

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

VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ'NİN
PEYNİR ALTI SUYUNDAN BİYOETANOL
ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA ÖZÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

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

VITREOSCILLA HEMOGLOBİNİ'NİN
PEYNİR ALTI SUYUNDAN BİYOETANOL
ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA ÖZÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2013



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.06.2013 tarih ve 2013/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/06/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan BÜŞRA ÖZÇELİK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Yrd. Doç. S. Tülay HEKİMBAŞI

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Ferda HACİVELİOĞLU

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, peynir altı suyundan biyoetanol üretiminin *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) aracılığı ile arttırılması araştırıldı. VHb ilk keşfedilen, aynı zamanda karakterizasyonu en iyi yapılmış prokaryotik hemoglobindir. Bu çalışmada, etanolojenik *Escherichia coli* FBR5 suşu ile *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin) genlerini içeren TS3 ve TS4 suşları kullanılarak, farklı havalandırma koşullarında, peynir altı suyu veya laktoz içeren kontrol besiyerlerindeki üreme, VHb ekspresyon miktarları ve etanol üretim özellikleri belirlendi.

Farklı koşullarda, VHb ekspresyonunun, TS3 ve TS4 suşlarında etanol üretimini arttırdığı görüldü. Etanol üretimi, peynir altı suyu içeren besiyerinde, FBR5 kontrol suşu ile elde edilene göre, TS3 suşu ile % 171-413, TS4 suşu ile % 38-48 artarken, her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin TS3 suşu ile % 160, TS4 suşu ile % 27 daha fazla olduğu belirlendi. Laktoz Kontrol (LK) besiyeri (% 4 w/v) içeren ortamda ise FBR5 kontrol suşuna göre, etanol üretimi TS3 ile % 80, TS4 suşları ile yaklaşık % 43 artarken, her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin TS3 suşu ve TS4 suşu ile % 100 daha fazla olduğu belirlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar 'VHb teknolojisi'nin gıda işleme atık suyundan etanol üretiminde pratik önemi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vitreoscilla* Hemoglobin, Biyoetanol, Peynir altı suyu.

SUMMARY

In the present work, the enhancement of bioethanol production from cheese whey through the use of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla* (VHb) was investigated. In this study, ethanologic *Escherichia coli* strain FBR5 was transformed *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin) gene in two constructs (TS3 and TS4) were utilized. The growth conditions for strains TS3, TS4 and FBR5 were varied by modulating the aeration rate of cultures as well as inclusion of lactose or whey in the growth medium. Parameters measured included cell growth, VHb levels, and ethanol production.

It was found that VHb expression in strains TS3 and TS4 enhanced their ethanol production under several conditions. In medium supplemented with whey, VHb expression increased ethanol production about 171-413 % with TS3 and 38-48 % with TS4, and the ratio of ethanol concentration to cell biomass as much as 160 % for TS3 and 27 % for TS4 compared with strain FBR5. In lactose containing (4% w/v) control medium the strains TS3 and TS4 showed as much as 80 and 43 % greater ethanol production respectively and an increase in the ratio of ethanol concentration to cell biomass of 100 % for both strains compared to the control strain, FBR5. The results obtained in this work demonstrate that 'VHb technology' may be of substantial use in the production of ethanol from food processing waste water.

Key words: *Vitreoscilla* Hemoglobin, Bioethanol, Cheese Whey.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileriyle çalışmama yön veren, her konuda destek olan ve bilimsel bir bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli tez danışmanı hocam Sn. Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan peynir altı suyunun teminindeki yardımlarından dolayı İspey Süt Ürünlerine ve Murat Alper AKSU'ya,

Tez çalışmamın tamamlanması için mali destek veren TÜBİTAK ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne,

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

Yüksek lisans çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Arş. Gör. Dr. Tuğrul DORUK ve Uzman Hüseyin BALCI'ya; laboratuvar arkadaşlarım Taner ŞAR, Fatma SÜMER, Tuğba KÖKÜMER ve Kübra HOCAOĞLU'na teşekkür ederim.

Eğitim hayatım süresince maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen ve her konuda bana yardımcı olan değerli aileme ve her zaman yanımda olan Kartal ŞENEL'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoetanol	3
2.1.1. Biyoetanolün Özellikleri	4
2.1.2. Biyoetanolün Kullanım Alanları	5
2.1.3. Biyoetanol Üretimi	6
2.1.4. Etanol Fermantasyonunda Kullanılan Hammaddeler	8
2.1.4.1. Lignoselülozik Ürünler	9
2.1.4.2. Nişastalı Ürünler	9
2.1.4.3. Şekerli Ürünler	9
2.1.5. Türkiye’de ve Dünyada Biyoetanol	11
2.1.6. Rekombinant Soylar ile Biyoetanol Üretiminin Arttırılması	12
2.2. Peynir Altı Suyu	13
2.2.1. Peynir Altı Suyunun Bileşimi	14
2.2.2. Peynir Altı Suyunun Kullanım Alanları	18
2.3. Bakteriyel Hemoglobin	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Peynir Altı Suyunun Hazırlanması	27
3.2.2. Kültür Ortamlarının Hazırlanması	28

3.2.3. Stok Kùltürlerin Pasajlanması ve Muhafazası	29
3.2.4. Önkùltürlerin Hazırlanması	29
3.2.5. Aerobik Koşullar	29
3.2.6. Mikroaerobik Koşullar	30
3.2.7. Kùltürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi	30
3.2.8. Toplam Hücre Sayısının (Biyokùtle) Belirlenmesi	30
3.2.9. Fermentasyon Ortamındaki Biyoetanol Miktarının Ölçümü	30
3.2.10. Besiyerinde Kalan Laktoz Miktarının Ölçümü	31
3.2.11. Rekombinant Soylardaki Hemogloblin Ekspresyonunun Ölçümü	31
3.2.12. İstatistiksel Analizler	32
4. BULGULAR	33
4.1. Peynir Altı Suyu ile Hazırlanan Besiyerlerindeki Ortamlarındaki Etanol Üretimleri	33
4.1.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kùltürler	33
4.1.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	34
4.1.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kùltürler	36
4.1.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	37
4.2. Laktoz İçeren Kontrol Besiyerindeki Etanol Üretimleri	39
4.2.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kùltürler	39
4.2.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	40
4.2.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kùltürler	42
4.2.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler	44
5. SONUÇLAR VE YORUMLAR	46
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler/

