırıldıktan sonra, yeni transformant suş ile etanol üretiminde artış olduğu görülmüştür [Sanny et al., 2010]. Ayrıca *vgb* geni ekspresyonu sayesinde, düşük havalandırılmalı koşullarda ATP üretiminin de arttığı belirlenmiştir. [Webster, 1987; Park et al., 2002; Arnaldos et al., 2012]. *E. coli*'deki *vgb* gen ekspresyonunun ve promotör aktivitesinin oksijen konsantrasyonundan etkilediği görülmüştür. *E. coli*'de *vgb* geninin ekspresyonu yaklaşık olarak 300 genin kontrol ettiği

bilinmektedir [Roos et al., 2004]. Ayrıca VHB proteini de birçok bakteriyel transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini etkilemektedir. *E. coli*'de hidrojen peroksit sensorü görevi gören proteini kodlayan *oxyR* geninin aktivitesi de VHB tarafından düzenlenmektedir [Anand et al., 2010].

Bakteriyel hemoglobin geninin aktarımı ökaryotik canlılarda da yapılmıştır. *S. cerevisiae*'ye aktarılan *vgb* geni etanol üretimini %30'a varan miktarlarda artırmıştır [Chen et al., 1994]. Ancak *E. coli*'de VHB varlığıyla etanol üretimi %49-66 aralığında bir artış gösterdiğinden tercihen *E. coli* kullanılmaya devam edilmiştir [Tsai et al., 1996; Frey et al., 2001]. Ksilozlu besiyerlerinde *S. cerevisiae*'deki VHB ekspresyonu iki basamaklı ksiloz, ksiluloz dönüşümünü içeren redoks tepkimeleriyle gerçekleştirilirken; *E. coli*'de bu işlem tek basamakta gerçekleştirilir [Song and Park, 1997].

VHB ilişkili etanol artışında kullanılan şeker türleri önemlidir. Ksiloz, glukoz ve arabinoz bulunduran besiyerlerinde etanol üretim yollarında gliseraldehit-3-fosfat (G3P) oluşum basamağı vardır. VHB'nin; G3P ve etanol arasındaki metabolizmayı etkileyerek etanol üretimini arttırdığı düşünülmektedir. VHB ekspresyonu sayesinde artan ATP miktarı, glukozdan G3P'ye dönüşümünü kolaylaştırmaktadır [Sanny et al., 2010].

Etanolojenik *E. coli* FBR5 suşuna *vgb* geni klonlanarak elde edilen TS3 suşunun, mısır püskülü hidrolizatı temelli saf glukoz ve ksilozla desteklenmiş besiyerinde büyütülmesi sonucunda *E. coli* TS3 suşunun *E. coli* FBR5 suşundan daha fazla miktarda biyoetanol ürettiği görülmüştür [Arnaldos et al., 2012]. Fakat çok yüksek oranlarda *vgb* ekspresyonu olan suşlar (TS5) etanol üretimini negatif yönde etkiler [Sanny et al., 2010].

VHB ekspresyonuyla etanol üretimindeki artış yüksek havalandırılmalı, çalkalamalı, farklı ölçekteki fermentasyon ortamlarında da denenmiş ve etanol artışındaki olumlu etki hücre başına etanol artışıyla ilişkilendirilmiştir [Abanoz vd., 2012; Akbas vd., 2014].

Havalandırmanın düşük olduğu koşullarda büyüme daha azdır; ancak yüksek havalandırılmalı koşullara kıyasla VHB ekspresyonuyla ilgili etanol artışı daha fazla olduğundan; büyüme ve etanol artış miktarı arasında net bir ilişki kurulmamıştır [Akbaş vd., 2014]. Fermentasyon ölçeğinin büyük olduğu ortamlarda daha fazla etanol üretiminin olması ise toplam hücre kütlelerinin daha fazla oluşuyla ilgili

olabilir. VHb varlığında mikroaerobik koşullar altında az miktarda da olsa ksiloz ve glukozun aerobik olarak kullanılabilmesi düşünölmüştür [Sanny et al., 2010].

VHb'nin varlığı aromatik bileşiklerin degradasyon yollarını da kolaylaştırmaktadır. Özellikle DNT'in yıkımını içeren yollara oksijen takviyesi yaparak yıkımı kolaylaştırmaktadır [Nasr et al., 2001]. *Burkholderia* suşlarına *vgb* geni klonlandığında aromatik bileşiklerin degradasyonunun 2-7 kat kadar arttığı kaydedilmiştir. Ayrıca *vgb* ekspresyonunun bazı mantar ve bakterilerde antibiyotik üretimini arttırdığı ve transforme *E. coli* suşlarında polimer oluşumunu tetiklediği; polihidroksibütirat üretimini %50 arttırdığı da gözlemlenmiştir [Wu et al., 2007; Horng et al., 2010].

VHb proteini spektral ölçümleri için, sodyum ditiyonit ile kimyasal indirgendiğinde 416-430 nm aralığında absorpsiyon piki oluşturur [Chung et al., 2006].

2.4. İnhibitörler

Biyoetanol üretimi için hemiselüloz, selüloz ve lignin içeren; karbonhidratça zengin olan lignoselülozik maddeler kullanılmaktadır. Selüloz yüksek moleküler ağırlıklı β -1,4 bağılı D-glukozun linear olarak polimerize olmuş halidir [Fon et al., 1982]. Hemiselülozlar pentozlardan D-ksiloz ve L-arabinoz ayrıca heksozlardan D-mannoz, D-glukoz, D-galaktoz içerir [Saka, 1991]. Hemiselülozun yıkımı sonucu ortaya mannoz, glukoz, galaktoz, ksiloz, asetik asit çıkar. Lignoselülozik maddelerin mikroorganizmalarca fermente edilebilmeleri için bazı ön uygulamalara tabii tutulmaları gerekir. Bu ön uygulamalardan maliyeti düşük olan asit hidrolizi ve buhar uygulamaları tercih edildiğinde ortaya mikroorganizmanın canlılığını ve üretkenliğini sekteye uğratabilecek inhibitörler açığa çıkar. İnhibitörler üç ana grupta incelenirler. Bunlar:

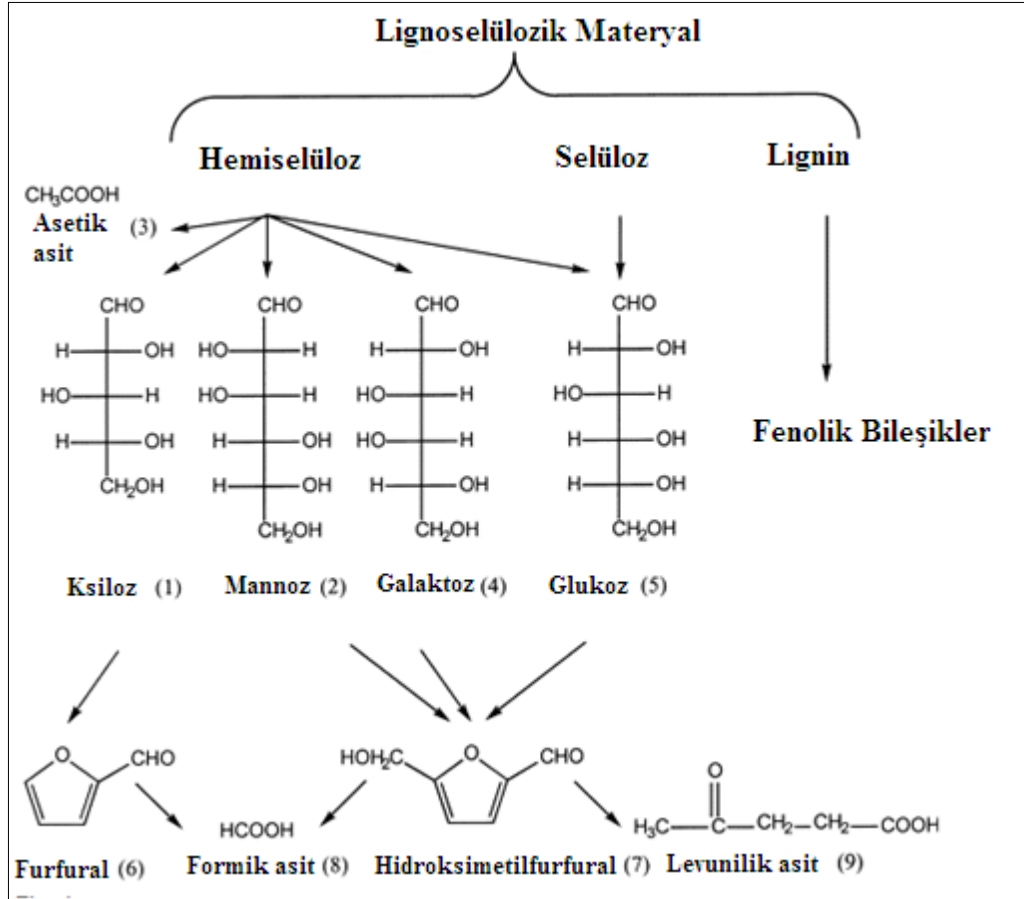
- Zayıf asitler: Alifatik asitlerden asetik asit, formik asit, levulinik asitlerdir. Bu inhibitörler; HMF'nin yıkımı veya hemiselülozun deasetilasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Zayıf asitler hücre duvarını tahrip ederek sitozole sızarlar. pH düşmesi ve enzimlerin inaktive olması sonunda hücre büyümesi durur, ölüm gerçekleşir

[Maiorella et al., 1983; Taherzadeh et al., 1997; Larsson et al., 1999b; Almeida et al., 2007].

•Furan türevleri: 2-furaldehit (furfural) ve 5-hidroksimetil-2-furaldehit (HMF) aldehit dehidrogenaz aktivitesini ve glikolitik enzimleri inhibe ederler. Bu inhibitörler ayrıca DNA'yı yıkar, protein ve RNA sentezini inhibe eder [Madig et al., 2002; Liu et al., 2004]. Ksilozu yüksek basınç ve sıcaklık uygulaması furfural oluşturur [Dunlop, 1948]. HMF de benzer şekilde heksoz degradasyonu sonucu oluşur [Ulbricht et al., 1984]. Etanolojenik *E. coli* suşlarından KO11 ve LY01 furfuralı furfural alkole dönüştürebilir ve bu mikroorganizmalar furfural redüktazı kullanarak furfuralı detoksifiye edebilir [Gutiérrez et al., 2002].

•Fenolik bileşikler: Vanilin, siringaldehid ve koniferil aldehid [Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000b; Musatto and Roberto, 2004]. Bu bileşikler lignin degradasyonu ile oluşan bileşiklerdir.

Palmqvist ve Hahn-Hägerdal tarafından yapılan çalışmada (2000) lignoselülozik materyallerden asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörler tanımlanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Lignoselülozik materyallerin asit hidroliziyle açığa çıkan inhibitörler.

Mayalarda bileşiklerin inhibe edici etkileri kıyaslandığında; en yüksek inhibe ediciler terpenler olup onu aldehitler, polihidroksi aromatikler, formik asit ve asetik asit takip etmektedir [Leonard and Hajny, 1945].

Ayrıca ortaya çıkan inhibitörlerin negatif etkilerini ortadan kaldırmak için lakkaz enzimi kullanılabilir [Parawira W. And Tekere M., 2011].

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

1.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan ananas atıkları Migros Ticaret A.Ş. (Türkiye)'den temin edildi. Atıklar ile hazırlanan farklı hidrolizatları içeren besiyerine ilave olarak maya özütü (Merck, ABD) kullanıldı. Ananas atıkları farklı konsantrasyonlarda HCl (Merck, ABD) ve H₂SO₄ (Merck, ABD) ile hidroliz edildi. Hidrolizatların içerdiği oranlarda fruktoz (Merck, ABD), glukoz (Sigma, ABD) ve %0.5 (w/v) maya özütü (Merck, ABD) içeren besiyerleri ile de çalışıldı. Besiyerlerine FBR5 suşu için sadece ampisilin (Merck, ABD); TS3 suşu için ampisilin ve streptomisin sülfat (Merck, ABD); TS4 suşu için ampisilin ve gentamisin sülfat (Merck, ABD) antibiyotikleri eklendi. TLC ve HPLC kalibrasyonları için ek olarak arabinoz (Sigma, ABD), ksiloz (Sigma, ABD) ve sukroz (Sigma, ABD) ile standartlar hazırlandı. Hidrolizatlarda hidroliz sonucu ortaya çıkan inhibitörlerin tayini için formik asit (Merck, ABD), asetik asit (Merck, ABD), HMF (Acros Organics, Belçika), 2-Furaldehit (Acros Organics, Belçika) kullanılarak standartlar hazırlandı. HPLC mobil fazı için ise asetonytril (Merck, ABD) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm deney malzemeleri Hirayama Hiclave™, HVE-50 (Japonya) otoklavı ile steril edildi. Kesilmiş ananas atıkları KERN hassas terazi (Balingen, Almanya) ile tartılıp uygun sulandırma oranlarıyla karıştırıldıktan sonra Arzum Ironmix Çubuk Blender (İstanbul, Türkiye) kullanılarak parçalandı. Ananas hidrolizatlarının pH değeri Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP (İngiltere) kullanılarak ayarlandı. İnkübasyon ortamı olarak New Brunswick Scientific Excella E24 çalkalamalı inkübatörleri kullanıldı. Hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (Optik Density; OD) Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre (ABD) ile ölçüldü. HPLC analizi için kullanılan mobil faz Wise Clean Degasser kullanılarak hazırlandı.

İnkübasyon sonrası kültürlerin kalan şeker miktarı, üretilen etanol miktarı ve eksprese edilmiş VHB konsantrasyonlarının ölçülmesi için hücrelerin çöktürülmesinde Heraeus Labofuge 400R, Awel CF 48-R, Labogene Scanspeed 1580R (Danimarka) santrifüjleri kullanıldı. Etanol, şeker ve inhibitör içerikleri CBM-20A, LC-20AD, SIL-20ACHT, DGU-20A5R, RID-10A, SPD-20A, CTO-10ASVP modülleri içeren HPLC analiz cihazı (Shimadzu, Japonya) ile belirlendi. Etanol ve şeker miktarı analizi için GL Sciences Inertsil Amin Kolonu (4.6x 250 mm), inhibitör içeriğinin belirlenmesi için ise Kromasil C18 HPLC Kolonu (150x4.6mm) kullanıldı. Şeker miktarı analizi ayrıca TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad (ABD) ile de belirlendi. Hücre hemoglobini ekstraksiyonu için Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250 (ABD) sonikatörü ile parçalandı ve hemoglobin ölçümleri için Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanıldı. TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad (ABD) kullanılarak kalan şeker miktarları belirlendi.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları

Bu tez çalışmasında, ananas atıklarının farklı asit hidroliz yöntemleri ile hazırlanan fermentasyon ortamlarında *E. coli* suşları ile biyoetanol üretim etkinliğinin artırılmasında VHB'nin etkisi araştırılmaktadır.

USDA laboratuvarından temin edilen *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) [Dien et al., 2000] ve bu suşlardan Dr. Sanny başına geliştirilen TS3 ve TS4 [Sanny, 2009] suşları kullanıldı. Bunun için, bütün suşlar *pdC* (piruvat dekarboksilaz), *adhB* (alkol dehidrogenaz) [Dien et al., 2000] ve *vgb* (TS3, TS4) içerecek şekilde, yeni oluşturulan plazmitlerle transforme edilerek elde edildi [Sanny et al., 2010].

Kullanılan suşlar ve özellikleri:

- NZN111 - *E. coli* [F+ λ - rpoS396(Am) rph-1 Δ pflB::Cam Δ ldhA::Kan].
- FBR5 - *pdC* ve *adhB* taşıyan pLOI297 plazmidi ile transforme edilmiş NZN111 suşu.
- FBR5/pTS3 (TS3 suşu)- *vgb* taşıyan pKT230 plazmidi (pTS3) ile transforme edilmiş FBR5 suşu.

- FBR5/pTS4 (TS4 suşu) - *vgb* taşıyan pBBR1MCS-5 plazmidi (pTS4) ile transforme edilmiş FBR5 suşu.

Çalışmada, *vgb(-)* *E. coli* FBR5 suşu ve *vgb(+)* rekombinant *E. coli* suşları (TS3 ve TS4), VHb'nin etanol üretimindeki etkilerini belirlemek için kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ananas Atığının Besiyeri için Hazırlanması

Taze ananas atıkları (kabuk ve merkez bölgeyi içeren) Migros Ticaret A.Ş. (İstanbul, Türkiye)'nin yerel mağazalarından temin edildi. Bu atıklar bıçak yardımıyla yaklaşık 2x4 cm boyutunda kesilerek, ananas parçaları elde edildi. Elde edilen ananas parçaları bir blender yardımıyla 10 dakika süre ile parçalanarak püre haline getirildi.

3.2.2. Ananas Atığı Hidrolizatları ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Fermentasyon ortamlarının hazırlanması için elde edilen ananas atığı püresi farklı oranlarda distile su ile sulandırılarak iki farklı asit (H_2SO_4 ve HCl) ile hidroliz edildi. Ananas atığı ile 10 farklı hidrolizat değerlendirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Ananas atığının seyreltik asitler (H₂SO₄ ve HCl) ile hidroliz yöntemleri.

Hidrolizat Metodu	Asit Türü	Asit Konsantrasyonu	Ananas Atığı: Asit Oranı
A	H ₂ SO ₄	% 0.5	2:1
B	H ₂ SO ₄	% 0.5	1:1
C	HCl	6N	2:1
D	HCl	% 0.5	1:1
D1	HCl	% 0.5	2:1
E	H ₂ SO ₄	% 0.5	1:10
F	H ₂ SO ₄	% 0.5	1:5
G	H ₂ SO ₄	% 5	1:3
H	H ₂ SO ₄	% 5	1:5
I	H ₂ SO ₄	% 5	1:10

3.2.2.1. Metot A

100 gram ananas atığı püresi 50 ml H₂SO₄ (% 0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantın pH değeri 10N NaOH ile 7.0 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot A ile hazırlanan hidrolizata 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı. 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi.

3.2.2.2. Metot B

100 gram ananas atığı püresi 100 ml H₂SO₄ (% 0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7.0 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot B ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.3. Metot C

100 gram ananas atığı püresi 50 ml 6N HCl ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot C ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.4. Metot D

100 gram ananas atığı püresi 100 ml HCl (%0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot D ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.5. Metot D1

100 gram ananas atığı püresi 50 ml HCl (%0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak ısıtıldı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot D1 ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.6. Metot E

100 gram ananas atığı püresi 1000 ml H₂SO₄ (%0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot E ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.7. Metot F

100 gram ananas atığı püresi 500 ml H₂SO₄ (%0.5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot F ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.8. Metot G

100 gram ananas atığı püresi 300 ml H₂SO₄ (%5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 90°C'de 120 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot G ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.9. Metot H

100 gram ananas atığı püresi 500 ml H₂SO₄ (%5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 90°C'de 120 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot H ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.2.10. Metot I

100 gram ananas atığı püresi 1000 ml H₂SO₄ (%5, v/v) ile sulandırılarak 180 rpm hızda, 37 °C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Sulandırılan ananas atığı püresi 90°C'de 120 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Otoklav sonrası 4100 rpm hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 10N NaOH ile pH değeri 7 olacak şekilde ayarlandı ve tekrar otoklavlanarak steril hale getirildi.

72 ml metot I ile hazırlanan hidrolizat ve 8 ml maya özütü (%5, w/v) ilave edilerek fermentasyon besiyeri hazırlandı.

3.2.3. Hidrolizathlı Besiyerlerinin İÇerdiği Oranda Şeker İÇeren Besiyerlerinin Hazırlanması

Hazırlanan farklı türdeki hidrolizatların içerdığı şeker konsantrasyonu ile aynı oranda şeker içerecek şekilde besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerinden A hidrolizatının şekerlerini içeren besiyeri (ASB); %2.33 (w/v) fruktoz ve %2.29 (w/v) glukoz ve %0.5 (w/v) maya özütü, B hidrolizatının şekerlerini içeren besiyeri (BSB); %2.00 (w/v) fruktoz, %1.94 (w/v) glukoz ve %0.5 (w/v) maya özütü, C hidrolizatının şekerlerini içeren besiyeri (CSB); %1.93 (w/v) fruktoz, %1.99 (w/v) glukoz, %0.05 (w/v) ksiloz ve %0.5 (w/v) maya özütü, D hidrolizatının şekerlerini içeren besiyeri (DSB); %1.82 (w/v) fruktoz, %1.74 (w/v) glukoz ve %0.5 (w/v) maya özütü, D1 hidrolizatının şekerlerini içeren besiyeri (D1SB); %2.37 (w/v) fruktoz, %2.47 (w/v) glukoz ve %0.5 (w/v) maya özütü içerecek şekilde hazırlandı.

