

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL HEMOGLOBİNİN
SÜREKLİ BİYOETANOL ÜRETİMİNDE
KULLANILMASI

GAMZE ŞEKER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL HEMOGLOBİNİN
SÜREKLİ BİYOETANOL ÜRETİMİNDE
KULLANILMASI

GAMZE ŞEKER
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

**USE OF BACTERIAL HEMOGLOBIN IN
CONTINUOUS BIOETHANOL
PRODUCTION**

GAMZE ŞEKER
**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

ÖZET

Bu çalışmada arpa malt özütünden etanol üretimini arttırmada VHB ekspresyonunun ve/veya hücre immobilizasyonunun etkisi araştırıldı. Etanol üreticisi *Esheria coli* suşu olan FBR5 ve bu suştan geliştirilmiş *vgb* bulunduran iki suş (TS3 ve TS4) fermentasyonu sağlamak amacıyla kullanıldı. Ayrıca farklı karbon kaynaklarının (glukoz, maltoz ve arpa malt özütü) etkin etanol üretimine etkisi karşılaştırmalı olarak şeker içeren besiyerleri ile değerlendirildi.

Maltoz içeren besiyeri (MB) dışında glukoz (GB) ve malt özütü içeren (MÖB) besiyerlerinde VHB ekspresyonunun ve immobilizasyonun etanol üretiminde arttırıcı etkisi olduğu görüldü. Denenen besiyerleri içerisinde arpa malt özütünün fermentasyon ortamı için en iyi karbon kaynağı olduğu belirlendi. En yüksek etanol üretimi %2.97 oranı ile immobilize TS4 suşu ile MÖB besiyerinde sağlandı. MÖB besiyerinde birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin immobilize FBR5 suşuna göre immobilize TS3 suşu için %2, immobilize TS4 suşu için %15 oranında daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca immobilize TS4 suşu (*vgb*+) ile immobilize FBR5 (*vgb*-) suşu ile üretilenden %57 oranında daha yüksek miktarda etanol ürettildiği saptandı.

İmmobilize boncukların tekrarlı kullanımının etanol üretimine etkisi, 48 saatlik ardışık 9 fermentasyon boyunca GB, MB ve MÖB besiyerlerine aktarılmasıyla belirlendi. MÖB besiyerinde, VHB eksprese eden immobilize haldeki TS4 suşu, immobilize FBR5 ve TS3 suşlarına göre sırasıyla %18-55 ve %29-57 oranında daha fazla etanol üretimi gerçekleştirdi.

Tez çalışması sonunda, VHB ekspresyonunun ve/veya hücre immobilizasyonunun farklı karbon kaynaklarından biyoetanol üretimini arttırmada etkin bir strateji olduğunu saptandı. Ayrıca, arpa malt özütünün biyoetanol üretiminde potansiyel alternatif bir karbon kaynağı olabileceği görüldü. Sonuç olarak immobilize formdaki VHB eksprese eden *E. coli* suşlarının arpa malt özütünden etanol üretimini arttırmada ümit verici bir yaklaşım olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Vitreoscilla* hemoglobini, Biyoetanol, Malt Özütü, *E. coli*.

SUMMARY

In this study, the enhancement of bioethanol production through VHb expression and/or cell immobilization from barley malt extract was investigated. The ethanologenic *Escherichia coli* strain FBR5 and two derivative strains (TS3 and TS4) carrying *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin) were used. The effects of different carbon sources (glucose, maltose and malt extract) were also evaluated for efficient ethanol production comparatively by using sugar containing media.

VHb expression and more effectively combination of VHb expression and immobilization enhanced ethanol production in all fermentation media except maltose containing media (MB). The barley malt extract was found to be the best carbon source for the fermentation medium. The highest amount of ethanol production was 2.97% (v/v) by using immobilized TS4 strain in barley malt extract medium (MOB). The ratio of ethanol concentration to cell biomass as much as 2% for TS3 and 15% for TS4 compared to FBR5 strain in MOB medium by immobilized cells. In addition, immobilized TS4 (*vgb*+) produced higher amount of ethanol than immobilized FBR5 (*vgb*-) at the rate of %57 MOB medium.

The efficiency of repeated use of immobilized cells, 9 successive 48 houred batches was determined by using GB, MB and MOB media. In MOB growth media, free VHb expressing and more effectively immobilized TS4 strain produced higher amount of ethanol up to 18-55% and 29-57% respectively than FBR5 and TS3 strains.

The results indicate that combination of VHb expression and/or cell immobilization can be an effective strategy for improving bioethanol production from different carbon sources. In addition as a carbon source barley malt extract can be a potential alternative raw material for bioethanol production. Repeated use of immobilized VHb expressing ethanologenic *E. coli* cells could be a promising approach to improve ethanol production from barley malt extract.

Key Words: *Vitreoscilla* hemoglobin, Bioethanol, Malt Extract, *E. coli*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerine ihtiyaç duyduğum her an ulaşabildiğim, yönlendirmeleri ile çalışmalarına destek olan ve manevi olarak bana ailem kadar yakın olan Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a

Çalışmalarım boyunca manevi olarak bana destek olan deney çalışma arkadaşlarım Taner ŞAR ve Ayşe Gökçe ERMAN'a,

Lisansüstü eğitimime devam etmem üzere mesleklerine olan saygılarıyla beni motive eden Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI ve Prof. Dr. Cengiz DARICI'ya,

Lisansüstü eğitimimin ilk yıllarından itibaren arkadaşlıkları ve yol göstericilikleri ile yanımda olan Erhan GÖNEN, Betül GÜRCAN, Seval ÖZCAN KOÇAK ve Dr. Ehsan Mohammad TAGIPUR'a,

Tez çalışmasında kullanılan malt özütünün temininde yardımcı olan Anadolu Efes Biracılık ve Malt Sanayi A.Ş. Adana Fabrikası laboratuvar sorumlusu Derya KORKUT TIRAŞ'a,

Okul hayatımın ilk günlerinden bu yana hayatımla ilgili her türlü kararı alırken bana yol gösteren ve destekleri ile yanımda olan aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1.Tezin Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Enerji Kaynakları	3
2.2.Biyoetanol	3
2.3.Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	4
2.4. <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini ve <i>vgb</i> Teknolojisi	7
2.5.Hücre İmmobilizasyonu	11
2.6.Malt Özütünün Eldesi ve Özellikleri	14
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	16
3.1.Gereçler	16
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	16
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	16
3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları	17
3.2.Yöntemler	17
3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması	17
3.2.1.1.Pasajlamada Kullanılan Katı Besiyerinin Hazırlanması	18
3.2.1.2.Glukozlu Besiyerinin Hazırlanması	18
3.2.1.3.Maltozlu Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.1.4.Malt Özütü İçeren Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.2. Stok Kültürlerin Pasajlanması ve Muhafazası	20
3.2.3. Önkültürlerin Hazırlanması	20

3.2.4. Kalsiyum Aljinat ile Hücre İmmobilizasyonu	21
3.2.5. Serbest Hücrelerin OD ₆₀₀ Değerlerinin Belirlenmesi ve İnkübasyonu	21
3.2.6. İmmobilize Hücrelerin Besiyeri İçerisine İnokülasyonu	21
3.2.7. İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanım Etkinliğinin Belirlenmesi	22
3.2.8. Kültür Koşulları	22
3.2.9. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi	22
3.2.10. Üretilen Biyoetanol ile Kalan Şeker Miktarının Ölçümü ve Verim Değerlerinin Hesaplanması	23
3.2.11. Rekominant Suşlardaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü	24
3.2.12. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR	25
4.1. Glukoz ile Hazırlanan Besiyerindeki (GB) Etanol Üretimleri	25
4.2. Maltoz ile Hazırlanan Besiyerindeki (MB) Etanol Üretimleri	29
4.3. Malt Özütü ile Hazırlanan Besiyerindeki (MÖB) Etanol Üretimleri	32
4.4. Glukoz İçeren Besiyeri (GB) İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı	37
4.5. Maltoz İçeren Besiyeri İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı	40
4.6. Malt Özütü İçeren Besiyeri İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	: Amonyum sülfat
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
<i>adh</i>	: Alkol dehidrojenaz geni
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CH_4	: Metan
CO	: Karbonmonoksit
CO_2	: Karbondioksit
dk	: Dakika
dm^3	: Desimetreküp
g	: Gram
h	: Saat
H_2SO_4	: Sülfürik asit
ha	: Hektar
HCl	: Hidrojen klorür
L	: Litre
m^3	: Metreküp
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	: Sodyum dityonit
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH_2	: Amin
NO_x	: Nitrit oksitli bileşikler
$^\circ\text{C}$	: Celcius derece

t	: Ton
v	: Hacim
w	: Ağırlık
DDGS	: Dried distillers grains with solubles
ETBE	: Etil tersiyer bütıl eter
GA	: Giberellik asit
GB	: Glukozlu besiyeri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
L.	: Carl Linnaeus
LB	: Luria-Bertani
MB	: Maltozlu besiyeri
MÖB	: Malt özütlü besiyeri
MTBE	: Metil tersiyer bütıl eter
OD	: Optik yoğunluk
<i>pdv</i>	: Piruvat dekarboksilaz geni
rpm	: Dakikada rotasyon sayısı
TAME	: Tersiyer amil metil eter
USDA	: United States Department of Agriculture
UV	: Ultraviyole
<i>vgb</i>	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini geni
VHb	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobini

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Yabanıl tip <i>vgb</i> 'nin promotör bölgelerinin sekansları.	8
2.2: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobinin üç boyutlu yapısı.	8
2.3: İmmobilizasyonda kullanılan yöntemler.	11
4.1: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının GB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%).	28
4.2: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının GB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları.	28
4.3: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%).	32
4.4: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml ⁻¹ /OD).	32
4.5: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MÖB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%).	36
4.6: Serbest ve immobilize haldeki FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MÖB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml ⁻¹ /OD).	36
4.7: GB, MB ve MÖB besiyerleri içerisinde serbest ve immobilize hücrelerin inkübasyon sonu Vhb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık).	37
4.8: GB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşların 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v).	39
4.9: GB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki Vhb ekspresyonu değerleri.	40

4.10:	MB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşların 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v).	43
4.11:	MB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki VHb ekspresyonu değerleri.	43
4.12:	MÖB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşların 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v).	46
4.13:	MB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki VHb ekspresyonu değerleri.	46
4.14:	GB, MB ve MÖB fermentasyon besiyerleri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımları ile belirlenen birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml ⁻¹ /OD).	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyoetanol üretiminde kullanılan bazı hammaddeler ve bu hammaddelerin etanol verimleri.	6
2.2: VHb eksprese eden mikroorganizmalar aracılığıyla mikrobiyal ürünlerin artışının sağlandığı güncel çalışmalar.	9
2.3: Maltlama işlemine tabi tutulmuş ve tutulmamış arpanın kuru madde içerikleri.	15
3.1: Kullanılan bakteri suşlarının inkübasyonu için kullanılan antibiyotik türleri ve miktarları.	18
3.2: LB besiyeri içeriği.	18
3.3: Glukozlu besiyeri içeriği.	19
3.4: Maltozlu besiyeri içeriği.	19
3.5: Malt özütü besiyeri içeriği.	20
4.1: GB besiyeri içerisindeki serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀ nm), üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v).	27
4.2: MB besiyeri içerisindeki serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀ nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v).	31
4.3: MÖB besiyeri içerisindeki serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀ nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v).	35
4.4: GB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀ nm), substrat tüketimi (%) ve alkol verimi (%) değerleri.	39
4.5: MB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD ₆₀₀ nm), substrat tüketimi (%) ve alkol verimi (%) değerleri.	42

- 4.6: MÖB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 45
kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD_{600} nm), substrat tüketimi (%) ve
alkol verimi (%) değerleri.

1. GİRİŞ

Petrol ve türevlerinin farklı alanlarda aşırı kullanımından kaynaklı ham petrolün azalması ve çevre kirliliğinin artması nedeniyle bilim insanları petrolün yerine geçebilecek farklı enerji kaynakları arayışına girmişlerdir. Fosil yakıt kullanımının sera gazı emisyonunu arttırması, küresel ısınma, hava kirliliği ve asit yağmurları gibi etmenler üzerinde olan ekolojik dezavantajları ciddi şekilde göze çarpmaktadır. Bunları önlemenin önemli bir yolu fosil yakıt kullanımını azaltarak, enerji altyapısını yenilenebilir enerjileri kullanmaya uygun duruma getirmektir. Petrole alternatif olması beklenen bu enerji kaynaklarının çevreye zarar vermeyecek, yenilenebilir, sürdürülebilir hatta uzun yıllardır atıklarla kirlenmiş olan doğayı biyolojik olarak daha temiz hale getirebilecek özellikte olması için çaba gösterilmektedir.

Katı, sıvı ya da gaz formda olabilen birçok farklı biyoyakıt türü mevcuttur. Biyodizel, biyogaz ve biyoetanol bunlardan yaygın olan birkaçıdır. Biyoetanol, yenilenebilir, biyolojik temelli, sera gazı salınımına az etki eden, çevre dostu bir yakıt olarak fosil kökenli yakıtlara alternatiftir. Biyolojik kökenli yakıt üretiminde karbonca zengin bitkilerin tohumları, kabukları ya da atıkları kullanılabildiği gibi sanayi atıkları, yanürünleri ve atıksular da üretim yöntemine göre enerji kaynağı olarak tercih edilebilmektedir.

Birçok farklı alanda kullanılabilirliği bulunan biyoetanolün yakıt verimliliğinin arttırılması amacıyla fosil yakıtlara karıştırılarak kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Biyoetanolü benzinle karıştırmak karbon salınımını azaltmanın yanı sıra taşıt kullanımı ile çevreye salınan zehirli gazların miktarında azaltma potansiyeline sahiptir.

Biyoetanol üretimini büyük ölçekte sağlamak için çeşitli politikalar geliştiren

ABD, Brezilya ve Kanada gibi üretimde ve tüketimde öncü olan ülkeler hammadde olarak tarımsal ürünleri yaygın bir şekilde kullanmaktadırlar. Ülkemizde bu amaçla kullanılabilecek atık, yan ürün veya tarımsal ürünlerin potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca belirlenen hammaddelerin fermentasyon yolu ile biyoetanole dönüştürülmesinde etkinliği ve pratikliği arttırmak adına farklı biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilirliğinin araştırılması, yapılan üretimin kalitesini arttıracaktır.

1.1. Tezin Amacı

Dünyada yakıt olarak kullanımı giderek yaygınlaşan biyoetanol üretimi konusunda ülkemizde yapılacak bilimsel çalışmaların ışığında endüstriyel üretimin etkin ve verimli seviyelere ulaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla bugüne kadar yapılmış çalışmalar sayesinde potansiyel hammadde kaynaklarının biyoetanol verimleri belirlenmiştir. Biyoetanol üretiminde en yüksek verimin sağlandığı mısır, şeker pancarı ve şeker kamışı gibi bazı hammaddeler endüstriyel biyoetanol üretiminde genel olarak kullanılmaktadır. Bu hammaddelere yenilerini ekleyebilmek için daha önce kullanılmamış ürünleri biyoetanol üretimi için kullanılma potansiyelinin belirlenmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasında *E. coli*'nin FBR5 (*vgb*-), TS3 (*vgb*+) ve TS4 (*vgb*+) suşları kullanılarak, *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonu ve/veya immobilizasyonun gıda sanayinde kullanılan malt özütünden etanol üretiminde potansiyel avantajları araştırılmıştır. Ayrıca immobilize hücrelerin biyoetanol üretiminde uzun süreli kullanımı da incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enerji Kaynakları

Genel tüketimin artmasıyla mevcut yakıtların artan insan popülasyonunun enerji ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmıştır. Kullanımı yaygın olan fosil yakıtların çevre-dostu olmaması nedeniyle çeşitli kirleticilerin doğada birikiminin artması, alternatif ve etkin yakıt türlerine yönelime neden olmuştur. Önümüzdeki 40-50 yıl içerisinde fosil yakıtların kullanımı bu yakıtların tükenmesine neden olacaktır [Vohra et al., 2014]. Aşırı kullanım nedeniyle açığa çıkan CO₂, CO, NO_x ve CH₄ gibi kirletici gazların sebep olduğu sera gazı etkisi, iklim değişikliği ve buna bağlı olarak deniz seviyesinin yükselmesi ile biyoçeşitliliğin yok olmasına neden olabilecek kadar ciddi sorunlara sebep olabilecektir [Vanhala et al., 2016; Kundu et al., 2013; Abnisa et al., 2013]. Bu nedenle insan sağlığına ve çevreye vermiş olduğu geri dönüşümsüz zararlarından dolayı fosil yakıtların yerine doğaya zarar vermeyen ve verimli bir şekilde enerji elde edilebilecek çevre dostu yakıtların geliştirilmesi konusunda araştırma-geliştirme çalışmaları yaygınlaşmıştır.

2.2. Biyoetanol

Biyoetanol, mikroorganizmalarla fermentasyon aracılığı ile şeker içerikli maddelerden üretilen bir biyomoleküldür. Biyoetanolün kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Biyoetanol karbonhidratlarca zengin yenilenebilir kaynaklardan üretilen günümüz yakıtlarına alternatif bir yakıttır [Zabed et al., 2017]. Özellikle biyoetanol üretmek için yetiştirilen şeker içerikleri yüksek bitkilerin kullanılmasının yanı sıra çeşitli sanayi kollarında açığa çıkan atıkları da kullanarak biyoetanol üretmek mümkündür.

Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Çin, Kanada ve birkaç AB üyesi ülke fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak amacıyla biyoetanolün kullanımına önem vermektedir [Zabed et al., 2017].

Biyoetanol içeriğinde %34.7 oksijen bulundurması ile benzine göre daha yüksek bir yanma etkinliği (%15) göstermesine neden olmaktadır [Kar ve Deveci, 2006].

Araçlarda kullanılacak olan benzinin oktan kalitesi o aracın motoruna uygun olacak şekilde seçilmektedir. Eğer uygun oktanlı yakıt kullanılmazsa araçlardaki önemli kısımlarda ciddi hasarlar oluşabilmektedir. Metil tersiyer bütül eter (MTBE) etil tersiyer bütül eter (ETBE), tersiyer amil metil eter (TAME) ve diğer oksijenatlar gibi oktan arttırıcılar ile benzinin oktan sayısı arttırılmaktadır. Bu bileşikler insan sağlığına ciddi zarar vermelerinin yanısıra yeraltı sularına karışarak içme suyunu da kirletmektedir [Green and Lowenbach, 2001]. Bu uygulamanın yerine benzine belirli oranlarda etanol eklenerek de oktan kalitesi arttırılabilmektedir. Benzine göre gözdardı edilebilir miktarda kükürtlü bileşikler içermesi nedeniyle biyoetanol, karışık kullanımla kükürtlü bileşik salınımının azalmasına yardımcı olur [Pickett et al., 2008]. Ayrıca benzin yerine etanol kullanımı karbon salınımını %80 oranında azaltmaktadır [Lashinky and Swartz, 2006].

Dünyada biyoetanol kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Petrole %5-85 oranında katırıştırılarak petrolün etkin kullanımını sağlayarak çevreye verdiği zararın azaltılması da sağlanmıştır. Amerika, Brezilya ve Kanada gibi biyoetanol üretiminde öncü ülkeler kullanılan fosil yakıtlara karıştırılmasını farklı oranlarda zorunlu kılmıştır.