Kisaltmalar

Açıklamalar

<i>adh</i>	: Alkol dehidrogenaz geni
Amp	: Ampisilin
BOİ	: Biyolojik oksijen isteği
EPDK	: Enerji piyasası düzenleme kurulu
ETBE	: Etil-terciyer-bütıl eter
EtOH	: Etanol
E25	: % 25 alkol + % 75 benzin karışımı yakıt
E85	: % 85 alkol + % 15 benzin karışımı yakıt
<i>Gm^R</i>	: Gentamisin direnç geni
LB	: Luria Bertani besiyeri
LBK	: Ksiloz içeren Luria Bertani besiyeri
<i>Idh</i>	: Laktat dehidrogenaz
LK	: Laktoz kontrol besiyeri
KOİ	: Kimyasal oksijen isteği
MTBE	: Metil-terciyer-bütıl eter
OD	: Optical density
PAS	: Peynir altı suyu
<i>pd</i>	: Piruvat dekarboksilaz geni
<i>pfl</i>	: Piruvat format liyaz geni
<i>Sm^R</i>	: Streptomisin direnç geni
TARKİM	: Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş.
TEZKİM	: Tezkin Tarımsal Kimya İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş.
<i>Tc^R</i>	: Tetrasiklin direnç geni
TKM	: Toplam katı madde
TLC	: Thin layer chromatography
<i>vgb</i>	: <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni

P_{vgb} : *Vgb* promotor bölge
VHb : *Vitreoscilla* hemoglobini

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>E. coli</i> 'de glukozdan etanol üretimi.	13
2.2: <i>Vgb</i> içeren <i>E. coli</i> TS4 suşuna ait hücre homojenatında VHb'nin ditiyonit ile indirgenmesi sonucu oluşan absorbsiyon spektrumunu.	23
2.3: <i>vgb</i> promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri.	24
4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	34
4.2: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	35
4.3: PAS besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	36
4.4: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	37
4.5: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	38
4.6: PAS besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	39

4.7: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	40
4.8: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	42
4.9: LK besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	42
4.10: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	44
4.11: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, Laktoz besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml ⁻¹ besiyeri / OD ⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	45
4.12: LK Besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	45

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyoetanolün fiziksel özellikleri.	4
2.2: Biyoetanolün termal özellikleri.	4
2.3: Biyoetanolün kimyasal özellikleri.	5
2.4: Etanol fermentasyonu için kullanılan bazı hammaddeler.	8
2.5: Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve işleniş aşamaları.	10
2.6: Türkiye’de biyoetanol üretimi.	12
2.7: 100 ml peynir altı suyu bileşimi.	15
2.8: Peynir altı suyu proteinlerinin bileşimi.	16
3.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteriler, plazmidler ve özellikleri.	26
3.2: Peynir altı suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri.	27
3.3: İz element solüsyonu içeriği.	28
3.4: Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.	30
4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	34
4.2: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	35
4.3: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	37

4.4: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	38
4.5: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	40
4.6: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde, 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	41
4.7: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	43
4.8: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.	44

1. GİRİŞ

Son yıllarda dünyadaki petrol rezervlerinin sanılandan daha hızlı bir şekilde azalmasına bağlı olarak, özellikle taşımacılıkta kullanılan yakıtların ve petrol türevi ürünlerin aşırı kullanımı sonucu çevresel kirlenme ve sera etkisinin artması önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu sebeple CO₂'nin atmosferdeki derişiminin kontrol edilmesini sağlayacak daha temiz, daha güvenilir, yenilenebilir, düşük maliyetli ve fosil yakıtlarına olan bağımlılığı azaltacak alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Tüm dünya ile birlikte ülkemizde de gittikçe artan enerji talebine karşılık, yenilenebilir enerji kaynaklarının alternatif olarak görülmesi, bu konudaki çalışmaları arttırmış ve gelişmeye yönlendirmiştir. Önemli ve en çok kullanılan yenilenemez enerji kaynaklarından biri olan benzine alternatif olarak, biyoetanolün kullanılması, hem ekonomik, hem çevresel hem de gelecekte oluşabilecek talepler doğrultusunda avantaj sağlamaktadır. Etanolün üretilip araçlarda kullanılması, ülkemizin dışa bağımlılığını azaltabileceği gibi, daha temiz bir çevre ve maddi imkânlar sağlaması açısından önemlidir.

Biyoetanol şeker pancarı, mısır, buğday, şeker kamışı, patates, tarımsal atıklar ve selüloz içerikli evsel atıklardan üretilen benzinle ve motorinle karıştırılarak kullanılabilen bir biyoyakıttır. Biyoetanol, petrol kökenli yakıtlar ile kullanıldığında, yakıt içindeki oksijen seviyesini arttırıp, yakıtın daha verimli yanmasını sağlayarak egzoz çıkışındaki oksijen seviyesini arttırıp, yakıtın daha verimli yanmasını sağlayarak, egzoz çıkışındaki zararlı gazları azaltmaktadır. Doğaya zarar vermeden çözünebilen bir yakıt olan biyoetanol, sahip olduğu bu özellikleriyle doğanın korunmasına katkıda bulunmaktadır.

Endüstriyel biyoetanol üretiminin çevreyle dost bir yaklaşım olabilmesi için atıkların değerlendirilmesi şarttır. Gıda üretim tesislerinin atıkları çok çeşitli etanolojenik mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir olması nedeniyle bu atıklar biyoetanol üretimine yönelik doğru bir hammadde seçimi olacaktır.