3.2.4. Ön Kültürlerin Hazırlanması

Düzenli olarak pasajlanan *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pasajlarından 15 ml besiyeri içeren 50 ml'lik Erlenmayer Flask ortamına bir veya iki koloni aktarıldı. FBR5 suşu için ampisilin, TS3 suşu için streptomisin ve ampisilin, TS4 suşu için ise gentamisin ve ampisilin antibiyotikleri Tablo 3.2'de belirtilen miktarlar kadar kullanıldı. Hazırlanan ön kültürler 180 rpm çalkalama hızında, 37°C sıcaklıkta ve bir gece boyunca çalkalamalı bir inkübatörde inkübe edildi.

Tablo 3.2: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları

Suş	Antibiyotikler		
	Ampisilin	Streptomisin	Gentamisin
FBR5	100µg/ml	–	–
TS3	100µg/ml	50µg/ml	–
TS4	100µg/ml	–	5µg/ml

3.2.5. Fermentasyon Ortamlarının Hazırlanması

Fermentasyon ortamlarının hazırlanması için 72 ml ananas hidrolizatına %5 (w/v) oranında hazırlanan maya özütü solüsyonundan 8 ml ilave edildi ve 100 ml'lik Erlenmayer flask içerisine aktarıldı. Bir gecelik ön kültürlerden fermentasyon ortamının başlangıç hücre sayısı (OD_{600}) 0.05 olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Hazırlanan kültür ortamları 180 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta ve 48 saat süre ile çalkalamalı bir inkübatörde inkübe edildi.

3.2.6. Analiz Yöntemleri

3.2.6.1. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi

24 ve 48 saat inkübe edilen kültürlerin toplam hücre miktarının belirlenmesi için UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kültürler optik yoğunluk OD_{600} de 0.6 değerini aşmayacak şekilde steril özgün besiyeri ile seyreltildi. Kör olarak ise inkübasyon öncesi hazırlanan özgün besiyeri kullanıldı.

3.2.6.2. Şeker, İnhibitör ve Etanol Miktarlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında değerlendirilen farklı hidrolizatların şeker içerikleri ve tüm hidrolizat çeşitleriyle hazırlanan besiyerlerinde inkübe edilen kültürlerin 24 ve 48 saat süre sonunda besi ortamında kalan şeker miktarı TLC ve HPLC analiz yöntemleri ile belirlendi. Fermentasyon sonrası üretilen etanol miktarı ve farklı hidrolizatların inhibitör içeriği ise HPLC analizi ile belirlendi.

TLC analizinde, farklı hidrolizatların potansiyel şeker miktarı analizi için glukoz, ksiloz, fruktoz, sukroz ve arabinoz içeriği (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mg/ml (w/v)) içeren standartlara göre belirlendi [Şar, 2013]. Hidrolizat ve kültür örnekleri standartların dışına çıkmayacak şekilde, uygun oranlarda distile su ile seyreltildi. TLC plakları (Whatman, TLC Plates Partisil® K5, Maidstone, İngiltere) üzerine standartlar ve seyreltilmiş örnekler mikro şırınga ile 1µl olacak şekilde damlatıldı. Plakalar kurutulduktan sonra %85'lik (v/v) asetonitril çözeltisi içerisine hafif bir açı ile bırakılarak şekerlerin yürütülmesi için bekletildi. Yürütülen plakalar kurutulurak,

yürütme işlemi tekrarlandı. Tekrar kurutulmuş plakalar alfa naftol (%0.5, v/v) çözeltisine daldırılarak boyandı. Şeker noktalarının görünür hale gelmesi için, TLC plaka ısıtıcısında 120°C'de 10 dakika süre ile yakıldı. Kültür ortamlarındaki kalan şekerlerin miktar tayini için, TLC görüntüleme densitometresinde (Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D.) taratılarak hacim hesaplama işlemi yapıldı. Standart grafiği üzerinde, R^2 değeri 0.950 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edildi

HPLC analizi ile şeker ve etanol miktarının belirlenmesinde ise glukoz, ksiloz, fruktoz, sukroz, arabinoz ve etanol (5, 10, 20, 40 ve 80 mg/ml) içeren standartlara göre belirlendi. Hidrolizat ve kültür örnekleri örnekleri 10000 rpm hızda 10 dakika süre ile santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvı 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek safsızlıklardan arındırıldı. Şeker ve etanol miktar tayini için Inertsil NH₂ kolonu (5 µm, 4.6x250 mm, GL Sciences Inc.) kullanıldı. Mobil faz olarak asetonitril:ultra saf su (60:40) kullanıldı. Kolon sıcaklığı 25°C, mobil faz akış hızı ise 1 ml/dakika olarak belirlendi. Örneklerin enjeksiyon miktarı 20 µl olarak belirlendi ve Refraktif Index detektörü ile ölçüm yapıldı [Sar et al., 2016].

Farklı hidrolizatların inhibitör içeriğinin belirlenmesinde ise C-18 (Kromasil, 5 µm, 4.6x150 mm) kolonu kullanıldı. Hidrolizatların inhibitör içeriği asetik asit, formik asit, furfural ve 5-hidroksimetil furfural (1-50 mM) içeren standartlara göre belirlendi. Mobil faz olarak asetonitril:ultra saf su (10:90) kullanıldı. Kolon sıcaklığı 30°C, mobil faz akış hızı ise 2 ml/dakika olarak belirlendi. Örneklerin enjeksiyon miktarı 10 µl olarak belirlendi ve UV detektörü ile 254 nm dalga boyunda analiz yapıldı.

3.2.6.3. TS3 ve TS4 (*vgb* geni aktarılmış) Suşlarındaki Hemoglobin Ekspresyonunun Belirlenmesi

48 saatlik inkübasyon sonrası kültürler 4000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta 16 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen pellet en az bir gece -20°C'de muhafaza edildi ve ardından 30ng/ml olacak şekilde PBS (50mM) içerisinde çözdürüldü. Hücre süspansiyonları bir sonikatör yardımıyla, buz içerisinde 20 saniyelik vurma ve 10 saniyelik bekleme süreleri ile toplamda 6 defa (3 dakika) sonike edildi.

Sonikasyon sonrası elde edilen hücre homojenatları 4000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta ve 16 dakika süreyle santrifüj edildi. Üst sıvılara eser miktarda sodyum dityonit eklenerek bir spektrofotometre cihazında (UV-1800 Shimadzu UV-VIS

NIR Spectro) VHB miktarları belirlendi. Kör olarak ise her örnek için sodyum dityonit eklenmemiş üst sıvılar kullanıldı. Sodyum dityonit VHB nin 416 ve 430 nm dalga boyları arasında indirgenmesini sağlar ve belirtilen dalga boyları arasında oluşan fark spektrasından VHB miktarı nmol/g olarak belirlendi [Chung ve ark., 2006].

3.2.6.4. Substrat Tüketimi, Fermentasyon Etkinliği ve Alkol Verimlerinin Hesaplanması

Fermentasyon sonucunda üretilen etanol miktarlarının g/L cinsinden hesaplanması için % v/v olarak belirlenen etanol miktarları 7,8924 ile çarpıldı.

Substrat tüketimi hesaplanmasında ilk basamak tüketilen şeker miktarının belirlenmesidir. Başlangıç şeker miktarından kalan şeker miktarı çıkarılarak tüketilen şeker miktarı bulundu. Başlangıç şeker miktarına göre tüketilen şeker miktarına bakılarak yüzde miktarda şeker tüketimi belirlendi; bu değer yüzde substrat tüketimine tekabül etmektedir.

Litrede üretilen etanol miktarının litrede tüketilen substrat miktarına oranlanmasını takiben 100 ile çarpılmasıyla % alkol verimleri hesaplandı.

Fermentasyon etkinliği; teorik alkol verimi aynı anlamlara gelen kavramlardır. Fermentasyon etkinliğini hesaplamak için; elde edilen alkol verim değerleri, teoride beklenen alkol üretim miktarına (51.2) bölünüp yüz ile çarpıldı.

$$\text{Etanol Miktarı (g/1000mL)} = \text{Etanol Miktarı (\%v/v)} \times 78924 \quad (3.1)$$

$$\text{Substrat Tüketimi (\%)} = (\text{Tüketilen Şeker (g/L)}) / (\text{Toplam Şeker (g/L)}) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Alkol Verimi (\%)} = (\text{Etanol Miktarı (g/L)}) / (\text{Tüketilen Şeker Miktarı (g/L)}) \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Fermentasyon Etkinliği (\%)} = (\text{Alkol Verimi (\%)}) / 51.2 \times 100 \quad (3.4)$$

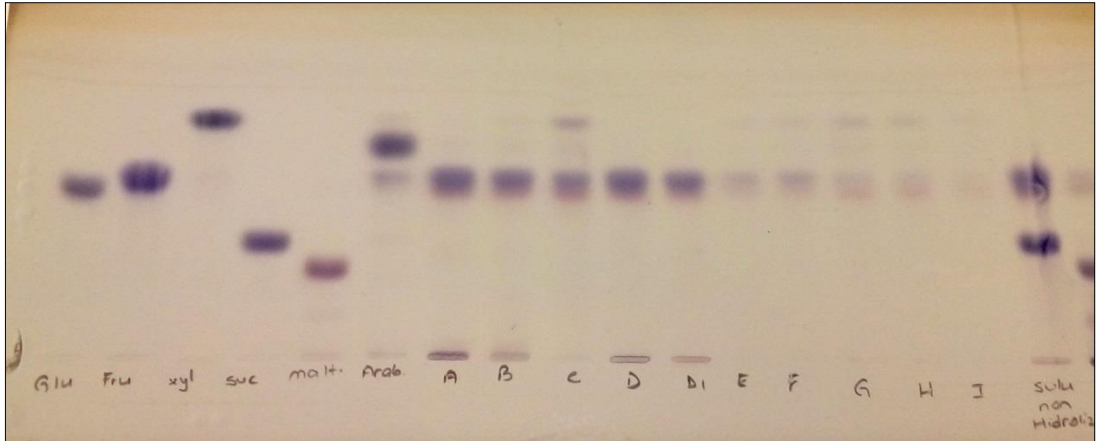
3.2.7. İstatistiksel Analizler

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

4. BULGULAR

4.1. Ananas Atığı Hidrolizatlarındaki Şeker ve İnhibitör İçeriklerinin Belirlenmesi

Ananas atığı hidrolizatlarının içerdiği şeker çeşitleri ve konsantrasyonları TLC yöntemiyle; oluşan inhibitör içerikleri ve konsantrasyonları ise HPLC yöntemiyle belirlendi. TLC yönteminin verdiği sonuçlara göre; hidroliz edilmeden hazırlanan ananas atığında sukroz, fruktoz ve glukoz bulunduğu belirlendi (Şekil 4.1). Hazırlanan tüm hidrolizatlarda ise glukoz ve fruktoz bulunması yanı sıra C hidrolizatında ek olarak ksiloz tespit edildi. Hidroliz edilmeyen ananas kabuk atığında sukroz miktarının %1.78 (w/v) ve glukoz ve fruktoz toplam miktarının ise %1.50 (w/v) oranında olduğu belirlendi.



Şekil 4.1: Farklı hidrolizatlarda ve hidroliz edilmeyen ananas kabuğu atığında bulunan şeker içeriğinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirlenmesi (Glu: Glukoz, Fru: Fruktoz, Xyl: Ksiloz, Suc: Sukroz, Malt: Maltoz, Arab: Arabinoz anlamına gelmektedir).

Ön denemelerde, hidroliz edilmeyen ananas atığı ve maya özütü (%0.5, w/v) içeren bir besiyerinde *E. coli* TS3 suşu ile üremenin zayıf olduğu, etanol üretiminin ise %1 (v/v)'den düşük olduğu belirlendi. Hidroliz edilmeyen ananas atığının şeker içeriğine benzer olarak hazırlanan ve maya özütü (%0.5, w/v) içeren besi ortamında ise *E. coli* suşları (FBR5, TS3 ve TS4) ile üremenin görülmesine rağmen maya özütü içermeyen besi ortamında *E. coli* suşları ile üreme tespit edilemedi.

Farklı yöntemler ile ön işlem uygulanan ananas hidrolizatları içerisinde üremenin en iyi maya özütü (%0.5, w/v) içeren D hidrolizatı ile hazırlanan besi ortamında olduğu belirlendi. Maya özütü (%0.5, w/v) içermeyen D hidrolizatı besiyerinde de *E. coli* suşları ile üremenin olduğu gözlemlendi. Fakat ananas hidrolizatlarının şeker içeriğine benzer olarak hazırlanan besi ortamlarına, hidrolizat içeriğinde belirtilen miktarlarda inhibitör ilave edildiğinde *E. coli* suşlarının üreyemediği gözlemlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: D Hidrolizatı ve aynı oranlarda, sadece şeker içeren besiyerinde *E. coli* suşlarının üreme özellikleri.

	Besiyeri (Glukoz, Fruktoz)	D Hidrolizatı	%0.5 Maya Özütü	İnhibitör Takviyesi	Bakteriyel Üreme
	+	-	+	-	+
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	-
FBR5, TS3 ve TS4 suşları	+	-	-	-	-
	-	+	+	-	+
	-	+	-	-	+

*Besiyeri (Glukoz, fruktoz); D hidrolizatına benzer olarak glukoz %1.74 (w/v) ve fruktoz %1.82 (w/v) içermektedir.

4.1.1. A Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 2:1 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (H₂SO₄) uygulanarak hazırlanan A hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %2.33 fruktoz ve %2.29 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.265 (w/v) formik asit, %0.562 (w/v) asetik asit, %0.105 (w/v) HMF ve %0.004 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.2. B Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:1 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (H₂SO₄) uygulanarak hazırlanmış B hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %2.00 fruktoz ve %1.94 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin

%0.080 (w/v) formik asit, %0.167 (w/v) asetik asit, %0.055 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.3. C Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 2:1 olan ve 6N asit (HCl) uygulanarak hazırlanmış C hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %1.96 fruktoz, %1.96 glukoz ve %0.05 ksiloz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.047 (w/v) formik asit, %0.263 (w/v) asetik asit, %0.982 (w/v) HMF ve %0.005 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.4. D Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:1 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (HCl) uygulanarak hazırlanmış D hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %1.82 fruktoz ve %1.74 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.004 (w/v) formik asit, %0.120 (w/v) asetik asit, %0.008 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.5. D1 Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 2:1 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (HCl) uygulanarak hazırlanmış D₁ hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %2.42 fruktoz ve %2.42 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.004 (w/v) formik asit, %0.120 (w/v) asetik asit, %0.008 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.6. E Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:10 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (H₂SO₄) uygulanarak hazırlanmış E hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %0.30 fruktoz ve %0.34 glukoz olarak belirlenmiştir. Asit hidrolizi sonucu oluşan

inhibitörlerin %0.070 (w/v) asetik asit, %0.023 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.7. F Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:5 olan ve %0.5'lik seyreltik asit (H_2SO_4) uygulanarak hazırlanmış F hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %0.49 fruktoz ve %0.45 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.055 (w/v) formik asit, %0.033 (w/v) asetik asit, %0.036 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.8. G Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:3 olan ve %5'lik seyreltik asit (H_2SO_4) uygulanarak hazırlanmış G hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %0.70 fruktoz ve %0.76 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.275 (w/v) formik asit, %0.191 (w/v) asetik asit, %0.188 (w/v) HMF ve %0.005 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.9. H Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:5 olan ve % 5'lik seyreltik asit (H_2SO_4) uygulanarak hazırlanmış H hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %0.65 fruktoz ve %0.71 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin %0.014 (w/v) formik asit, %0.258 (w/v) asetik asit, %0.081 (w/v) HMF ve %0.004 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

4.1.10. I Hidrolizatı

Ananas atığı seyreltik asit oranı 1:10 olan ve % 5'lik seyreltik asit (H_2SO_4) uygulanarak hazırlanmış I hidrolizatında başlangıç şeker konsantrasyonu %0.82 fruktoz ve %0.78 glukoz olarak belirlendi. Asit hidrolizi sonucu oluşan inhibitörlerin

%0.130 (w/v) formik asit, %0.026 (w/v) asetik asit, %0.065 (w/v) HMF ve %0.003 (w/v) furfural olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Ananas atığının farklı seyreltik asitler kullanılarak hidrolizi ile elde edilen şeker ve inhibitör içerikleri (%).

Hidrolizat Metodu	Şeker ve İnhibitör İçerikleri (% w/v)						
	Fruktoz	Glukoz	Ksiloz	Formik asit	Asetik asit	HMF	Furfural
A	2.33(0.12)	2.29(0.16)	0.00(0.00)	0.265(0.09)	0.562(0.00)	0.105(0.01)	0.004(0.02)
B	2.00(0.15)	1.94(0.20)	0.00(0.00)	0.080(0.00)	0.167(0.00)	0.055(0.02)	0.003(0.02)
C	1.93(0.22)	1.99(0.40)	0.05(0.00)	0.047(0.00)	0.263(0.00)	0.982(0.00)	0.005(0.02)
D	1.82(0.13)	1.74(0.15)	0.00(0.00)	0.004(0.00)	0.120(0.00)	0.008(0.00)	0.003(0.01)
D1	2.37(0.09)	2.47(0.05)	0.00(0.00)	0.127(0.00)	0.187(0.00)	0.008(0.01)	0.003(0.00)
E	0.30(0.08)	0.34(0.06)	0.00(0.00)	0.000(0.00)	0.070(0.00)	0.023(0.01)	0.003(0.00)
F	0.49(0.09)	0.45(0.12)	0.00(0.00)	0.055(0.00)	0.033(0.00)	0.036(0.01)	0.003(0.01)
G	0.70(0.12)	0.76(0.16)	0.00(0.00)	0.275(0.00)	0.191(0.00)	0.188(0.00)	0.005(0.02)
H	0.65(0.30)	0.71(0.40)	0.00(0.00)	0.014(0.00)	0.258(0.00)	0.081(0.02)	0.004(0.01)
I	0.82(0.01)	0.78(0.02)	0.00(0.00)	0.130(0.00)	0.026(0.00)	0.065(0.01)	0.003(0.02)

D1 hidrolizatının şeker oranı en yüksek hidrolizat olduğu belirlendi. A, C, B ve D hidrolizatlarında ise toplam şeker miktarının en az %3.56 (w/v) olduğu belirlendi. Ağırlıklı olarak fruktoz ve glukoz ihtiva eden A, B, C, D ve D₁ hidrolizatlarının toplam şeker oranı genel olarak %3.57-4.85 (w/v) aralığında olduğu, C hidrolizatında ise glukoz ve fruktoza ek olarak %0.05 (w/v) oranında ksiloz bulunduğu tespit edildi. Tüm hidrolizatlar arasında toplam şeker miktarının en düşük E hidrolizatı (%0.64 w/v) olduğu belirlendi.

Toplam inhibitör konsantrasyonu en fazla C hidrolizatında, en az E hidrolizatında olduğu belirlendi.

4.2. Küçük Ölçek Biyoetanol Üretimi

4.2.1. Ananas Atığı Hidrolizatları Kullanılarak TS3 Suşu ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamları

Tez çalışmasının ilk denemelerinde ananas atığı hidrolizatı ile hazırlanan besiyerlerinde *E .coli* TS3 suşu ile 48 saatlik fermentasyon süresi sonunda toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), etanol üretim miktarları (% , v/v) ve kalan şeker miktarları (% , w/v) belirlendi.