Ülkemizde ise resmî gazetede yayımlanan 27 Eylül 2011 tarihli ve 28067 sayılı tebliğe göre, piyasaya akaryakıt olarak arz edilen benzin türlerinin, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanolden en az %3 oranında eklenmesi 2014 yılı itibariyle zorunlu hale getirilmiştir.

2.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadeler

Genel anlamıyla biyoetanol üretiminde kullanılan yenilenebilir kaynaklar şekerler, nişastalar, lignoselülozik biokütle ve algler olarak gruplandırılabilir [Zabed et al., 2017]. Şeker ve nişasta kullanarak biyoetanol elde etme birinci nesil biyoetanol olarak adlandırılırken, lignoselülozik biyokütleden ve alglerden biyoetanol eldesi sırasıyla ikinci ve üçüncü nesil biyoetanol üretimi olarak adlandırılmaktadır [Zabed et al., 2017]. Biyoetanol üretimi için kullanılan bu hammaddelerden fermente edilebilir şekerler elde edilebilmesi, hammaddenin yapısına bağlı olarak asidik ve/veya enzimatik hidroliz ve ısı uygulaması gibi farklı ön uygulamalara bağlıdır [Zabed et al., 2017; Akbas and Stark, 2016]. Fermente edilebilen şeker içeren hammaddeler

doğrudan kullanılabilirken, nişastalı ürünlerde nişastayı glukoza dönüştürmek için hidroliz işlemine ihtiyaç duyulmaktadır. Lignoselülozik biyokütlelerdeki selülozun fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi için ise öncelikle selülozu parçalayan enzimlerin etki edebilmesi için bir ön uygulama gerekmektedir [Zabed et al., 2017]. Biyoetanol üretiminde kullanmak üzere yüksek şeker içerikleri nedeniyle yetiştirilen bazı bitkiler ve bu bitkilerin etanol verimleri Tablo 2.2’de belirtilmiştir [Zabed et al., 2017]. Her ne kadar insan tüketimi için kullanılan bitkilerin enerji üretimi amacıyla kullanılması bazı etik tartışmalara neden olsa da bu yaklaşım birçok ülke tarafından bir tarım ve enerji politikası olarak benimsenmiştir.

Tablo 2.1: Biyoetanol üretiminde kullanılan bazı hammaddeler ve bu hammaddelerin etanol verimleri.

Biyokütle	Etanol verimi (L/ton)	Potansiyel verim (L/ha)
Şeker kamışı	70–90	6470–6660
Şeker pancarı	95–107	1605–5500
Mısır	370–470	4180
Sorgum sap suyu	40–86	2062–2595
Sorgum suyu	250	1796–6591
Sorgum tohumu	380	1099
Melas	280	–
Arpa	345	–
Yulaf	264	–
Tritikale	368	–
Tatlı Patates	125–170	1989–4800
Kasava	363–455	4901
Yerelması	90	1821–5930
Ararot Kamışı	208	2496
Patates	80–100	1600
Buğday	376–435	1001–1700
Hint Yerelması	192	4800
Mısır sapı	450	4400
Mısır koçanı	510	–
Buğday samanı	490	–

Tüm bu bitkisel kaynakların yanısıra endüstriyel üretim aşamasında açığa çıkan karbonca zengin atıklar da biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilmektedir. Özellikle gıda işleme sanayinde üretim sonrası oluşan meyve kabukları, melas, peyniraltı suyu, patates işleme atığı gibi enerji içeriği yüksek atıklar bu amaçla tercih edilen değerli atıklardandır. Bu tip sanayi atıklarının halen içerdikleri enerjiyi biyoetanole dönüştürmek, aynı zamanda doğadan aldığımız hammaddeden maksimum seviyede faydalanmamızı da sağlayacaktır.

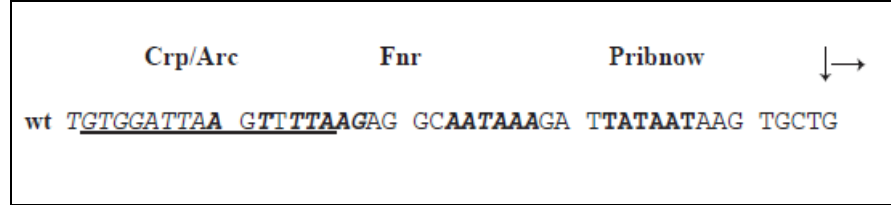
2.4. *Vitreoscilla* hemoglobini ve *vgb* Teknolojisi

Keşfedilen ilk bakteriyel hemoglobin olan *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb), D. Webster tarafından Gram negatif bakteri *Vitreoscilla sp.*'den izole edilmiştir [Webster and Hackett, 1966]. Ancak ilk önceleri cytochrome *o* olduğu sanılan *Vitreoscilla* hemoglobinin, aslında bir hemoglobin molekülü olduğu ilerleyen çalışmalar sayesinde ortaya konulmuştur [Wakabayashi et al., 1986]. İlerleyen çalışmalarla birlikte bu protein grubunun bulunduğu canlı metabolizmasında önemli birçok rolü olduğu anlaşılmış ve biyoteknolojik uygulamaları üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır [Frey and Kallio 2003; Vinogradov et al. 2006; Zhang et al. 2007]. Protein yapılı olduğunun anlaşılması ile *vgb* farklı canlılara klonlanmış ve etki ettiği metabolik yollar araştırılmıştır. VHb'nin hücre kütesinin, antibiyotik üretiminin, fermentasyon ürünlerinin ve toplam veya tek bir proteinin miktarını arttırmada, ayrıca çevre için potansiyel zararlı bileşiklerin biyodegradasyonunda etkinlik sağladığı bilinmektedir [Stark et al., 2011].

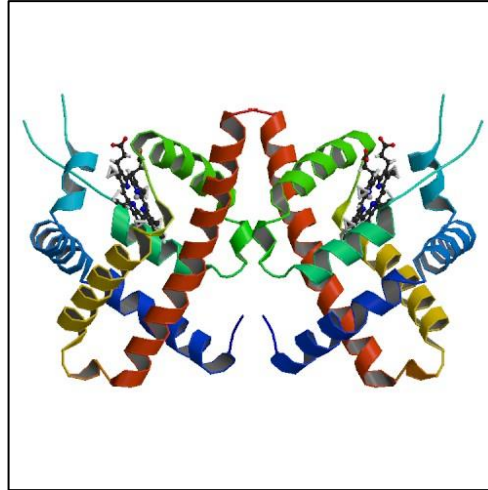
İzole edildiği canlı olan *Vitreoscilla sp.* zorunlu aerobik bir canlı olmasına rağmen, VHb'nin ekspresyonunun düşük oksijenli koşullarda indüklenmesi sayesinde hipoksik koşullarda yaşayabilmektedir [Pringsheim, 1951]. VHb ekspresyonu oksijen seviyesine bağlı olarak düzenlenir [Boerman and Webster, 1982]. Oksijen bağlayan protein olarak, ortamda olan oksijeni, terminal solunum oksidazlarına taşır. Bazı çalışmalarda VHb'nin solunumdaki etkisini belirlemek amacıyla, spesifik bölgelere mutasyonlar yapılarak oksijen bağlanmasını etkileyen etmenler araştırılmıştır [Ratakonda et al., 2013]. Şekil 2.2.'de VHb'nin 3 boyutlu yapısı mevcuttur [Ratakonda et al., 2013]. Yapılan bir çalışmada, terminal oksidazları olmayan mutant bakterilerde VHb varlığı sayesinde solunum devam edebilmiştir. Bu durum VHb'nin terminal solunum oksidazı olarak da iş yapabildiğini ortaya koymuştur [Dikshit et al. 1992].

O₂, CO, NO ve CN⁻ gibi çeşitli ligandlar hemoglobininlerin hem grubuna bağlanarak adsorbsiyon spektrası oluşturmaktadır. Gözlemlenen adsorbsiyon spektrası sayesinde hemoglobinlerin karakterizasyonu belirlenir. Oksijen ve karbonmonoksit ferrous hem grubuna, nitrik oksit ise ferrous ve ferrik hem grubuna bağlanır. Hemoglobin miktarını belirlemek amacıyla VHb'i adsorbsiyon spektrasında görünür hale getirmek için CO ile indirgendiğinde 419-439 nm aralığında, kimyasal olarak Na₂S₂O₄ ile ise 416-430 nm aralığında adsorbsiyon piki vermektedir.

Bakteriyel hemoglobinin oksijen durumuna bağı bir şekilde ekprese edilmesinin nedeni, promotörünün (*Pvgb*) oksijene duyarlı bir promotör olmasıdır. Promotördeki bu duyarlılık, üzerinde tanıma bölgelerini taşıdığı Fnr, ArcAB ve OxyR gibi bazı global düzenleyici proteinlerin oksijen durumunu algılayıcı mekanizmalarda görev almasıyla sağlanmaktadır (Şekil 2.1) [Yang et. al., 2005].



Şekil 2.1: Yabanıl tip *vgb*'nin promotör bölgelerinin sekansları. Kalın: Pribnow kutusu; Altı çizili: ArcA bölgesi; İtalik: Crp bölgesi; Bold ve italik: Fnr bölgesi.



Şekil 2.2: *Vitreoscilla* hemoglobinin üç boyutlu yapısı

Solunum metabolizmasını düzenleyerek birçok farklı metabolik yolağı da etkinleştirme özelliğı olan *vgb*, çeşitli amaçlarla bazı mikroorganizmalara aktarılmıştır. *vgb*'nin aktarıldığı mikroorganizmalar ve üretiminin arttırıldığı ürünlerden bazıları Tablo 2.2'de verilmiştir [Stark et al., 2014].

Tablo 2.2: VHb eksprese eden mikroorganizmalar aracılığıyla mikrobiyal ürünlerin artışının sağlandığı güncel çalışmalar.

Türler	Ürünler	Referanslar
<i>P. aeruginosa</i>	Rhamnolipid	Kahraman ve Erenler, 2012
<i>B. amyloliquefacien</i>	Poly- γ -glutamic acid	Zhang et al., 2013
<i>A. hydrophila</i>	Hydroxyalkanoates	Liu et al., 2011
<i>C. freundii</i>	Methionine γ -lyase	Kahraman ve ark., 2011
<i>C. crenatum</i>	L-arginine	Xu et al. 2011
<i>S. elodea</i>	Gellan gum	Wu et al. 2011
<i>S. gilvosporeus</i>	Natamycin	Wang et al. 2014
<i>S. diastatochromogenes</i>	Toyocamycin	Ma et al. 2014
<i>E. coli</i>	Biomass	Pablos et al. 2011
<i>E. coli</i>	Etanol	Sanny et al. 2010; Arnaldos et al. 2012; Abanoz et al. 2012; Akbas et al. 2014

Bir çalışmada, *E. coli*'nin etanolojenik suşlarından VHb ekspres etmeyen FBR5 ve VHb ekspres eden TS3 suşları kullanılarak glukoz, ksiloz veya mısır kalıntısı hidrolizatı içeren besiyerinde mikroaerobik koşullarda etanol üretimi incelenmiştir. Çalışmanın sonunda mikroaerobik koşullarda TS3'ün FBR5'ten glukoz, ksiloz ve mısır kalıntısı hidrolizatı içeren besiyerlerinde sırasıyla %30, %119 ve %59 oranında daha yüksek oranda etanol ürettiği belirlenmiştir. Büyük ölçekte üretim potansiyelini belirlemek için 2L hacimde glukoz ve ksiloz besiyeri içerisinde gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda TS3 FBR5'ten sırasıyla %10 ve %15 oranında daha yüksek miktarda etanol ürettiği rapor edilmiştir [Sanny et al., 2010].

Farklı oranlarda (0.25-2x) LB ve 80g/dm³ ksiloz içeren besiyeri kullanılarak etanol üretiminde VHb ekspresyonunun etkisini görmek amacıyla VHb ekspres etmeyen FBR5 ve VHb ekspres eden TS3 suşları kullanılmıştır. Tüm durumlarda TS3, FBR5'ten daha yüksek miktarda etanol üretmiştir. En yüksek etanol üretimi 0.25x LB kullanıldığında TS3 ile elde edilmiştir. Mısır püskülü hidrolizatı farklı oranlarda (0.2, 0.4 ve 0.8m³/m³) 2x LB'ye karıştırılarak oluşturulan besiyerinde de TS3, FBR5'ten

daha yüksek miktarda etanol üretmiş, en yüksek verimin $0.4 \text{ m}^3/\text{m}^3$ hacminde hidrolizat içeren besiyeri ile elde edildiği belirlenmiştir [Arnaldos et al., 2012].

VHb ekspres eden suşlarla yapılan başka bir çalışmada ise farklı besin takviyeleri ile desteklenen peyniraltı suyu, peyniraltı suyu tozu veya şeker pancarı melası içeren besiyerlerinde *E. coli*'nin VHb ekspres etmeyen FBR5 ve VHb ekspres eden TS3 ve TS4 suşları kullanılarak etanol üretimine VHb ekspresyonunun etkisi araştırılmıştır. 48 saat süren fermentasyon sonunda VHb ekspresyonunun üç sanayi atığı ile de etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir [Akbaş ve ark., 2014].

Patates işleme atığı hidrolizatı kullanılarak yapılan bir çalışmada etanolojenik FBR5 (*vgb-*), TS3 (*vgb+*) ve TS4 (*vgb+*) suşları ile LB besiyerinde etanol üretimi incelenmiştir. Düşük havalandırmalı koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda VHb ekspresyonunun TS3 ve TS4 suşlarında sırasıyla %5 ve %18 oranında etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir [Abanoz ve ark., 2012].

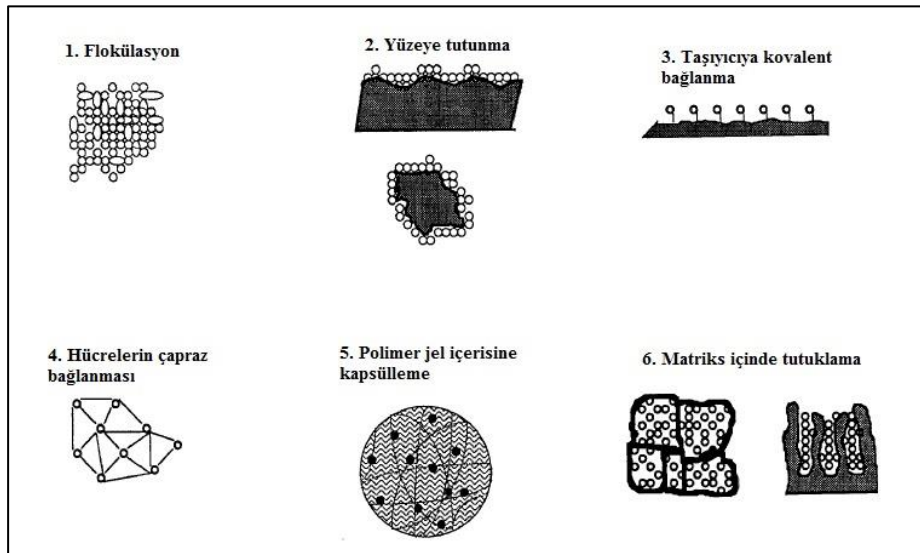
Biyoetanol üretiminde verimin yüksek olması önemlidir. Bu amaçla kullanılan hammadde, kültür koşulları ve oluşturulan fermentasyon besiyeri içeriği gibi verimi etkileyecek parametreler iyi belirlenmelidir. Tüm bunların yanı sıra fermentasyonu sağlayacak mikroorganizmanın özellikleri de verimi arttırmada oldukça önemlidir. Bitkisel hammaddeler ve gıda işleme atıkları genellikle tek şeker çeşidi içermediklerinden, kullanılacak olan fermentatif mikroorganizmanın birden çok şeker çeşidini metabolize edebilmesi gereklidir. Özellikle büyük ölçekte üretimde ortam koşulları aşırı kontrollü olamayacağından pH değişiklikleri, oksijen yetersizliği ve canlının kendi ürettiği çeşitli metabolitlerin varlığı veya artışı gibi çevresel koşulların değişmesinden olumsuz etkilenmeyecek türde dayanıklı mikroorganizmalar seçmek, genetik mühendisliği ile canlıyı iyileştirmek ya da mikrobiyal hücreleri olumsuz ortamdan biyoteknolojik yöntemlerle izole etmek gerekmektedir.

Tez çalışmasında, *E. coli*'nin etanolojenik FBR5 suşu ve bakteriyel hemoglobin (*Vitreoscilla* hemoglobini) üretecek şekilde transforme edilmiş TS3 ve TS4 suşları kullanılmıştır. Fermentasyon esnasında sadece etanol değil laktik asit, hidrojen, bütirik asit veya aseton da üretilebilir. Farklı metabolitlerin oluşumu ile ortamdaki karbon kaynağı kaybını önlemek için etanolojenik FBR5 suşunun tüm fermentasyon yolları susturulmuş ve *Zymomonas mobilis*'in pLOI297 plazmidinde kodlanan piruvat dekarboksilaz (*pdh*) ve alkol dehidrojenaz (*adh*) genleri ile rekombine edilmiştir. Böylece fermentasyon sonunda üretilen tek metabolit etanol

olmuştur [Althertun and Ingram, 1989]. Bakteriyel hemoglobinin etanol üretiminde etkisini belirlemek amacıyla FBR5, *vgb* bulunduran az kopya sayılı pTS3 plazmidi transforme edilip TS3 suşu; pTS4 plazmidi ile transforme edilmesi ile çok kopya TS4 suşu geliştirilmiştir [Sanny et al., 2010].

2.5. Hücre İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, tutuklanmak istenen yapının etkinliğinin korunması ve etkin bir üretim sağlanması için kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla geliştirilmiş flokülasyon, yüzeye tutunma, taşıyıcı ortama kovalent bağlanma, hücrelerin çapraz bağlanması, polimer jel içerisine kapsülleme ve matriksde tutuklanma gibi çeşitli immobilizasyon yöntemleri mevcuttur (Şekil 2.3) [Cassidy et al., 1996].



Şekil 2.3: İmmobilizasyonda kullanılan yöntemler

Bilimsel ve endüstriyel alanlarda kullanmak üzere mikrobiyal enzimler [Mosbach, 1987a; Mosbach 1987b; Mosbach 1987c], organeller [Mattiasson ,1983a; Mattiasson 1983b] ve hücreler immobilize edilmektedir [Cassidy et al., 1996]. İmmobilize edilen bu yapılar metabolit üretimi, bir bileşiğin ya da hücrenin bir ortama kontrollü salınımı veya çevreye zararlı bir bileşiğin biyodegradasyonunu sağlamak için kullanılabilirler. Metabolit üretiminde mikroorganizmaların kullanımı araştırmaların dışında endüstriyel olarak da yaygınlaşmıştır. Kitlesel üretimde ortam

şartlarının değişmesiyle ortaya çıkan sorunların önüne geçmek için farklı biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiştir.