Fermentasyon teknolojisinde, kullanılan ana materyallerden biri mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalar fermentasyon sürecinde biyokatalizör olarak kullanılırlar. Ancak fermentasyon sonucu ortamdaki oksijen hızla tükenmekte, bununla birlikte özellikle alkol gibi fermentasyon ürünleri ortam pH'sını önemli

ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, *Vitreoscilla* hemoglobini'nin (VHb) bu gibi durumların aşılması, fermentasyonun daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi ve Türkiye'nin sera etkisi yapan gazlara ve çevre kirliliği sorunlarına belli düzeyde de olsa çözüm olabilecek biyoyakıt türlerinden biyoetanolün üretiminin arttırılması açısından önemli avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Peynir üretiminde 10 kg sütün 1 kg peynir üretilirken 9 kg peynir altı suyu oluşmakta ve oluşan peynir altı suyu süt besinlerinin % 50'sini içinde barındırmaktadır [Rech et al., 1999]. Ancak, peynir işletmelerinden peynir altı sularının birçok ülkede hiçbir işleme tabi tutulmadan doğaya verilmesi yasaklanmıştır. Bu bağlamda, bu tez çalışması, hiçbir işleme tabi tutulmadan atılan önemli derecede çevre kirliliğine yol açan peynir altı suyunun değerlendirilmesi için bir örnek oluşturmaktadır. Laktozu doğrudan tüketen ve etanol üreten mikroorganizmaların sayısı sınırlı olmakla birlikte, laktoz hidrolizi ile oluşan glukoz ve galaktozdan etanol üreten endüstriyel mikroorganizmalardan *vgb/VHb* sistemini içeren rekombinant *E. coli* suşlarının etkili bir kullanım alanı bulacak olan biyoetanolün üretiminde kullanılabilirliği bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

VHb'nin üretildiği rekombinant organizmaların kullanımının artması [Frey et al., 2002] nedeniyle, VHb'nin üremeyi ve üretkenliği etkilemesine yönelik çalışmalar giderek artan bir şekilde ilgi çekmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda; VHb'nin etanol fermentasyonundaki fizyolojik etkilerinin neler olduğu, tamamen aydınlığa kavuşmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının ana amacı, Dr. Sanny tarafından geliştirilen VHb ekprese eden rekombinant organizmaların [Sanny et al., 2010] fermente olabilen şeker kaynağı olarak peynir altı suyu kullanılmasıyla üreme ve üretkenliği dolayısıyla da etanol üretiminin arttırılmasıdır. Çalışmanın özel amaçları ise, VHb ekspresyonu yapan rekombinant *E.coli* suşları farklı havalandırma koşullarında, peynir altı suyu veya laktozu içeren besi ortamlarında üretilmesi, bu rekombinant suşların denenilen farklı koşullardaki hücre yoğunluklarının, VHb ekspresyonlarının ve ürettikleri etanol miktarlarının belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoetanol

Biyoetanol, fosil yakıtların tükenmesine bağlı olarak ortaya çıkan küresel enerji sorununu hafifletmek ve aynı zamanda sera gazlarının oluşumunu azaltmak için benzine sürdürülebilir bir alternatif olarak düşünülmektedir. Günümüzde daha temiz ve yaşanılabilir bir çevre için alternatif enerji kaynakları bulunmasına yönelik çalışmalar giderek artış göstermektedir. Enerji kaynakları yenilenebilirliğine göre ve oluşumlarındaki zaman süreci bakımından iki ana sınıf altında toplanmaktadır. Bunlardan birincisi oluşumları çok uzun yıllar alan, kömür, petrol, doğalgaz gibi klasik enerji kaynakları ile ağır radyoaktif atomların (nükleer) yer aldığı yenilenemeyen (tüketilebilir) enerji kaynaklarıdır. İkincisi, güneş, rüzgar, su gücü, jeotermal, deniz dalga enerjisi ve biyokütleden oluşan yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Ana bileşenleri karbonhidrat bileşikler olan bitkisel ve hayvansal kökenli tüm maddeler biyokütle enerji kaynağı, bu kaynaklardan üretilen enerji kaynağı ise biyokütle enerjisi olarak tanımlanmaktadır [Karaosmanoğlu, 2002]. Biyokütle yakıt olarak kullanılarak veya çeşitli proseslerle yakıt kalitesi yükseltip, mevcut olan yakıtlarla aynı özellikte alternatif biyoyakıtlar elde edilerek enerji teknolojisinde değerlendirilmektedir. Biyoyakıtlar içerisinde yer alan biyoetanol hızla yaygınlaşmakta ve önem kazanmaktadır. Bunun önemli sebepleri olarak benzin ile karıştırılarak yakıt olarak değerlendirilebilmesi ve çevreye olumsuz etkisinin daha az olmasıdır [IEA, 2004].

Biyoetanölün diğer fosil yakıtlara göre üstünlüğü şöyle sıralanabilir;

- Yerli, yenilenebilir bir yakıt kaynağıdır. Fosil kökenli yakıtlara olan bağımlılığı azaltır.
- Enerji bakımından ele alındığında; benzine nazaran 2-3 oktan daha fazla enerji verir ve daha temiz bir enerji maddesidir.
- Bileşiminde daha az formaldehit bulunur, kükürt bulunmaz, yandığında daha az karbon monoksit ve karbon dioksit verir.
- Biyolojik parçalanabilirliği, suda çözünebilir, daha ucuzdur, ayrıca tarıma katkı sağlar.

- Enerji üretimi konusunda dışa bağımlılığı azaltır ve ülke ekonomisine katkıda bulunur.
- Zararlı sera gazı emisyonlarını azaltır ve fosil yakıtlardan % 40-80 daha az sera gazı yayar.

2.1.1. Biyoetanolün Özellikleri

Etanol, alkoller olarak adlandırılan organik bileşikler sınıfının en önemli üyesidir. Etanol, etil alkol veya bitkisel alkol olarak adlandırılır. Renksiz, berrak, yanıcı, oksitlenmiş hidrokarbondur. Kimyasal formülü C_2H_6O olup EtOH ya da C_2H_5OH olarak da ifade edilmektedir. Biyoetanol yakıt alkolü, metil alkol ve etil alkolü kapsayan bir tanımlama olmasına rağmen, yaygın olarak bu isim biyokütle kaynaklarından elde edilen etil alkol için kullanılmaktadır [Karaosmanoğlu, 2005].

Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3’ de biyoetanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri verilmiştir [Acaroğlu vd., 2004].

Tablo 2.1: Biyoetanolün fiziksel özellikleri.

Özgül Ağırlık	0.79 kg/dm ³
Buhar Basıncı (38 °)	50 mmHg
Kaynama Sıcaklığı	78.5 °C
Dielektrik Katsayısı	24.3
Suda Çözünme	∞

Tablo 2.2: Biyoetanolün termal özellikleri.