Farklı ananas hidrolizatları ile hazırlanan besiyerlerinde *E .coli* TS3 suşu ile gerçekleştirilen 48 saatlik fermentasyon sonrasında toplam hücre yoğunluğunun (OD_{600nm}) en fazla D hidrolizatı içeren besiyerinde (DHB) olduğu belirlendi. CHB (C hidrolizatı içeren besiyeri), EHB (E hidrolizatı içeren besiyeri), FHB (F hidrolizatı içeren besiyeri), HHB (H hidrolizatı içeren besiyeri) ve IHB (I hidrolizatı içeren besiyeri) ortamlarında ise toplam hücre yoğunluğunun (OD_{600nm}) 0.5'ten küçük olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

Farklı ananas hidrolizatları ile gerçekleştirilen fermentasyon sonrasında en yüksek etanol üretim miktarının D hidrolizatı içeren besiyerinde (DHB) %1.63 (v/v) olduğu ve başlangıç substrat miktarının yaklaşık %85'ini tükettiği belirlendi (Tablo 4.3).

Ananas hidrolizatları içerisinde kullanılan asidin seyreltilme oranının yüksek olmasından dolayı toplam inhibitör ve şeker miktarının EHB'de en düşük olduğu belirlendi. EH besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonrası başlangıç substrat

miktarının yaklaşık %33'ünü tükettiği ve etanol üretiminin ise çok düşük (< %0.5, v/v) olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

G hidrolizatı içeren besiyerinde (GHB) başlangıç susbsrat miktarının %97-98 oranında azaldığının belirlenmesine rağmen etanol üretiminin %0.74 (v/v) olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Ananas atığı hidrolizatları ile hazırlanan besiyerlerinde *E. coli* TS3 suşu ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Hidrolizatlı Besiyerleri	OD _{600nm}	Etanol (% v/v)	Kalan Fruktoz Miktarı (% w/v)	Kalan Glukoz Miktarı (% w/v)	Kalan Ksiloz Miktarı (% w/v)
AHB	0.56 (0.11)	0.17 (0.08)	1.46 (0.38)	1.46 (0.38)	-
BHB	0.62 (0.03)	0.17 (0.09)	1.24 (0.38)	1.24 (0.38)	-
CHB	0.25 (0.03)	0.32 (0.06)	1.44 (0.27)	1.44 (0.27)	0.05
DHB	2.47 (0.04)	1.63 (0.18)	0.28 (0.05)	0.28 (0.05)	-
D1HB	1.10 (0.49)	1.26 (0.11)	1.33 (0.10)	1.33 (0.10)	-
EHB	0.21 (0.08)	< 0.05	0.14 (0.04)	0.14 (0.04)	-
FHB	0.26 (0.01)	< 0.05	0.14 (0.08)	0.14 (0.08)	-
GHB	1.08 (0.03)	0.74 (0.02)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	-
HHB	0.26 (0.08)	< 0.05	0.42 (0.08)	0.42 (0.08)	-
IHB	0.33 (0.02)	< 0.05	0.21 (0.05)	0.21 (0.05)	-

4.2.2. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizatı Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamları

Yüksek şeker oranına sahip hidrolizatlı besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile 24 saatlik fermentasyon sonrası toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), etanol üretimi miktarları (% , v/v) ve kalan şeker miktarları (fruktoz (% , w/v), glukoz (% , w/v) ve ksiloz (% , w/v)) belirlendi.

A hidrolizatı içeren besiyeri (AHB) ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında, FBR5 suşu ile toplam hücre yoğunluğunun (OD_{600nm}) çok düşük olduğu (0.27) ve etanol üretiminin gerçekleşmediği belirlendi. Toplam hücre yoğunluğunun FBR5 suşuna göre TS3 suşunun %118, TS4 suşunun ise %81 daha fazla olduğu belirlendi. Etanol üretiminin ise TS3 ve TS4 suşları ile sırasıyla %0.17 ve %0.14 olduğu saptandı (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

B hidrolizatı içeren besiyeri (BHB) ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında, FBR5 suşu ile toplam hücre yoğunluğunun AHB'ye göre daha yüksek olmasına rağmen etanol üretiminin gerçekleşmediği belirlendi. BHB ortamında etanol üretiminin TS3 suşu ile %0.17 olduğu belirlendi. Toplam hücre yoğunluğunun FBR5 suşuna göre TS4 suşunun %152 fazla olduğu görüldü. TS4 suşu ile toplam hücre yoğunluğunun AHB ortamına göre yaklaşık üç kat faz olmasına rağmen etanol üretimine yansımadağı saptandı (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

C hidrolizatı içeren besiyerinde (CHB) bütün *E. coli* suşlarının toplam hücre yoğunluğunun 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında benzer olmasına rağmen, 24 saatlik inkübasyon sonrasında etanol üretimi tespit edilmedi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise, TS3 ve TS4 suşları ile üretilen etanol miktarının %0.5 (v/v)'den düşük olduğu belirlendi (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

DHB ortamında FBR5 suşu ile belirlenen toplam hücre yoğunluğunun AHB, BHB ve CHB ortamlarına göre çok daha fazla olduğu belirlendi. AHB, BHB ve CHB ortamlarına *E. coli* suşları ile etanol üretiminin düşük olmasına rağmen, DHB ortamında FBR5 suşu ile üretilen etanol miktarının 24 ve 48 saat süre sonunda sırasıyla %1.61 (v/v) ve %1.65 (v/v) olduğu gözlemlendi.

DHB ortamında TS3 suşu ile toplam hücre yoğunluğunun AHB, BHB ve CHB ortamlarına göre çok daha fazla olduğu belirlendi. DHB ortamında TS3 suşu ile üretilen etanol miktarının 24 ve 48 saat süre sonunda sırasıyla %1.19 (v/v) ve %1.51 (v/v) olduğu gözlemlendi.

DHB ortamında TS4 suşu ile toplam hücre yoğunluğunun AHB, BHB ve CHB ortamlarına göre yaklaşık 5 kat fazla olduğu belirlendi. DHB ortamında TS4 suşu ile üretilen etanol miktarının 24 ve 48 saat süre sonunda sırasıyla %2.08 (v/v) ve %2.12 (v/v) olduğu gözlemlendi.

D1HB ortamında *E. coli* suşlarının toplam hücre yoğunluğunun DHB ortamından düşük olduğu, fakat AHB, BHB ve CHB ortamlarından yüksek olduğu belirlendi. D1HB ortamında *E. coli* suşları ile üretilen etanol miktarının; AHB, BHB ve CHB ortamlarına göre yaklaşık dört kat fazla olduğu ancak DHB ortamında üretilen etanol miktarlarından ise yaklaşık % 75 az olduğu belirlendi (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

Tablo 4.4: Şeker oranları en yüksek olan hidrolizatl  besiyelerinde 100 ml ölçekte *E.coli* suşları ile 24 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol miktarı ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Besiyeri	Suş	Süre (24 Saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
	FBR5	0.23(0.04)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.87(0.04)	0.00(0.00)
AHB	TS3	0.56(0.28)	0.13(0.04)	0.10(0.04)	2.93(0.36)	0.17(0.61)
	TS4	0.42(0.05)	0.10(0.00)	0.07(0.00)	3.70(0.29)	0.16(0.09)
	FBR5	0.45(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	2.74(0.85)	0.00(0.00)
BHB	TS3	0.62(0.22)	0.16(0.04)	0.12(0.04)	2.80(0.05)	0.18(0.20)
	TS4	1.65(0.24)	0.05(0.05)	0.03(0.05)	2.89(0.61)	0.02(0.00)
	FBR5	0.21(0.13)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.54(0.38)	0.00 (0.00)
CHB	TS3	0.25(0.03)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.35(0.04)	0.00 (0.00)
	TS4	0.33(0.07)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.53(0.36)	0.00 (0.00)
	FBR5	5.01(0.24)	1.61(0.09)	1.27(0.09)	0.69(0.07)	0.25(0.09)
DHB	TS3	3.83(0.01)	1.19(0.13)	0.93(0.13)	1.85(0.16)	0.24(0.07)
	TS4	4.66(0.31)	2.08(0.08)	1.64(0.08)	0.13(0.05)	0.35(0.06)
	FBR5	0.70(0.21)	0.43(0.02)	0.33(0.02)	0.74(0.04)	0.48(0.15)
D1HB	TS3	0.75(0.02)	0.23(0.00)	0.18(0.00)	1.17(0.02)	0.24(0.11)
	TS4	0.84(0.03)	0.38(0.11)	0.29(0.11)	2.10(0.02)	0.61(0.10)

Tablo 4.5: Şeker oranları en yüksek olan hidrolizatl  besiyerlerinde 100 ml ölçekte *E.coli* suşları ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Besiyeri	Suş	Süre (48 Saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
	FBR5	0.27(0.02)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.66(0.04)	0.00(0.00)
AHB	TS3	0.59(0.11)	0.17(0.08)	0.13(0.08)	2.92(0.38)	0.22(0.04)
	TS4	0.49(0.19)	0.14(0.01)	0.11(0.01)	3.25(0.59)	0.22(0.04)
	FBR5	0.82(0.09)	0.04(0.02)	0.03(0.06)	2.71(0.09)	0.03(0.00)
BHB	TS3	0.67(0.03)	0.17(0.09)	0.13(0.09)	2.48(0.38)	0.21(0.07)
	TS4	2.07(0.19)	0.05(0.05)	0.03(0.05)	2.77(0.04)	0.01(0.00)
	FBR5	0.23(0.01)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	2.29(0.23)	0.00(0.00)
CHB	TS3	0.25(0.03)	0.32(0.06)	0.25(0.06)	2.87(0.27)	1.00(0.12)
	TS4	0.35(0.04)	0.33(0.04)	0.26(0.04)	2.89(0.34)	0.72(0.10)
	FBR5	6.00(0.71)	1.65(0.21)	1.30(0.21)	0.17(0.01)	0.21(0.11)
DHB	TS3	4.90(0.14)	1.51(0.17)	1.19(0.17)	0.18(0.07)	0.24(0.09)
	TS4	5.02(0.13)	2.12(0.07)	1.67(0.07)	0.09(0.05)	0.33(0.12)
	FBR5	2.47(0.34)	0.44(0.21)	0.34(0.21)	0.16(0.11)	0.14(0.05)
D1HB	TS3	1.55(0.05)	0.28(0.17)	0.22(0.17)	0.90(0.02)	0.14(0.05)
	TS4	3.28(0.08)	0.66(0.39)	0.52(0.39)	0.97(0.00)	0.91(0.17)

4.2.2.1. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizatı Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Etanol Artışının (%) Belirlenmesi

Yüksek şeker oranına sahip hidrolizat içeren besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) *E. coli* TS3 ve TS4 suşları ile üretilen etanol miktarlarının *E. coli* FBR5 suşuna göre 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonundaki artış oranları belirlendi.

AHB'de FBR5 suşu ile 48 saatlik inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla etanol üretiminin FBR5 suşuna göre %100'ün üzerinde olduğu belirlendi.

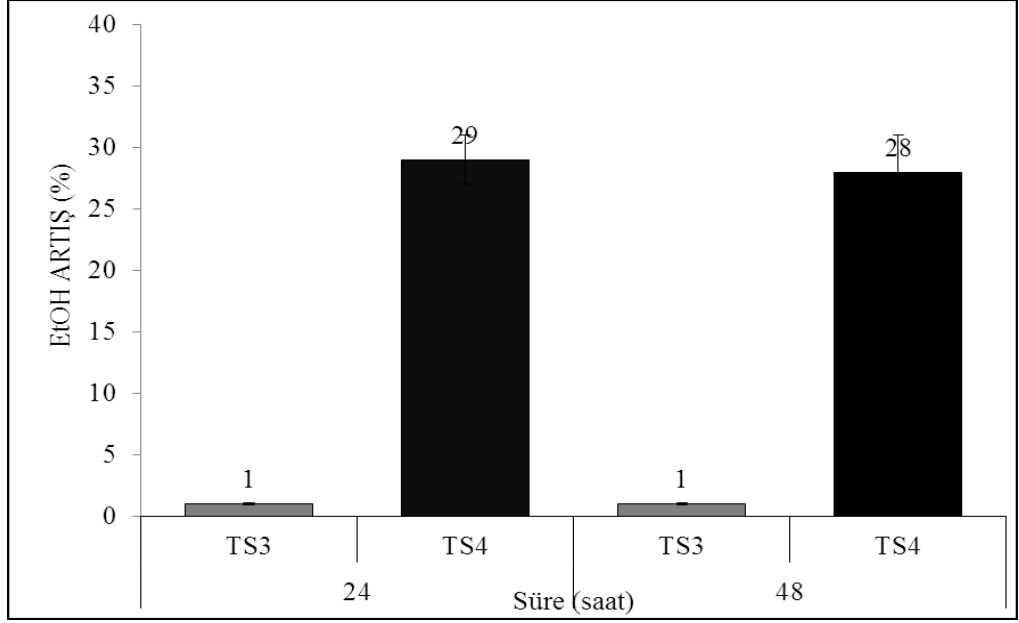
BHB'de FBR5 suşu ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla ise etanol üretiminin FBR5 suşuna göre, 24 saatlik inkübasyon sonrasında %100'ün üzerinde olduğu, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise FBR5 suşuna göre TS3 suşunun %300, TS4 suşunun ise %26 daha fazla olduğu belirlendi.

CHB'de *E. coli* suşları ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında üreme ve etanol üretimi görülmedi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında, TS3 ve TS4 suşlarıyla etanol üretiminin FBR5 suşuna göre %100'ün üzerinde olduğu belirlendi.

En iyi üreme ve en yüksek etanol üretiminin görüldüğü DHB'de TS3 suşu ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında FBR5 suşuna göre etanol üretiminde artış tespit edilemedi (Tablo 4.5). DHB ortamında TS4 suşu ile etanol üretiminin FBR5 suşuna göre 24 saatlik inkübasyon sonrasında %29 ($p = 0.03$), 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise %28 ($p = 0.01$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.5).

D1HB'de TS3 suşu ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında FBR5 suşuna göre etanol üretiminde artış tespit edilemedi. D1HB ortamında TS4 suşu ile etanol üretiminin FBR5 suşuna göre 24 saatlik inkübasyon sonrasında %57 daha fazla olduğu belirlendi fakat 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise artış belirlenemedi.

Yüksek oranda şeker içeren besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) 48 saatlik inkübasyon sonrasında, FBR5 suşuna kıyasla etanol üretiminde artış en fazla BHB ortamında TS3 suşu ile belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: DHB’de *E. coli* FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen etanol üretim artışı (%).

4.2.2.2. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizatı Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Birim Hücre Biyokütle Başına Etanol Üretim Miktarının Belirlenmesi

Yüksek şeker oranına sahip hidrolizat içeren besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (EtOH/OD) belirlendi.

AHB’de FBR5 suşu ile gerçekleştirilen inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi görülmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla etanol üretiminin FBR5 suşuna göre %100’ün üzerinde olduğu belirlendi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları TS3 ve TS4 suşları ile 0.3’den küçük olduğu belirlendi (Tablo 4.4; Tablo 4.5).

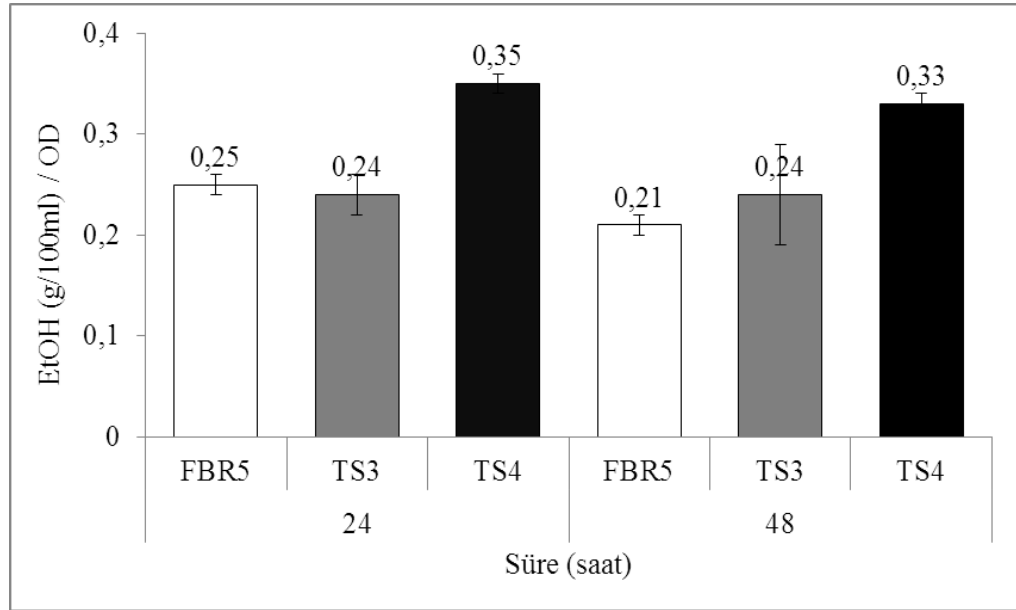
BHB’de FBR5 suşu ile gerçekleştirilen 24 saatlik inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları, TS3 ve TS4 suşları ile 0.2’den küçük olduğu belirlendi (Tablo 4.4; Tablo 4.5).

CHB’de *E. coli* suşları yapılan deneylerde 24 saat süre sonunda üreme görülmedi. 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen

etanol miktarları TS3 suşu ile 1.0 olduğu belirlendi, TS4 suşu ile ise TS3 suşuna benzer olduğu belirlendi (Tablo 4.4; Tablo 4.5).

En iyi üreme ve etanol üretiminin olduğu besiyeri olan DHB’de 24 saatlik inkübasyon sonunda, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının; AHB, BHB ve CHB’de tüm suşlar ile üretilen etanol miktarından daha yüksek olduğu bulundu. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 ve TS3 suşları ile 0.24, TS4 suşu ile ise 0.35 olduğu belirlendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının ise 24 saat süre sonunda belirlenen değerlere benzer olduğu belirlendi (Tablo 4.4, Tablo 4.5, Şekil 4.3).

D1HB’de *E. coli* suşları ile birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının 24 saatlik inkübasyon sonunda 0.7’den küçük olduğu, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise FBR5 ve TS3 suşları ile 0.2’den düşük olduğu fakat TS4 suşu ile 0.91 olduğu belirlendi (Tablo 4.4; Tablo 4.5).



Şekil 4.3: DHB’de *E. coli* suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (%).

4.2.2.3. Yüksek Şeker Oranına Sahip Ananas Hidrolizatı Besiyerleri ile Hazırlanan Fermentasyon Ortamlarında Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarlarındaki Artışın (%) Belirlenmesi

Yüksek şeker oranına sahip hidrolizat içeren besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) *E. coli* TS3 ve TS4 suşlarının *E. coli* FBR5 suşuna göre, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarındaki artış (% EtOH/OD artış) belirlendi.

AHB'de FBR5 suşu ile yapılan deneylerde 48 saatlik inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %100'den fazla olduğu belirlendi.

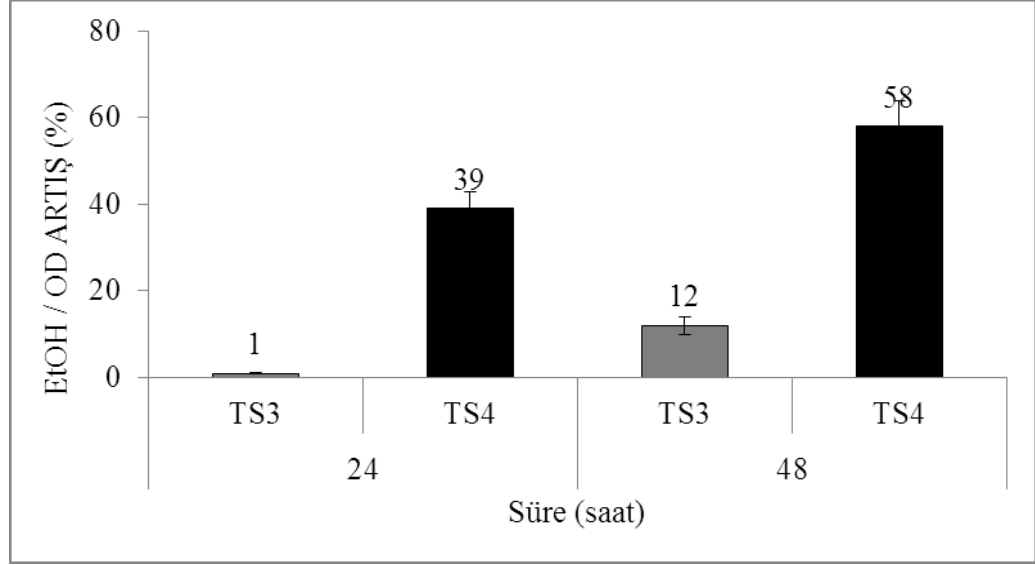
BHB'de FBR5 suşu ile yapılan deneylerde 24 saatlik inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %100'den fazla olduğu belirlendi. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise; TS3 suşuyla birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %48 fazla olduğu görüldü. TS4 suşuyla yapılan inkübasyonda bir artış kaydedilmedi.