Yüksek yoğunluktaki hücrelerin, hidrojel bir matriks sayesinde bir arada tutarak üretkenliklerinin arttırılabildiği birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu geçirgen matriksler sayesinde immobilize edilen mikrobiyal hücreler değişen pH, sıcaklık, organik çözücü konsantrasyonu gibi zararlı çevresel koşullardan izole bir şekilde canlılıklarını koruyabilmektedirler [Park and Chang, 2000]. Ayrıca üretim sonrası immobilize hücreleri üründen ayırmak, serbest hücrelerle kültüre almaya kıyasla daha kolay olmaktadır. Tutuklamanın yapıldığı polimerin porlu yapısı sayesinde, mikrobiyal hücrelerin üretmiş olduğu metabolitin elde edilmesi pratik hale gelmektedir. Bu sayede yüksek konsantrasyonlu üretimin olduğu koşullarda metabolitin sebep olabileceği hücrelerin inhibisyona uğraması durumunun da önüne geçilmesi sağlanmış olmaktadır.

Aljinat, bakteriyel selüloz, κ-Carrageenan gibi doğal polimerlerin yanısıra poliakrilamid, polietilen glikol ve poliüretan gibi sentetik polimerler de hücre immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Hücre immobilizasyonunda doğal polimerleri kullanmak hücre canlılığının devamlılığına zarar vermediğinden genellikle daha çok tercih edilmektedir. Sodyum aljinat doğal polimerler içerisinde en yaygın kullanılanıdır. Polimerleşme koşullarının uygulamayı zorlaştırmaması, kolay bulunması gibi özelliklerinden dolayı diğer doğal polimerlere göre daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur.

E. coli'nin FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla yapılan bir çalışmada erlenler ve fermentör kullanarak serbest ve immobilize hücrelerin etanol üretim kapasiteleri araştırılmıştır. Farklı oranlarda (%3, 5, 8 ve 15) peyniraltı suyu tozu ve maya özütü (% 0.3 ve 0.5) içeren fermentasyon besiyerinde 48-96 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda daha fazla etanol üretimi gerçekleşmiş ve %8 oranında laktoz ve %0.5 oranında maya özütü içeren besiyerinde tüm suşlarla farklı oranlarda serbest hücrelere göre en etkin etanol üretiminin sağlandığı besiyeri olarak belirlenmiştir [Sar et al., 2016].

Fermente edilebilir şekerlerce zengin Mahula bitkisinin (*Madhuca latifolia* L.) taze ve 12 ay depo edilmiş çiçekleri kullanılarak *S. cerevisiae* CTCRI suşunun serbest ve immobilize formlarının etanol üretimi 2L hacimli erlenlerde inkübasyonu sağlanarak incelenmiştir. Sonuç olarak immobilize hücrelerin etanol üretiminde

serbest hücrelerden daha etkin olduğu belirlenmiştir. En yüksek alkol üretimi taze çiçeklerle oluşturulan besiyeri içerisinde immobilize hücrelerle gerçekleştirilen fermentasyon sonucu elde edilmiştir [Swain et al., 2007].

Sürekli etanol üretimini sağlamak için yapılan bir çalışmada ise farklı oranlarda (50, 100, 150g/L) şeker kamışı melası ile oluşturulan besiyeri serbest ve %3 oranında sodyum aljinat kullanılarak kaplanmış immobilize hücrelerle immobilize hücre reaktöründe inkübe edilmiştir. En yüksek etanol üretimi %46.23 teorik alkol verimi ile 19.5g/L miktarında elde edilmiştir [Ghorbani et al., 2011].

Farklı immobilizasyon matrikslerinin alkol üretimine etkisini kıyaslamak amacıyla Ca-aljinat ve κ -Carrageenan ile immobilize edilmiş *Z. mobilis* ve *S. cerevisiae* hücreleri sürekli fermentasyon sisteminde inkübe edilmiştir. Ca-aljinat ile kaplanan hücreler κ -Carrageenan ile kıyaslandığında daha etkin etanol üretimi sağlamışlardır. En yüksek üretim %82 konversiyon oranıyla 77g/L/h etanol ile Ca-aljinat kaplı *Z. mobilis* hücreleri ile elde edilmiştir [Ryu and Lee 1997].

Biyoetanol üretiminde immobilizasyonu ticari boyuta taşımak için oluşturulan boncukların tekrar kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır. Büyük ölçekte etanol üretiminde her üretim için yeni boncuklar oluşturmak zamandan, paradan ve işgücünden zarar edilmesine neden olacaktır. Bu nedenle içerisindeki hücrelerin metabolizmalarını olumsuz etkilemeyecek kadar birden çok sefer kullanılabilecek dayanıklılıkta boncuklar oluşturmak ve bu boncukların kullanılabilirliğini belirlemek oldukça önemlidir.

Yapılan bir çalışmada, sodyum aljinat ile immobilize edilmiş *E. coli*'nin FBR5 ve TS3 suşları kullanılarak, peyniraltı suyu tozu içeren besiyeri içerisinde etanol üretiminde boncukların tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır. Farklı saklama solüsyonlarında farklı sürelerde (15, 30, 60 gün) muhafaza edilen immobilize hücreler etanol üretiminde farklı sonuçlar vermiştir. 15 ve 30 depolanan boncuklar 96 saatlik 8 tekrar boyunca azalma olmadan etanol üretimi devam etmiştir [Sar et al., 2017].

Önuygulamaya tabi tutmadan ve herhangi bir besin takviyesi eklemekten doğrudan doğal sorgum küspesi kullanılarak immobilize *S. cerevisiae* hücreleri tekrarlı etanol üretimi incelenmiştir. Immobilize hücrelerin etanol üretiminde serbest hücrelerden 2.24 kat daha etkin olduğu belirlenmiştir. Tekrarlı kullanım için fermentasyon ortamında 200g/L şeker bulunacak şekilde küspe eklenmiş ve neredeyse tüm şekerin ilk 16 saatin sonunda tükendiği gözlenmiştir. 50mL besiyeri içerisinde

gerçekleştirilen tekrarlı kullanım denemeleri sonucunda 13 tekrar boyunca ortalama olarak 96g/L alkol elde edilmiş, hatta sonraki tekrarlarda miktarın 100g/L'ye yaklaştığı rapor edilmiştir [Yu et al., 2007].

Duarte ve arkadaşları (2013), boncuk dayanıklılığını arttırmak amacıyla önceden oluşturulmuş Ca-aljinat boncukları kitosan ile kaplayarak etanol üretimini glukoz veya sükroz içeren besiyerlerinde incelemişlerdir. Etanol üretiminde Ca-aljinatlı hücrelerin, kitosan kaplı Ca-aljinatlı hücrelerden daha verimli olduğu belirlenmiştir. Boncuklar 10 saatlik 8 kullanım boyunca sabit denebilecek seviyede etanol üretimi sağlamışken, 8 kullanımdan sonra bozulmaya başlamış olduğu rapor edilmiştir [Duarte et al., 2013].

2.6. Malt Özütünün Eldesi ve Özellikleri

Nişasta içeriği yüksek hammaddelerin biyoetanol üretiminde kullanılması oldukça yaygındır. Bunun sebebi bu hammaddelerin elde edildiği bitkilerin dünyada geniş bir bölgede yetişebilmesi, özel ekolojik isteklerinin olmayışı, hem yaz hem de kış bitkisi olan varyetelerinin bulunması ve depolanmaya uygun olmalarıdır [Zabed et al., 2014]. Tahıllar (%60-80), yumrular (%60-90), baklagiller (%25-50) ve olgunlaşmamış yeşil meyveler (%70) nişasta içerikleri yüksek hammaddelerdendir [Huang et al., 2013]. Mısır, buğday, kasava, patates ve tatlı patates de biyoetanol üretiminde kullanılan, nişasta içeriği yüksek ürünlerin arasına girmiştir [Balat, 2011].

Nişastalı ürünlerin biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak kullanabilmesi için bazı ön uygulamalardan geçirilmesi gerekmektedir. Nişastayı glukozu hidrolize edebilmek için bazı amilolitik enzimler kullanılmaktadır. Ancak küçük ölçekte üretim yapıldığında enzim kullanımı maliyeti arttırabilmektedir.

Bir tahıl türü olan arpa (*Hordeum vulgare*), yüksek nişasta içeriğinin yanı sıra çimlenmesiyle birlikte etkinleşen enzimleri sayesinde içerdiği nişastanın büyük bir kısmını parçalayabilen bir tohumdur. Bu ilginç özelliği sayesinde herhangi bir kimyasal uygulaması yapmaya gerek kalmadan nişasta hidrolizi sonucu glukoz elde edilmektedir. Diğer tahıllarda bu işlemi yapabilecek miktarda enzim olmadığından arpa diğer tahıllardan bu özelliği ile ayrılmaktadır [Durgun, 2008].

Malt özütünü elde etmek genel olarak ısılatma, çimlendirme, kurutma-kavurma ve mayşeleme, süzme ve buharlaştırma işlemleri sırasıyla uygulanmalıdır. Isılatmadaki amaç tohumun suyu içerisine alarak çimlenme için gerekli bitki büyüme

düzenleyicilerinin harekete geçmesini sağlamaktır. Hatta bu aşamayı hızlandırmak için dışarıdan Giberellik asit (GA) takviyesi yapılabilmektedir. Çimlenmeyi başlatacak olan GA arpa tanesindeki alöron tabakasına ulaşır. Enzim deposu olan alöron tabakasında enzimlerin oluşumu ve var olan enzim miktarının artışı sağlanır [Durgun, 2008]. Sırasıyla endo- β -glukanaz, α -amilaz, proteaz ve fosfataz enzimler oluşur. Çimlenme sonunda şeker miktarı %2-3'ten %7,5-14,5'e yükselir [Durgun, 2008]. Azotlu madde miktarı ise çimlenmeyle %8-10'dan %20-25'e çıkar [Durgun ve Kılıç, 1978]. Çimlenen tohum kontrolü sıcaklıklarda (50-60 °C) kurutulmaktadır [Durgun, 2008]. Kurutmadan sonra kademeli olarak farklı sıcaklıktaki su ile muamele edilen malt, enzimlerin etkin çalıştığı sıcaklıklarda hidrolizi sağlanarak daha küçük yapıdaki monomerlerine ayrılmaktadır. Elde edilecek malt özütü beslenme amaçlı kullanılacaksa maltoz miktarının fazla olması sağlanır. Sonuçta elde edilen ürün santrifüjle tortularından ayrılır. Elde edilen malt özütünün kuru madde içeriği oldukça yüksek ve zengindir. İçerdiği kuru maddeler arasında maltoz, glukoz, dekstrinler, azotlu maddeler, mineraller, pentozlar, maltotriozlar ve tetraozlar bulunur [Schormüller, 1974]. Tablo2.3.'de maltlamanın arpadaki kuru madde miktarına etkisi verilmiştir [Bhatty, 1996].

Tablo 2.3: Maltlama işlemine tabi tutulmuş ve tutulmamış arpanın kuru madde içerikleri

İçerik, Kuru Madde	Malt Edilmemiş	Malt Edilmiş
Nem %	-	43.4
Toplam Protein %	15.3	13.7
Nişasta %	61.4	62.8
Beta Glukan %	4.4	1.2
Çözünür Karbonhidratlar %	2.9	10.2
Çözünür Proteinler %	3.6	4.4
Viskozite, cps	20.2	1.6
Kalan Şeker %	0.3	3.2
Alfa Amilaz, Ceralpfa Units g ⁻¹	0.1	288
Beta Glukanaz, U/kg	0	502
Proteolitik Aktivite mg npn 100g ⁻¹	46	105

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelerden NaOH, Na₂S₂O₄, (NH₄)₂SO₄, NaCl, HCl, H₂SO₄, D-Xylose, asetonitril (HPLC Grade), streptomisin sülfat, ampicilin sodyum ve gentamisin sülfat antibiyotikleri Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edildi. Tripton, maltoz ve agar Biolife (Milano, İtalya)'tan, maya özütü ise Applichem (Darmstadt, Almanya)'den sağlandı. Sodyum aljinat, D-Glucose, MgSO₄.7H₂O ve CaCl₂ Sigma-Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri)'ten satın alındı. Biyoetanol üretimi için besiyerine ilave edilen malt özütü ise Anadolu Efes Biracılık ve Malt Sanayii A.Ş.'den temin edildi. HPLC analizleri için örnekleri hazırlamada kullanılan 0,22 µm şırınga ucu filtreler Sartorius (Göttingen, Almanya)'tan ve alkol ve şeker analizi için GL Sciences (Tokyo, Japonya) marka NH₂ kolon (Inertsil, 4.5 I.D.x250 mm) tercih edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca hücrelerin besiyerleri içerisinde inkübasyonları New Brunswick Scientific Excella E₂₄ model çalkalamalı inkübatörde sağlandı. Hücrelerin optik yoğunlukları (OD) Shimadzu UV Spektrofotometre UV 1800 ile ölçüldü. Besiyeri içeriklerinin hazırlanması esnasında tartım işlemleri için Kern 200-3 marka hassas tartı kullanılırken, hazırlanan çözeltilerde tam karışmayı sağlamak amacıyla ve kabin içerisinde hücre immobilizasyonunda IKA RH Basic 2 marka manyetik karıştırıcı kullanıldı. Besiyeri ve kültür pH değerleri Hanna Instruments HI 2211pH/ORP metre ile belirlendi. Gerekğinde besiyeri hazırlarken, hemoglobin ölçümleri için kültürden ortamından hücreleri ayırırken ve örneklerin kalan şeker ve etanol ölçümleri için hazırlık aşamasında Awel CF 48-R, Heraeus Labofuge 400R ve Labogene Scanspeed 1730R santrifüjleri kullanıldı. Hemoglobin ölçümlerinden önce kültürlerden elde edilen pelletlerdeki hemoglobinin ekstraksiyonunu sağlamak için

Branson Ultrasonic Sonifier 250 (Danbury, ABD) ile parçalanarak hemoglobinin miktarları Shimadzu UV Spektrofotometre UV 1800 (Kyoto, Japonya) ile ölçüldü. Fermentasyon sonunda kalan şeker ve üretilen etanol miktarını ölçmek için çeşitli modüllerden oluşan Shimadzu marka HPLC cihazı (LC-20AD, Autosampler SIL-20AC, RID Dedektör RID-10A, UV Dedektör SPD-20A, Floresan Dedektör RF-20A, Fırın CTD-10AS) kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları

Bu tez çalışmasında USDA laboratuvarından temin edilen *Escherichia coli* FBR5 suşu [Dien ve ark., 2000] ve bu suş kullanılarak Dr. Sanny tarafından geliştirilen TS3 ve TS4 [Sanny et al., 2010] suşları kullanıldı. Bütün suşlar *pdc* (piruvat dekarboksilaz), *adhb* (alkol dehidrojenaz) [Dien ve ark., 2000] içeren plazmidler ile transforme edildi. Bu suşlardan TS3 ve TS4 *vgb* içerecek şekilde oluşturulan plazmidler ile transforme edilerek geliştirildi (Illinois Institute of Technology, Department of Biological Chemical and Physical Sciences, Chicago, IL, USA).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları kullanılarak gıda sanayinde kullanılan malt özütünden biyoetanol üretimi gerçekleştirildi. Biyoetanol üretimi için gereken fermentasyon süresi, besiyerinin içerdiği şeker türünün tüketilme hızına göre belirlendi. Besiyerine takviye amaçlı mineral karışımı eklendi (Kuhad et al., 2010). Besiyerlerinin karamelize olmasını engellemek için şeker solüsyonları ve malt özütü, diğer içeriklerden ayrı bir şekilde otoklavlandı (Hirayama HiclaveTM, HVE-50, Saitama, Japonya). Besiyeri içerisine her bakteri suşu için eklenmesi gereken antibiyotikler ve miktarları Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1: Kullanılan bakteri suşlarının inkübasyonu için kullanılan antibiyotik türleri ve miktarları.

Bakteri Suşu	Antibiyotik Türü	Miktarı
FBR5	Ampisilin	100 µg/mL
TS3	Ampisilin; Streptomisin	100 µg/mL; 50 µg/mL
TS4	Ampisilin; Gentamisin	100 /mL; 5 µg /mL

3.2.1.1. Pasajlamada Kullanılan Katı Besiyerinin Hazırlanması

Tablo 3.2’de içeriği verilen %8 ksiloz içeren LB (Luria-Bertani) besiyeri steril edildikten sonra sıcaklığı yaklaşık 50°C’ye soğutulduktan sonra Tablo 3.1’e göre uygun antibiyotikleri eklendi. Steril koşullarda Petri kaplarına döküldü ve donması beklendi. Kullanım süresine kadar +4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.2. LB Besiyeri İçeriği (1L, pH 7.0).

Besiyeri İçeriği	Miktar (g)
Maya Özü	5
Trypton	10
Ksiloz	80
NaCl	5
Agar	15

3.2.1.2. Glukozlu Besiyerinin Hazırlanması

Biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalarda genel olarak kullanılan bir monosakkarit şeker çeşidi olan glukoz, mikroorganizmaların metabolize edebildiği evrensel bir karbon kaynağıdır. Kullanılan bakteri suşlarının glukozlu besiyerindeki (GB) etkinliğini görmek için %8 oranında glukoz içeren besiyeri içeriği oluşturuldu (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Glukozlu Besiyeri İçeriği (1L, pH 7.0).

Besiyeri İçeriği	Miktar (g)
Trypton	10
Maya zt	5
Glukoz	80
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

3.2.1.3. Maltozlu Besiyerinin Hazırlanması

Malt ztnn biyoetanol üretimindeki etkinliğini görmek için aynı miktarda ve türde şekerler içeren bir besiyeri oluşturuldu. Bunun için %4.5 oranında maltoz ve %1 oranında glukoz içeren besiyerinin içeriği (MB) Tablo 3.5'tedir.

Tablo 3.4. Maltozlu Besiyeri İçeriği (1L, pH 7.0).

Besiyeri İçeriği	Miktar (g)
Maltoz	45
Glukoz	10
Maya zt	5
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

3.2.1.4. Malt zt İçeren Besiyerinin Hazırlanması

Anadolu Efes Biracılık ve Malt Sanayii A.ř.'den temin edilen malt özütünün içerdiği şeker eřitleri ve miktarları HPLC (Shimadzu) aracılığı ile belirlendi. Yapılan analiz sonucunda %9 oranında Maltoz ve %2 oranında glukoz içerdiği tespit edildi. Yapılan n çalışmalarla bu çalışmada kullanılan bakteri suşlarının üreyebildiği şeker konsantrasyonu belirlenerek ve uygun bir besiyeri içeriği geliştirildi. En etkin

üremenin olduğu şeker miktarı olarak %4.5 maltoz ve %1 glukoz olarak belirlendi. Malt özütü içeren besiyeri (MÖB) içeriği Tablo 3.4'tedir.

Tablo 3.5. Malt Özütlü Besiyeri İçeriği (1L, pH 7.0).

Besiyeri İçeriği	Miktar (g)
Malt Özütü	
(Maltoz %9)	500 mL
(Glukoz %2)	
Maya Özütü	5
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

3.2.2. Stok Kültürlerin Pasajlanması ve Muhafazası

Bakteri suşları uygun antibiyotikleri ve %8 (w/v) oranında ksiloz içeren steril LB agar besiyeri (Tablo 3.2) kullanılarak pasajlandı.

3.2.3. Önkültürlerin Hazırlanması

Önkültür için 24 saatlik taze kültürler kullanıldı. Bir veya iki koloni 10 mL fermentasyon besiyerine 50mL hacimlik erlenlerde inoküle edilerek yaklaşık 16 saat boyunca 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) inkübe edildi. Kültürlerin OD_{600nm}'deki optik yoğunlukları, OD_{600nm} 0.6 değerini aşmayacak şekilde gerektiğinde steril özgün besiyeri ile seyreltilerek ölçüldü.