Alt ısı değeri (kcal/kg)	6,400
Tutuşma sıcaklığı (°C)	35
Özgül ısı (kcal/kg °C)	0,6
Erime noktası (°C)	-115

Tablo 2.3: Biyoetanolün kimyasal özellikleri.

Formül	C ₂ H ₅ OH
Moleküler Ağırlık	46.1
Karbon (wt)	% 52.1
Hidrojen (wt)	% 13.1
Oksijen (wt)	% 34.7
C/H oranı	4
Steimetrik (Hava/EtOH)	9.0

2.1.2. Biyoetanolün Kullanım Alanları

Etanol çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bunların en başında içki sanayi gelmektedir. Sürekli çalışan kolonlarda damıtma yöntemiyle elde edilen saf alkol (% 96-97 v/v) seyreltilerek ve içkiye özgül aromatik madde ya da maddelerle tekrar damıtılarak özel içkilerin üretiminde ve likör yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca çözelti şeklinde ve dezenfeksiyon amacıyla laboratuvarlarda, tıpta, eczacılıkta, kolonya sanayi ve parfümeride, sirke üretiminde, boya sanayinde ve patlayıcı madde üretiminde kullanılmaktadır.

Petrolde üretilen pek çok kimyasal madde biyoetanolden de üretilmektedir. Etilen, hidrojen, glikol eterler, etil akrilat, asetik asit, etil asetat, etil eter, etil klorür bu kimyasallardan bazılarıdır. Ayrıca yine biyoetanolden yüzey aktif maddeler, yapıştırıcılar, yağ asitleri, karbon siyahı, kauçuk ve plastik gibi ara kimyasallarda üretilmektedir [Grassi, 2000].

Biyoetanol yakıt olarak kullanılabildiği gibi benzinle karıştırılarak da kullanılmaktadır. Etanol iyi bir benzin karışım bileşeni olarak yüksek oktan sayısına, yüksek alevlenme hızına ve yüksek buharlaşma ısısına sahiptir. Bu özellikleri, daha kısa yanma süreleri sağlayarak, bu sayede içten yanmalı motorlarda benzine göre daha yüksek verim alınmasını ve bir aracın en iyi performansla yakıt sistemini temiz tutarak çalışmasına yardımcı olur [Kumar et al., 2010]. Biyoetanol yakıt teknolojisinde alternatif motor yakıtı, yakıt hücresi yakıtı ve biyodizel üretim girdisi olarak değerlendirilmektedir. Biyoetanol alternatif motor yakıtı olarak benzin katkı maddesi, motorin katkı maddesi, benzinle harmanlanabilir bileşen, motorinle

harmanlanabilir bileşen ve doğrudan motor yakıtı seçenekleri ile kullanılabilir. Günümüzde yaygın olarak kullanımda olan yakıt alkolü kökenli alternatif yakıtlar; gasohol (% 10 alkol + % 90 benzin karışımı), E25 (% 25 alkol + % 75 benzin karışımı), E85 (% 85 alkol + % 15 benzin karışımı) ve diesohol (E-Dizel, Oksimotorin: En fazla %15 oranında alkol içeren motorin)'dur [Karaosmanoğlu, 2006].

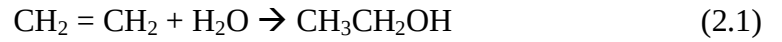
Biyoetanolün bir diğer kullanım şekli, sentetik olarak üretilen ETBE (etil-tersiyer-butil-eter) maddesine katılarak kullanılmaktadır. ETBE akaryakıtın oktan sayısını yükseltmekte, yanmayı iyileştirmektedir. ETBE çevre kirletici ve karsinojen etkili olduğu ifade edilen MTBE (metil-tersiyer-butil-eter)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

Biyoetanol her ne kadar benzin ile karıştırılabilen bir alternatif yakıt kaynağı olarak düşünülse de, dizel yakıtı ile de emülsiyon halinde karıştırılabilmektedir. Biyoetanol dizel yakıt ile karıştırıldığında, setan sayısını düşürmektedir.

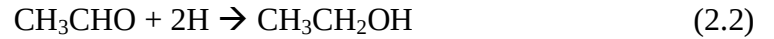
2.1.3. Biyoetanol Üretimi

Etanolün üç önemli üretim kaynağı bulunmaktadır.

- Etilenin (C_2H_4) hidrasyonu ile üretim; bir petrol ürünü olan etilenin hidrasyonu değişik şartlarda yapılmakla birlikte endüstriyel üretimde önemli bir methottur.



- Asetaldehitin (CH_3CHO) indirgenmesiyle üretim; asetilen kullanılarak üretilen asetaldehit, hidrojenlenerek etanole indirgenir.



- Fermantasyon ile üretim; alkolik fermantasyonda şekerler başlıca olarak monosakkaritler, kompleks enzim ihtiva eden mikroorganizma mevcudiyetinde, etanol ve karbondioksit verecek şekilde bozunurlar.



Tamamen parçalanmada 100 gram glukozdan 51.1 g etilalkol, 100 g sakkarozdan hidrolizle 53.8 g glukoz ve 100 g nişastadan hidrolizasyonu izleyen işlemlerde oluşan n molekül glukozdan 56.8 g etanol olduğu teorik olarak

hesaplanmıştır. Ancak, kullanılan mikroorganizma, hammaddenin bileşimi ve fermantasyon koşullarının, fermantasyon sırasında oluşan yan ürünlerin çeşidi ve miktarı üzerinde rol oynadığı anlaşılmıştır [Avcı, 2004].

Alkol fermantasyonu ile etanol miktarı % 10-18 arasında olduğu zaman durmaktadır. Çünkü etanol mikroorganizmanın artık ürünü olarak büyük konsantrasyonlarda mikroorganizmaların hayati faaliyetlerini etkilemektedir. Saf glukoz, endüstride alkolik fermantasyona başlama maddesi olarak kullanılmamaktadır. Bunun yerine, şeker ihtiva eden ya da nişasta ihtiva eden materyaller kullanılmaktadır. Nişasta içeren materyaller bir dizi dönüşüm basamağından sonra fermantasyon kullanımına hazır hale getirilir.

Alkol su ile azeotrop karışım yapar ve bu nedenle alkol su karışımından damıtma sonucu elde edilen etanol, % 96 oranında etanol % 4 oranında su içermektedir. Bu % 4'lük su, damıtma yolu ile doğrudan ayrılmamaktadır. Bu nedenle, suyun ayrılması için susuzlaştırma işlemi yapılmaktadır.