CHB'de FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, 24 saatlik inkübasyon sonunda üreme ve etanol üretimi görülmedi. 48 saat süre sonunda TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan inkübasyonlarda, FBR5 suşuyla etanol üretilmediğinden, birim hücre başına üretilen biyoetanol miktarındaki artışın, FBR5 suşuna göre %100'den fazla olduğu belirlendi.

En yüksek üreme ve en fazla etanol üretiminin görüldüğü besiyeri olan DHB'de 24 saat sonunda, TS4 suşuyla birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %39 ($p = 0.02$) arttığı belirlendi. TS3 suşuyla yapılan inkübasyonda bu değer FBR5 suşuna kıyasla artış görülemedi. 48 saatlik süre sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre, TS3 suşuyla yapılan deneyde %12, TS4 suşuyla yapılan deneyde ise %58 ($p = 0.01$) arttığı tespit edildi (Şekil 4.4).

D1HB'de 24 saat sonunda TS4 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %28 fazla olduğu gözlemlendi.

Yüksek oranda şeker ihtiva eden besiyerlerinde (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) 24 saatlik inkübasyon sonunda, FBR5 suşuna kıyasla, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki artışın en çok BHB’de TS3 suşuyla olduğu belirlendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise, FBR5 suşuna kıyasla birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki artışın en çok D1HB’de TS4 suşuyla yapılan deneyde gözlemlendi.



Şekil 4.4: DHB’de, *E. coli* FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol (g/100 ml) miktarlarındaki artış (%).

4.2.3. Hidrolizathı Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerlerinde Biyoetanol Üretimi

Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan besiyerlerinde (ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB) *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik fermentasyon sonrası toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), etanol üretimi miktarları (% v/v) ve kalan şeker miktarları (fruktoz (% w/v), glukoz (% w/v) ve ksiloz (% w/v) belirlendi (Tablo 4.6; Tablo 4.7).

AHB’nin içerdiği oranlarda fruktoz ve glukoz içeren ASB’de, 48 saatlik fermentasyon gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşuyla yapılan deneyde üreme gözlenmedi (Tablo 4.6). Toplam hücre miktarı FBR5 suşuyla 1.59, TS3 suşuyla ise 1.41 olduğu belirlendi. Üretilen etanol miktarlarının ise %0.5’ten (v/v) az olduğu görüldü. TS4 suşuyla 24 saatlik inkübasyon sonunda üreme

gözlenmemesine ve etanol üretimi olmamasına rağmen; 48 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşunun diğer suşlardan daha yüksek OD değerine sahip olduğu ve daha çok etanol ürettiği (< % 1) belirlendi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

BHB'nin içerdiği oranlarda fruktoz ve glukoz içeren BSB'de, 48 saatlik fermentasyon gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşuyla yapılan deneyde üreme gözlenmedi. FBR5 ve TS3 suşlarının toplam hücre miktarı ise ASB'de elde edilen sonuçlara benzer olduğu belirlendi. ASB'de olduğu gibi bu besiyerinde de FBR5 ve TS3 suşlarıyla yapılan deneylerde üretilen etanol miktarının 24 saat sonunda %0.5'ten (v/v) düşük olduğu görüldü (Tablo 4.6). 48 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşu, OD değeri ve üretilen etanol miktarı bakımından diğer suşları geride bıraksa da, üretilen etanol miktarının AKB'de üretilenden daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

CHB'nin içerdiği oranlarda fruktoz, glukoz, ayrıca ksiloz içeren C şekerli besiyeriyle (CSB) 48 saatlik fermentasyon gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda FBR5 ve TS3 suşlarıyla yapılan deneylerde belirlenen OD değerlerinin, ASB ve BSB'de belirlenenlere benzer olduğu görüldü (Tablo 4.6). 48 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşuyla yapılan deneyde OD değeri ve üretilen etanol miktarlarının (<1) diğer iki suşa göre fazla olduğu belirlendi ve üretilen etanol miktarlarının ASB'de üretilen miktarlara yakın olduğu görüldü (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

DHB'nin içerdiği oranlarda fruktoz ve glukoz içeren DSB'de deneyler yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşuyla yapılan deneyde üreme gözlenmedi (Tablo 4.6). DSB'de FBR5 ve TS3 suşlarıyla yapılan inkübasyonlarda, OD değerleri ve üretilen etanol miktarlarının ASB, BSB, CSB'de yapılan deneylerde üretilen etanol miktarlarına benzer olduğu görüldü. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise tüm suşlarda üretilen etanol miktarlarının (<0.5) yakın olup BSB' de yapılan deney sonuçlarına benzediği tespit edildi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

D1HB'nin içerdiği oranlarda fruktoz ve glukoz içeren D1SB'de deneyler yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda ASB, BSB, CSB ve DSB'den farklı olarak; TS4 suşuyla yapılan deneyde üreme gözlemlendi (Tablo 4.6). 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS4 suşuyla yapılan deneyde üretilen etanol miktarının %1(v/v)'den fazla olduğu ve şekerli besiyerlerinde en yüksek etanol üretiminin D1SB'de gerçekleştiği belirlendi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

Tablo 4.6: Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan şekerli besiyerlerinde *E. coli* suşları ile 24 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Besiyeri	Suş	Süre (24 Saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
	FBR5	1.59(0.21)	0.30(0.25)	0.23(0.25)	3.94(0.21)	0.17(0.05)
ASB	TS3	1.41(0.15)	0.21(0.05)	0.16(0.05)	4.16(0.11)	0.11(0.02)
	TS4	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	4.11(0.21)	0.00(0.00)
	FBR5	1.60(0.12)	0.35(0.01)	0.27(0.01)	3.57(0.07)	0.16(0.00)
BSB	TS3	1.33(0.19)	0.25(0.07)	0.19(0.07)	3.81(0.07)	0.14(0.04)
	TS4	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.47(0.22)	0.00(0.00)
	FBR5	1.54(0.33)	0.21(0.02)	0.16(0.02)	3.33(0.04)	0.10(0.01)
CSB	TS3	1.20(0.00)	0.24(0.01)	0.18(0.01)	3.52(0.02)	0.15(0.02)
	TS4	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.20(0.30)	0.00(0.00)
	FBR5	1.23(0.28)	0.03(0.02)	0.02(0.02)	3.48(0.19)	0.18(0.03)
DSB	TS3	0.82(0.26)	0.14(0.09)	0.11(0.09)	3.47(0.00)	0.10(0.00)
	TS4	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	3.56(0.05)	0.00(0.00)
	FBR5	1.30(0.24)	0.77(0.07)	0.60(0.07)	3.83(0.04)	0.46(0.03)
D1SB	TS3	1.07(0.21)	0.07(0.00)	0.05(0.00)	3.89(0.00)	0.46(0.01)
	TS4	3.10(0.23)	0.05(0.01)	0.03(0.01)	3.86(0.00)	0.00(0.00)

Tablo 4.7: Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan şekerli besiyerlerinde *E. coli* suşları ile 48 saatlik fermentasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Besiyeri	Suş	Süre (48 Saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
	FBR5	1.71(0.60)	0.36(0.07)	0.28(0.07)	3.37(0.05)	0.13(0.03)
ASB	TS3	1.63(0.00)	0.50(0.17)	0.39(0.16)	4.15(0.22)	0.23(0.03)
	TS4	2.97(0.12)	0.79(0.36)	0.62(0.36)	4.09(0.28)	0.20(0.02)
	FBR5	1.62(0.01)	0.35(0.14)	0.27(0.14)	3.53(0.16)	0.16(0.07)
BSB	TS3	1.34(0.19)	0.40(0.10)	0.31(0.10)	3.50(0.20)	0.23(0.05)
	TS4	2.88(0.35)	0.46(0.21)	0.36(0.21)	0.13(0.20)	0.12(0.00)
	FBR5	1.64(0.21)	0.21(0.00)	0.16(0.00)	3.13(0.09)	0.09(0.03)
CSB	TS3	1.60(0.00)	0.26(0.02)	0.20(0.02)	2.57(0.07)	0.12(0.01)
	TS4	3.00(0.00)	0.80(0.38)	0.63(0.18)	1.94(0.25)	0.21(0.38)
	FBR5	1.45(0.03)	0.20(0.01)	0.15(0.01)	3.35(0.09)	0.01(0.01)
DSB	TS3	1.21(0.26)	0.17(0.11)	0.13(0.09)	3.34(0.01)	0.13(0.01)
	TS4	1.10(0.20)	0.41(0.04)	0.32(0.04)	2.77(0.22)	0.29(0.04)
	FBR5	2.47(0.29)	0.80(0.07)	0.63(0.07)	3.29(0.29)	0.25(0.04)
D1SB	TS3	1.71(0.31)	0.13(0.04)	0.10(0.04)	3.86(0.00)	0.05(0.00)
	TS4	3.41(0.12)	1.17(0.24)	0.92(0.24)	1.45(0.38)	0.26(0.01)

4.2.3.1. Hidrolizath Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyeriyle Üretilen Etanol Artışının (%) Belirlenmesi

Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan besiyerlerinde (ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB) *E. coli* TS3 ve TS4 suşları ile üretilen etanol miktarlarının *E. coli* FBR5 suşuna göre, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda artış (%) oranları belirlendi.

ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB’de 24 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, FBR5 suşu ile üretilen etanole göre artış gözlemlenmedi.

ASB’de 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşuyla üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre %52, TS4 suşuyla üretilen etanol miktarının ise FBR5 suşuna göre %169 daha fazla olduğu belirlendi.

BSB’de 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşuyla üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre %14, TS4 suşuyla üretilen etanol miktarının ise FBR5 suşuna göre %31 fazla olduğu tespit edildi.

CSB’de 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşuyla üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre %25, TS4 suşuyla üretilen etanol miktarının ise FBR5 suşuna göre %100’den fazla olduğu gözlemlendi.

DSB’de 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 ve TS4 suşlarıyla üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre %100’den ($p = 0.07$) fazla olduğu belirlendi.

D1SB’de 48 saatlik inkübasyon sonunda TS4 suşuyla üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuna göre %4 fazla olduğu tespit edildi.

Tüm şekerli besiyerlerinde TS3 ve TS4 suşuyla yapılan deneylerde, FBR5 suşuyla yapılan deneylere göre etanol üretiminde en yüksek artış oranları, temel besiyeri olan DHB’nin içerdği oranlarda şeker içerecek şekilde hazırlanan DSB’de görüldü.

4.2.3.2. Hidrolizath Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerlerindeki Kùltùrlerde Birim Hùcre Biyokùtlesi Başına Üretilen Etanol Miktarının Belirlenmesi

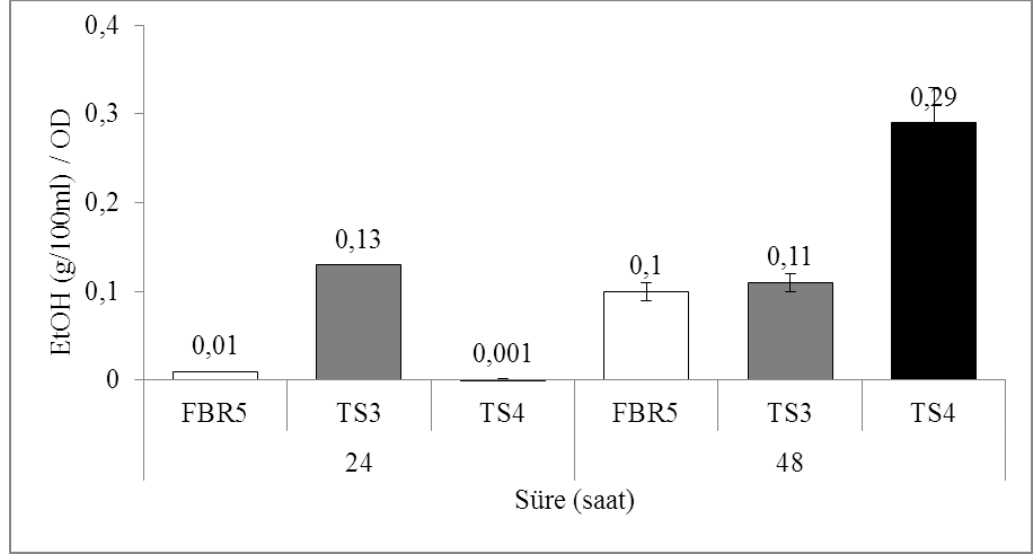
Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan besiyerlerinde (ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB) *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile 24 ve 48 saatlik fermentasyon sonrası birim hùcre biyokùtlesi başına üretilen etanol miktarları (EtOH/OD) belirlendi.

ASB’de, FBR5 suşuyla yapılan deneylerde 24 saatlik inkùbasyon sonunda birim hùcre başına üretilen etanol miktarı 0.17; TS3 suşuyla yapılan deneylerde ise 0.11 olarak belirlendi. TS4 suşuyla yapılan deneylerde ise etanol üretimi gözlemlenmedi. 48 saatlik inkùbasyon sonunda FBR5 ve TS3 suşlarıyla yapılan deneylerde birim hùcre başına üretilen etanol miktarı, 24 saat sonundaki değerlere benzer olduğu belirlendi. TS4 suşuyla yapılan deneyde ise bu değer 0.20 olarak belirlendi (Şekil 4.5). BSB ve CSB’ de yapılan deneylerde, 24 ve 48 saatlik inkùbasyon sonunda tüm suşlarda belirlenen birim hùcre biyokùtlesi başına üretilen etanol miktarlarının birbirine benzer olduğu tespit edildi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

DSB’de, FBR5 ve TS3 suşlarıyla yapılan deneylerde birim hùcre başına üretilen etanol miktarlarının, 24 saatlik inkùbasyon sonunda ASB, BSB ve CSB’de üretilen miktarlara yakın olduğu belirlendi. TS4 suşuyla yapılan deneylerde ise 24 saatlik inkùbasyon sonunda üreme görùlme de, 48 saatlik inkùbasyon sonunda birim hùcre başına üretilen etanol miktarının tüm hidrolizath besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde üretilen en yüksek miktar olduğu tespit edildi (Tablo 4.6, Tablo 4.7; Şekil 4.5).

Tüm hidrolizath besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerleri kıyaslandığında FBR5 ve TS3 suşlarıyla 24 ve 48 saatlik inkùbasyon sonunda birim hùcre başına üretilen etanol miktarının en fazla olduğu besiyeri D1SB olsa da 48 saatlik inkùbasyon sonunda bu değerin D1SB’de diğer şekerli besiyerlerindeki değerlerden daha düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

Tüm hidrolizath besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde, TS4 suşuyla yapılan deneylerde 24 saat sonunda üreme görùlmedi. 48 saatlik inkùbasyon sonunda birim hùcre başına üretilen etanol miktarlarının ise en yüksek DSB’de olduğu belirlendi (Tablo 4.6, Tablo 4.7; Şekil 4.5).



Şekil 4.5: DSB' de *E. coli* suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g/100 ml).

4.2.3.3. Şekerli Besiyerlerindeki Kültürlerle Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarlarındaki Artışların (%) Belirlenmesi

Yüksek şeker içeren hidrolizatların içerdiği şeker oranlarına uygun olarak hazırlanan besiyerlerinde (ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB) *E. coli* TS3 ve TS4 suşlarının *E. coli* FBR5 suşuna göre, 24 ve 48 saatlik fermentasyon sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarındaki artış (%) belirlendi.

ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB'de 24 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, FBR5 suşu ile yapılan deneylere göre birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarında artış (%) görülmedi.

ASB'de 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuyla üretilenden %77, TS4 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının ise FBR5 suşuyla üretilenden %54 fazla olduğu gözlemlendi.

BSB'de, 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuyla üretilenden %44 fazla olduğu tespit edildi. TS4 suşuyla yapılan deneylerde bu değer için artış belirlenmedi.

CSB'de, 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuyla üretilenden %33,

TS4 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının ise FBR5 suşuyla üretilenden %133 fazla olduğu gözlemlendi.

DSB’de, 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuyla üretilenden %100’den fazla olduğu belirlendi.

D1SB’de, 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS4 suşuyla yapılan deneyde birim hücre biyokütlesi tarafından üretilen etanol miktarının, FBR5 suşuyla yapılan deneylerden %4 fazla olduğu tespit edildi. TS3 suşuyla yapılan deneylerde bu değer için artış belirlenmedi.

Tüm hidrolizatlı besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde TS3 ve TS4 suşuyla yapılan deneylerde FBR5 suşuyla yapılan deneylere göre, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarındaki en yüksek artış oranları, temel besiyeri olan DHB’nin içerdiği oranlarda şeker içerecek şekilde hazırlanan DSB’de tespit edildi.

Tablo 4.8: DSB’de 100 ml ölçekte *E.coli* suşları ile 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen alkol verimi (%) değerleri.

Suş	Alkol Verimi (%)
	48 saat
FBR5	56.1
TS3	46.4
TS4	31.6

4.3. Büyük Ölçek Biyoetanol Üretimi

4.3.1. DH Besiyerinde Hazırlanan Kültürler

Küçük ölçekte tüm suşlarla en iyi üreme ve en yüksek etanol üretiminin belirlendiği DHB’de 500 ml’lik erlenlerde, düşük havalandırılmalı ortamda yapılan deneylerde 48 saatlik inkübasyon sonunda tüm suşların (FBR5, TS3, TS4) toplam hücre miktarı değerlerinin (OD_{600nm}) genel olarak 4.95- 5.26 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 4.10).

24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda üretilen etanol miktarının en yüksek TS4 suşu ile 24 saat sonunda %2.26 (v/v) ve 48 saat sonunda ise %2.41 (v/v) olduğu

belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda en az etanol üretimi TS3 ile yapılan deneylerde görülmesinin yanı sıra, 48 saatlik inkübasyon sonunda en az miktarda etanol üretimi ise FBR5 suşu ile yapılan deneylerde saptandı (Tablo 4.9, Tablo 4.10).

Büyük ölçekte yapılan deneylerde FBR5 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, inkübasyonun 24 saat sonunda hemen hemen tamamlandığı belirlendi. TS3 suşuyla yapılan deneylerde ise 24 saatlik inkübasyon sonunda başlangıç şekerinin sadece %54'ünün kullanıldığı görüldü (Tablo 4.9). TS3 suşuyla yapılan deneyde etanol üretiminin 24 ve 48 saatler arasında yoğunlaştığı belirlendi.

Büyük ölçekte DHB'de yapılan deneyde, 24 saatlik inkübasyon sonunda üretilen etanol miktarının küçük ölçekte DHB'de üretilen etanol miktarına göre; FBR5 için %7, TS3 için %2 ve TS4 için %8 ($p = 0.05$) arttığı belirlendi (Tablo 4.9, Tablo 4.10).

Büyük ölçekte DHB'de yapılan deneyde, 48 saatlik inkübasyon sonunda üretilen etanol miktarının küçük ölçekte DHB'de üretilen etanol miktarına göre; FBR5 için %8, TS3 için %34 ve TS4 için %14 ($p > 0.05$) arttığı tespit edildi (Tablo 4.9; Tablo 4.10).