3.2.4. Kalsiyum Aljinat ile Hücre İmmobilizasyonu

Çalışmada, hücre immobilizasyonunu sağlamak amacıyla sodyum aljinat (Sigma) kullanıldı. Sodyum aljinat UV ışık altında 30 dakika boyunca steril edildi [Ivanova et al., 2011]. Steril edilen sodyum aljinat steril koşullar altında steril saf suya yavaşça eklenerek çözelti haline getirildi. Kullanılan %3'lük CaCl_2 ve %0,9'luk NaCl çözeltileri 121°C 'de 15 dakika boyunca otoklav edilerek steril edildi.

İmmobilize edilecek hücreler OD_{600} 0.05 olacak şekilde üretilen önkültürden alınarak 4100 rpm hızında 4°C sıcaklıkta 16 dakika boyunca steril koşullarda santrifüj edildi. Elde edilen pellet, steril %0.9 NaCl çözeltisi ile karıştırılarak OD_{600} değeri 0.05'e denk gelecek şekilde seyreltilerek hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonu %3 (w/v) final konsantrasyonlu sodyum aljinat çözeltisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı. Hücre-aljinat karışımı 1000 μL mikropipetle, karışım hacminin 3 katı hacimdeki %3'lük CaCl_2 çözeltisi içerisine yapışma olmayacak şekilde dikkatlice manyetik karıştırıcı üzerinde düşük karıştırma hızında (400 rpm) dakikada 150 damla olacak şekilde damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra 1 saat boyunca polimerleşmenin sağlanması için boncuklar oda sıcaklığında bekletildi. Yaklaşık 3-4 mm çaplı boncuklar, polimerleşme sonunda tutuklanmamış hücrelerden ve fazla CaCl_2 'den arındırmak için steril saf su ile yıkandı [Ivanova et al., 2010; Sar et al., 2016].

3.2.5. Serbest Hücrelerin OD_{600} Değerlerinin Belirlenmesi ve İnkübasyonu

Bakteri önkültürlerinden fermentasyon besiyeri içerisinde son OD_{600} değeri 0.05 olacak şekilde hesaplanarak 80 mL fermentasyon besiyeri içerisine inokülasyon yapıldı. Fermentasyon 100 mL hacimlik erlenlerde 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (48 ve 72 saat) gerçekleştirildi.

3.2.6. İmmobilize Hücrelerin Besiyeri İçerisine İnokülasyonu

Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi immobilizasyonu sağlanan hücreleri içeren boncuklar fermentasyon ortamı içerisine %20 oranında (80 mL besiyeri içerisinde 16

mL boncuk olacak şekilde) eklendi. İnkübasyon 100 mL hacimlik erlenlerde 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (48 ve 72 saat) gerçekleştirildi.

3.2.7. İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanım Etkinliğinin Belirlenmesi

İmmobilize ederek tutuklanan FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanılabilirliğini araştırmak üzere glukozlu, maltozlu ve malt özütü besiyeri ayrı ayrı değerlendirildi. Bu amaçla boncuklar, her fermentasyon süresi 48 saat sürecektir şekilde üç besiyeri için de ardışık olarak 9 defa yeni fermentasyon besiyerine aktararak kullanıldı. Yeni besiyerine aktarma işlemi steril koşullarda süzgeçli huni aracılığıyla en az üç kez steril saf su ile durulandıktan sonra gerçekleştirildi. İnkübasyon için 100 mL hacimli erlenler kullanıldı. Ağız kısmı mantar tıpa ile kapatılan erlenler üstü 22-kalibre iğne ile delinerek gaz çıkışı sağlandı. İnkübasyon her uygulama için 180 rpm hızda, 37°C’de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi.

3.2.8. Kültür Koşulları

Çalışma, bakteriyel hemoglobinin düşük oksijenli koşullarda ekspresyonunun sağlanması için düşük oksijenli koşullarda gerçekleştirildi. Bunun için erlenlerde %20 oranında havalanma olacak şekilde 100 mL’lik erlenin 80 mL’si besiyeri ve inokulum veya kültür ortamının %20’si oranında (80mL besiyeri hacminin 16 mL’si boncuk, 64 mL’si besiyeri olacak şekilde) immobilize hücre ile dolduruldu. Ağız kısmı mantar tıpa ile kapatılan erlenlerin üstü 22-kalibre iğne ile delinerek gaz çıkışı sağlandı. İnkübasyon her uygulama için 180 rpm hızda, 37°C’de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi.

3.2.9. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi

Farklı besiyerleri içerisinde inkübe edilen serbest ve immobilize hücrelerin kültür sonundaki hücre sayıları bir spektrofotometre kullanılarak belirlendi.

Kültürlerin OD₆₀₀ nm'deki optik yoğunlukları, OD₆₀₀ nm 0,6 değerini aşmayacak şekilde gerektiğinde steril özgün besiyeri ile seyreltilerek ölçüldü.

3.2.10. Üretilen Biyoetanol ile Kalan Şeker Miktarının Ölçümü ve Verim Değerlerinin Hesaplanması

48 ve 72 saatlik fermentasyon süreleri sonunda üretilen etanol ve kalan şeker miktarlarını belirlemek için yaklaşık 1,5 mL hacimlerde örnekler mikrosantrifüj tüplerine alındı. 10000 rpm rotasyon hızında +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilen örneklerin üst sıvıları 0.22µ por çaplı steril olmayan filtrelerle süzülerek cam viallere aktarıldı. Analiz öncesi, beklenen aralıklardaki glukoz veya maltoz şekerleri ve etanol miktarları standart olarak (%0.5-1.0-2.0-4.0-5.0) önceden belirtilen değerlere göre değerlendirildi. 25°C kolon sıcaklığında 1mL/dk akış hızı ile izokratik akış modunda 20µL injeksiyon hacmi kullanılarak ayarlanan analiz koşullarında HPLC'de örneklerin içerdikleri şeker ve etanol miktarları belirlendi. Mobil faz olarak ultra saf su ile hazırlanan Asetonitril çözeltisi (60:40) kullanıldı.

Yapılan ölçümler sonunda elde edilen veriler doğrultusunda alkol miktarı (g/100mL), alkol verimi (%) ve teorik verim (%) hesaplamaları aşağıda verilen formüllere göre yapıldı:

$$\text{Etanol Miktarı } \left(\frac{\text{g}}{100\text{mL}} \right) = \text{Etanol Miktarı } (\%v/v) \times 0,78924 \quad (3.1)$$

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

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

3.2.11. Rekombinant Suşlardaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü

Fermentasyon sonunda *vgb* içeren TS3 ve TS4 suşlarının sentezledikleri VHb miktarları indirgenmiş-indirgenmemiş [Webster and Liu, 1974] fark spektrasıyla [Khosla ve Bailey,1988] UV-1800 Shimadzu UV-VIS NIR spektrofotometre cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılarak ölçüldü.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile yapıldı. *p* değerleri tek kuyruklu *t*-testi ile VHb'nin ve/veya hücre immobilizasyonunun farklı şekerlerden ve gıda sanayinde kullanılan malt özütünden etanol üretimini olumlu etkileyeceği hipotezine dayanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Glukoz ile Hazırlanan Besiyerindeki (GB) Etanol Üretimleri

Serbest ve immobilize haldeki FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının %8 (w/v) oranında glukoz içeren modifiye LB (GB) besiyeri içerisindeki 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında, düşük havalandırılmalı koşullarda 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre yoğunlukları (OD₆₀₀ nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100mL, %v/v) incelendi. Elde edilen verilere göre suşların 72 saat sonunda substrat tüketimi (%), alkol üretimi (%) oranları ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanolx100mL⁻¹/OD) belirlendi.

- İnkübasyon sonu hücre yoğunluğu

Uygun antibiyotikleri içeren GB besiyerinde düşük havalandırılmalı koşullarda 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda, genel olarak serbest hücreler immobilize hücrelerden daha yüksek oranda üreme özelliği (OD₆₀₀) gösterdi. En yüksek OD₆₀₀ değeri 72 saatte serbest FBR5 suşu ile elde edildi (Tablo 4.1).

- Serbest hücrelerle etanol üretimi

Bütün serbest formdaki suşlar için fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması sonucunda etanol üretiminde %10-20 oranında artış belirlendi. Serbest formdaki VHB eksprese eden TS4 suşu FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında, TS4 suşu ile 48 saat sonunda %5 oranında daha fazla olacak şekilde %2.6 (v/v) oranında ($p>0.05$) etanol üretildiği görüldü. Fermentasyon 72 saatte sonlandırıldığında ise, serbest formdaki TS4 suşunun serbest formdaki FBR5 suşundan %13 oranında ($p=0.005$) daha fazla etanol ürettiği saptandı (Tablo 4.1).

- Immobilize hücrelerle etanol üretimi

İmmobilize hücrelerle fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması ile bütün suşlarla etanol üretiminde %5-17 oranında artış belirlendi. 48 saatlik fermentasyon sonunda en yüksek etanol üretiminin %2.27 (v/v) oranında ve FBR5 suşundan %14 daha yüksek oranda ($p=0.01$) olacak şekilde immobilize formdaki TS4

suşu ile elde edildiği saptandı. 72 saat boyunca sürdürülen fermentasyon sonunda ise en yüksek etanol üretiminin immobilize TS4 suşu ile %2.7 (v/v) oranında ve bu üretimin FBR5 suşu ile elde edilen üretimden %26 oranında daha fazla ($p=0.01$) olduğu tespit edildi. TS4 suşuna ait hücreleri immobilize etmenin etanol üretimini 48 saatte %10, 72 saatte ise % 7 oranında arttırdığı belirlendi (Tablo 4.1).

VHb ekspresyonunun etanol üretimini 72 saat sonunda immobilize TS4 (*vgb+*) suşu serbest formadaki FBR5 (*vgb-*) ile karşılaştırıldığında %21 ($p=0.02$) oranında arttırdığı görüldü. Tüm uygulamalarda TS3 suşunun etanol üretimi FBR5 suşundan daha düşük olduğu saptandı (Tablo 4.1).

- Substrat tüketimi

72 saatlik fermentasyon sonunda, serbest hücrelerle en yüksek substrat tüketiminin %50 oranı ile TS3 suşu tarafından gerçekleştirildiği görüldü. Immobilize hücreler arasında ise en yüksek substrat tüketiminin %59 oranı ile FBR5 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlendi (Şekil 4.1).

- Alkol verimi

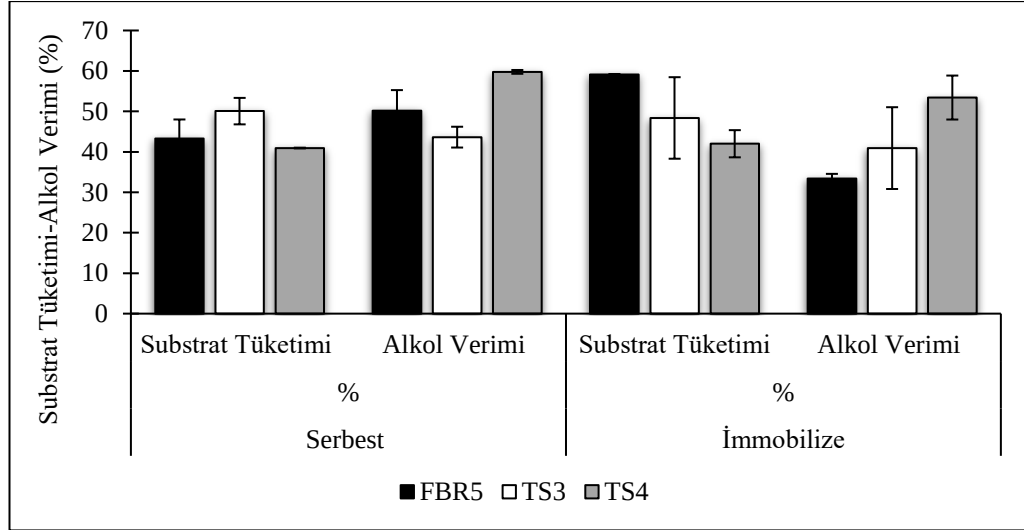
En yüksek alkol veriminin VHb ekprese eden TS4 suşu ile serbest formda %60, immobilize formda ise %53 oranında olduğu saptandı (Şekil 4.1).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

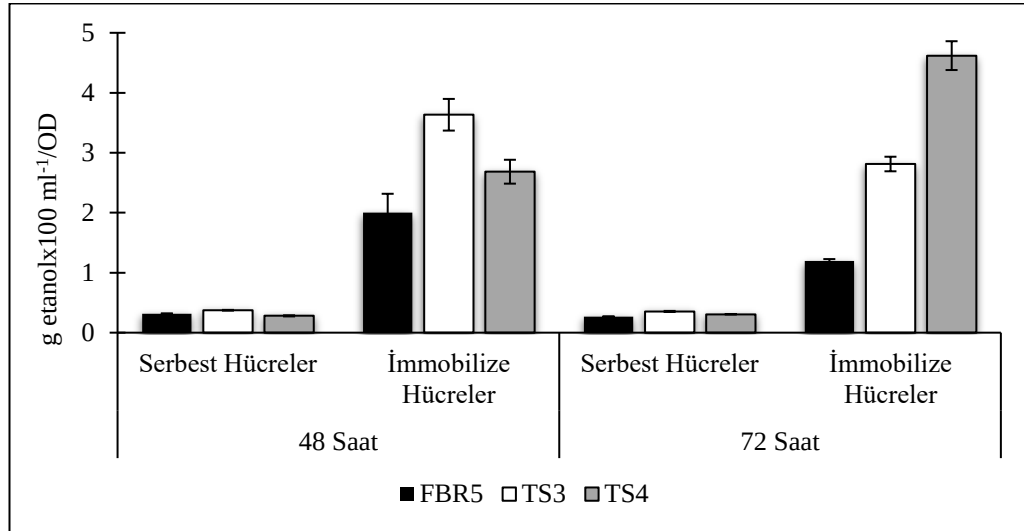
Bütün fermentasyon süreleri sonunda immobilize hücrelerle serbest hücrelerle elde edilen birim hücre biyokütlesi başına etanol değerinden yaklaşık 6-15 kat daha yüksek miktarda bulundu. Ayrıca özellikle VHb ekspresyonu yapan immobilize suşlarla 48 saat (TS3) ve 72 saat (TS4) sonunda en yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol değerleri elde edildi (Şekil 4.2).

Tablo 4.1: GB besiyeri içerisindeki serbest (S) ve immobilize (İ) FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm), üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Süre	Hücre Formu	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	EtOH %v/v
48 saat	S	FBR5	4.96 (0.04)	1.57 (0.02)	1.97 (0.02)
		TS3	4.08 (0.10)	1.52 (0.01)	1.91 (0.01)
		TS4	5.85 (0.01)	1.64 (0.05)	2.06 (0.06)
	İ	FBR5	0.81 (0.16)	1.60 (0.06)	2.00 (0.07)
		TS3	0.43 (0.01)	1.56 (0.06)	1.96 (0.08)
		TS4	0.68 (0.04)	1.81 (0.04)	2.27 (0.05)
72 saat	S	FBR5	6.54 (0.08)	1.75 (0.01)	2.19 (0.01)
		TS3	4.99 (0.16)	1.76 (0.01)	2.21 (0.01)
		TS4	6.45 (0.04)	1.98 (0.01)	2.48 (0.01)
	İ	FBR5	1.37 (0.01)	1.67 (0.01)	2.10 (0.01)
		TS3	0.65 (0.00)	1.83 (0.08)	2.29 (0.10)
		TS4	0.46 (0.01)	2.12 (0.05)	2.66 (0.06)



Şekil 4.1: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının GB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.2: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının GB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.2. Maltoz ile Hazırlanan Besiyerindeki (MB) Etanol Üretimleri

Serbest ve immobilize formdaki FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının %1 oranında glukoz ile %4.5 oranında maltoz içeren besiyeri içerisindeki 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında, düşük havalandırılmalı koşullarda 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre yoğunlukları (OD₆₀₀ nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100mL, %v/v) incelendi. Elde edilen verilere göre suşların 72 saat sonunda substrat tüketimi (%), alkol üretimi (%) oranları ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanolx100 mL⁻¹/OD) belirlendi.

- İnkübasyon sonu hücre yoğunluğu

Uygun antibiyotikleri içeren MB besiyerinde serbest hücreler, immobilize hücrelerden daha yüksek oranda üreme özelliği (OD₆₀₀) gösterdi. Fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması ile hücre yoğunluklarında artış gözlemlendi. Serbest hücrelerle en yüksek hücre yoğunluğu 48 saatte FBR5 suşu ile, 72 saatte ise TS4 suşu ile elde edildi. Immobilize hücrelerle ise 48 ve 72 saat sonundaki en yüksek OD₆₀₀ değeri FBR5 suşu ile elde edildi (Tablo 4.2).

- Serbest hücrelerle etanol üretimi

MB besiyerinde suşların etanol üretimleri %0.77-2.19 (v/v) oranlarında bulundu. Serbest hücrelerle en yüksek etanol üretiminin TS3 suşu ile 48 saatte %1.71 (v/v), 72 saatte ise %2.19 oranlarında olduğu belirlendi. Serbest formdaki hücrelerle gerçekleştirilen fermentasyonun süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması sonucunda etanol üretimindeki en yüksek artışın %28 oranı ile serbest formadaki TS3 suşu ile elde edildiği saptandı. Serbest formdaki VHB eksprese eden TS3 suşu serbest formdaki FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında, 72 saat sonunda TS3 suşu ile %26 oranında daha fazla ($p=0.02$) etanol üretildiği görüldü (Tablo 4.2).

- Immobilize hücrelerle etanol üretimi

İmmobilize hücrelerle fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması ile bütün suşlarla etanol üretiminin %16-57 oranlarında arttığı gözlemlendi. İmmobilize formdaki hücrelerle etanol üretimleri incelendiğinde en yüksek üretimin FBR5 suşu

ile 48 saatte %1.19 (v/v) oranında, 72 saatte ise %1.88 (v/v) oranında olduğu belirlendi. Ayrıca immobilizasyonun etanol üretiminde artışa neden olduğu tek suşun %11 oranı ($p=0.04$) ile FBR5 olduğu saptandı (Tablo 4.2).

72 saat sonunda immobilize TS3 (*vgb+*) ve TS4 (*vgb+*) suşları serbest formadaki FBR5 (*vgb-*) ile karşılaştırıldığında ise MB besiyerinde VHb ekspresyonunun etanol üretiminde bir artışa neden olmadığı belirlendi (Tablo 4.2).

- Substrat tüketimi

72 saatlik fermentasyonun sonunda, serbest hücrelerle en yüksek substrat tüketiminin %55 oranı ile FBR5 suşu tarafından, immobilize hücrelerde ise %36 ile TS3 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlendi (Şekil 4.3).