Fermantasyon, uygulama ve işleyiş bakımından temel olarak 3'e ayrılır.

- Kesikli fermantasyon; fermantasyon başlamadan önce reaktör içerisine tüm ortam bileşenlerinin eklenmesi ve fermantasyon sonunda tüm materyalin uzaklaştırılması ile işleyen sistemdir. Fermantasyon boyunca reaktör hiçbir bileşen eklenmez veya ortamdan hiçbir bileşen uzaklaştırılmaz. Endüstride kullanılan uygulamaların büyük kısmında kesikli fermantasyon sistemleri kullanılmaktadır.
- Sürekli fermantasyon; başlangıç olarak fermentöre gerekli bileşenler konularak işlemin başlatıldığı ve uygulama boyunca ortama substrat eklenirken aynı zamanda oluşan ürünün de, birikim yapmaması için sürekli uzaklaştırılmasıyla, reaktör içinde dengenin sağlandığı sistemlerdir.
- Yarı-kesikli fermantasyon; zorunlu olarak kesikli uygulama yapılmasına karşın, fermantasyon süresi içerisinde ya sürekli bir giriş ya da sürekli bir çıkışın olduğu sistemlerdir.

Fermantasyonda asıl amaç mümkün olan en kısa sürede, en az hammadde kullanılarak en fazla ürün elde edilmesidir. Uygulanan işlem ve kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak üretim ortamının yapısı ve gerekse fermantasyon süreleri farklılık göstermektedir. İdeal bir üretim ortamının; substrattan ürünün veya biyokütleli hızlı ve maksimum verim ile üretebilmesi, istenmeyen yan ürünlerin

miktarının düşük olması, kararlılığını uzun süre koruyabilmesi ve sterilizasyonu sırasında havalandırma, karıştırma, saflaştırma aşamalarında herhangi bir olumsuzluk oluşturmaması gibi özellikleri taşıması istenmektedir [Stanbury et al., 1995].

2.1.4. Etanol Fermantasyonunda Kullanılan Hammaddeler

Günümüzde ucuz karbonhidrat kaynaklarından etanol üretimine artan ilgi dünya çapında hızla artmaktadır [Mohanty et al., 2009]. Etanol fermantasyonunda başta glukoz olmak üzere çeşitli karbonhidratlar kullanılmaktadır. Son zamanlarda şeker kamışı, mısır, soya fasulyesi gibi yenilenebilir enerji kaynaklarından etanol üretimi artmaktadır. Etanol üretim maliyetleri hammadde fiyatları ve üretimin büyüklüğü ile yakından ilişkilidir. Biyokimyasal biyokütle bileşimi -hammaddenin etanol verimini içindeki şeker ve selüloz bileşimini etkilemesi gibi- işleme performansında önemli bir rol oynar.

Etanol fermantasyonunda kullanılan hammaddeler şeker içeren hammaddeler (örneğin; şeker kamışı, şeker pancarı, peynir altı suyu ve meyveler), nişasta içeren hammaddeler (örneğin; mısır, buğday, pirinç, patates ve arpa) ve lignoselülozik hammaddeler (örneğin; tarım ve ağaç işlemede ki atık ürünler, odun, saman ve otlar) olarak üç gruba ayrılabilir (Tablo 2.4). Genel olarak, etanol, birinci nesil olarak adlandırılan nişasta ve şeker gibi hammaddelerden üretilmektedir. Etanol fermantasyonunda bu hammaddelere alternatif ikinci nesil atık biyokütle materyalleri kullanılabilir ve bu hammaddeler lignoselülozik atıklardır.

Tablo 2.4: Etanol fermantasyonu için kullanılan bazı hammaddeler.

Şekerli Ürünler	Nişastalı Ürünler	Lignoselülozik Ürünler
Şeker pancarı	Patates	Tarım atık ürünleri
Şeker kamışı	Buğday	Orman atık ürünleri
Peynir altı suyu	Mısır	Saman
Melas	Arpa	Odun
Meyveler	Pirinç	Saman
Süpürge darısı	Çavdar	Kentsel atık ürünleri

2.1.4.1. Lignoselülozik Ürünler

Lignoselülozik maddeler doğada; ağaç, ot, zirai atıklar, ormancılık atıkları ve evsel atık ürünlerinin yapısında bulunur. Lignoselülozik maddeler atık kağıt hamuru ve kağıt ürünlerinde lif kalitesini arttırmak için kimyasal hammaddeler ve alternatif enerjiler üretmek için kullanılır. Lignoselülozik biyokütle etanol gibi sıvı yakıtlara ve karboksil asit gibi kimyasallara dönüştürülebilir [O'Dwyer, 2005]. Bitki hücre duvarı, lignin, hemisülüz içine gömülmüş selüloz liflerinden oluşan bir makromoleküldür [Brett and Waldron, 1996]. Odunsu ve lifli bitkilerin yapısında bulunan lignoselülozik materyaller üç polimerden oluşur; selüloz, hemiselüloz, lignin. Lignoselüloz kuru ağırlık olarak % 35-50 selüloz, % 20-35 hemisülüz ve % 10-15 lignin içermektedir [Wyman, 1994]. Polisakkaritlerin beş ve altı karbonlu monomerik şekerlerine dönüştürülmesi ve bunların uygun mikroorganizmalarla fermente edilerek enerji değeri bulunan yakıtların elde edilmesi son zamanlarda üzerinde durulan konuların başında gelmektedir.

2.1.4.2. Nişastalı Ürünler

Nişasta, doğada fazla miktarda bulunan farklı oranlarda amiloz ve aminopektin polimerlerinin bir bileşimi olan doğal katı bir substrattır. Özellikle mantarlar olmak üzere birçok organizma nişastayı hidroliz edebilmektedir, ancak genellikle nişasta etkin bir şekilde hidroliz edildikten sonra kullanılmaktadır. Hidroliz edilen nişasta bu şekilde mikroorganizmaların kullanabileceği fermente edilen şekerlere dönüştürülür. Etanol üretimi için yaygın olarak kullanılan hammaddeler patates, buğday, pirinç, mısır ve arpadır.