Tablo 4.9: DHB’de 500 ml ölçekte *E. coli* suşları ile 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol miktarı ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

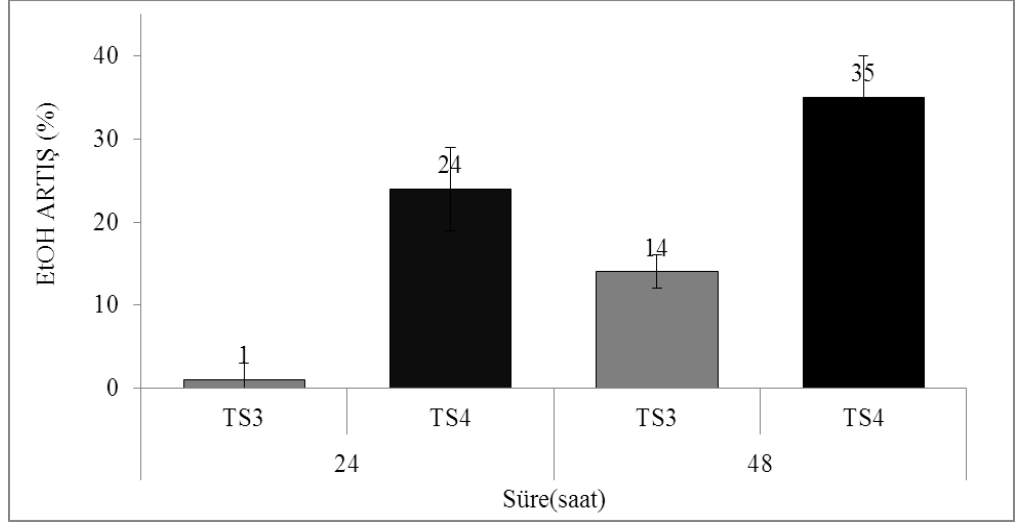
Besiyeri	Suş	Süre (24 saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
DHB (500ml)	FBR5	5.95(0.32)	1.72(0.01)	1.35(0.01)	0.04(0.00)	0.22(0.02)
	TS3	4.13(0.18)	1.27(0.03)	1.00(0.03)	1.67(0.11)	0.24(0.01)
	TS4	5.20(0.64)	2.26(0.01)	1.78(0.01)	0.07(0.01)	0.34(0.04)

Tablo 4.10: DHB’de 500 ml ölçekte *E. coli* suşları ile 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}), etanol miktarı (v/v) ve kalan şeker konsantrasyonları (%).

Besiyeri	Suş	Süre (48 saat)				
		OD	EtOH (%v/v)	EtOH (g/100ml)	K.Şeker (%w/v)	EtOH/OD (g/100ml/OD)
DHB (500ml)	FBR5	4.95(0.72)	1.79(0.11)	1.41(0.11)	0.00(0.03)	0.28(0.04)
	TS3	4.80(0.20)	2.03(0.04)	1.60(0.04)	0.32(0.15)	0.33(0.01)
	TS4	5.26(0.80)	2.41(0.07)	1.90(0.07)	0.00(0.00)	0.36(0.06)

4.3.1.1. DH Besiyerinde Biyoetanol Üretim Artışının (%) Belirlenmesi

Küçük ölçekte tüm suşlarla en iyi üreme ve en yüksek etanol üretiminin belirlendiği DHB’de 500 ml’lik erlenlerde, 24 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla FBR5 suşuna göre etanol üretiminin artmadığı, TS4 suşuyla ise FBR5 suşuna göre %24 ($p = 0.02$) artış olduğu belirlendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda TS3 suşuyla üretilen etanolün, FBR5 suşuyla üretilen etanole göre %14 ($p = 0.02$); TS4 suşuyla üretilen etanolün, FBR5 suşuyla üretilen etanole göre ise % 35 fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.6).

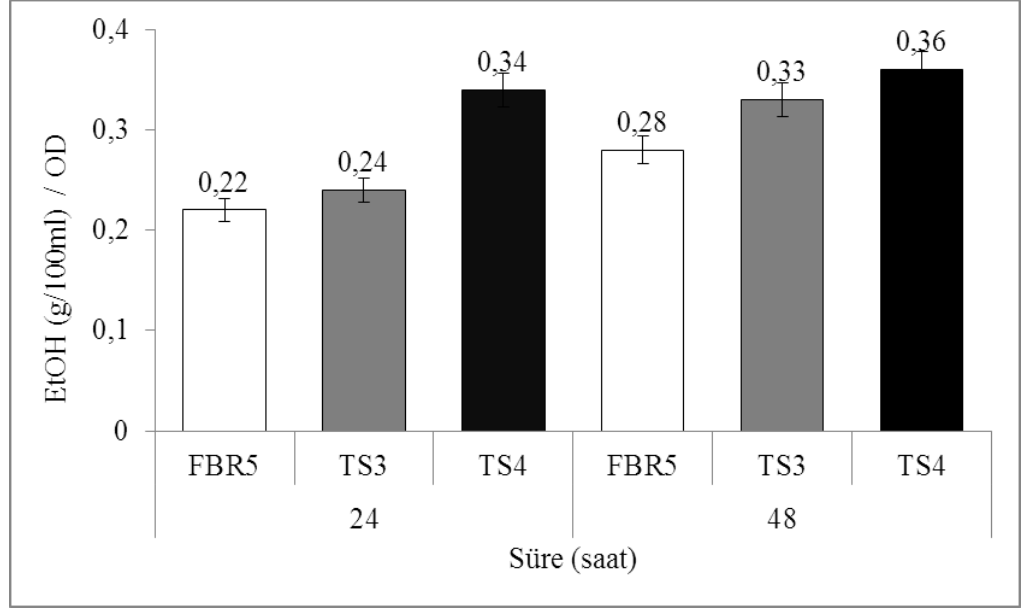


Şekil 4.6: DHB kullanılarak 500 ml ölçekte FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen etanol artışı (%).

4.3.1.2. DH Besiyerinde Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol Miktarının Belirlenmesi

Küçük ölçekte tüm suşlarla en iyi üreme ve en yüksek etanol üretiminin belirlendiği DHB’de 500 ml’lik erlenlerde, 24 saatlik fermentasyon süresinde FBR5 suşuyla hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarı 0.22, TS3 suşuyla hazırlanan ortamda 0.24 ve TS4 suşuyla hazırlanan ortamda ise 0.34 olduğu belirlendi. 48 saatlik fermentasyon sonunda bu değerlerin 0.28, TS3 suşuyla 0.33 ve TS4 suşuyla ise 0.36 olduğu tespit edildi.

Tüm suşlar içinde birim hücre biyokütlesi başına en çok etanol üretiminin TS4 suşu ile yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucunda olduğu belirlendi (Şekil 4.7).



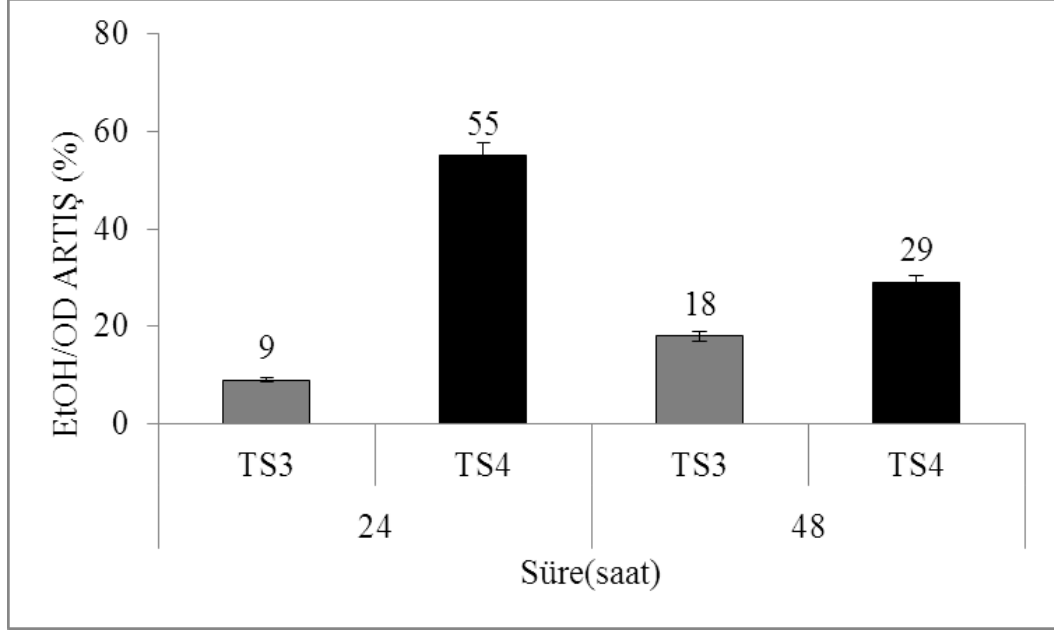
Şekil 4.7: DHB kullanılarak 500 ml ölçekte *E. coli* suşlarıyla yapılan 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (%).

4.3.1.3. DH Besiyerinde Birim Hücre Biyokütlesi Başına Üretilen Etanol miktarlarındaki Artışların (%) Belirlenmesi

DHB’de, 24 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %9, TS4 suşuyla hazırlanan inkübasyon ortamında ise FBR5 suşuna göre %54 arttığı tespit edildi.

48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 suşuyla birim hücre başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre %18, TS4 suşuyla hazırlanan inkübasyon ortamında ise FBR5 suşuna göre %29 arttığı belirlendi (Şekil 4.8).

Tüm suşlar içinde birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarındaki artışın en fazla TS4 suşunda olduğu kaydedildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: DHB’de 500 ml ölçekte FBR5 suşuna göre TS3 ve TS4 suşlarıyla 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarındaki artış (%).

4.4. Küçük Ölçek Kültürlerdeki Bakteriyel Hemoglobin (VHb) Ekspresyonu

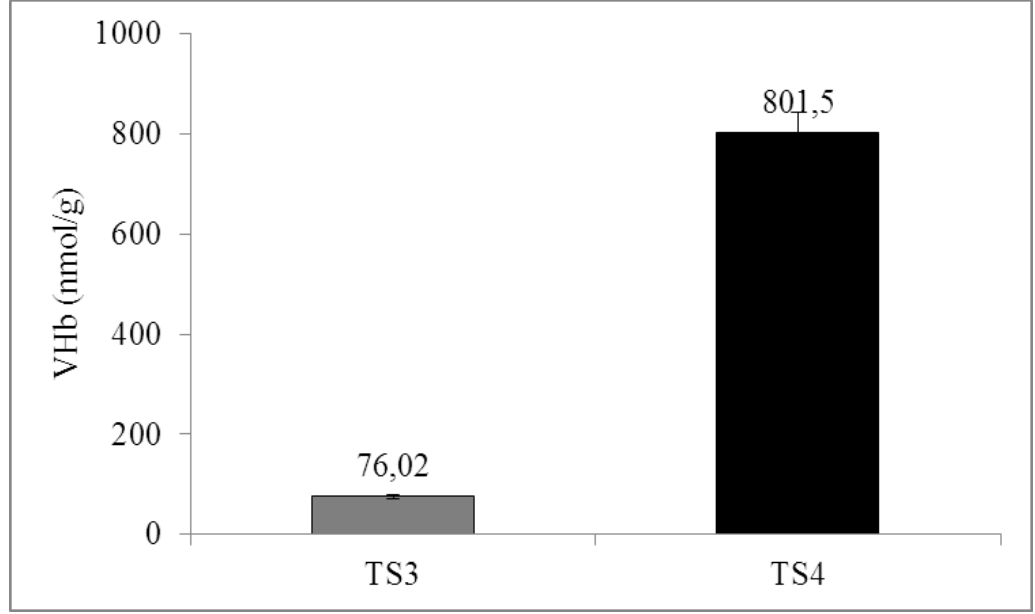
4.4.1. Yüksek Şeker Oranına Sahip Hidrolizatl ı Besiyerleri ile Hazırlanan Kültürler

AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB’de, 100 ml’lik erlenler kullanılarak hazırlanan küçük ölçekli besiyeri ortamında, *vgb* geni taşıyan TS3 ve TS4 suşlarının inkübasyon sonundaki hemoglobin ekspresyon değerleri belirlendi.

AHB ve CHB’de, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde hemoglobin ekspresyonu belirlenmezken, BHB’de TS4 suşunun inkübasyonu sonunda belirlenen VHb ekspresyonunun 5 nmol/g olduğu tespit edildi.

En yoğun VHb ekspresyonun görüldüğü besiyeri DHB olup TS3 suşuyla yapılan deneylerde VHb ekspresyonu 76 nmol/g iken TS4 suşuyla yapılan deneylerde bu miktarın 801 nmol/g olduğu saptandı (Şekil 4.10).

D1HB’de TS3 suşuyla yapılan deneylerde VHb ekspresyonunun 36 nmol/g ve TS4 suşuyla yapılan deneylerde 87 nmol/g olduğu belirlendi.



Şekil 4.9: DHB’de, 100 ml’lik ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen Vhb konsantrasyonları (nmol/g).

4.4.2. Hidrolizatl  Besiyerlerinin İçerdiği Oranda Şeker İçeren Besiyerleri ile Hazırlanan Kültürler

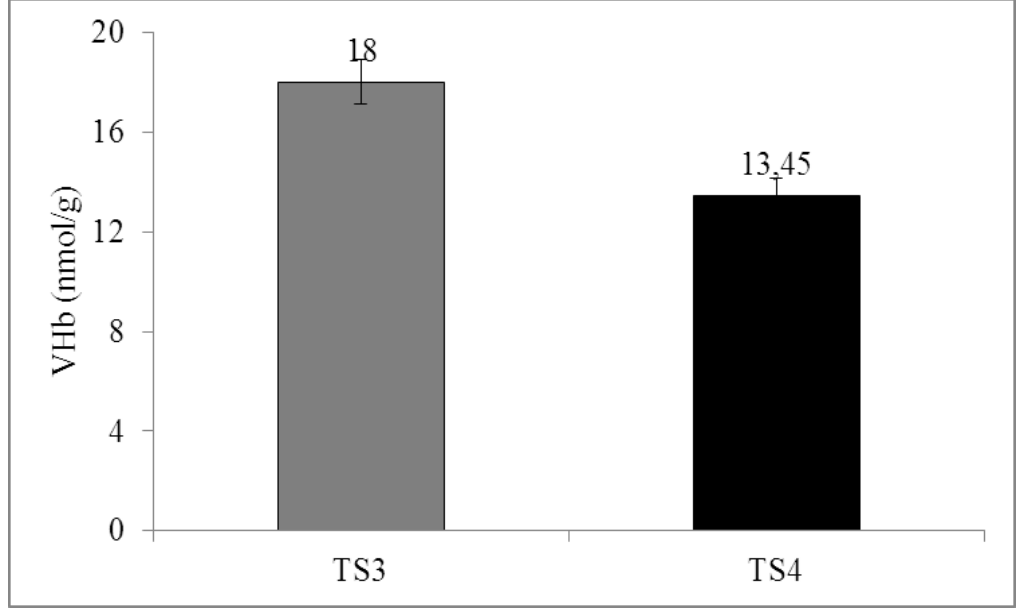
ASB’de TS3 suşuyla yapılan deneyde, inkübasyon sonunda Vhb ekspresyonunun 22 nmol/g, TS4 suşuyla yapılan deneyde ise 13 nmol/g olduğu tespit edildi.

BSB’de TS3 suşuyla yapılan deneyde Vhb ekspresyonu 22 nmol/g iken TS4 suşuyla yapılan deneyde ekspresyon görülmedi.

CSB’de TS3 suşuyla yapılan deneyde, inkübasyon sonunda Vhb ekspresyonu 10 nmol/g iken TS4 suşuyla yapılan deneyde ekspresyon görülmedi.

Tüm hidrolizatl  besiyerleri arasında en yüksek Vhb ekspresyonunun belirlendiği besiyeri DHB olduğu gibi, hidrolizatl  besiyerlerinin içerdiği oranda Şeker içeren besiyerleri arasında da TS4 suşuyla yapılan deneylerde Vhb ekspresyonunun en yüksek olduğu besiyerinin DKB olduğu görüldü. DSB’de TS3 suşuyla yapılan deneyde, inkübasyon sonunda Vhb ekspresyonunun 18 nmol/g ve TS4 suşuyla yapılan deneyde ise 14 nmol/g olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

D1KB’de TS3 suşuyla yapılan deneyde, inkübasyon sonunda Vhb ekspresyonunun 19 nmol/g ve TS4 suşuyla yapılan deneyde 9 nmol/g olduğu tespit edildi.



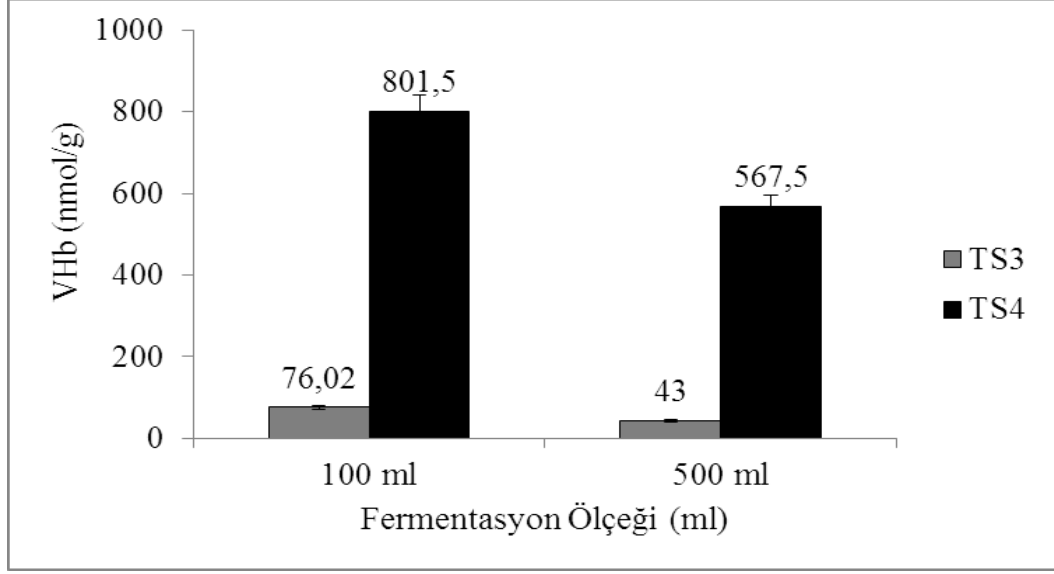
Şekil 4.10: DSB’de 100 ml’lik ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen Vhb konsantrasyonları (nmol/ g).

4.5. Büyük Ölçek Kültürlerdeki Vhb Ekspresyonu

4.5.1. DH Besiyerinde Büyük ve Küçük Ölçekli İnkübasyon Ortamlarında Vhb Ekspresyonları

DHB’de büyük ölçekte, TS3 suşuyla yapılan deneyde, inkübasyon sonunda Vhb ekspresyonunun 43 nmol/g ve TS4 suşuyla yapılan deneyde ise 568 nmol/g olduğu saptandı.

DHB’de küçük ölçekte inkübe edilen TS3 suşunun, büyük ölçekteki TS3 suşundan % 77 daha fazla; DHB’de küçük ölçekte inkübe edilen TS4 suşunun ise büyük ölçekteki TS4 suşundan % 41 daha fazla hemoglobin eksprese ettiği belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: DHB’de büyük ve küçük ölçekte TS3 ve TS4 suşları tarafından eksprese edilen VHB konsantrasyonları (nmol/ g).

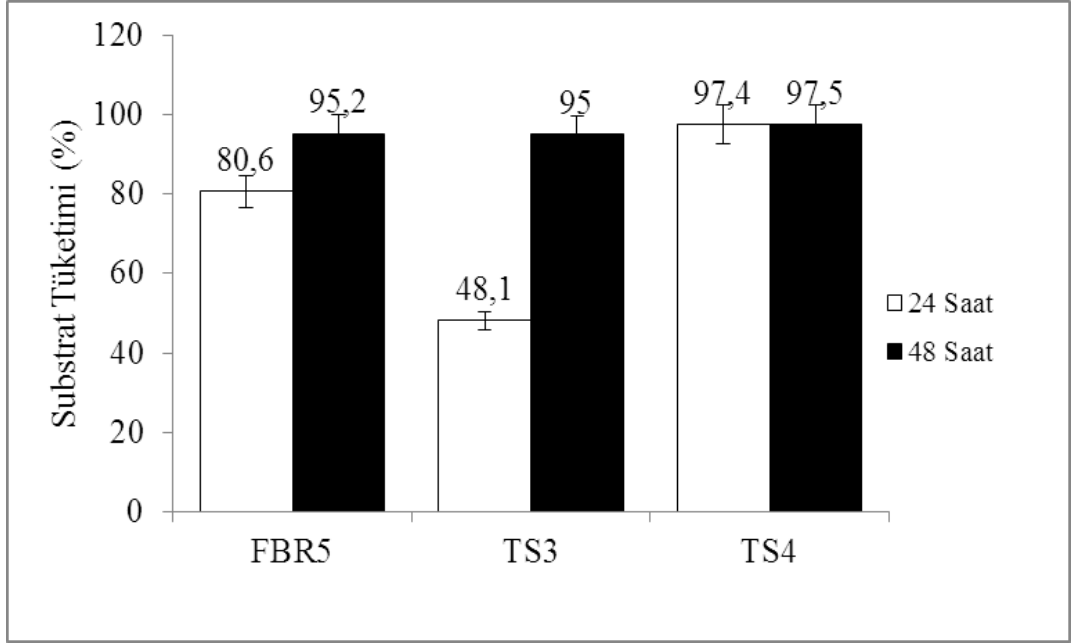
4.6. DH Besiyerlerinde Büyük ve Küçük Ölçekli Fermentasyon Ortamında Substrat Tüketimi, Fermentasyon Etkinliği ve Alkol Verimleri

DHB’de büyük ve küçük ölçekte FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla gerçekleştirilen finkübasyon sonununda fermentasyon etkinliği ve substrat tüketimi belirlendi.