- Alkol verimi

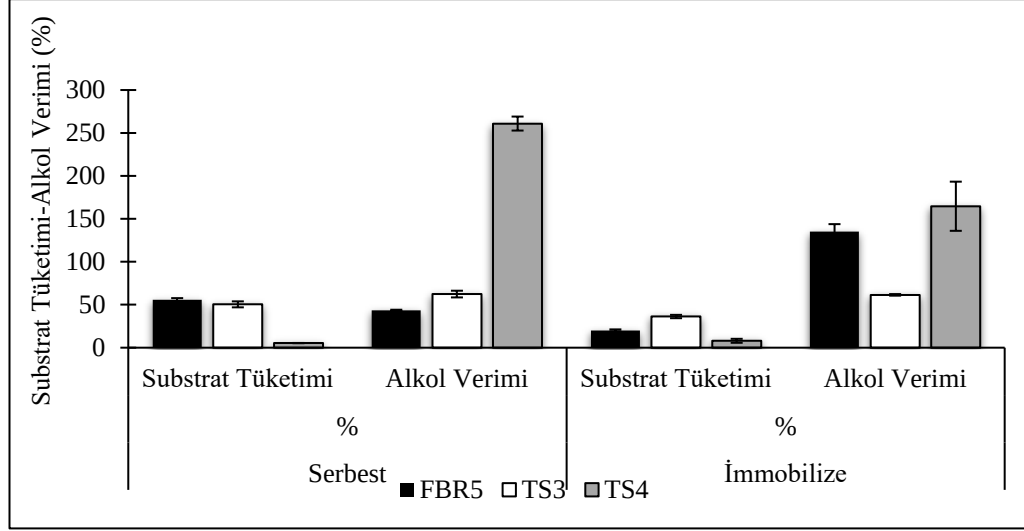
72 saat sonunda en yüksek alkol verimi sırasıyla %261 ve %164 oranları ile serbest ve immobilize formdaki TS4 suşu ile sağlandı (Şekil 4.3).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

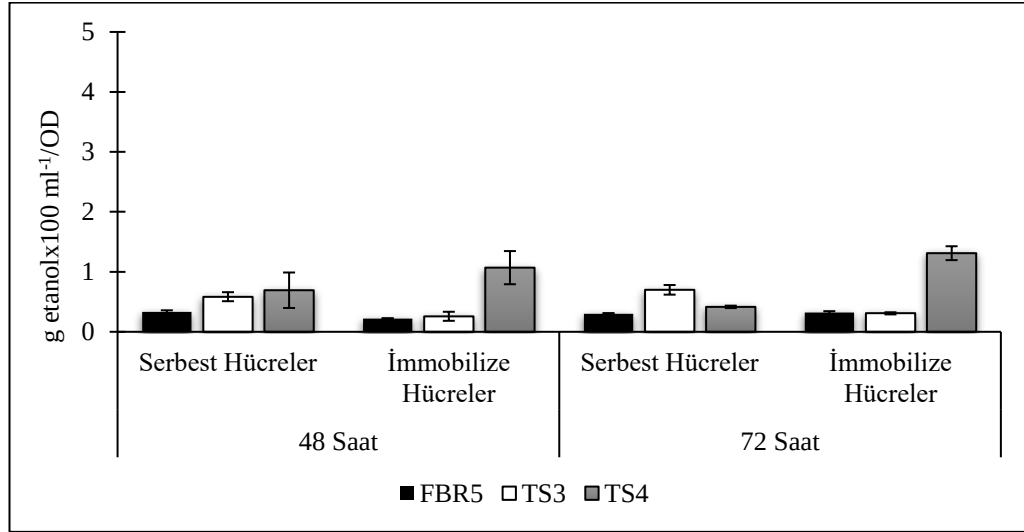
Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin genel olarak düşük ($0.22-1.31 \text{ g} \times 100 \text{ mL}^{-1} / \text{OD}$) olduğu gözlemlendi. En yüksek üretim birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi immobilize formdaki TS4 suşu ile elde edildi (Şekil 4.4).

Tablo 4.2: MB besiyeri içerisindeki serbest (S) ve immobilize (İ) FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Süre	Hücre Formu	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	EtOH %v/v
48 saat	S	FBR5	4.15 (0.14)	1.34 (0.06)	1.69 (0.07)
		TS3	2.34 (0.13)	1.36 (0.10)	1.71 (0.13)
		TS4	1.26 (0.48)	0.80 (0.04)	0.98 (0.05)
	İ	FBR5	4.31 (0.06)	0.95 (0.02)	1.19 (0.03)
		TS3	3.40 (0.53)	0.86 (0.12)	1.08 (0.15)
		TS4	0.58 (0.07)	0.61 (0.08)	0.77 (0.11)
72 saat	S	FBR5	6.22 (0.09)	1.35 (0.03)	1.73 (0.04)
		TS3	6.30 (0.30)	1.75 (0.01)	2.19 (0.01)
		TS4	6.79 (0.08)	0.78 (0.01)	1.01 (0.01)
	İ	FBR5	4.69 (0.33)	1.50 (0.00)	1.88 (0.00)
		TS3	4.03 (0.04)	1.24 (0.08)	1.56 (0.11)
		TS4	0.55 (0.11)	0.71 (0.08)	0.90 (0.11)



Şekil 4.3: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.4: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml⁻¹/OD). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.3. Malt Özütü ile Hazırlanan Besiyerindeki (MÖB) Etanol Üretimleri

Serbest ve immobilize formdaki FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının %1 (w/v) oranında glukoz ile %4.5 (w/v) maltoz içeren malt özütü besiyeri içerisindeki

içerisindeki 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında, düşük havalandırılmalı koşullarda 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre yoğunlukları (OD₆₀₀ nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100mL, %v/v) incelendi. Elde edilen verilere göre suşların 72 saat sonunda substrat tüketimi (%), alkol üretimi (%) oranları ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi (g etanolx100 mL⁻¹/OD) belirlendi.

- İnkübasyon sonu hücre yoğunluğu

Denenen besiyerleri içinde (GB, MB ve MÖB) hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu besiyeri MÖB besiyeri olarak belirlendi. Fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate kadar arttırılmasının tüm suşlarda hücre yoğunluğunun artmasına neden olduğu görüldü. En yüksek OD₆₀₀ değeri immobilize formdaki TS4 suşu ile 72 saatlik fermentasyon sonunda elde edildi (Tablo 4.3).

- Serbest hücrelerle etanol üretimi

Uygun antibiyotikleri içeren MÖB besiyerinde serbest hücrelerle etanol üretimi genel olarak 72 saatte 48 saatten daha yüksek bulundu. Serbest formdaki hücrelerle fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılmasıyla etanol üretimindeki en yüksek artış %42 oranı ile TS4 suşuyla elde edildi. Serbest haldeki hücreler ile en yüksek etanol üretiminin 48 saatte %2.14 (v/v) oranı ile FBR5 suşu ile, 72 saatte ise %2.65 (v/v) oranı ile serbest formdaki TS4 suşu ile elde edildiği belirlendi (Tablo 4.3).

- İmmobilize hücrelerle etanol üretimi

İmmobilize hücrelerle fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması ile tüm suşlarla etanol üretiminde %13-78 oranlarında artış olduğu görüldü. Fermentasyon sonucu elde edilen en yüksek etanol üretimleri 48 ve 72 saat sonunda TS4 suşu ile sırasıyla %1.67 ve %2.97 (v/v) olarak belirlendi. İmmobilize formdaki TS4 suşu ile 48 saatlik fermentasyon sonundaki etanol üretiminin immobilize FBR5 suşu ile aynı miktarda ($p>0.05$) etanol ürettiği belirlendi. 72 saatlik fermentasyonun sonunda ise immobilize formdaki TS4 suşu (*vgb+*) ile üretilen etanol miktarının immobilize formdaki FBR5 suşu ile üretilenden %57 oranında daha fazla ($p=0.002$) olduğu görüldü (Tablo 4.3).

Serbest formdaki FBR5 ve immobilize formdaki VHb eksprese eden TS4 suşu karşılaştırıldığında ise etanol üretiminin TS4 suşu ile %12 oranında ($p>0.05$) daha yüksek olduğu saptandı (Tablo 4.3).

- Substrat tüketimi

72 saat sonunda substrat tüketimi serbest formdaki hücrelerle en yüksek %87 oranı ile FBR5 suşu tarafından gerçekleştirildiği saptandı. Immobilize formdaki hücrelerle en yüksek substrat tüketiminin %88 oranı ile TS4 suşu ile olduğu belirlendi (Şekil 4.5).

- Alkol verimi

72 saat sonunda serbest hücrelerle en yüksek alkol veriminin %62 oranı ile TS3 suşu tarafından, immobilize hücrelerle ise %48 oranı ile TS4 suşu tarafından sağlandığı belirlendi (Şekil 4.5).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

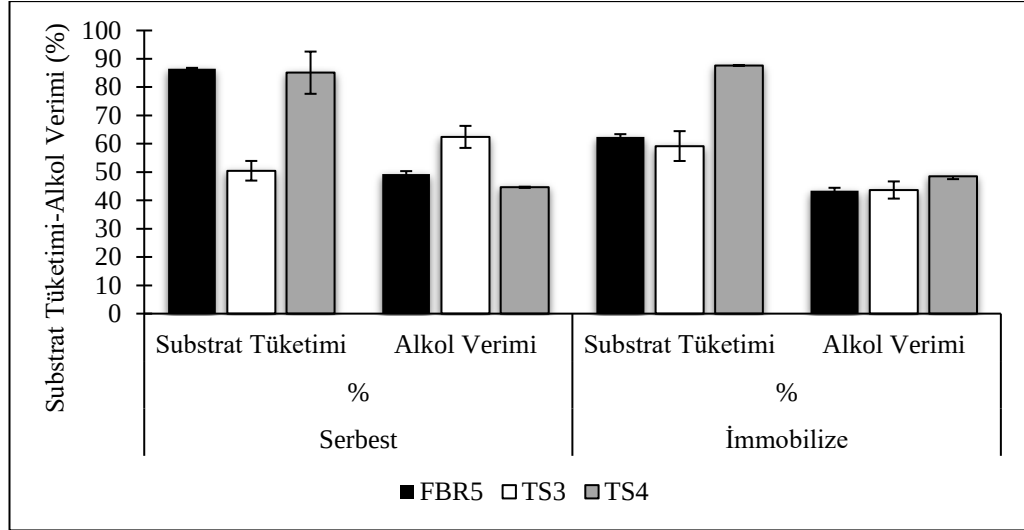
Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi diğer besiyerleri ile karşılaştırıldığında en düşük seviyede bulundu (Şekil 4.6).

- VHb ekspresyonu seviyeleri

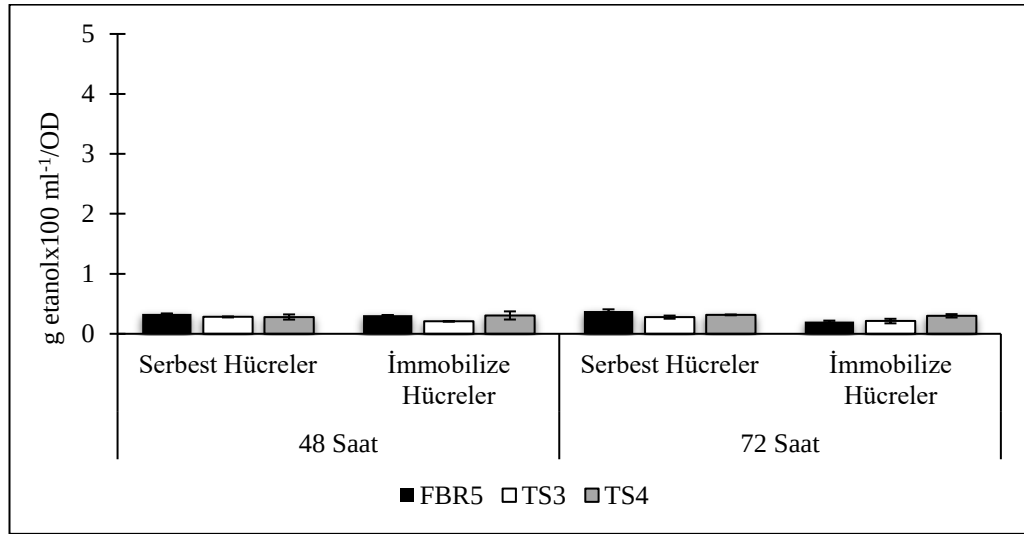
GB, MB ve MÖB besiyerlerinde inkübe edilen serbest ve immobilize hücrelerin inkübasyon sonu VHb ekspresyon değerleri TS3 ve TS4 suşlarında (nmol/g yaş ağırlık) belirlendi. Üç besiyerinde de VHb ekspresyonunun serbest ve immobilize hücrelerde en yüksek TS4 suşu ile olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Ekspresyon seviyesinin denenen diğer besiyerlerine göre en yüksek MB besiyerinde olduğu saptandı (Şekil 4.7).

Tablo 4.3: MÖB besiyeri içerisindeki serbest (S) ve immobilize (İ) FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 ve 72 saat sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm) ve üretilen alkol miktarı (g/100ml, %v/v). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

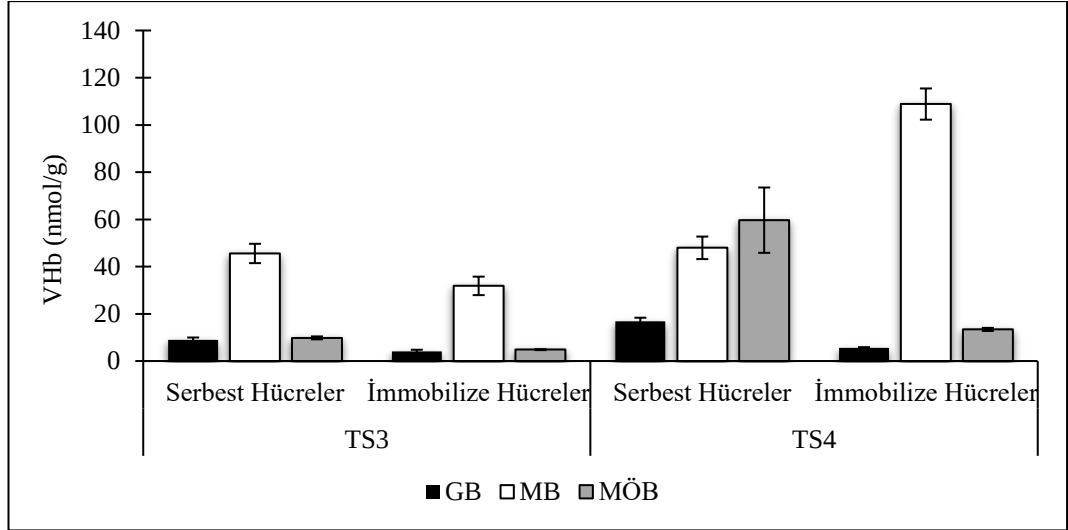
Süre	Hücre Formu	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	EtOH %v/v
48 saat	S	FBR5	5.15 (0.16)	1.71 (0.01)	2.14 (0.01)
		TS3	5.11 (0.07)	1.44 (0.02)	1.80 (0.03)
		TS4	5.33 (0.29)	1.48 (0.15)	1.86 (0.18)
	İ	FBR5	4.68 (0.84)	1.33 (0.18)	1.67 (0.34)
		TS3	5.08 (0.28)	1.05 (0.01)	1.32 (0.09)
		TS4	4.70 (0.14)	1.33 (0.17)	1.67 (0.18)
72 saat	S	FBR5	6.22 (0.16)	2.09 (0.14)	2.63 (0.08)
		TS3	6.30 (0.06)	1.75 (0.07)	2.19 (0.04)
		TS4	6.79 (0.91)	2.11 (0.01)	2.65 (0.06)
	İ	FBR5	7.50 (0.97)	1.50 (0.06)	1.89 (0.23)
		TS3	6.87 (1.36)	1.43 (0.03)	1.80 (0.01)
		TS4	7.94 (0.91)	2.37 (0.05)	2.97 (0.22)



Şekil 4.5: Serbest ve immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MÖB besiyeri içerisinde 72 saatlik fermentasyon sonundaki substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.6: Serbest ve immobilize haldeki FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının MÖB besiyeri içerisinde 48 ve 72 saatlik fermentasyon sonu birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml⁻¹/OD). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.7: GB, MB ve MÖB besiyerleri içerisinde serbest ve immobilize hücrelerin inkübasyon sonu VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.4. Glukoz İçeren Besiyeri (GB) İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı

İmmobilize edilmiş FBR5, TS3 ve TS4 suşlarına ait hücrelerin biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanım etkinliği araştırıldı. Bu amaçla immobilize suşları içeren boncuklar ayrı ayrı, her fermentasyon süresi 48 saat sürecektir şekilde %8 (w/v) oranında glukoz içeren GB besiyerine 9 defa yeni fermentasyon besiyerine aktararak kullanıldı. Bu 9 kullanım arasından seçilen 1., 5. ve 9. kez fermentasyon sonunda elde edilen hücre yoğunlukları (OD_{600} nm), üretilen alkol miktarı (g/100mL) substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%) ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimleri (g etanolx100 ml⁻¹/OD) incelendi. Ayrıca kalan glukoz miktarları (%w/v), üretilen alkol miktarları (%v/v) ve VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) belirlendi.

- Kullanım sonu hücre yoğunluğu

Üç kullanım arasından elde edilen değerlere göre en yüksek hücre yoğunluğunun FBR5 (6.17, OD_{600} nm) ve TS4 (4.15, OD_{600} nm) suşu ile 5. kullanımda olduğu belirlendi (Tablo 4.4).

- Substrat tüketimi

1. kullanımda en yüksek substrat tüketimi %55 oranı ile FBR5 suşu tarafından gerçekleştirilmiştir. Üç kullanım içerisinde en yüksek substrat tüketimi 5. kullanım sonucu %67 oranı ile TS4 suşuyla elde edildi. 9. kullanımda ise %54 oranında substrat tüketimi ile en yüksek tüketim TS4 suşu tarafından sarfedildiği belirlendi (Tablo 4.4).

- Alkol verimi

Üç kullanım incelendiğinde 1. kullanımda en yüksek alkol veriminin %53 oranı ile TS4 suşuyla ve 5. kullanımda %41 oranıyla TS3 suşuyla elde edildiği ve 9. kullanımda ise en yüksek alkol veriminin %51 oranı ile TS4 suşuyla sağlandığı saptandı. (Tablo 4.4).

- Etanol üretimi

1. kullarımdaki en yüksek etanol üretimi %2.3 (v/v) oranıyla FBR5 suşuyla, 5. kullarımdaki en yüksek etanol üretimi ise % 2.6 (v/v) oranıyla TS3 (*vgb+*) suşu ile elde edildiği belirlendi. 9. kullarımdaki en yüksek etanol üretimi %2.6 oranı ile TS3 ve TS4 suşlarıyla elde edildiği saptandı. 1., 5. ve 9. kullarımlar arasında en yüksek etanol üretiminin 9. kullarımda TS4 (*vgb+*) suşu ile %2.65 (v/v) olduğu ve bu üretimin FBR5 suşu ile üretilenden %12 oranında ($p=0.02$) daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.8).