2.1.4.3. Şekerli Ürünler

Biyoetanol üretiminde şeker kaynağı olarak genellikle şeker kamışı, şeker pancarı ve süpürge darısı kullanılmaktadır. Şeker endüstrisinin yan ürünü olan melas yaklaşık % 45-50 civarında fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilmektedir. Melas kolay bulunabilen, kaliteli ve ucuz bir karbon kaynağıdır. Ayrıca, melasa mikroorganizmanın gelişimi ve fermentasyon aktivitesi için zorunlu olarak ilave

edilmesi gerekli madde olmaması açısından da, fermantasyon yöntemi ile etanol üretiminde en yaygın kullanılan hammaddedir. Mikroorganizma melasın içindeki sakkarozu, enzimleri sayesinde glukoz ve fruktoza dönüştürür ve etanol fermantasyonunu gerçekleştirir. Şeker kamışı ve şeker pancarından başka çeşitli meyveler (örneğin; portakal, elma, incir, hurma) ve peynir altı suyu gibi şekerli materyaller biyoetanol üretiminde kullanılan diğer ürünlerdendir. Peynir altı suyu içerdiği laktoz, protein ve minerallerden dolayı fermentasyon endüstrisi için uygun bir hammadde özelliği taşımaktadır.

Genel olarak tarımsal ürünlerden biyoetanol üretimi süreci dört adımdan oluşmaktadır.

- Hammaddeden bir şeker çözeltisi elde etmek için işlem,
- Maya veya bakteri yardımı ile şekerin biyoetanol ve karbondioksit'e dönüştürülmesi,
- Biyoetanolün fermentasyon çözeltisinden damıtılması,
- Biyoetanolün dehidrasyonu.

Şeker içeren ürünlerden biyoetanol üretimi sürecinde ürün öncelikle içerisindeki şekerin ortaya çıkarılması için işleme tabi tutulur (ezme, ıslatma ve kimyasal işlem gibi). Elde edilen şeker daha sonra biyoetanol üretmek için mikroorganizmalar yardımıyla fermantasyona uğratılır. Ardından ise fermantasyon çözeltisi biyoetanol istenilen konsantrasyona gelinceye kadar damıtılır. Son olarak ise susuz biyoetanol elde etmek için dehidrasyon işlemi yapılır. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve işleniş aşamaları tablo 2.5'te gösterilmiştir [Bulut, 2006]

Tablo 2.5: Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve işleniş aşamaları.

Hammadde	Önişlem	Fermantasyon	Son ürünler ve yan ürünler
Şeker İçeren Kaynaklar	Öğütme, temizleme, kimyasal ve enzimatik eklemeler, ıslatma	pH ve sıcaklık ayarları, nütrient ve hücrelerin eklenmesi, etanol üretimi ve damıtılması	Etanol, melas, küspe
Nişasta İçeren Kaynaklar	Enzim eklenmesi, sıvılaştırma, kesme, öğütme		Hayvan yemi
Lignoselülozik Kaynaklar	Kesme, öğütme, enzim ve kimyasal eklemeler		Hayvan yemi, biyoplastik

2.1.5. Türkiye’de ve Dünyada Biyoetanol

Dünya genelinde sürekli artan enerji talebi sonucunda küresel biyoetanol pazarı 2006 yılında 50 milyar litreye ulaşmıştır. Ayrıca, bu miktarın 2020 yılı sonuna kadar 150 milyar litre seviyesine ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu üretimin % 49.6’sı Amerika Birleşik Devletleri’nde, % 38.4’ü Brezilya’da yapılmıştır. Bu da göstermektedir ki bu büyük pazarın neredeyse tamamı bu iki ülke tarafından yönetilmektedir. Avrupa’da ise Fransa, Almanya ve İspanya en büyük biyoetanol üreticileri konumundadır.

Türkiye tarımsal potansiyeli oldukça yüksek bir ülkedir. Çeşitli meyveler, hububat ürünleri, yumrulu bitkiler önemli miktarlarda yetiştirilmektedir. Bu ürünlerin üretim fazlaları ve atıkları biyoetanol üretiminde değerlendirildiğinde hem çiftçimize, hem çevremize hem de ekonomimize katkı sağlayabilecektir. 2004 yılında faaliyete geçen Bursa- Kemalpaşa’da bulunan Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş. (TARKİM) biyoetanol üretim lisansına sahip, girdisi buğday ve mısır olan 40 milyon lt/yıl kapasiteye sahip ilk üreticidir. Türkiye’de kurulan ikinci biyoetanol tesisi ise 2007 yılında Adana’da faaliyete geçen Tez kim Tarımsal Kimya (TEZKİM) İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasına ait üretim tesisidir. Biyoetanol üretimini ağırlıklı mısır kullanarak biyoetanol üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye’nin en büyük biyoetanol üretim tesisi olan Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.’nin Konya ilinin Çumra ilçesinde kurmuş olduğu Çumra Şeker Fabrikası’dır. Yıllık 84 milyon lt. üretim kapasitesine sahip olan fabrika 2007’de kurulmuştur. Çumra ve Kemalpaşa’da ki üretimlerin Türkiye’nin günümüzdeki ihtiyacı olan biyoetanolü karşılayacak kapasitede olduğu bildirilmektedir. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.’ye bağlı dört alkol fabrikası (Eskişehir, Turhal, Adana, Erzurum) bulunmaktadır. Şeker üretim artışı olan melas, bu tesislerde alkole dönüştürülmektedir. Eskişehir alkol fabrikasında alkol üretimi sonucunda elde edilen ve çevreye zararlı bir atık olan şilempe arıtma tesisleri bulunmaktadır. Şilempe arıtma tesislerinin Turhal, Malatya ve Erzurum fabrikalarına kurulması, çevreyi korumak adına bir zorunluluktur. Ülkemizde benzine % 5 oranında yakıt alkolü katılması halinde, yıllık benzin tüketimi 3.5 milyon ton olarak alındığında yaklaşık 220 milyon litre biyoetanole ihtiyaç olacaktır. Biyoetanol ihtiyacının karşılanması için 44.000 ha’lık bir alanda

şeker pancarı tarımı yapılması gerekmektedir [Oruç, 2008]. Türkiye’de biyoetanol üreten fabrikaların kullandığı hammadde ve kapasiteleri gösterilmiştir (Tablo 2.6) [Karaosmanoğlu, 2008], [Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş, 2004].