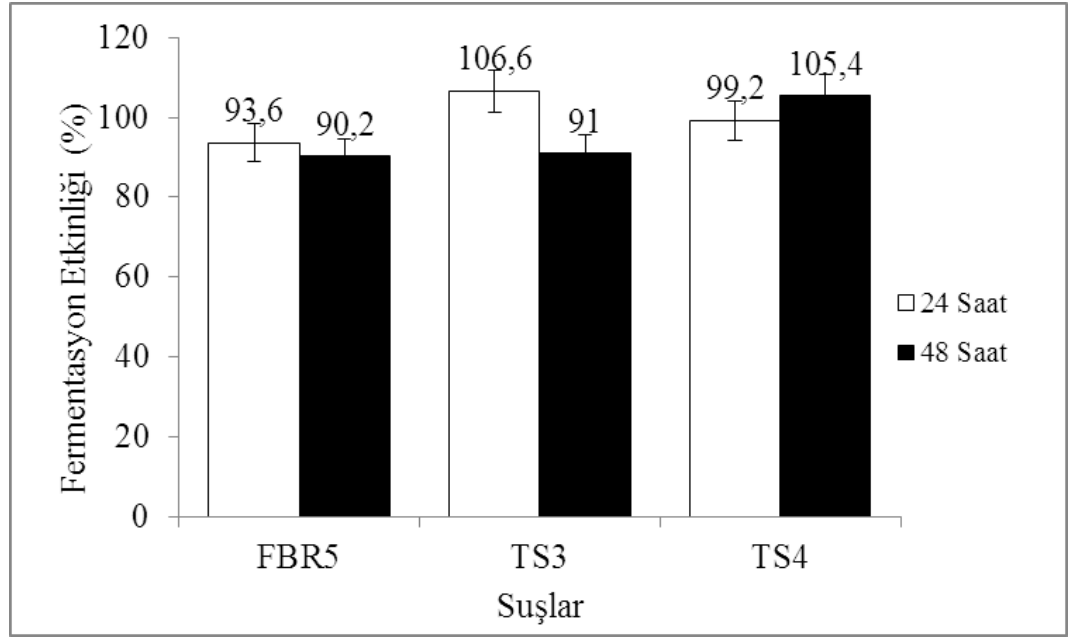
24 saatlik inkübasyon sonunda, 100 ml’lik ölçekte, FBR5 ve TS4 suşlarının substrat tüketiminin %81 ve %97 olduğu; bu iki suş için de fermentasyonun yaklaşık olarak 24 saatte tamamlandığı belirlendi. TS3 suşunun substrat tüketimi ise 24 saat sonunda %48 olup fermentasyonun 48 saatte tamamlandığı belirlendi (Şekil 4.12).

24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 100 ml’lik ölçekte, tüm suşlarda fermentasyon etkinliğinin %90- %105 aralığında olduğu saptandı (Şekil 4.12).

a)

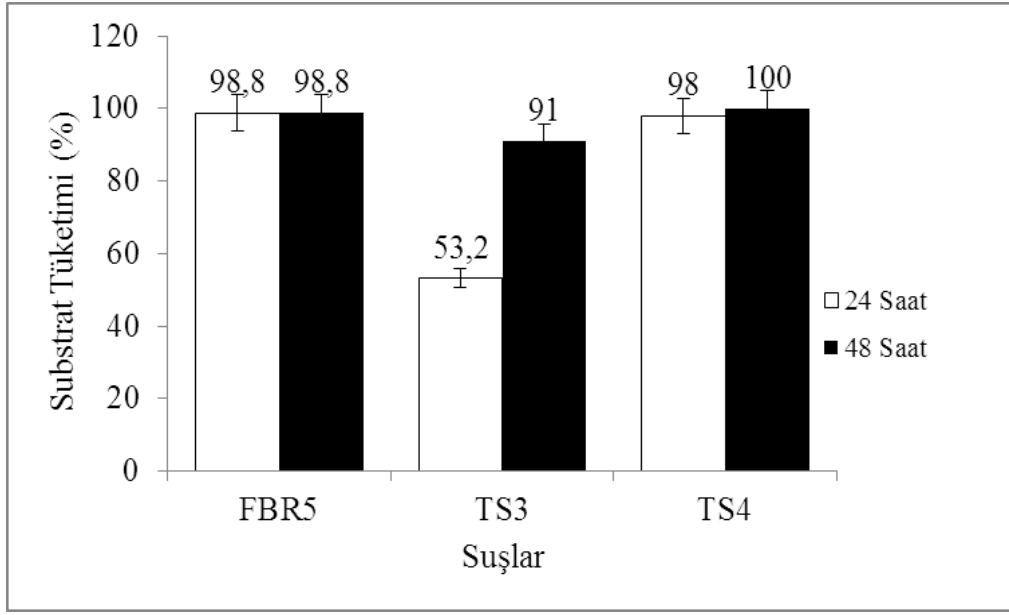


b)

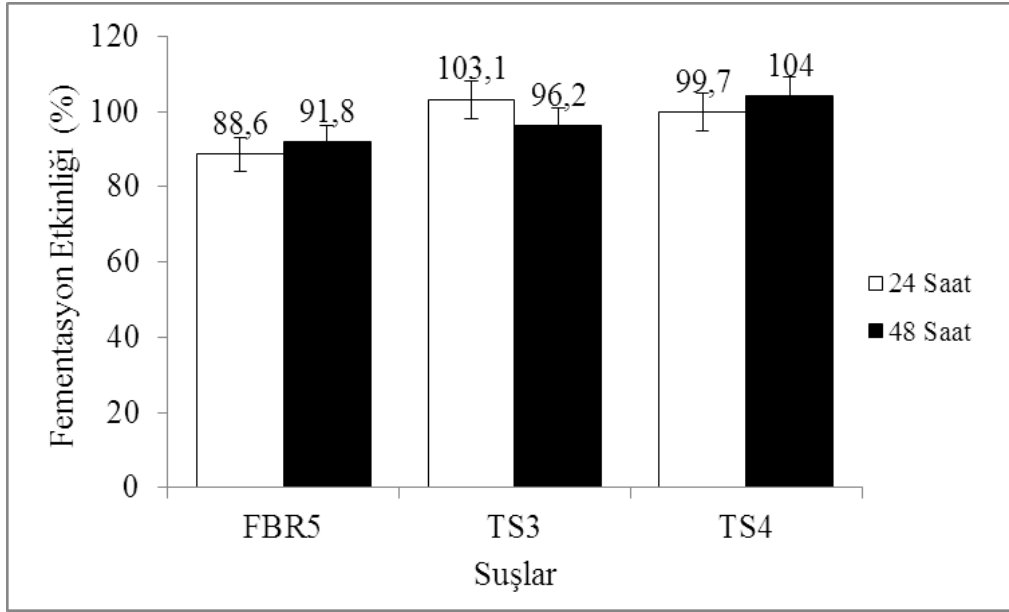


Şekil 4.12: DHB’de 100 ml ölçekte *E. coli* ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen substrat tüketimi (%), fermentasyon etkinliği (%) değerleri (a: Substrat Tüketimi, b: Fermentasyon Etkinliği).

a)



b)



Şekil 4.13: DHB’de 500 ml ölçekte *E. coli* ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen substrat tüketimi (%), fermentasyon etkinliği (%) değerleri a: Substrat Tüketimi, b: Fermentasyon Etkinliği).

DHB’de 100 ml ve 500 ml ölçekte FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen alkol veriminin % 37.3 ve %54.6 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: DHB’de 100 ml ve 500 ml ölçekte *E. coli* suşları ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen alkol verimi (%) değerleri.

Ölçek	Suş	Alkol Verimi (%)	
		24 saat	48 saat
100 ml	FBR5	44.0	38.3
	TS3	54.6	36.5
	TS4	47.7	48.0
500 ml	FBR5	38.4	37.3
	TS3	40.0	49.2
	TS4	51.0	53.2

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında meyve işleme atıkları ile etanol üretiminin arttırılması için etanol üreticisi *E. coli* FBR5 suşu ve *vgb* geni taşıyan TS3 ve TS4 suşları kullanılarak ananas atığı hidrolizatı içeren besiyerinde bu suşların etanol üretiminin arttırılmasına çalışılmıştır.

Meyve sanayisi atığı olan ananas atıkları, çürüme sonucu oluşturdukları bileşenlerden ve asidik pH'a sahip olmasından dolayı çevreyi olumsuz etkilemektedir [Demirbaş, 2006; Ünal ve Alibaş, 2007; İkılıc ve Yücesu, 2008]. Ananas atıklarının lignin, selüloz ve hemiselüloz ihtiva etmesi etanolojenik mikroorganizmalar için potansiyel ve alternatif bir karbon kaynağı olabilir [Tinoi and Rakariyatham, 2015]. Atıklardaki lignin, selüloz ve hemiselülozun içeriğindeki mikroorganizmalarca kullanılabilir şeker miktarının artırılması için; çeşitli ön uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Hidroliz enzim uygulaması veya seyreltik asit muamelesi ile yapılabilir. Maliyetinin düşük olmasından dolayı asit hidrolizi tercih edilen bir hidroliz yöntemidir [Talebniya et al., 2010; Liu et al., 2012; Adıgüzel 2013].

Bu tezin ön çalışmalarında sadece hidroliz edilmemiş ananas atıkları ve hem hidroliz edilmemiş ananas atıkları hem de %0.5 (w/v) oranında maya özütü ihtiva eden iki farklı besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerleri kullanılarak FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan inkübasyonlarda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmiştir. Bu ön çalışma; ananas atıklarının herhangi bir hidroliz işlemi yapılmadan besiyerine ek olarak veya sadece besiyeri olarak kullanılabileceğini, ihtiva ettiği şekerlerin etanolojenik *E. coli* suşlarınca fermente edilebiliyor olduğunu göstermektedir.

Tanaka ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada, *Z. mobilis* ATCC 10988 suşu ile çürümüş ananas atıkları veya ananas kabuklarından elde edilen sulandırılmamış, hidroliz edilmemiş, besin desteği eklenmemiş ve pH ayarlaması yapılmamış ananas suyu ortamında üreme ve etanol üretimi görülmüştür. Bu doğrultuda sulandırılmamış ananas suyunun çeşitli mineral ve elementleri ihtiva ettiği belirtilebilir. Etanolojenik *E. coli* suşlarıyla yapılan bu tez çalışmasında da, ananas atıkları ile hidroliz edilmeden hazırlanan besiyeri kullanıldığında etanolojenik *E. coli* suşları üreme gözlemlenmiştir.

Upadhyay ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada, ananas atığının kimyasal içeriği belirlenmiştir. Taze ananas atığının kuru materyalinin %11.2'si selüloz, %7'si hemiselüloz, % 6.7'si pektin ve %11.5'i lignin ihtiva etmektedir.

Nigam (2000) yaptığı bir çalışmada, konserve ananas atıklarının genellikle %1.05 (w/v) şeker (sukroz, glukoz, fruktoz) içerdiğini belirtmiştir. Bu tez çalışmasında ise, ananas atıklarının ihtiva ettiği şeker çeşitlerini ve şekerlerin miktarlarını belirlemek için kullanılan TLC yöntemi sonuçlarına göre; hidroliz edilmemiş ananas atık suyunda % 1.78 (w/v) sukroz ve toplamda %1.78 (w/v) oranında glukoz ve fruktoz bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1; Tablo 4.2). Choonut ve arkadaşları (2014) yaptığı bir çalışmada, kullanılan ananas atığının özellikleri ve tercih edilen ayrıştırma yöntemlerine göre elde edilen şeker miktarlarında farklılık olabileceği ifade edilmiştir.

Tez çalışmasında; %0.5 (w/v) konsantrasyonda maya özütü ve hidroliz edilmemiş ananas atığı içeren besiyeri ortamlarında üretilen etanol miktarının, TS3 suşuyla yapılan inkübasyon sonrasında % 1.5'ten (v/v) az olduğu için ananas atıklarının hidroliz edilmesine karar verilmiştir. Ananas atığında bulunan sukrozun asit hidroliziyle parçalanması sonucunda mevcut monosakkarit miktarının artırılması sağlanarak DHB hidrolizatı ile etanol üretiminin arttığı gözlemlenmiştir.

Kontrol besiyerleri için ilk olarak hidrolizatlolu besiyerlerinin içerdiği oranlarda şeker ve maya özütü ile inhibitör madde ilavesiyle tüm suşlarla inkübasyon yapılmıştır. 48 saat inkübasyon sonunda kontrol besiyerlerinde hiçbir suşta üremenin gözlenmemesi, ancak ananas atığı hidrolizatlarıyla hazırlanan besiyerlerinde üremenin görülmesi; ananas atığının ihtiva ettiği organik ve inorganik maddelerin, belli konsantrasyonlarda inhibitör varlığının negatif etkilerini yok ettiğini, bundan dolayı ananas atığının değerli ve değerlendirilmeye uygun bir karbon kaynağı olabileceğini düşündürmüştür.

Tanaka ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada, kontrol besiyeri olarak hazırlanan; sukroz, maya özütü ve mineral tuzlarını ihtiva eden besiyerinde etanol üretimi belirlenmiştir. Tez çalışmasında inhibitör madde ihtiva etmeyen ve maya özütü eklenmiş şekerli besiyerleriyle kurulan inkübasyon ortamlarında da tüm suşların ürediği gözlemlenmiştir (Tablo 4.6, Tablo 4.7). Ancak inhibitör ihtiva etmeyen şekerli besiyerleri maya özütü eklenmeden hazırlandığında, *E. coli* suşlarının üremediği belirlenmiştir (Tablo 4.1). Bu şekerli besiyerlerinde üreme

olmamasının nedeninin azot, mineral madde ve vitamin eksiklikleri olabileceği düşünülmüştür [Mancinelli R.L et al., 1983].

DH besiyeri kullanılarak yapılan deneylerde %0.5 (w/v) oranında maya özütünün olmasından bağımsız olarak tüm suşlarda üreme görülmüştür (Tablo 4.1). Bu durum hidroliz edilmiş ananas atığının ihtiva ettiği inorganik ve organik bileşik kaynaklarının önemini düşündürmektedir. Bakteri suşları tarafından azot kaynağı olarak kullanılan maya özütünün olmadığı durumlarda da bakteriyel üremenin gözlemlenmesi ananas atığının zengin ve değerli bir gıda işleme atığı olabileceğini göstermektedir [Tanaka et al., 1999; Upadhyay et al., 2010].

Yüksek oranda şeker içeren hidrolizatların ihtiva ettiği miktarlarda şeker ve maya özütü içeren ASB, BSB, CSB, DSB ve D1SB'de tüm suşlarla yapılan inkübasyonlarda 24 saat sonunda %0.8 (v/v)'den düşük etanol üretilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek etanol üretim miktarının D1SB'de TS4 suşuyla %1.17 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

En yüksek etanol üretiminin D1SB'de olmasının nedeninin; D1 hidrolizatının diğer hidrolizatlar arasında en çok şeker ihtiva eden hidrolizat olması ve D1SB'inde bu oranlarda fruktoz ve glukoz içermesi olduğu düşünülmüştür. Hidrolizatl besiyerlerinde üretilen en yüksek etanol miktarı DHB'de %2.08 (v/v) iken, hidrolizatl besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde bu oranın %1.17 (v/v) olması ananas atıklarının içerdiği organik ve inorganik maddelerin önemini göstermiştir.

Yüksek oranda şeker ihtiva eden besiyerlerinde, hücre içi osmotik basıncın artışı *E. coli* suşlarının üreme ve üretim faaliyetlerini olumsuz etkilemektedir [Chirife et al., 1983; Kargı ve Ozmıhçı, 2006]. Tüm hidrolizatl besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda, TS3 ve TS4 suşuyla yapılan deneylerde, FBR5 suşuyla yapılan deneylere göre en yüksek etanol üretimi artış oranlarının DSB'de görülmesinden dolayı bu şekerli besiyerinin optimal şeker oranına sahip bir besiyeri olabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.5).

TS3 suşuyla, 24 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının en fazla D1SB'de olduğu belirlenmiştir. Ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda bu değer D1SB'de belirlenen değerlerin diğer hidrolizatl besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerindeki değerlerden daha düşük

olduğu belirlenmiştir. TS3 suşunun bu uygulamada latent evresinin kısa sürdüğü düşünülmüştür.

Tüm hidrolizatlı besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde, TS4 suşu ile 24 saatlik inkübasyon sonunda üreme görülmemiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarının DSB ve D1SB’de birbirine çok yakın olduğu ve diğer besiyerlerindeki değerlerden daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumun, TS4 suşunun genetik yükünün fazla olmasından ve yüksek şeker içeren D1SB’de inkübe edilmesi nedeniyle latent evresinin uzun sürmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Ananas hidrolizatları, farklı konsantrasyonlarda ve farklı tür asitler (HCl, H₂SO₄) ile ön muamele edilerek elde edilmiştir. Hazırlanan hidrolizatlar içerisinde en yüksek şeker oranının D₁ ve A hidrolizatlarında olduğu tespit edilmiştir. Tüm hidrolizatlar arasında en yüksek inhibitör miktarları C ve A hidrolizatlarında belirlenmiştir. AHB ve CHB’de yapılan deneylerde elde edilen etanol miktarlarının, düşük oranda şeker içeren hidrolizat türleriyle (E, F, H, G, I) yapılan deneylerde elde edilen etanol miktarlarına benzer olduğu görülmüştür. AHB ve CHB ile düşük etanol üretiminin gözlenmesinin, yüksek inhibitör içeriğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Seçilen asit molaritesi ve sulandırma oranı en yüksek olan E hidrolizatı, en az miktarda şeker (%0.64 w/v) ve toplam inhibitöre (% 0.096 w/v) sahip olan hidrolizat çeşidi olmuştur.

I hidrolizatı E hidrolizatı ile aynı oranda sulandırılmış ve her ikisinde de ananas atığı/seyretilik asit oranı 1/10 olacak şekilde kullanılmıştır. Ancak E hidrolizatında %0.5 (v/v)’lik H₂SO₄, I hidrolizatında ise %5 (v/v)’lik H₂SO₄ kullanılmıştır. I hidrolizatının daha yoğun oranlarda asit kullanılarak hazırlanması, ortaya çıkan şeker ve inhibitör oranlarının E hidrolizatından 2 kat fazla olmasına neden olmuştur.

F hidrolizatıyla hazırlanan besiyerlerinde yapılan inkübasyonlarda %1 (v/v)’den az etanol üretilmiştir. Bu durumun F hidrolizatının E hidrolizatından sonra en az miktarda toplam inhibitör ve şeker konsantrasyonu (%0.94 w/v) içeren bir hidrolizat olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. (Tablo 4.2, Tablo 4.3).

GHB’de TS3 suşuyla yapılan deneylerde, üretilen etanol miktarının düşük fakat toplam hücre miktarının fazla olduğu bu durumda, suşun etanol üretimi yerine üremeye yöneldiği düşünülmüştür.