- VHb ekspresyonu

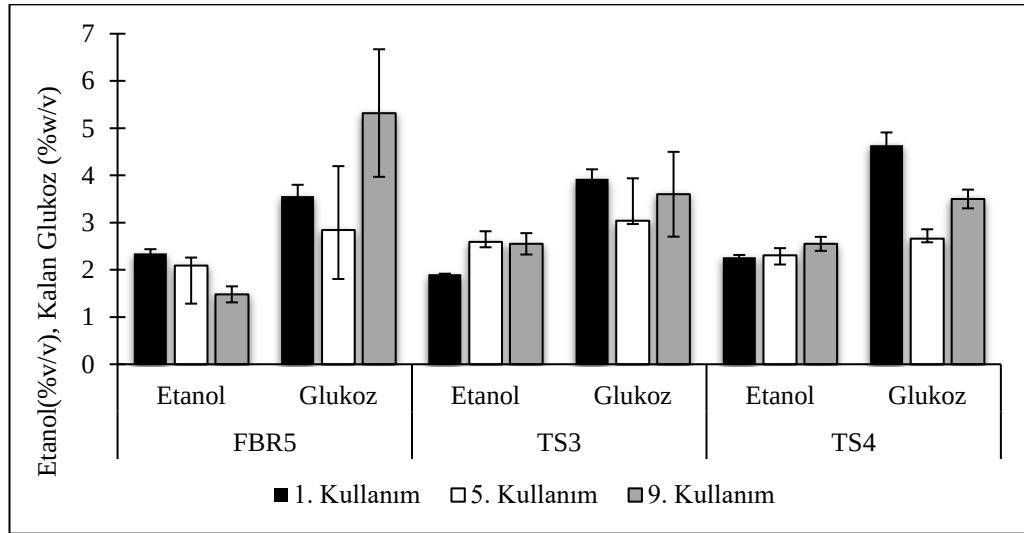
En yüksek VHb ekspresyonu 9. kullarımda TS3 suşunda gözlemlendi. TS3 suşunun TS4 suşuna oranla %92 daha fazla ($p<0.05$) VHb ekspresyonu gerçekleştirdiği belirlendi (Şekil 4.9).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

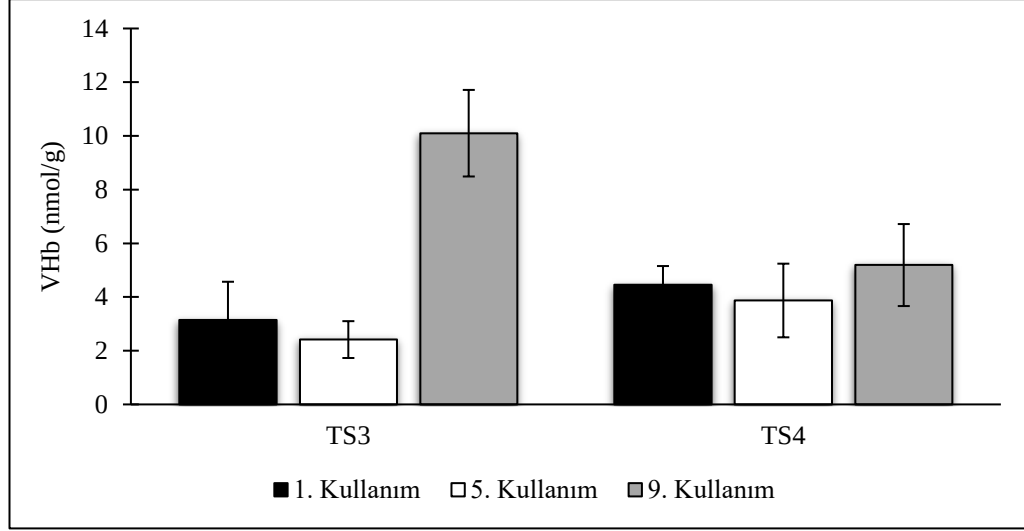
İmmobilize hücrelerin GB besiyeri içerisinde etanol üretimi için tekrarlı kullanımı sonunda en yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin 5. kullanım sonunda $2.41 \text{ g} \times 100 \text{ mL}^{-1} / \text{OD}$ ile TS3 suşu ile elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.14).

Tablo 4.4: GB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm), substrat tüketimi (%) ve alkol verimi (%) değerleri. Tablodaki veriler 1., 5. ve 9. tekrarlar aittir. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Kullanım	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	Substrat Tüketimi %	Alkol Verimi %
1	FBR5	1.21 (0.13)	1.87 (0.07)	55.50 (3.01)	41.70 (0.62)
	TS3	0.64 (0.09)	1.51 (0.01)	50.88 (2.47)	36.79 (1.93)
	TS4	0.82 (0.02)	1.81 (0.04)	42.00 (3.36)	53.33 (3.10)
5	FBR5	6.17 (0.26)	1.67 (0.64)	64.44 (2.99)	31.39 (6.01)
	TS3	2.26 (0.20)	2.07 (0.09)	62.00 (0.88)	41.23 (2.39)
	TS4	4.15 (0.17)	1.73 (0.16)	67.44 (0.97)	31.77 (3.35)
9	FBR5	3.85 (0.23)	1.28 (0.14)	45.44 (16.88)	36.58 (9.91)
	TS3	3.18 (0.16)	1.91 (0.18)	47.06 (11.23)	50.99 (7.47)
	TS4	3.26 (0.10)	2.03 (0.12)	54.50 (2.47)	46.06 (0.60)



Şekil 4.8: GB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.9: GB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki VHb ekspresyonu değerleri. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.5. Maltoz İçeren Besiyeri İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı

İmmobilize edilmiş FBR5, TS3 ve TS4 suşlarına ait hücrelerin bulunduğu boncukların biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanım etkinliği araştırıldı. Bu amaçla boncuklar, her fermentasyon süresi 48 saat sürecek şekilde %1 (w/v) oranında glukoz ile %4.5 (w/v) oranında maltoz içeren besiyerinde (MB) 9 fermentasyon gerçekleştirecek şekilde aktarılarak kullanıldı. Bu 9 kullanım arasından seçilen 1., 5. ve 9. kullanımlardan elde edilen hücre yoğunlukları (OD_{600} nm), üretilen alkol miktarları (g/100mL) substrat tüketimleri (%), alkol verimleri (%) ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimleri (g etanolx100mL⁻¹/OD) incelendi. Kalan glukoz ve maltoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v) belirlendi.

- Kullanım sonu hücre yoğunluğu

Üç kullanım arasından elde edilen değerlere göre en yüksek hücre yoğunluğu değeri (OD_{600} nm) FBR5 suşu ile 5.34 olarak 1. kullanımda olduğu belirlendi.

- Substrat tüketimi

Substrat tüketiminin üç suş için de en yüksek 1. kullanımda olduğu saptanmıştır. 1. kullanımda en yüksek substrat tüketiminin %71 oranıyla TS4 suşu ile olduğu belirlendi. 5. kullanımdaki en yüksek substrat tüketimi %17 oranı ile TS3 suşunda gözlenirken, 9. kullanımda %12 ile FBR5 suşuna gözlendi (Tablo 4.5).

- Alkol verimi

1. kullanımdaki en yüksek alkol verimi %50 oranı ile TS3 ve TS4 suşlarından elde edildi. 5. kullanımda FBR5 ve TS4 suşlarının %150 oranıyla en yüksek verimi sağladığı saptandı. 9. kullanımdaki alkol veriminin en yüksek olduğu suşun %180 oranı ile TS3 suşu olduğu belirlendi. FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında TS3 ve TS4 suşları ile 9. kullanımda sırasıyla %19 ve %13 oranında daha fazla verim sağlandığı görüldü (Tablo 4.5).

- Etanol üretimi

1. kullanımda en yüksek etanol üretiminin TS4 suşu ile %2.5 (v/v) oranında FBR5 suşu ile üretilen alkolden %14 daha yüksek ($p=0.01$) oranda üretildiği saptandı. 5. kullanımdaki en yüksek üretimin %1.3 (v/v) oranıyla TS4 ve FBR5 suşlarıyla, 9. kullanımdaki en yüksek üretimin ise %1.4 (v/v) oranıyla TS4 suşu ile elde edildiği görüldü (Şekil 4.10).

- VHb ekspresyon seviyeleri

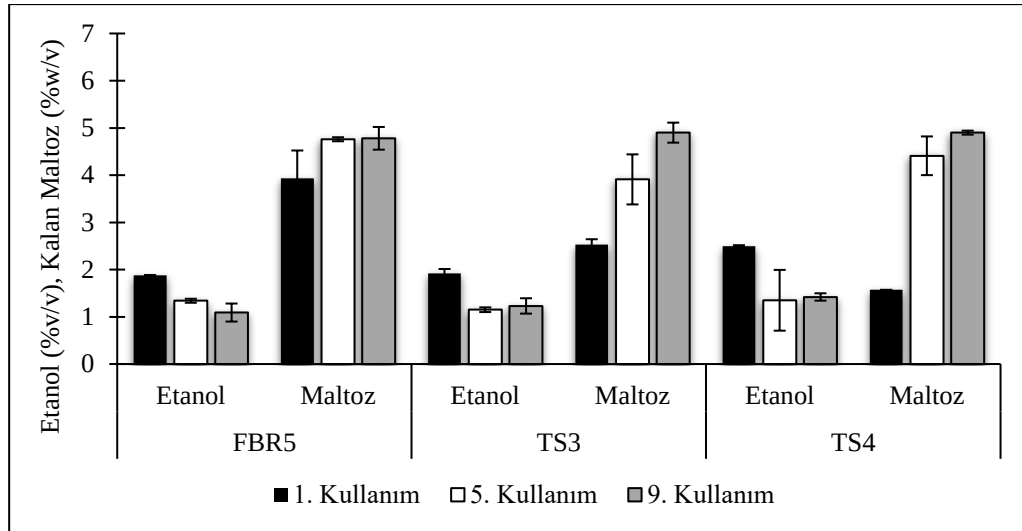
1., 5. ve 9. kullanımlar karşılaştırıldığında VHb ekspresyonunun TS3 suşu ile TS4 suşundan ($p<0.05$) daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.11).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

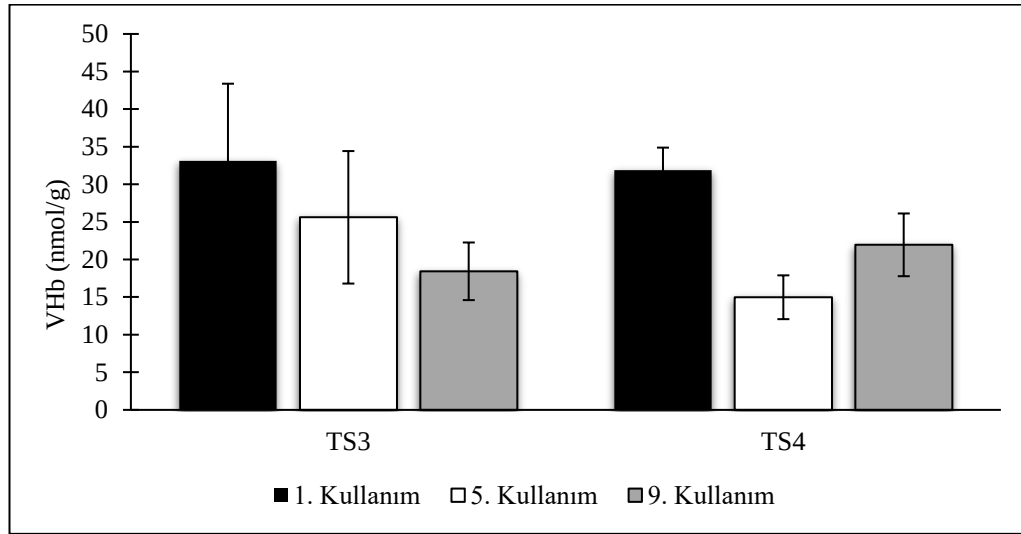
İmmobilize hücrelerin MB besiyeri ile fermentasyonda tekrarlı kullanımı sonunda en yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin 5. kullanım sonunda $1.12\text{gx}100\text{mL}^{-1}/\text{OD}$ ile TS4 suşu ile elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.14).

Tablo 4.5: MB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm), substrat tüketimi (%) ve alkol verimi (%) değerleri. Tablodaki veriler 1., 5. ve 9. kullanımlara aittir. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Kullanım	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	Substrat Tüketimi %	Alkol Verimi %
1	FBR5	5.34 (0.15)	1.50 (0.00)	55.73 (2.19)	48.45 (1.90)
	TS3	2.17 (0.19)	1.48 (0.07)	52.55 (2.06)	50.65 (0.53)
	TS4	3.82 (0.16)	1.99 (0.02)	71.45 (0.10)	50.11 (0.43)
5	FBR5	1.95 (0.70)	1.12 (0.01)	13.55 (1.41)	149.62 (14.87)
	TS3	3.13 (0.09)	1.03 (0.17)	17.00 (0.64)	109.04 (14.38)
	TS4	1.03 (0.34)	1.08 (0.00)	13.36 (3.21)	149.28 (35.90)
9	FBR5	3.09 (0.04)	0.98 (0.15)	11.91 (1.67)	150.70 (44.15)
	TS3	1.95 (0.02)	0.89 (0.13)	9.09 (2.57)	179.55 (25.11)
	TS4	2.84 (0.12)	0.95 (0.06)	10.00 (0.77)	170.12 (1.96)



Şekil 4.10: MB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşların 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.11: MB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki VHB ekspresyonu değerleri. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.6. Malt Özütü İçeren Besiyeri İçerisinde İmmobilize Hücrelerin Tekrarlı Kullanımı

İmmobilize edilmiş FBR5, TS3 ve TS4 suşlarına ait hücrelerin biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanım etkinliği araştırıldı. Bu amaçla immobilize suşları içeren

boncuklar ayrı ayrı, her fermentasyon süresi 48 saat sürecektir şekilde %1 (w/v) oranında glukoz ile %4.5 (w/v) oranında maltoz içeren malt özütü besiyerinde 9 defa yeni fermentasyon besiyerine aktararak kullanıldı. Bu 9 kullanım arasından seçilen 1., 5. ve 9. kez fermentasyon sonunda elde edilen hücre yoğunlukları ($OD_{600\text{ nm}}$), üretilen alkol miktarı (g/100mL) substrat tüketimleri (%) ve alkol verimleri (%) ve birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimleri (g etanolx100 ml⁻¹/OD) incelendi. Ayrıca kalan glukoz miktarları (%w/v), üretilen alkol miktarları (%v/v) ve VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) belirlendi.

- Kullanım sonu hücre yoğunluğu

Kullanımlar karşılaştırıldığında toplam hücre sayımı için $OD_{600\text{ nm}}$ 'de yapılan ölçümlere göre en yüksek hücre yoğunluğu 5. kullanımda gözlemlendi. En yüksek değer 5. kullanımdaki FBR5 suşu ile belirlendi.

- Substrat tüketimi

1., 5. ve 9. kullanımlar arasında en yüksek substrat tüketimi %87 oranı ile 1. kullanımdaki TS3 suşu tarafından gerçekleştirildi (Tablo 4.6).

- Alkol verimi

Her üç kullanımda da en yüksek alkol verimi TS4 suşu ile elde edildi. 1., 5. ve 9. kullanımlar arasında en yüksek alkol verimi %54 oranı ile 5. kullanımdaki TS4 suşu ile sağlandı (Tablo 4.6).

- Etanol üretimi

En yüksek etanol üretiminin 1., 5. ve 9. kullanımlarda sırasıyla %3, %2.3 ve %2.1 (v/v) oranları ile TS4 suşuyla elde edildiği saptandı. FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında TS4 suşu ile 1., 5. ve 9. kullanımda sırasıyla %55, %25 ve %18 oranında ($p<0.05$) etanol üretiminin arttığı görüldü (Şekil 4.12).

- VHb ekspresyon seviyeleri

MÖB besiyerinde düşük havalandırılmalı şartlarda inkübe edilen TS3 ve TS4 suşlarının VHb ekspresyonu seviyeleri 1., 5. ve 9. kullanımlar boyunca incelendi. Her üç kullanımda da TS4 suşunun TS3 suşundan daha yüksek oranda VHb ekspresyonu

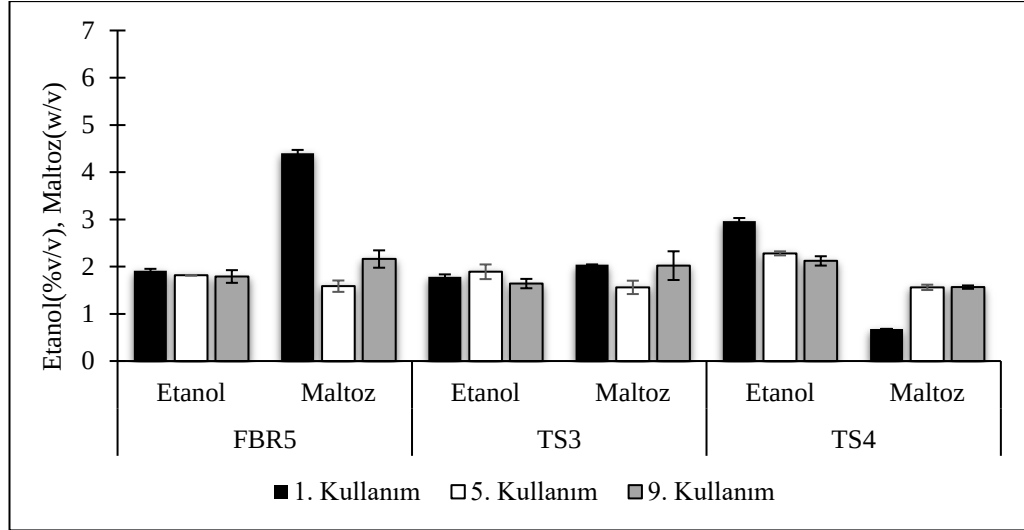
yaptığı belirlendi. 5. kullanımda TS4 suşu TS3 suşundan %48 ($p=0.07$) oranında daha yüksek ekspresyon yaparak en yüksek ekspresyonu gerçekleştirdiği saptandı (Şekil 4.13).

- Birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi

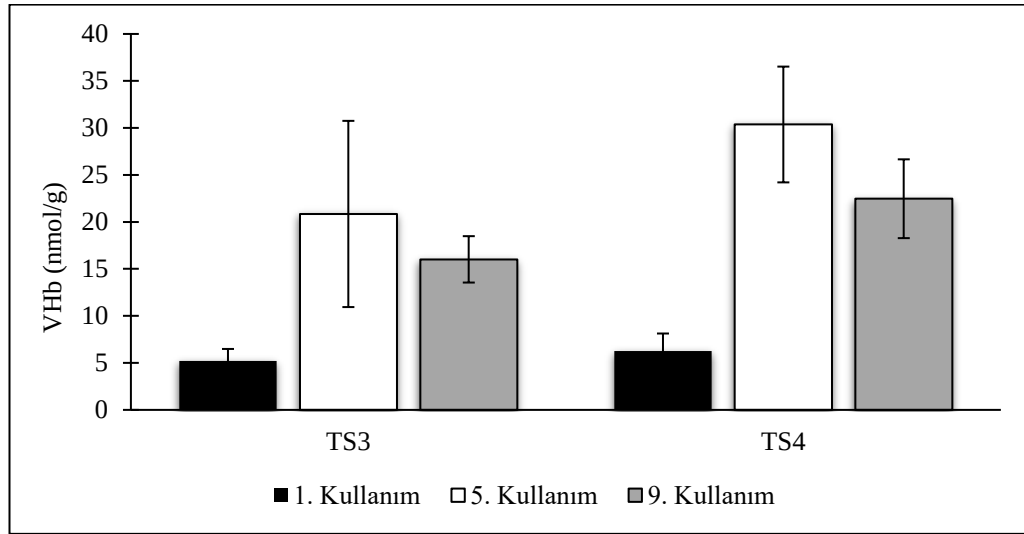
İmmobilize hücrelerin MÖB besiyeri içerisinde etanol üretimi için tekrarlı kullanımı sonunda en yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin 9. kullanım sonunda $0.87 \text{ g} \times 100 \text{ mL}^{-1} / \text{OD}$ ile TS4 suşu ile elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.14).