Tablo 2.6: Türkiye’de biyoetanol üretimi.

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

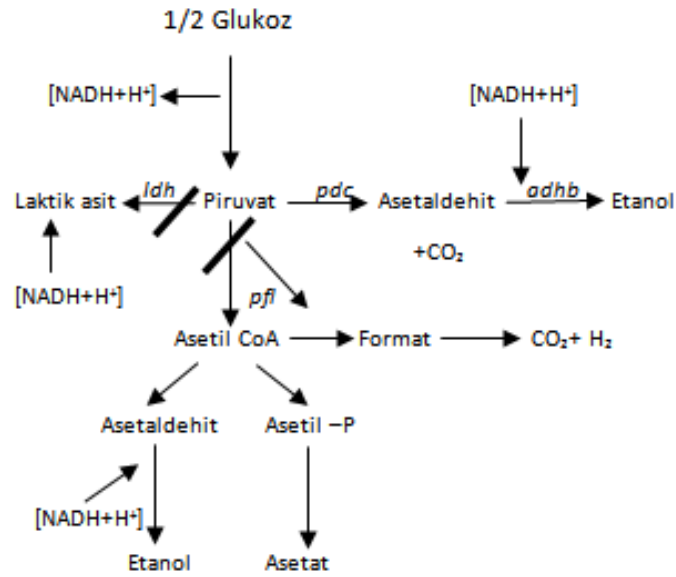
Ülkemizde Enerji Piyasası Düzenleme Kurulunun (EPDK) 19 Eylül 2011 tarihinde aldığı bir karar ile 2013 yılından itibaren, akaryakıtta her yıl artan oranlarda, yerli tarım ürünlerinden elde edilen etanol ve biyodizel katılması zorunlu hale getirilmektedir (5015 sayılı Petrol Piyasası Kanunu, EPDK, 2011).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

Ülkemiz, kullandığı petrolün neredeyse tamamını ithal etmektedir, yaklaşık % 94’ü, bu yüzden benzine doğrudan alternatif olan biyoetanolün üretimi çok büyük önem taşımaktadır. Türkiye’de biyoetanol üretimi, Avrupa ve Amerika’ya kıyasla oldukça yenidir ancak son yıllarda özel sektör tarafından yapılan yatırımlar sayesinde üretim kapasitesi büyük ölçüde artmıştır.

2.1.6. Rekombinant Soylar ile Biyoetanol Üretiminin Arttırılması

Biyoetanol üretimi için, biyokütlenin içerdiği şekerlerin karışımını fermente

edebilen bir mikroorganizma gereklidir. Mikroorganizmalar arasında *E. coli* geniş spektrumlu şekerleri metabolize edebilmesine rağmen, diğer şekerlere göre glukozu tercih etmektedir. Etanol üretiminde, *E.coli*'nin metabolik mühendisliği için çabalar, etanol üretimi için karbon kaybına neden olan doğal fermentasyon yollarının susturulması yönündedir. Böyle yollarından birinde piruvat laktata, laktat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla çevirilmektedir. Bir çalışmada, *E.coli* NZN111 suşu, *Idh* (laktat dehidrogenaz) ve *pfl* (piruvat format liyaz) genlerinin içine homolog rekombinasyonla antibiyotik direnç genlerinin eklenerek susturulması ile elde edilmiştir [Dien et al., 2000]. Bu suş, glikolizisten oluşan NADH dengesi için, piruvattan NAD^+ 'yi elde edemediği ve bunun sonucu olarak da anaerobik üremeyi sürdüremediği görülmüştür (Şekil 2.5). Anaerobik olarak NZN111 suşu'nun üreyebilmesi, bu suşun lac promotorunun kontrol ettiği *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli *pdc* (piruvat dekarboksilaz) ve *adhb* (alkol dehidrogenaz II) genlerini taşıyan pLOI297 plazmidi ile transformasyonu ile sağlanmıştır. *E. coli* NZN111:pLOI297 suşu FBR5 suşu olarak ifade edilmiştir [Dien et al., 2000].



Şekil 2.1: *E. coli*'de glukozdan etanol üretimi.

2.2. Peynir Altı Suyu

Peynir altı suyu, peynir ya da kazein üretiminde kazein çöktürülmesi sonucu elde edilen yarı saydam, yeşilimsi sarı renkte bir sıvı protein kaynağı olarak

tanımlanmaktadır. Süt endüstrisi içinde yer alan ve peynir üretiminde ortaya çıkan peynir altı suyu kimyasal oksijen ihtiyacı, içerdiği yüksek miktardaki şeker (laktoz) ve protein nedeniyle önemli ölçüde kirliliğe neden olmaktadır. Biyolojik parçalanabilirliği kolay olan peynir altı suyu, kirli sulardaki organik maddeleri parçalamak için mikroorganizmalar tarafından kullanılan oksijen miktarı olarak tanımlanan biyolojik oksijen isteği (BOİ), kimyasal oksijen isteği (KOİ) ve toplam katı madde (TKM) içeren süt endüstrisinin tekrar işlenebilen ve başka ürünlere dönüştürülebilen bir yan ürünüdür. Biyolojik oksijen ihtiyacı, peynir yapım sürecine bağlı olarak 30 000- 60 000 mg/L arasında değişmektedir [Yenigün vd., 1991]. Kimyasal oksijen isteği ise, 60 000- 80 000 mg/L arasında bulunmaktadır [Gardner, 1989]. Peynir üretiminde 10 kg sütten 1 kg peynir üretilirken 9 kg peynir altı suyu oluşmakta ve oluşan peynir altı suyu süt besinlerinin % 50'sini içinde barındırmaktadır [Rech et al., 1999]. Bu nedenle peynir işletmelerinden peynir altı sularının birçok ülkede hiçbir işleme tabi tutulmadan doğaya verilmesi yasaklanmıştır. Değerlendirmeden atıldığı takdirde peynir altı suyunun imalathaneden atılması için özel kanalizasyon sistemlerine ihtiyaç duyulmakta, bu sistemin bulunmadığı durumlarda bu maddenin tanklarla taşınması gerekmektedir. Peynir altı suyunun atıldığı yerler yerleşim alanlarından uzak olmalı ve durgun su ve akarsulara bırakılmamalıdır. Çünkü hiçbir işleme tabi tutulmadan atılan peynir altı suyundaki organik maddeler su içinde fermentasyona uğrayarak önemli derecede çevre kirliliğine yol açmaktadır [Kurt, 1990].