Hidrolizatlar içerisinde şeker oranı yüksek olan beş hidrolizat ile (A, B, C, D ve D1) hazırlanan besiyerlerinde tüm suşlar inkübe edilmiştir. AHB'de FBR5 suşuyla yapılan deneylerde, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla üretilen etanol miktarları ise %0.5 (v/v)'den düşük olsa da, etanol miktarları, hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ve hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarının FBR5 suşuna göre artışının %100'ün üzerinde olduğu tespit edilmiştir. AHB ikinci sırada en yüksek şeker içeren besiyeri (%4.63 w/v) olmasına rağmen içerdiği yüksek konsantrasyondaki inhibitörler nedeniyle bu besiyerinde etkin üreme ve etanol üretiminin gerçekleştirilmediği düşünülmüştür.

BHB'de FBR5 suşuyla yapılan deneylerde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmedi. TS3 ve TS4 suşlarıyla üretilen etanol miktarları %0.5 (v/v)'ten düşük olmasına rağmen etanol miktarları, hücre başına üretilen etanol miktarları ve hücre başına üretilen etanol miktarlarının FBR5 suşuna göre artışının %100'ün üzerinde olduğu tespit edilmiştir. AHB ve BHB'de; ananas atığı ve seyreltik asit oranları farklı olup her iki hidrolizatta da % 0.5'lik H₂SO₄ kullanılmıştır. İki hidrolizat çeşidi arasındaki tek farklı parametre ise sulandırma oranları olmuştur. Bu durum A hidrolizatının B hidrolizatından %18 daha fazla şeker oranına sahip olmasına ve oluşan toplam inhibitör miktarının da A hidrolizatında 2 kat fazla olmasına neden olmuştur. A ve B hidrolizatlarının her ikisinde de ortaya çıkan inhibitörlerden en yüksek konsantrasyona sahip olan inhibitörün formik asit olduğu tespit edilmiştir. Formik asit konsantrasyonunu sırasıyla asetik asit, HMF ve furfural konsantrasyonu takip etmektedir.

CHB'de FBR5 suşuyla 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda üreme ve etanol üretimi gözlemlenmemiştir. TS3 ve TS4 suşlarıyla üretilen etanol miktarları %0.5 (v/v)'den düşük olduğu belirlendi; yine de etanol, hücre başına üretilen etanol ve hücre başına üretilen etanol miktarlarının FBR5 suşuna göre artışının %100'ün üzerinde olduğu tespit edilmiştir. CHB'de ortaya çıkan toplam inhibitör içeriğinin A hidrolizatındaki toplam inhibitör içeriğinden %38.5, B hidrolizatındakinden ise yaklaşık iki kat fazla olduğu belirlenmiştir. A ve B hidrolizatlarından farklı olarak C hidrolizatında inhibitör madde olarak en fazla asetik asit bulunmaktadır. Asetik asit konsantrasyonunu takiben HMF, formik asit ve furfural açığa çıkmıştır.

A ve B hidrolizatlarında en fazla formik asit oluşurken, C hidrolizatında asetik asit olmuştur. Asetik asit H_2SO_4 ile reaksiyona girdiğinde sülfat grubu, metan ve formik asit oluşturmaktadır. Kısaca asetik asit formik asitten daha fazla karbon sayısına sahiptir ve yıkımı esnasında etanol üretimini teşvik edici sülfat grubu da açığa çıkmaktadır. Asetik asit, formik asite göre daha az inhibe edici etki göstermektedir [Leonard and Hajny, 1945]. Bu sebepten CHB ortamında, inhibitör miktarının fazla olmasına rağmen AHB ve BHB'ye göre TS3 ve TS4 suşlarıyla daha fazla etanol üretilmesinin nedeni olarak inhibitör konsantrasyon farkı olabileceği düşünülmüştür.

DHB'de TS4 suşuyla yapılan deneylerde FBR5 suşuna göre etanol artış (%) değeri 24 saat sonunda %29, 48 saat sonunda ise %28 olduğu belirlenmiştir. TS4 suşuyla yapılan deneylerde hem 24, hem de 48 saatlik inkübasyon sonunda; FBR5 suşuyla yapılan deneylere göre daha fazla etanol üretilmesinin, TS4 suşundaki yüksek kopya sayılı *vgb* geninin varlığından kaynaklandığı düşünülmüştür [Tsai et al., 1996; Frey et al., 2001; Sanny et al., 2010].

D hidrolizatının az miktarda inhibitör ve yüksek oranda şeker içeren hidrolizatlardan biri olduğu tespit edilmiştir. Tüm suşlarla yapılan deneylerde en yüksek üreme ve etanol üretimi DHB'de görüldüğünden temel besiyeri olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda AHB, BHB ve CHB'ye kıyasla DHB'de *E.coli* suşları ile toplam hücre miktarının 12 kat arttığı, benzer şekilde etanol üretiminin 238 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. AHB, BHB ve CHB'de başlangıç şekeri kullanım oranı en yüksek %42 iken, DHB'de başlangıç şekerinin neredeyse tamamı (%97.4) suşlar tarafından kullanılarak alkol üretimi sağlanmıştır. Yüksek oranda inhibitör içeren AHB ve CHB'de, başlangıç şekerinin yaklaşık yarısının tüketilmesi, açığa çıkan inhibitör maddelerin bakteriyel metabolizma faaliyetlerini olumsuz etkilemesinden ileri gelebilir.

A hidrolizatı D hidrolizatının yedi katı; B hidrolizatı D hidrolizatının iki katı, C hidrolizatı D hidrolizatının on katı ve D1 hidrolizatı D hidrolizatının iki buçuk katı toplam inhibitör içermektedir (Tablo 4.2). D hidrolizatından daha yüksek oranda fazla olacak şekilde şeker içeren bu hidrolizatların, aynı zamanda yüksek oranda inhibitör içermesi; DHB'de tüm suşlarla yapılan inkübasyonlar sonunda elde edilen en iyi üreme miktarı ve en yüksek etanol üretiminin nedenini açıklamaktadır. Ayrıca D hidrolizatında ağırlıklı olarak açığa çıkan inhibitörün asetik asit olması yüksek

miktarda üreme ve etanol üretimiyle ilişkilendirilebilir. Bu ilişki, asetik asitin belli konsantrasyonlara kadar üreme ve etanol üretimini teşvik etmesi; HMF, furfural ve formik asite göre daha zayıf bir inhibitör olması sebebiyle kurulmuştur [Taherzadeh et al., 1997].

Antonio ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir çalışmada, hidroliz edilmiş ananas kabuğu atıklarıyla hazırlanan besiyerinde *S. cerevisiae* ile yapılan inkübasyon sonucunda 72.05 g/l etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Choonut ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada (2014) enzimatik hidroliz yapılmış ananas kabuğu atıkları, maltoz, dekstroz ve LB içeren zengin bir besiyerinde *S. cerevisiae* ile 9.69 g/l, aynı besiyerinde *Enterobacter aerogenes* ile 1.38 g/l etanol üretildiği belirlenmiştir.

Silva ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada, rekombinant *E. coli* KO11 suşu kullanılmış ve farklı sukroz konsantrasyonlarındaki etanol üretim miktarları araştırılmıştır. Bu çalışmada, %8 (w/v) sukroz içeren LB besiyerinde, en çok 17 g/l etanol üretildiği belirtilmiştir. Akbaş ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada; sukroz monomerleri (glukoz; % 1.2 w/v ve fruktoz; % 1.2 w/v), LB materyali (maya özütü ve pepton), vitamin ve mineral ilave edilerek hazırlanmış zengin melas hidrolizat (MH) besiyeriyle bir litrelik ölçekte elde edilen en yüksek etanol miktarının ise 16.45 g/l olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında, çok daha etkin bir şekilde sukroz monomerleri (glukoz; %1.78 w/v ve fruktoz; % 1.78 w/v) ve sadece % 0.5 (w/v) maya özütü içeren DHB’de küçük ölçekte üretilen en yüksek etanol miktarı 16.73 g/l ve büyük ölçekte 19 g/l olarak belirlenmiştir. *E. coli* TS4 suşuyla DHB’deki etanol üretiminin; bazı besiyerlerinde *S. cerevisiae* dahil, *E. coli* KO11 ve *Enterobacter aerogenes* ile zengin besiyerlerinde üretilen etanol miktarından fazla olduğu; hatta zenginleştirilmiş melas hidrolizat besiyerinde *E. coli* TS4 suşu ile üretilen etanol miktarından da fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bu verilerin ışığında; DHB’de TS4 suşuyla etanol üretiminde, besiyerine pepton, vitamin gibi organik maddeler; mineral gibi inorganik maddeler ilave edilmemesine rağmen; üretilen etanol miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum ananas atıklarının etanol üretimi için potansiyel bir ham madde kaynağı olabileceğini ve DHB’de etanol üretiminde VHB ekspresyonu yapan TS4 suşunun önemini göstermiştir.

HCl ile yapılan hidroliz işlemi sonrasında C, D ve D1 hidrolizatlarında daha çok asetik asit; H₂SO₄ ile hidroliz işlemi sonrasında A, B, E, F, G, H ve I hidrolizatlarında daha çok formik asit açığa çıktığı belirlenmiştir. Asetik asit (CH₃COOH) formik asitten (HCOOH) daha az toksik olduğundan ve yapısında daha çok karbon ihtiva ettiğinden dolayı, mikroorganizmalarca belli konsantrasyonlara kadar karbon kaynağı olarak kullanılabilir [Taherzadeh M.J. et al., 1997]. Bu veriler ışığında % 0.5 HCl uygulamasının ananas atığı hidrolizi için daha uygun olduğu düşünülmüştür.

D1HB’de tüm suşlarla yapılan deneylerin sonuçları, DHB’de yapılan deneylerle benzerlik göstermektedir. D1HB’nin tek farkı ananas atığı oranının DHB’den iki katı olmasıdır. D1HB’nin en yüksek miktarda şeker ihtiva eden (% 4.85) besiyeri olmasına rağmen, DHB’deki kadar etkin etanol üretimi gözlenmemesinin nedeninin; ortaya çıkan inhibitör içeriğinin toplamda D hidrolizatının üç katı miktarda olması ve bu içeriğin büyük bir kısmını formik asitin oluşturması olduğu düşünülmüştür. D1 hidrolizatındaki formik asit miktarının D hidrolizatına göre 33 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu verilerin ışığında; etanol üretim kapasitesinin başlangıç şekerinin yanı sıra ortamdaki inhibitör türü ve konsantrasyonuna bağlı olabileceği tahmin edilmektedir.

D1HB’de TS3 suşuyla yapılan deneylerde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda, FBR5 suşuna göre etanol üretiminde artış görülmemiştir. 24 saat sonunda TS4 suşunun FBR5 suşuna göre etanol artışı %57 olarak belirlense de, üretilen etanol miktarı az olduğu için bu artış değeri etkin etanol üretimi olduğu anlamına gelmemektedir (Tablo 4.4 Tablo 4.5). TS4 suşuyla yapılan deneyde, 48 saat sonunda FBR5 suşuna göre etanol üretiminde artış görülmemesinin, 24 saat sonunda başlangıç şekerinin %94’ünün tüketilmiş olmasıyla ilgisi olduğu tahmin edilmektedir (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

Tüm suşlarla yapılan inkübasyonlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarı en yüksek D1HB’de tespit edilmiştir. Ancak üreme ve etanol üretimi açısından DHB’nin gerisinde kaldığından, D1HB’ de belirlenen hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları, etanol üretimi açısından net bir bilgi vermemiştir.

DHB’de büyük ölçekli inkübasyon ortamında üretilen etanolün küçük ölçekli inkübasyon ortamında üretilen etanol miktarına göre; FBR5 ve TS3 suşlarıyla

yapılan deneylerde %15 ve TS4 suşuyla yapılan deneyde %7.5 fazla olduğu belirlenmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak; büyük ölçekte etanol üretiminin arttığı ve bu denemelerin sanayiye uyarlanabilmesi için uygun olacağı düşünülmüştür.

Büyük ölçekli inkübasyon ortamında yapılan deneylerde 24 ve 48 saat sonunda üretilen etanol miktarlarının ve birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarının en çok olduğu suşun TS4 olduğu belirlenmiştir. Aynı inkübasyon koşullarında, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan deneylerde, FBR5 suşuna göre birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarlarının artması her iki suşta bulunan VHb ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir [Frey and Kallio, 2003; Khosla and Bailey, 1988; Sanny et al., 2010] (Şekil 4.10). ATP üretiminin özellikle düşük oksijenli koşullarda arttığı ve böylece etanol üretiminin de VHb ekspresyonu ile arttığı belirlenmiştir [Park et al., 2002].

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada; LB ve % 8 (w/v) glukoz içeren besiyerinde mikroaerobik koşullarda TS3 suşuyla üretilen etanol miktarının FBR5 suşuyla üretilenden fazla (%15-56) olduğu belirlenmiştir ve bu durum TS3 suşuna klonlanmış *vgb* geniyle ilişkilendirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise; Arnaldos ve arkadaşları (2012), mısır atığı hidrolizatına ek olarak ksiloz ve glukozla desteklenmiş besiyerinde en fazla etanol üretiminin TS3 suşuyla yapılan fermentasyon sonucu elde edildiğini belirtmiştir.

Bu tez çalışmasında, TS4 suşuyla birim hücre başına üretilen etanol miktarının FBR5 suşuna göre artışının; TS3 suşuyla yapılan deneylerdekinin iki katı olması, TS4 suşunun TS3 suşuna göre daha yüksek *vgb* kopya sayısına sahip olmasıyla ilişkilendirilmiştir [Dikshit and Webster 1988; Sanny et al., 2010; Sumer vd., 2015].

Tez çalışmasında TS3 *vgb* (+) ve TS4 *vgb* (+) suşlarının eksprese ettiği bakteriyel hemoglobin (VHb) miktarları, hem hidrolizatlı besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde, hem de hidrolizatlı besiyerlerinde belirlenmiştir. Yüksek şeker oranına sahip hidrolizatlı besiyerleri (AHB, BHB, CHB, DHB ve D1HB) içerisinde, büyük ve küçük ölçekte, VHb ekspresyonu en çok DHB'de görülmüştür. TS4 suşuyla yapılan inkübasyonda eksprese edilen VHb miktarının, TS3 suşuyla yapılan inkübasyonda eksprese edilen VHb miktarından 10 kat fazla olması; TS4 suşunun TS3 suşuna göre daha fazla sayıda *vgb* kopyası içermesiyle ilişkilendirilmiştir [Dikshit and Webster 1988; Sanny et al., 2010]. Farklı hidrolizatlı besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde yapılan inkübasyonlarda

ise, TS3 ve TS4 suşlarının birbirine yakın miktarlarda VHB eksprese ettiği belirlenmiştir. Hidrolizatlı besiyerlerinin içerdiği oranda şeker içeren besiyerlerinde TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan inkübasyonlarda eksprese edilen VHB miktarlarının yakın olmasına rağmen; hidrolizatlı besiyerlerinde bu durumun tam tersi olması, VHB ekspresyonunun inhibitör madde varlığında uyarılmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Nigam (1999)'ın yaptığı bir çalışmada (1999), konserve ananas atıkları ile hazırlanan besiyerinde *S. cerevisiae* ile yapılan inkübasyonda fermentasyon etkinliğinin en çok %92.5 olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, küçük ve büyük ölçekteki fermentasyon etkinliklerinin, tüm suşlarda %72-105 aralığında olması nedeniyle; ananas atıklarından biyoetanol üretiminde kullanılan etanolojenik *E. coli* suşları FBR5, TS3 ve TS4'ün *S. cerevisiae*'ye alternatif olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

En yüksek fermentasyon etkinliğinin büyük ölçekli ortamda, 48 saat süre sonunda TS4 suşuyla yapılan fermentasyon ortamında görülmesi, yapılan çalışmanın büyük ölçekte sanayiye uygulanabilirliğini göstermektedir.

Duarte ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada, *S. cerevisiae*'de alkol fermentasyonunda glukozun % 51 (w/v)'inin etanole dönüştüğü ifade edilmiştir. Tez çalışmasında alkol verimi değerleri %38-55 aralığında belirlenerek çalışmadaki alkol verimi değerlerine yakın ve daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun ananas atığının ihtiva ettiği zengin inorganik ve organik madde kompozisyonu ve besiyerlerine eklenen %0.5 (w/v) maya özütüyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Belirlenen fermentasyon etkinliği değerleri, hem atıkların değerlendirilmesi, hem de çalışmanın sanayiye uyarlanabilirliği açısından umut vaat etmektedir.

Bu tez çalışmasında ananas kabuklarından farklı hidrolizatlar ve bu hidrolizatları içeren on farklı besiyeri hazırlanmıştır.

Bu hidrolizatlı besiyerleri içerisinde en fazla etanol üretimi % 1.82 (w/v) fruktoz, % 1.74 (w/v) glukoz içeren DHB'de belirlenmiştir.

Etanol üreticisi *E. coli* FBR5 ile VHB ekspresyonu yapan TS3 ve TS4 suşlarının 48 saat süresince ürettikleri etanol miktarları belirlenmiştir. Sonuç olarak en fazla etanol üretiminin % 1.82 (w/v) fruktoz, % 1.74 (w/v) glukoz içeren DHB'de, büyük ölçekte VHB ekspresyonu yapan TS4 suşu ile 2.41 (v/v) olduğu; fermentasyon veriminin %53.2, fermentasyon etkinliğinin ise %105 olduğu ve VHB

ekspresyonunun birim hücre başına etanol üretimini % 36 kadar arttırdığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında VHB ekspresyonu yapan *E. coli* suşları ile meyve sanayi atığı olan ananas kabuğu atığı hidrolizatından etanol üretiminin artırılmasına çalışılmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen veriler fermentör ortamında önce pilot ölçekte ve daha kontrollü bir ortamda gerçekleştirilmesi, daha sonra da sanayide uygulanması için ümit vericidir.

Bu çalışmanın sanayiye uygun şekilde fermentör gibi kontrollü ortam şartlarında gerçekleştirilmesi sonucunda daha yüksek etanol üretiminin sağlanacağı düşünülmektedir. Ayrıca besi ortamı farklı meyve atığı hidrolizatları ile karıştırılarak hazırlanıp etanol üretiminin ne şekilde etkilendiği gelecek çalışmalarda araştırılabilecek konular arasında sayılabilir.

KAYNAKLAR

Abanoz K., Stark B. C., Akbas M. Y., (2012), “Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla haemoglobin*”, *Letters in Applied Microbiology*, 55 (6), 436–443.

Adler E., (1977), “Lignin chemistry – past, present and future”, *Wood Science Technology*, 11, 169–218.

Agietos J. M., Vallejo J. A., Veiga-Crespo P., Villa, T. G., (2011), “Oily yeasts as oleaginous cell factories.”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1219-1227.

Ahokas M., Välimaa A. L., Lötjönen T., Kankaala A., Taskila S., Virtanen E., (2014), “Resource assessment for potato biorefinery: side stream potential in Northern Ostrobothnia.”, *Agronomy Research*, 12, 695–704.

Akbas M. Y., Sar T., Ozcelik B., (2013), “Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla hemoglobin* expressing *Escherichia coli*”, *Microbiology & Fermentation Technology*, 78 (4), 687-694.

Akbas M. Y., Stark B., (2016), “Recent trends in bioethanol production from food processing by products”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43 (11), 1593–1609.

Alain K., Georges A. N., Aka Y., (1987), “Ethanol production from pineapple cannery juice in Co’te d’Ivoire with preselected yeast strains”, *Journal of Fermentation Technology*, 65, 475–481.

Alfani F., Gallifuoco A., Saporosi A., Spera A., Cantarella M., (2000), “Comparis on of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw.”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 184–192.

Almeida J.R., Bertilsson M., Gorwa-Grauslund M.F., Gorsich S., Lidén G., (2009), “Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 625–638.

Alothman M., Bhat R., Karim A. A., (2009), “Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents”, *Food Chemistry*, 115, 785-788.

Anand A., Duk B. T., Singh S., Akbas M. Y., Webster D. A., Stark B. C., Dikshit K. L., (2010), “Redox mediated interactions of *Vitreoscilla hemoglobin* (VHb) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress.” *Bioresource Technology*, 426, 271–280.