Tablo 4.6: MÖB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 kullanımı sonundaki hücre yoğunlukları (OD600 nm), substrat tüketimi (%) ve alkol verimi (%) değerleri. Tablodaki veriler 1., 5. ve 9. tekrarlara aittir. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

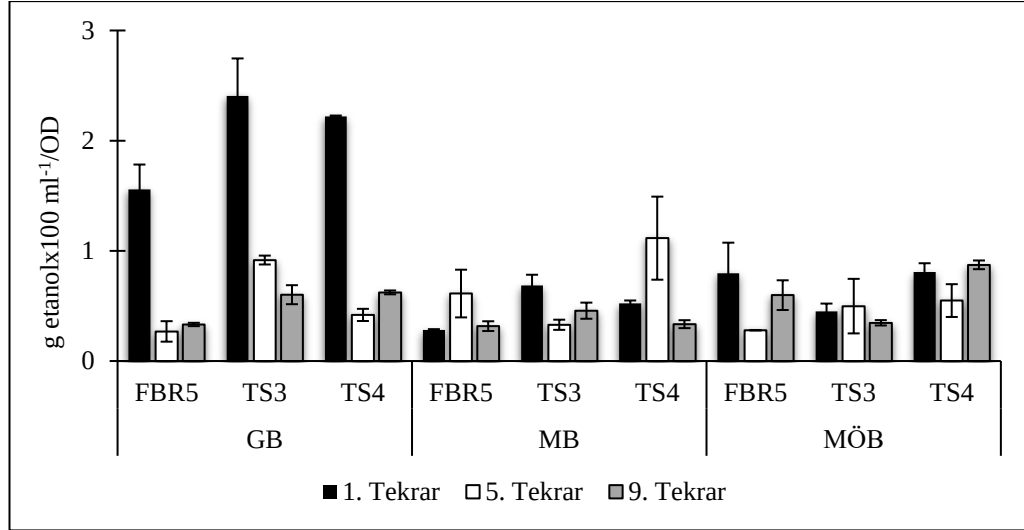
Kullanım	Suşlar	OD 600nm	EtOH g/100mL	Substrat Tüketimi %	Alkol Verimi %
1	FBR5	1.21 (0.05)	2.02 (0.02)	79.73 (3.73)	45.67 (1.75)
	TS3	0.64 (0.29)	1.42 (0.04)	62.91 (0.00)	40.72 (1.13)
	TS4	0.82 (0.16)	2.40 (0.05)	87.27 (0.51)	48.76 (1.33)
5	FBR5	6.17 (0.03)	1.45 (0.01)	71.18 (2.19)	36.61 (0.62)
	TS3	2.26 (0.00)	1.51 (0.12)	71.64 (2.57)	37.83 (1.93)
	TS4	4.15 (0.62)	1.83 (0.03)	61.09 (3.34)	53.66 (3.10)
9	FBR5	3.85 (0.15)	1.29 (0.10)	52.27 (0.90)	44.17 (2.73)
	TS3	3.18 (0.09)	1.02 (0.15)	40.55 (4.11)	45.01 (2.19)
	TS4	3.26 (0.08)	1.67 (0.17)	45.55 (2.19)	51.72 (4.42)



Şekil 4.12: MÖB besiyeri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşların 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımlarına ait kalan glukoz miktarı (%w/v) ve üretilen alkol miktarı (%v/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.13: MÖB besiyeri içerisindeki immobilize TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik 9 tekrarlı kullanımları sonundaki VHB ekspresyonu değerleri. Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.14: GB, MB ve MÖB fermentasyon besiyerleri içerisindeki immobilize FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tekrarlı kullanımları ile belirlenen birim hücre biyokütlesi başına etanol üretim miktarları (g etanolx100 ml⁻¹/OD). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Dünyada mısır, buğday, şeker pancarı ve şeker kamışı gibi karbonhidrat içeriği yüksek bitkilerin hammadde olarak kullanılmasıyla biyoetanol üretimi oldukça yaygındır. Etanol üretimi için mısır %72 oranında nişasta içermesiyle en yaygın kullanılan hammaddelerden biridir [Sohn et al., 2007]. Mısırdan etanol üretiminin yaygınlaşması ile ortaya çıkan mısır fiyatındaki artış, biyoetanol üreticilerinin ve bilim insanlarının yeni hammadde kaynakları araştırmasına neden olmuştur [Griffey et al., 2010]. Bu amaçla incelenen tahıllardan arpanın (*Hordeum vulgare* L.), kabuklu çeşitlerinde %50-55 oranında, kabuksuz çeşitlerinde ise %61 oranında nişasta içerdiği belirlenmiştir [Sohn et al., 2007; Huth et al., 2002]. Yakıt olarak kullanmak amacıyla etanol üretmek için arpayı hammadde olarak kullanmak daha düşük fiyatlı olması ve proteince zengin olması gibi bazı özelliklerle mısır ve buğdayın önüne geçmektedir [Griffey et al., 2010].

Bu çalışmada arpadan elde edilen malt özütünün kullanarak *E. coli*'nin etanol üreticisi suşlarından bakteriyel hemoglobin içermeyen FBR5 suşu ile bakteriyel hemoglobin içeren TS3 ve TS4 suşlarına ait serbest ve immobilize hücrelerin biyoetanol üretiminde kullanımı ile immobilize edilen hücrelerin biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Ayrıca farklı karbon kaynaklarının (monosakkarit ve disakkarit) böyle bir üretimdeki etkinliğini araştırmak için düşük oksijenli koşullarda, %8 (w/v) oranında glukoz içeren modifiye LB besiyeri (GB), %1(w/v) oranında glukoz ile %4.5 (w/v) oranında maltoz içeren besiyeri (MB) ve %1 (w/v) oranında glukoz ile %4.5 (w/v) oranında maltoz içeren malt özütlü besiyerleri (MÖB) kullanılmıştır.

Bir monosakkarit olan glukoz içeren (%8 w/v) GB besiyerinde, inkübasyon sonu hücre yoğunluğunun (OD_{600}) 48 ve 72 saat sonunda serbest hücrelerle immobilize hücrelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek OD_{600} değerinin 72 saatte sonunda serbest FBR5 suşu ile elde edildiği belirlenmiştir. İçerik olarak zengin bir besiyeri olan GB besiyerinde yüksek miktarda bir monosakkarit olan glukozun bulunması ve kullanılan suşlar tarafından kolay metabolize edilebilmesi nedeniyle hücre yoğunluğunun yüksek olduğu düşünülmektedir. Serbest formdaki suşlar için 48 saatten 72 saate arttırılan fermentasyon süresinin, etanol üretiminde %10-20 oranında artışa neden olduğu görülmüştür. Serbest formdaki VHb eksprese eden TS4 suşu

FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında, 48 saat sonunda %5 oranında daha fazla olacak şekilde 1.64 g/100mL, 72 saat sonunda ise bu oran 1.98 g/100mL ile %13'e yükselmiştir. Fermentasyon süresinin 48 saatten 72 saate arttırılması ile bütün immobilize suşlarla etanol üretiminde %5-17 oranlarında artış olduğu görülmüştür. 48 saat sonundaki en yüksek etanol üretiminin TS4 suşu ile; FBR5 suşu ile üretilenden %14 oranında daha fazla olacak şekilde 1.81 g/100mL olduğu belirlenmiştir. 72 saat boyunca sürdürülen fermentasyon sonunda ise en yüksek etanol üretiminin FBR5 suşu ile elde edilen üretimden %26 oranında daha fazla olan 2.12 g/100mL ile immobilize TS4 suşuyla üretildiği tespit edilmiştir. TS4 suşu ile serbest hücrelere göre immobilize hücrelerle etanol üretiminin 48 saatte %10, 72 saatte ise % 7 oranında arttığı görülmüştür. Substrat tüketimleri 72 saat sonunda incelendiğinde serbest hücrelerle en yüksek substrat tüketiminin %50 oranı ile TS3 suşunda olduğu belirlenmiştir. Immobilize hücrelerle ise en yüksek substrat tüketiminin %59 oranı ile FBR5 suşunda olduğu saptanmıştır. Alkol verimlerine göre karşılaştırılan serbest ve immobilize hücreler arasında en yüksek verim oranlarının serbest hücrelerle %60 oranıyla, immobilize hücrelerle ise %53 oranıyla TS4 suşuna ait olduğu saptanmıştır. Birim hücre biyokütlesi başına etanol miktarı serbest hücrelerle kıyaslandığında immobilize hücrelerle yaklaşık 6-15 kat daha yüksek miktarda olduğu görülmüştür. En yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol değerlerinin VHB ekspresyonu yapan immobilize suşlar olan TS3 ve TS4 suşları ile elde edildiği saptanmıştır.

Sanny ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2010), etanol üreticisi *E. coli* suşlarından VHB eksprese etmeyen FBR5 ve VHB eksprese eden TS3 suşları ile %8 (w/v) glukoz, %8 (w/v) ksiloz %8 (w/v) arabinoz ve %20 oranında mısır atığı hidrolizatı içeren LB besiyerlerinde mikroaerobik koşullarda etanol üretimi incelenmiştir. Sonuçta %8 (w/v) glukoz içeren LB besiyerinde mikroaerobik koşullarda TS3 suşu ile üretilen biyoetanolün FBR5 suşuna göre %30 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Büyük ölçekte üretim potansiyelini belirlemek için 2L hacminde fermentör kullanarak %8 (w/v) glukoz ve %8 (w/v) ksiloz içeren LB besiyerleri içerisinde TS3 suşu ile FBR5 suşu ile üretilenden sırasıyla %10 ve %15 oranında daha yüksek miktarda etanol ürettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak VHB ekspresyonun etanol üretiminde artışa neden olduğu görülmüştür.

Abanoz'un yaptığı tez çalışmasında (2012) patates işleme atığı hidrolizatı ile zenginleştirilen LB besiyeri içinde *E. coli*'nin FBR5, TS3, TS4 ve TS5 suşlarını

kullanarak biyoetanol üretimi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan hidrolizatlı besiyerinin kontrolü olarak %8 glukoz ve çeşitli mineraller içeren LB besiyeri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek etanol üretiminin TS4 suşu ile 4.25 g/100mL olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya benzer şekilde mevcut tez çalışmasında da GB kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon sonunda, serbest hücrelerle en yüksek etanol üretimi TS4 suşu ile 2.1 g/100mL olarak belirlenmiştir. Abanoz'un yaptığı bu çalışmada etanol üretimin mevcut tez çalışmasındaki etanol üretiminden daha yüksek olmasının nedeni minerallerce daha zengin bir besiyeri kullanılmış olması olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada disakkarit bir şeker türü olan %4.5 maltoz ile hazırlanan MB besiyerinde serbest hücrelerin immobilize hücrelerden daha yüksek oranda üreme özelliği (OD₆₀₀) gösterdiği görülmüştür. İnkübasyon süresinin 48 saatten 72 saate devam ettirilmesinin hücre yoğunluğunda artışa neden olduğu saptanmıştır. Serbest formda inkübe edilen hücrelerde 48 saat sonunda en yüksek hücre yoğunluğunun FBR5 suşu ile, 72 saatte ise TS4 suşu ile elde edildiği belirlenmiştir. Immobilize edilmiş hücrelerle en yüksek hücre yoğunluğunun 48 ve 72 saat sonunda da FBR5 suşu ile elde edildiği saptanmıştır. MB besiyerinde inkübe edilen serbest hücrelerle etanol üretimi FBR5, TS3 ve TS4 suşlarıyla sırasıyla 1.34, 1.36 ve 0.80 g/100mL olarak belirlenmiştir. Serbest hücreler arasında en yüksek üretimi sağlayan TS3 suşu 48 saatten 72 saate artan fermentasyon süresi sonunda %28 oranında artış (1.75 g/100mL) göstermiştir. Serbest formdaki TS3 (*vgb+*) suşu serbest formdaki FBR5 (*vgb-*) suşu ile karşılaştırıldığında ise TS3 suşu ile 72 saat sonunda %26 oranında daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. 48 saatten 72 saate artan fermentasyon süresinin immobilize hücrelerle etanol üretiminde %16-57 oranında artışa neden olduğu görülmüştür. Immobilize hücreler arasında en yüksek etanol üretimi yapan suşun 48 saatte 0.95 g/100mL, 72 saatte ise 1.50 g/100mL üretimle FBR5 suşu olduğu saptanmıştır. Immobilizasyonun etanol üretimini arttırdığı tek suşun %11 oranında artış ile FBR5 suşu olduğu görülmüştür. MB besiyerinde immobilizasyonun ve VHb ekspresyonunun etanol üretimine etkisini belirlemek için 72 saatlik fermentasyon sonunda immobilize formdaki TS3 (*vgb+*) ve TS4 (*vgb+*) suşları serbest formdaki FBR5 (*vgb-*) ile karşılaştırıldığında, uygulamaların etanol üretiminde bir artışa neden olmadığı görülmüştür. 72 saat sonunda, en yüksek substrat tüketiminin serbest hücrelerle %55 oranı ile FBR5 suşu tarafından, immobilize hücrelerde ise %36 ile TS3 suşu tarafından

gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. En yüksek alkol verimi ise serbest ve immobilize formdaki TS4 suşu ile sırasıyla %261 ve %164 oranları ile sağlanmıştır. Fermentasyonda kullanılan üç besiyeri içerisinde en düşük birim hücre biyokütlesi başına etanol üretimi MB besiyeriyle elde edilmiştir. MB besiyerinde birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin en yüksek olduğu suş olarak immobilize formdaki TS4 suşu ($1.31 \text{ gx}100\text{mL}^{-1}/\text{OD}$) belirlenmiştir.

Akbaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2014) ise *E. coli*'nin VHb eksprese etmeyen FBR5 ve VHb ekspres eden TS3 ve TS4 suşları kullanılarak farklı besin takviyeleri ile desteklenmiş bir disakkarit olan laktozca zengin peyniraltı suyu ve peyniraltı suyu tozu ve şeker pancarı melası hidrolizatı içeren besiyerlerinden etanol üretimine VHb ekspresyonunun etkisi araştırılmıştır. Bu yan ürünlerin etanol üretimine etkisini belirlemek için içerdikleri şeker miktarlarına uygun şekilde sırasıyla CM1 (%4 w/v laktoz), CM2 (%5.5 w/v laktoz) ve CM3 (%1.2 w/v glukoz, %1.2 w/v fruktoz) kontrol besiyerleri oluşturulmuştur. 48 saatlik fermentasyon sonunda VHb ekspresyonunun peyniraltı suyu, peyniraltı suyu tozu veya şeker pancarı melası içeren besiyerleri ile etanol üretimini sırasıyla %21-419, %17-362 ve %48-118 oranlarında arttırdığı saptanmıştır. CM2 besiyeri (%5.5 w/v laktoz) ile elde edilen en yüksek etanol üretimi TS3 suşu ile $1.14 \text{ g}/100\text{mL}$ olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada MB besiyeri de MÖB besiyerinin kontrolü olarak hazırlanmış ve CM2 besiyeriyle içerdikleri şekerlerin disakkarit olması nedeniyle karşılaştırıldıklarında MB besiyerinde en yüksek üretimin benzer şekilde serbest TS3 suşu ile $1.36\text{g}/100\text{mL}$ olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise MB besiyerinde immobilize TS3 suşu ile $1.24\text{g}/100\text{mL}$ etanol üretimi sağlanmıştır.

Bir çalışmada mahula bitkisinin (*Madhuca latifolia* L.) taze ve 12 ay depo edilmiş çiçekleri içerisinde bulunan fermente edilebilir şekerlerin (glukoz, fruktoz ve maltoz) karbon kaynağı olarak kullanılmasında *S. cerevisiae* CTCRI suşunun serbest ve immobilize formlarının etanol üretimi 2L hacimli erlenlerde gerçekleştirilmiştir. %4 sodyum aljinat çözeltisinin 1:1 oranında hücre süspansiyonu ile karıştırılmasıyla immobilize edilen hücrelerin etanol üretiminde serbest hücrelerden daha etkin olduğu belirlenmiştir. Glukoz, fruktoz ve maltoz içeren besiyeri içerisinde en yüksek alkol üretimi taze çiçeklerle oluşturulan besiyeri içerisinde immobilize hücrelerle gerçekleştirilen fermentasyon sonucu elde edilmiştir ($25\text{g} \times \text{kg}^{-1}\text{çiçek}$) [Swain et al., 2007]. Fermentasyonu sağlamak amacıyla *S. cerevisiae* kullanılması nedeniyle mevcut

tez çalışmasına oranla yüksek miktarda etanol üretimi sağlandığı belirlenmiştir. Ancak immobilizasyonun hücrelerin etanol üretim kapasitelerini arttırmak üzerine olumlu etkisi benzer şekilde iki çalışmada da görülmüştür.

%3 kalsiyum aljinat ile immobilize edilmiş *E. coli*'nin FBR5 ve TS3 suşları kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise serbest ve immobilize hücrelerin etanol üretimleri araştırılmıştır [Sar et al., 2016]. Fermentasyon besiyerinde bir disakkarit olan laktozca zengin peyniraltı suyu tozu kullanılmıştır. Farklı oranlarda (%3, 5, 8 ve 15) peyniraltı suyu tozu ve maya özütü (% 0.3 ve 0.5) içeren fermentasyon besiyerinde 48-96 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek etanol üretiminin immobilize hücrelerle, %8 oranında laktoz ve %0.5 oranında maya özütü içeren besiyerinde 96 saat sonunda immobilize TS3 suşu ile elde edildiği (%4 v/v) belirlenmiştir. Bu tez çalışması da hem içerdiği karbon kaynağının disakkarit olmasıyla hem de immobilizasyonun ve VHB ekspresyonunun kombinasyonunun etanol üretimini arttırmış olmasıyla benzemektedir. Ancak araştırmacılar kullanılan besiyerinin daha yüksek miktarda şeker içermesi ve fermentasyon süresinin 96 saat olması nedeniyle daha yüksek etanol üretimi elde etmişlerdir.