- Dela Cruz A. A. C., D. R. Antonio R. M., Quinto Jr. A. S., Cordero P. R., Dimaano M. N., (2010), "A Study on Some Efficient Parameters in Batch Fermentation of Ethanol Using *Saccharomyces cerevisiae* SC1 extracted from Fermented Siahe Sardasht Pomace.", *African Journal of Biotechnology*, 9 (20), 2906-2912.
- Babel S., Fukushi K., Sitanrassamee B., (2004), "Effect of acid speciation on solid waste liquefaction in an anaerobic acid digester", *Water Research*, 38, 2417-2423.
- Babu B. R., Rastogi N. K., Raghavarao K. S. M. S., (2008), "Liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system", *Chemical Engineering and Processing*, 47, 83-89.
- Balat M., (2011), "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review", *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.
- Balat M., Balat, H., Öz, C., (2008), "Progress in bioethanol processing.", *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551–573.
- Ban-Koffi L. and Han Y. W., (1990), "Alcohol production from pineapple waste", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 281- 284.
- Cabrera H. A. P., Menezes H. C., Oliveira J. V. and Batista R.F.S., (2000), "Evaluation of residual levels of benomyl, methylparathion, diuron, and vamidothion in pineapple pulpand bagasse (Smooth cayenne).", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5750-5753.
- Cantarella M., Cantarella L., Gallifuoco A., Spera A., Alfani F., (2004), "Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF" *Biotechnology Progress*, 20, 200–206.
- Chen W., Hughes D. E., Bailey J. E., (1994), "Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.", *Biotechnology Progress*, 10, 308–313.
- Choonut. A., Saejong M., Sangkharak K., (2014), "The Production of Ethanol and Hydrogen from Pineapple Peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*", *Energy Procedia*, 52, 242-249.
- Chum, H. L., Zhang Y., Hill J., Tiffany, D. G., Morey R. V., Goss Eng A., Haq Z., (2014), "Understanding the evolution of environmental and energy performance of the U.S. corn ethanol industry: evaluation of selected metrics." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(2), 224–240.
- Chye T. T., Meng L. C, (1975), "Industrial alcohol from pineapple waste", *Singapore National Academy of Science.*, 4, 152–154.

- Classen P. A. M., Sijistsma L., Stams A. J. M., Deveries S. S., Westhuls R. A., (1999), "Utilization of the biomass for the supply of energy carries.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755.
- Correia R. T. P., McCue P., Vattem D. A., Magalhaes M. M. A., Macedo G. R., Shetty K., (2004b), "Amylase and Helicobacter pylori inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bioprocessed by Rhizopus oligosporus", *Journal of Food Biochemistry*, 28, 419-434.
- Cotta M. A., (2012), "Ethanol production from lignocellulosic biomass by recombinant Escherichia coli strain FBR5", *Bioengineered*, 3 (4), 197-202.
- Dacera D. D. M., Babel S., (2008), "Removal of heavy metals from contaminated sewage sludge using Aspergillus niger fermented raw liquid from pineapple wastes", *Bio-resource Technology*, 99, 1682-1689.
- Dacera D. D. M., Babel S., Parkpian P., (2009), "Potential for land application of contaminated sewage sludge treated with fermented liquid from pineapple wastes", *Journal of Hazardous Materials*, 167, 866-872.
- David P., Marklein A., Toth M. A., Marissa K., Gillian S. P., McCormack R., Joanna K., Krueger T., (2008), "Biofuel Impacts on World Food Supply: Use of Fossil Fuel, Land Water Resources Energies", 1(2), 41-78.
- DeMaio R. A., Webster D. A., Chance B., (1983), "Spectral evidence for the existence of a second cytochrome o in whole cells of Vitreoscilla.", *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 13768-13771.
- Demirbas A., (2006), "Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol.", *Energy Conversion and Management*, 43, 2349-2356.
- Dien, B. S., Nichols N. N., O'Bryan P.J., Rodney B. J., (2000), "Development of new ethanologenic Escherichia coli strains for fermentation of lignocellulosic biomass.", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84, 181-196.
- Dodic S., Popov S., Dodic J., Rankovic J., Zavargo Z., Mucibabic R. J., (2009), "Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing." *Biomass Bioenergy*, 33, 822-827.
- Drapcho C. M., Nhuan N. P., Walker, T. H., (2008), "Biofuels Engineering Process Technology." McGraw-Hill Companies, Inc., United States.
- Dunlop A. P., (1948), "Furfural formation and behaviour", *Industrial and Engineering Chemistry*, 40 (2), 204-209.
- Farrell A. E., Plevin R. J., Turner B. T., Jones A. D., O'Hare, M., Kammen D. M., (2006), "Ethanol can contribute to energy and environmental goals." *Science*, 311 (5760), 506-508.

Fengel D., Wenger G., (1989), "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions", 1th Edition Walter De Gruyter.

Frey A. D., Kallio P. T., (2003), "Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology", FEMS Microbiology Review, 27, 525–545.

Galbe M., Zacchi G.,(2007), "Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production.", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 108(1), 41-65.

Ghorbani F., Younesi H., Sari A. E., Najafpour G., (2011), "Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*.", Renewable Energy, 36, 503-509.

Goh C. S., Tan K. T., Lee K. T., Bhatia S., (2010), "Bio-ethanol from lignocellulose: Status perspectives and challenges in Malaysia.", Bioresource Technology, 101(13), 4834-4841.

Grassi G., (2000), "Bioethanol – Industrial world perspectives.", Renewable Energy World, 3(3), 86-98, 90, 92-97.

Gupta P., Maqbool T., Saleemuddin M., (2007), "Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 45, 78-83.

Gutiérrez T., Buszko M. L., Ingram L. O., Preston J. F., (2002), "Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose" Applied Microbiology and Biotechnology, 98–100, 327–340.

Gutiérrez T., Ingram L. O., Preston J. F., (2006), "Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1—an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production." Journal of Biotechnology, 121, 154–164.

Hameed B. H., Krishni R. R., Sata S. A., (2009), "A novel agricultural waste adsorbent for the removal of cationic dye from aqueous solutions", Journal of Hazardous Materials, 162, 305-311.

Hardison R. C., (1996), "A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 93, 5675–5679.

Hebbar H. U., Sumana B., Raghavarao K. S. M. S., (2008), "Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes.", Bioresource Technology, 99, 4896-4902.

Hiroshi N., Glazer A., (1995), "Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.", Freeman and Company, New York.

Hong Y. T., Chang K. C., Chien C. C., Wei Y. H., Sun Y. M., Soo P. C., (2010), "Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and vgb genes controlled by arabinose P-BAD promoter in *Escherichia coli*.", *Letters in Applied Microbiology*, 50, 158–167.

Hossain A. B. M. S., Fazlily A. R., (2010), "Creation of alternative energy by bio-ethanol production from pineapple waste and the usage of its properties for engine", *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 813-819.

Hu G., Heitmann J. A., Rojas O. J., (2008), "Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues." *Bioresource Technology*, 3(1), 270-294.

Hu C., Zhao X., Zhao J., Wu S., Zhao Z.K., (2009), "Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*.", *Bioresource Technology*, 100, 4843-4847.

Ingram L. O., Conway T., (1988), "Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*.", *Applied and Environmental Microbiology* 54(2), 397-404.

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

Janssens J. H., Bernard A. C., Bailey R. B., (1984), "Ethanol from whey: continuous fermentation with cell recycle." *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1–5.

Joshi M., Mande S., Dikshit K. L., (1998), "Hemoglobin biosynthesis in *Vitreoscilla stercoraria* DW: cloning, expression, and characterization of a new homolog of a bacterial globin gene", *Applied Environmental Microbiology*, 64(6), 2220-2228.

Khosla C, Bailey J. E., (1988), "Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*." *Nature*, 331, 633–635.

Khosla C., Bailey J. E., (1989), "Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*.", *Journal of Bacteriology*, 171, 5995–6004.

Klinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K., (2004), "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (1), 10–26.

Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S., (1993), "Transcriptional regulation of cAMP and its receptor protein.", *Annual Review of Biochemistry*, 62, 749–795.

Koskinen P. E. P., Beck S. R., Orlygsson J., Puhakka J. A., (2008), "Ethanol and hydrogen production by two thermophilic, anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas.", *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 679-690.

Kumar D., Jain V. K., Shanker G., Srivastava A., (2003), "Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation", *Process Biochemistry*, 38, 1725-1729.

Kurosumi A., Sasaki C., Yamashita Y., Nakamura Y., (2009), "Utilization of various fruit juice as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693", *Carbohydrate Polymers*, 76, 333-335.

Lane A. G., (1984), "Laboratory scale anaerobic digestion of fruit and vegetables solid waste", *Biomass*, 5, 245-259.

Larrauri J. A., Ruperez P., Calixto F. S., (1997), "Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols" *J Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4028-4031.

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N., Jonsson L. J., (1999a), "Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce.", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, 91-103.

Leiper K. A., Schlee C., Tebble I., Stewart G. G., (2006), "The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol." *Journal of the Institute of Brewing*, 112, 122-133.

Lewkowski J., (2001), "Synthesis, chemistry and applications of 5-Hydroxymethyl-furfural and its derivatives." *Arkivoc*, 1, 17-54.

Li, Q., Du, W., Liu, D.H., (2008), "Perspectives of microbial oils for biodiesel production.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 749-756.

Lin J.M., Stark B.C., Webster D.A., (2003), "Effects of *Vitreoscilla* hemoglobin on the 2, 4-dinitrotoluene (DNT) dioxygenase activity of *Burkholderia* and on DNT degradation in two-phase bioreactors.", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 362-368.

Linden T. M., Hahn-Hagerdal B., (1989), "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates with yeast and xylose isomerase.", *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 119-123.

Mainoo N. O. K., Barrington S., Whalen J. K., Sampedro L., (2009), "Pilot-scale vermin-composting of pineapple wastes with earthworms native to Accra, Ghana", *Bioresource Technology*, 100, 5872-5875.

Maiorella B., Blanch H. W., Wilke C.R., (1983), "By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 103-121.

- Meral R., Kanberoğlu G., (2012), "Tahıllardan Etanol Üretimi", Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(3), 61-68.
- Merino S. T., Cherry J., (2007), "Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(1), 95-120.
- Mino A. K., (2008), "Ethanol production from sugarcane in India: Viability, constraints and implications", Thesis of Doctorate, University of Illinois at Urbana.
- Modig T., Lidén G., Taherzadeh M. J., (2002), "Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase." *Biochemical Journal*, 363, 769–776.
- Mohagheghi A., Ruth M., Schell D., (2006), "Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields." *Process Biochemistry*, 41, 1806–1811.
- Moon, H. C., Jeong, H. R., Kim D. H., (2012), "Bioethanol production from acid-pretreated rice hull." *Asia Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, 206-211.
- Morton J., (1987), "Fruits of Warm Climates", Creative Resource Systems, Inc.
- Mumm R. H. , Goldsmith P. D., Rausch K., Stein H.H, (2014), "Land usage attributed to corn ethanol production in the United States: Sensitivity to technological advances in corn grain, ethanol conversion, and co-product utilization." *Biotechnology for Biofuels*, 7 (61), 1-17.
- Mussatto S. I., Roberto I. C., (2004), "Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review." *Bioresource Technology*, 93, 1–10.
- Mussatto S. I., Dragone G., Guimaraes P. M. R., Silva J. P. A., Carneiro L. M., Roberto I. C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J. A., (2010), "Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production." *Biotechnology Advances*, 28(6), 1873-1899.
- Nie H., Shubai L., Zhou Y., Chen T., He Z., Su S., Zhang H., Xue Y., Zhu L., (2008), "Purification of bromelain using immobilized metal affinity membranes" Abstract published in *Journal of Biotechnology*, 136(S), S402-S459.
- Nigam J. N., (1999b), "Continuous cultivation of the yeast *Candida utilis* at different dilution rates on pineapple cannery waste", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 115- 117.
- Nigam J. N., (1999a), "Continuous ethanol production from pineapple cannery waste", *Journal of Biotechnology*, 72, 197-202.

Nigam J. N., (1999), "Continuous ethanol production from pineapple cannery waste", *Journal of Biotechnology*, 72(3), 197–202.

Nigam P. S., Sing A., (2011), "Production of liquid biofuels from renewable resources." *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52–68.

Nunes M. C. N., Emond J. P., Rauth M., Dea S., Chau K. V., (2009), "Environmental conditions encountered during typical consumer retail display affect fruit and vegetable quality and waste", *Postharvest Biology and Technology*, 51, 232-24.

Oliveira A. C., Valentim I. B., Silva C. A., Bechara E. J. H., Barros M. P., Mano C. M., Goulart M. O. F. G., (2009), "Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues", *Food Chemistry*, 115, 469-475.

Olsson L., Hahn-Hägerdal B., (1996), "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production", *Enzyme and Microbial Technology*, 18(5), 312-331.

Paepatung N., Nopharatana A., Songkasiri W., (2009), "Biomethan-potential of biological solid materials and agricultural wastes.", *Asian Journal on Energy & Environment*, 10, 19-27.

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

Palmqvist E. Q., Meinander N., Grage H., Hahn-Hägerdal B., (1999), "Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts." *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 46–55.

Parawira W., Tekere M., (2011), "Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review", *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), 20-31.

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.", *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 33334–33337.

Patterson W., (1994), "Power from Plants.", Earthscan Publications Ltd: London.

Poole R. K., Anjum M. F., Membrillo-Hernández J., Kim S. O., Hughes M. N., Stewart V., (1996), "Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12", *Journal of Bacteriology*, 178, 5487–5492.

Porro D., Martegani E., Ranzi B. M., (1992), "Lactose/whey utilisation and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells.", *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 799–805.

Potts M., Angeloni S. V., Ebel R. E., Bassam D., (1992), "Myoglobin in a cyanobacterium.", *Science* 256, 1690–1691.

Prema V., Sumithra D. S., Krishna N., (1992), "Anaerobic digestion of fruit and vegetable processing wastes for biogas production", *Bioresource Technology*, 40, 43-48.

Prior B. A., Lategan P. M., Botes P. J., Potgieter H. J., (1980), "Ethanol production from pineapple cannery effluent", *Journal of South African Food Review*, 71, 120–123.

Ramandeep H. 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, 24781–24789.

Razmovski R., Vučurović V., (2012), "Bioethanol production from sugarbeet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue." *Fuel*, 92, 1–8.

Reddy L. V., Reddy O. V. S., Wee Y. J., (2011), "Production of ethanol from mango (*Mangifera indica* L.) peel by *Saccharomyces cerevisiae* CFTRI101." *African Journal of Biotechnology*, 10, 4183-4189.

Renewable Fuels Association (RFA), *Accelerating Industry Innovation–2012 Ethanol Industry Outlook*, Retrieved 18 March, 3, 8, 10, 22, 23.

Rosillo-Calle F., Walter A., (2006), "A global market for Bioethanol: Historical trends and future prospects.", *Energy Sustainable Development*, 10(1), 20-32.

Saka S., (1991), "Chemical composition and Distribution.", Dekker, New York, 3–58.

Sakai S., Tsuchida, Y., Nakamoto, H., Okino, S., Ichihashi, O., Kawaguchi, H., Yukawa, H., (2007), "Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth arrested *Corynebacterium glutamicum*" *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2349-2353.

Sánchez O. J., Cardona C. A., (2008), "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." *Bioresource Technology*, 99, 5270–5295.

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

Sasaki K., Watanabe M., Tamaka T., (2002), "Biosynthesis biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 23-29.

Schieber A., Stintzing F. C., Carle R., (2001), "By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments", *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.

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

Spiro S., Guest J. R., (1990), "FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *E. coli*.", *FEMS Microbiology. Review*, 75, 399-428.

Sruamisri S., (2007), "Agricultural wastes as dairy feed in Chiang Mai", *Animal Science Journal*, 78, 335-341.

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

Stark B. C., Dikshit K. L., Pagillac K.R., (2012), "The biochemistry of *Vitreoscilla* hemoglobin", *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210002.

Stark B. C., Urgun-Demirtas M., Pagilla K. R., (2008), "Role of hemoglobin in improving biodegradation of aromatic contaminants under hypoxic conditions." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15, 181-189.

Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Baipai R., (2010), "Microbial lipids from renewable resources: production and characterization.", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1271 - 1287.

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

Sun, Y., Cheng, J., (2002), "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review.", *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

Şar T., Akbaş M. Y., (2016), "Biyoeanol üretimi için gıda işleme atıklarının asit hidrolizi", *Akademik Gıda* 14(1), 15-20.

Taherzadeh M. J., Gustafsson L., Niklasson C., Lidén G., (1999), "Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 169-174.

Tanaka K., Hilary Z. D., Ishizaki A., (1999), "Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*", 87(5), 642-646.

Tinoi J., Rakariyatham N., (2015), "Utilization of pineapple waste hydrolysate for lipid production by oleaginous yeast *Rhodoturula glutinis*", International Journal of Advanced Research (IJAR), 3(3), 1233-1243.

Tropea A., Wilson D., La Torre L. G., La Curto R.B., Saugman P., Troy-Cavies P., Dugo G., Waldron K. W., (2014), "Bioethanol production from pineapple wastes", Journal of Food Research, 3(4), 60-70.

Ueno T., Ozawa Y., Ishikawa M., Nakanishi, K., Kimura T., (2003), "Lactic acid production using two food processing wastes, canned pineapple syrup and grape invertase as substrate and enzyme", Biotechnology Letters, 25, 573-577.

Ulbricht R. J., Sharon J., Thomas J., (1984), "A review of 5-hydroxymethylfurfural HMF in parental solutions", Fundamental and Applied Toxicology., 4 (1984), 843-853.

Unal H., Alibas K., (2007), "Agricultural Residues as Biomass Energy. Energy Sources", Part B: Economics, Planning, and Policy, 2, 123- 140.

Upadhyay A., Lama J. M., Tawata S., (2010), "Utilization of Pineapple Waste: A Review", Journal of Food Science and Technology Nepal, 6, 10-18.

Urgun-Demirtas M., Pagilla K .R., Stark B. C., (2004), "Enhanced kinetics of genetically engineered *Burkholderia cepacea*: role of vgb in the hypoxic co-metabolism of 2-CBA." Biotechnology and Bioengineering, 87, 110-118.

Vaitheki S., Deepa B., (2016), "A Comparative Study on the Production of Bioethanol from Individual and Mixed Fruit Wastes", Imperial Journal of Interdisciplinary Research, 2(5), 652-656.

Vinogradov S. N., Hoogewijs D, Bailey X, Arredondo-Peter R, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren J.R., (2006), "A phylogenomic profile of globins." BMC Evolutionary Biology Journal, 6, 31.

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

Wang C. H., Lin P. J., Chang J. S., (2006), "Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge", Process Biochemistry, 41, 1353- 1358.

Web 1, (2017), <http://www.konyaseker.com.tr/tr/icerik/detay/2085/biyoetanol-uretim-tesisi>, (Erişim Tarihi: 09/02/2017).

Web 2, (2015), <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-EthanolProduction> (Erişim Tarihi: 24/08/2015).

Webster D. A., (1987), "Structure and function of bacterial haemoglobin and related proteins. in Advances in inorganic biochemistry", *Advances in Inorganic Chemistry*, 7, 245–265.

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

Wu ., Wang H., Sun Y., Wu Q., Feng L., Zhang Z., Yang Q., Yang G., (2007), "Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Saccharopolyspora erythraea* and its effect on erythromycin production. *Zhongguo Kangshengsu Zahzi*, 32, 599–601.

Wyman C. E., (1996), "Handbook on ethanol: production and utilization.", Bristol, Paris, France: Tylor & Francis.

Wyman C. E., Hinman N. D., (1990), "Ethanol: Fundamentals of ethanol production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24/25, 735–753.

Xie W. D., Xing D. M., Sun H., Wang W., Ding Y., Du L. J., (2005), "The effects of *Ananas comosus* L. leaves on diabeticdyslipidemic rats induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet", *The American Journal of Chinese Medicine*, 33, 95-105.

Xie W., Wang W., Su H., Xing D., Pan Y., Du L., (2006), "Effect of ethanolic extracts of *Ananascomosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143, 429-435.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., (2001), "Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 17–34.

Zhang L., Li Y., Wang Z., Xia Y., Chen W., Tang K., (2007), "Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin applications in metabolic engineering", *Biotechnology Advances*, 25, 123–136.

Zhang Y. H., Ding S. Y., Mielenz J. R., Cui J. B., Elander R. T., Laser M., (2007), "Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions.", *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 214–223.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Gökçe ERMAN, 28 Şubat 1992'de Isparta'da doğdu. 2010 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü Tam Burslu olarak kazandıktan sonra 2012 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne yatay geçiş yaptı. 2015 yılının Eylül ayında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.