GB, MB ve MÖB besiyerleri içinde en yüksek hücre yoğunluğunu MÖB besiyerinden elde edilmiştir. En yüksek OD₆₀₀ değerinin immobilize formdaki TS4 suşu ile 72 saatlik fermentasyon sonunda elde edildiği belirlenmiştir. Serbest formdaki FBR5 hücreleriyle gerçekleştirilen 72 saatlik fermentasyon sonucu üretilen etanolün 48 saatlik sonunda üretilenden %42 oranı ile en yüksek artış olduğu tespit edilmiştir. Serbest haldeki hücreler ile en yüksek etanol üretiminin 48 saatte 1.71 g/100mL ile FBR5 suşu ile 72 saatte ise 2.11 g/100mL ile serbest formdaki TS4 suşu ile elde edildiği belirlenmiştir. Fermentasyon süresi immobilize hücrelerde 48 saatten 72 saate arttırıldığında tüm suşlarla etanol üretiminde artış görülmüştür. Immobilize hücrelerle elde edilen en yüksek etanol miktarları 48 saat sonunda FBR5 ve TS4 suşu ile 1.33 g/100mL, 72 saat sonunda ise TS4 suşu ile 2.37 g/100mL olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda immobilize formdaki TS4 ve FBR5 suşlarının aynı miktarda etanol ürettiği görülmüştür. 72 saat sonunda immobilize TS4 (*vgb*+) suşunun 2.37 g/100mL etanol üreterek immobilize FBR5 (*vgb*-) suşuyla üretilenden %58 oranında daha fazla üretim yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize formdaki TS4 suşunun serbest formdaki FBR5 suşundan %15 oranında daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. Serbest hücrelerle elde edilen en yüksek substrat tüketimi oranı 72 saat sonunda %87 oranı ile

FBR5 suşu ile elde edilmiştir. İmmobilize hücrelerde ise en yüksek substrat tüketiminin %88 oranı ile TS4 suşu ile olduğu saptanmıştır. 72 saatlik fermentasyon sonunda serbest hücreler en yüksek alkol veriminin TS3 suşu ile (%62), immobilize hücrelerle ise TS4 suşu ile (%48) sağlandığı görülmüştür. Denenen diğer besiyerleri arasında birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin en düşük olduğu besiyerinin MÖB besiyeri olduğu belirlenmiştir.

Fermentasyonda kullanılan GB, MB ve MÖB besiyerlerinde serbest ve immobilize formdaki TS3 ve TS4 suşlarına ait hücrelerin belirlenen VHb seviyelerine (nmol/g yaş ağırlık) göre üç besiyerinde en yüksek ekspresyon seviyelerinin TS4 suşu ile elde edildiği görülmüştür.

Bu çalışmada ayrıca immobilize edilmiş FBR5, TS3 ve TS4 suşlarına ait hücrelerin biyoetanol üretiminde tekrarlı kullanım etkinliğini araştırmak amacıyla immobilize edilmiş hücreler GB besiyerine 48 saatlik 9 ardışık fermentasyon boyunca aktararak kullanılmıştır. Her kullanım sonu hücre yoğunluğu 9 kullanım arasından seçilen 1., 5. ve 9. kullanımlar arasında en yüksek FBR5 suşu ile 5. kullanım sonunda olduğu belirlenmiştir. En yüksek substrat tüketiminin 1. kullanımda %55 oranı ile FBR5 suşu ile, 5. kullanımda %67 oranı ile TS4 suşu ile, 9. kullanımda ise %54 oranı ile TS4 suşu ile olduğu tespit edilmiştir. En yüksek alkol verimi oranları ise 1. kullanımda %53 oranı ile TS4 suşuyla, 5. kullanımda %41 oranıyla TS3 suşuyla ve 9. kullanımda ise %51 oranı ile TS4 suşuyla sağlandığı saptanmıştır. 48 saatlik ardışık 9 fermentasyon boyunca ortalama etanol üretimi FBR5, TS3 ve TS4 suşlarında sırasıyla 1.73, 1.58 ve 2 g/100mL olarak belirlenmiştir. 1. kullanımdaki en yüksek etanol üretimi 1.81 g/100mL ile FBR5 suşuyla, 5. kullanımda 2.05 g/100mL ile TS3 (*vgb+*) suşu ile, 9. kullanımda ise 2.01 g/100mL ile TS3 ve TS4 suşlarıyla elde edildiği saptanmıştır. En yüksek VHb ekspresyonu 9. kullanımda TS3 suşunda saptanmıştır ve TS3 suşunun ekspresyon seviyesinin TS4 suşun ekspresyon seviyesinden %92 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Denenen üç besiyeri içerisinde en düşük hücre yoğunluğunun MB besiyerinde olduğu gözlenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu değerinin ($OD_{600\text{ nm}}$) FBR5 suşu ile 5.34 olarak 1. kullanımda olduğu saptanmıştır. En yüksek substrat tüketiminin 1. kullanımda %71 oranıyla TS4 suşu ile, 5. kullanımda %17 oranı ile TS3 suşu ile, 9. kullanımda ise %12 ile FBR5 suşuna olduğu tespit edilmiştir. En yüksek alkol verimlerinin 1. kullanımda %50 oranı ile TS3 ve TS4

suşları ile, 5. kullanımda FBR5 ve TS4 suşlarının %150 oranı ile, 9. kullanımda ise %180 oranı ile TS3 suşu olduğu görülmüştür.

300g/L glukoz içeren besiyerinde %3 sodyum aljinatla veya %4 κ -Carrageenan ile immobilize edilmiş hücrelerle yapılan bir çalışmada 1L'lik erlenlerin %30 oranında immobilize hücre olacak şekilde fermentasyon yapılmıştır. Immobilize edilen *S. cerevisiae* 101 hücrelerinin etanol üretimleri 4 tekrar boyunca incelenmiş ve en yüksek etanol üretiminin aljinat kaplı hücrelerle %12.8-13.6 arasında olduğu görülmüştür [Puligundla et al., 2011].

Tekrarlı kullanımda denenen üç besiyeri içerisinde en düşük etanol üretiminin MB besiyerinde olduğu belirlenmiştir. En yüksek etanol üretiminin 1. kullanımda 2.0 g/100mL ile TS4 suşu tarafından sağlanmış ve bu değerin FBR5 suşu ile üretilen alkolden %14 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 5. kullarımdaki en yüksek üretimin 1.12 g/100mL ile FBR5 suşu ile, 9. kullarımdaki en yüksek üretimin ise 0.98 g/100mL ile TS4 suşu ile elde edildiği görülmüştür. Ardışık kullarımlara ait VHb ekspresyonu seviyeleri incelendiğinde 1. ve 5. kullarımda TS3 suşunun VHb ekspresyonu TS4 suşu tarafından eksprese edilenden sırasıyla %4 ve %70 oranında daha yüksekken, 9. kullarımda ise TS4 suşunun VHb ekspresyonu TS3 suşu tarafından eksprese edilenden %21 oranında daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

MÖB besiyerinde gerçekleştirilen ardışık kullarımlar sonunda OD₆₀₀ nm'de yapılan ölçümlere göre en yüksek hücre miktarının 5. kullarımda FBR5 suşu ile (6.17) gözlemlenmiştir. En yüksek substrat tüketiminin 1. kullarımda %87 oranı ile TS4 suşuyla, 5. kullarımda %72 oranı ile TS3 suşuyla, 9 kullarımda ise %52 oranı ile FBR5 suşuyla gözlemlendiği belirlenmiştir. Alkol verimleri incelendiğinde ise verimin genel olarak %30-53 oranları arasında olduğu saptanmıştır. En yüksek verimin 1. kullarımda %49 oranı ile, 5. kullarımda %54 oranı ile, 9. kullarımda ise %51 oranı ile TS4 suşuyla olduğu belirlenmiştir. 9 ardışık kullanım boyunca elde edilen etanol üretimlerinin ortalamaları karşılaştırıldığında en yüksek üretimin 1.86 g/100mL ile TS4 suşu ile elde edildiği saptanmıştır. En yüksek etanol üretiminin 1., 5. ve 9. kullarımlarda sırasıyla 2.40, 1.83 ve 1.67g/100mL ile TS4 suşuyla elde edildiği belirlenmiştir. FBR5 suşu ile karşılaştırıldığında ise VHb eksprese eden TS4 suşu ile etanol üretiminin 1., 5. ve 9. kullarımlarda sırasıyla %55, %25 ve %18 oranında arttığı tespit edilmiştir. MÖB besiyerinde ardışık kullarımla fermentasyon yapan TS3 ve TS4 suşlarının VHb ekspresyonu seviyeleri 1., 5. ve 9. kullarımlarda TS4 suşu ile TS3

suşundan daha yüksek oranda VHb ekspresyonu yapıldığı belirlenmiştir. En yüksek VHb ekspresyonunun ise TS4 suşunun 5. kullanımında TS3 suşundan %48 oranında daha yüksek ekspresyon yaparak gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Peyniraltı suyu tozu ile oluşturulan ve %8 (w/v) laktoz içeren besiyeri kullanılarak yapılan bir çalışmada, sodyum aljinat ile immobilize edilmiş *E. coli*'nin FBR5 ve TS3 suşları kullanılarak, etanol üretiminde boncukların tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. 96 saatlik ardışık 14 kullanım boyunca etanol üretimi sağlanmış ve en yüksek üretimin VHb eksprese eden TS3 suşu ile 8. kullanımda (%4.4 v/v) elde edildiği saptanmıştır [Sar et al., 2017].

Bu çalışmada, farklı karbon kaynakları (glukoz, maltoz, arpa malt özütü) kullanılarak VHb eksprese eden etanol üreticisi suşların immobilize edilmesinin etanol üretimini artırma üzerine etkisi araştırılmıştır. En yüksek etanol üretimin malt özütü içeren besiyeri ile VHb eksprese eden immobilize TS4 suşu tarafından %2.97 (v/v) oranında olduğu ve bu oranın immobilize FBR5 suşu ile elde edilenden %57 oranında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca immobilize hücrelerin tekrarlı kullanımının etanol üretimini arttırmadaki etkisi, 48 saatlik 9 fermentasyon boyunca her üç besiyeri için de değerlendirilmiştir. Tekrarlı kullanımda en etkin biyoetanol üretimi MÖB besiyerinden TS4 suşu ile sağlandığı belirlenmiştir.

Ticari olarak biyoetanol üretimi yapılan hammaddelere alternatif olabilecek yeni karbon kaynaklarının potansiyellerinin belirlenmesi hem biyoetanol üretimini farklı bir boyuta taşıyacak hem de çeşitlilik sağlayacaktır. Ekonomik olarak minimum maliyetle etanol üretiminin sağlanması amacıyla zengin fermentasyon ortamlarının oluşturulabileceği hammaddelerin keşfedilmesi üretimin ticari boyuta taşınması konusunda ülkemiz üreticilerini teşvik edecektir.

Bugüne kadar daha önceki çalışmalarda farklı besiyerleri kullanılarak immobilize hücrelerin tekrarlı kullanımının biyoetanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak etkin bir şekilde biyoetanol üretiminin immobilize edilmiş hemoglobin eksprese eden etanol üreticisi *E. coli* suşları ile yapıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada ilk kez etanol üretimi bir gıda sanayi ürünü olan arpa malt özütü içeren besiyerinden VHb ekspresyonu ve immobilizasyonun birlikte kullanılmasıyla etkin bir şekilde arttırılmaya çalışılmıştır. İleriki çalışmalarda etanol üretiminin büyük ölçekte denenmesi kitlesel üretimde ve kontrollü koşullar altında endüstride pratik kullanımının belirlenmesi önemlidir.

Geleneksel olarak fermentasyonda kullanılan mayalar dışında alternatif rekombinant bakterilerin denenmesi, birçok şeker türünün bakteriler tarafından metabolize edebilmesi ile etanol üretimi genişletilmektedir. Bu tez çalışması sonucunda VHb eksprese eden ve/veya immobilize edilmiş etanol üreticisi *E. coli* suşları ile bu güne kadar ilk defa denenene arpa malt özütünden etanol üretimi araştırılmıştır. Sonuç olarak, arpa malt özütünden VHb eksprese eden etanol üreten *E. coli* suşları ile etanol üretiminin arttığı ve VHb ekspresyonu ile immobilizasyonun etanol üretiminde avantajlı ve pratik bir yöntem olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

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

Abnisa F., Arami-Niya A., Daud W., Sahu J., (2013), "Characterization of Bio-oil and Bio-char from Pyrolysis of Palm Oil Wastes", *BioEnergy Research*, 6(2), 830-840.

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

Akbas M., Stark B., (2016), "Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(11), 1593-1609.

Altherhum F., Ingram L. O., (1989), "Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1943-1948.

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

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

Bhutti R. S., (1996), "Production of Food Malt from Hull-less Barley", *Nonwheat Grains and Products, Cereal Chemistry* 73(1), 75-80.

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

Cassidy M., Lee H., Trevors J., (1996), "Environmental applications of immobilized microbial cells: A review", *Journal of Industrial Microbiology* 16(2), 79-101.

Dien B., Nichols N., O'Bryan P., Bothast R., (2000), "Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass", *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86 (1-9), 181-196.

Dikshit R., Dikshit K., Liu Y., Webster D., (1992), "The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293(2), 241-245.

- Duarte J., Rodrigues J., Moran P., Valena G., Nunhez J., (2013), “Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation”, *AMB Express*, 3(1), 31.
- Durgun T., (2008), “Malt ekstraktı etimi ve değerlendirilmesi”, *Gıda*, 33 (1), 43-51.
- Durgun T., Kılıç O., (1978), “Malt, malt z ve bira üretiminde teknoloji ve bileşim ilişikleri”, *Gıda*, 3(4-5), 139-148.
- Frey A., Kallio P., (2003), “Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology”, *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 525-545.
- Ghorbani F., Younesi H., Esmaeili Sari A. Najafpour G., (2011), “Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*”, *Renewable Energy*, 36(2), 503-509.
- Green K., Lowenbach W., (2001), “MTBE Contamination: Environmental, legal, and public policy challenges guest editorial”, *Environmental Forensics*, 2(1), 3-6.
- Huang Y., Jin Y., Fang Y., Li Y. Zhao H., (2013), “Simultaneous utilization of non-starch polysaccharides and starch and viscosity reduction for bioethanol fermentation from fresh *Canna edulis* Ker. tubers”, *Bioresource Technology*, 128, 560-564.
- Huth M., Dongowski G., Gebhardt E., Flamme W., (2000), “Functional Properties of Dietary Fibre Enriched Extrudates from Barley”, *Journal of Cereal Science*, 32(2), 115-128.
- Ivanova V., Petrova P., Hristov J., (2011), “Application in the ethanol fermentation of immobilized yeast cells in matrix of alginate/magnetic nanoparticles, on chitosan-magnetite microparticles and cellulose-coated magnetic nanoparticles”, *International Review of Chemical Engineering*, 3(2011), 289 – 299.
- Kahraman H., Aytan E., Kurt A., (2011), “Production of methionine γ - lyase in recombinant *Citrobacter freundii* bearing the hemoglobin gene”, *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 44(9), 590-594.
- Kahraman H., Erenler S., (2012), “Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* engineered with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 188-193.
- Kar Y., Deveci H., (2006), “Importance of P-Series Fuels for Flexible-Fuel Vehicles (FFVs) and Alternative Fuels”, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 28(10), 909-921.
- Kuhad R. C., Gupta R., Khasa Y. P., Singh A., (2010), “Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation”, *Bioresource Technology*, 101, 8348–8354.

Kundu A., Sahu J., Redzwan G., Hashim M., (2013), “An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(4), 1745-1757.

Luo Y., Kou X., Ding X., Hu S., Tang Y., Li W., Huang F., Yang Q., Chen H., Xia L., (2012), “Promotion of spinosad biosynthesis by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Saccharopolyspora spinosa*”, *Science China Life Sciences*, 55(2), 172-180.

Ma C., Qin D., Sun Q., Zhang F., Liu H., Yu C., (2016), “Removal of environmental estrogens by bacterial cell immobilization technique”, *Chemosphere*, 144, 607-614.

Mattiasson B., (1983a), “Immobilization methods. In: *Immobilized Cells and Organelles*”, CRC Press, 1, 3-25.

Mattiasson B., (1983b), “Immobilized viable cells. In: *Immobilized Cells and Organelles*”, CRC Press, 2, 2340.

Mosbach K., (1987a), “Immobilized enzymes and cells. Part A. Methods in enzymology”, Academic Press, 134, London, United Kingdom.

Mosbach K., (1987b), “Immobilized enzymes and cells. Part B. Methods in enzymology”, Academic Press, 135, London, United Kingdom

Mosbach K., (1987c), “Immobilized enzymes and cells. Part C. Methods in enzymology”, Academic Press, 136, London, United Kingdom.

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

Pringsheim E., (1951), “The *Vitreoscillaceae*: A family of colourless, gliding, filamentous organisms”, *Journal of General Microbiology*, 5(1), 124-149.

Ryu S., Lee K., (1997), “Comparison of immobilization matrix for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(6), 438-440.

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

Sar T., Seker G., Erman A., Stark B., Yesilcimen Akbas M., (2017), “Repeated batch fermentation of immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for long-term use”, *Bioengineered*, 0(0) 1-10, doi:10.1080/21655979.2017.1303024.

Sar T., Stark B., Yesilcimen Akbas M. (2016), “Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin”, *Bioengineered*, 8(2), 171-181.

Schormüller J., (1974), “Lehrbuch der lebensmittelchemie”, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.

Sohn M., Himmelsbach D., Barton F., Griffey C., Brooks W., Hicks K. (2007), “Near-Infrared Analysis of Ground Barley for Use as a Feedstock for Fuel Ethanol Production”, Applied Spectroscopy, 61(11), 1178-1183.

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*”, Biotechnol Letters, 33(9),1705-1714.

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

Swain M., Kar S., Sahoo A., Ray R., (2007), “Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, Microbiological Research, 162(2), 93-98.

Vanhala P., Bergström I., Haaspuro T., Kortelainen P., Holmberg M., Forsius M., (2016), “Boreal forests can have a remarkable role in reducing greenhouse gas emissions locally: Land use-related and anthropogenic greenhouse gas emissions and sinks at the municipal level”, Science of The Total Environment, 557-558, 51-57.

Vinogradov S. N., Hoogewijs D., Bailly X., Arrendondo-Peter R., Gough J., Dewilde S., Moens L., Vanfleteren JR., (2006), “A phylogenomic profile of globins”, Biomed Central Evolutionary Biology, 6, 31.

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

Wakabayashi S., Matsubara H., Webster D., (1986), “Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*”, Nature, 322(6078), 481-483.

Wang S., Liu F., Hou Z., Zong G., Zhu X., Ling P., (2013), “Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb)”, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(4), 1369-1376.

Web 1, (2006), <http://www.permaculture.com/node/1499> (Erişim tarihi: 27/07/2017).

Web 2, (2008), <https://royalsociety.org/topics-policy/publications/2008/sustainable-biofuels> (Erişim tarihi: 27/07/2017).

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

Wu X., Chen Y., Li Y., Li O., Zhu L., Qian C., Tao X., Teng Y., (2010), Constitutive expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Sphingomonas elodea* to improve gellan gum production”, *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 422-430.

Xu M., Rao Z., Xu H., Lan C., Dou W., Zhang X., Xu H., Jin J., Xu Z., (2010), “Enhanced Production of L-Arginine by Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Using a Novel Expression System in *Corynebacterium crenatum*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(6), 707-719.

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

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

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

Zhang W., Xie H., He Y., Feng J., Gao W., Gu Y., Wang S., Song C., (2013), “Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances γ -PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens*”, *FEMS Microbiology Letters*, 343(2), 127-134.

ÖZGEÇMİŞ

Gamze ŞEKER 1990 yılında İstanbul’da doğdu, 2008 yılında Adana İncirlik Lisesi’den mezun oldu. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü (%30 İngilizce)’nden mezun oldu. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksekisans eğitime başladı. 2015 yılının Kasım ayında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Lisansüstü eğitime Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda devam etmektedir.