Peynir işletmelerinde üretilen peynirin yapılış şekline göre iki şekilde peynir altı suyu oluşmaktadır. Asit ile yapılan peynirlerden süzülen atık su ekşi peynir suyu ($\text{pH} < 5$), maya enzimiyle yapılan peynirlerden süzülen peynir suyu ise tatlı peynir suyu ($6 < \text{pH} < 7$) olarak adlandırılmaktadır. Ekşi peynir altı suyu daha fazla kül daha az protein içermektedir ve sınırlı miktarlarda üretilmektedir.

2.2.1. Peynir Altı Suyunun Bileşimi

Peynir altı suyu işlenen sütün kalitesine ve içeriğine, peynir yapım tekniğine, pıhtılaşma sıcaklığı ve süresine pıhtılaştırmada kullanılan maya veya asit miktarı ve kalitesi gibi birçok farklı faktöre bağlı olarak, elde edilen peynir altı suyunun bileşimi de geniş sınırlar içinde farklılık göstermektedir. İçerik olarak süte benzerlik

gösteren peynir altı suyu, süt kuru maddesinin yaklaşık yarısını, süt şekerinin neredeyse tamamını, proteinlerin yaklaşık 1/5' ini ve B vitaminlerinin ise büyük bir bölümünü içermektedir [Demirci ve Arıcı, 1989]. Tablo 2.7'de 100ml peynir altı suyu içeriği verilmiştir [Aktaş, 2003].

Tablo 2.7: 100ml peynir altı suyu bileşimi.

Bileşen	Miktar
Kuru Madde	6.3-7.0 g
Yağ	0.05-0.4 g
Ham Protein	0.85-1.15 g
Karbonhidrat	4.6-5.2 g
Kül	0.5-0.6 g
Laktoz	4.6-5.2 g
Laktik asit	0.05-0.2 g
Sitrik asit	0.14-0.17 g
Kazein	0.04-0.05 g
Na	36-51 mg
K	140-160 mg
Ca	40-50 mg
Mg	8-10 mg
Fe	0.10 mg
Cl	70-120 mg
P	40-55 mg
S	15-18 mg
Tiamin (B ₂)	0.03-0.05 mg
Riboflavin	0.1-0.16 mg
Pridoksin	0.04-0.07 mg
Vitamin A	0.002-0.004 mg
Vitamin C	0.9-1.5 mg

Sütten kazeinin uzaklaştırılmasıyla kalan süt serumu içerisinde % 0.5-1 kadar protein kalır ve bu proteinlere süt serumu ya da peynir üretimi sırasında peynir altı suyunda kaldıkları için peynir altı suyu proteinleri adı verilmektedir. Peynir altı suyunun içerdiği majör ve minör proteinler onu değerli bir hale getirmektedir. Majör

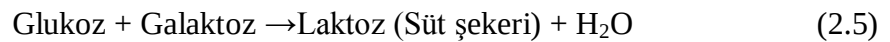
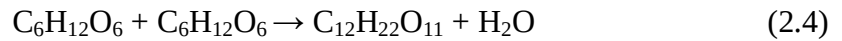
peynir altı suyu proteinleri; β - laktoglobülin, α - laktoalbümin, serum albümin, immünglobülinler ve glikomakropeptitlerdir. Minör peynir altı suyu proteinleri ise; laktoperoksidaz, laktoferin, mikroglobülin, lizozim, insülin-benzeri büyüme faktörü, γ - globülinler ve diğer birkaç küçük proteinlerden oluşmaktadır [Pihlanto and Korhonen, 2003]. Sütün hidrofıl karakterli proteini olduğu için kolay pıhtılaşmaz. Sıcaklığa karşı duyarlı bir protein olup 74 °C’de 15 saniyede denatüre olmaktadır. β - laktoglobülin sadece inek sütünde bulunmakta ve peynir suyu proteinlerinin % 50-60’ını oluşturmaktadır. Özellikle lösin ve lisin aminoasitleri bakımından oldukça zengindir ve 85- 100 °C’de denatüre olmaktadır. Tablo 2.8’de peynir altı suyu proteinlerinin bileşimi verilmiştir [De Witt, 1998].

Yüksek besin değerine ve fonksiyonel özelliklere sahip olan peynir altı suyu proteinleri; sporcu beslenmesine ve özel beslenme amaçlı gıda ve içeceklerde, bebek mamalarında ve gıda sanayinde çözünürlük, köpük, jel emülsiyon ve lif oluşturma su bağlama ve kıvam verme gibi fonksiyonel özelliklerinden yararlanılmaktadır [Özcan ve Delikanlı, 2011].

Tablo 2.8: Peynir altı suyu proteinlerinin bileşimi.

Bileşim	Konsantrasyon (g/L süt)
β - Laktoglobülin	3.2
α - Laktoalbümin	1.2
Serum albümin	0.4
Laktoferrin	0.2
Laktoperoksidaz	0.03
Proteaz- Pepton	≤ 1

Peynir altı suyunda miktarca en fazla ve doğada yalnızca sütte bulunan laktoz, yapısındaki glukoz galaktozun bir molekül su ayrılmasıyla oluşan bir disakkarittir.

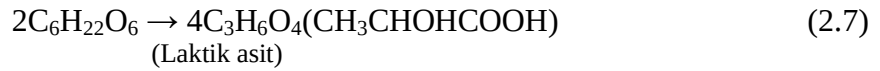
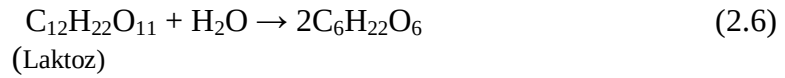


Peynir imalatından sonra peynir altı suyunda kalan yaklaşık % 4-5 laktoz, mikrobiyolojik işlemler için iyi bir ham madde kaynağı oluşturmaktadır. Laktoz

glukoz ile karşılaştırıldığında, daha az tatlılığı, daha düşük osmotik basınç ve daha yavaş absorpsiyon hızına sahiptir. Laktoz peynir altı suyunun diğer bileşenleriyle birlikte ülkemizde çoğunlukla değerlendirilmeden atılmakta hem çevre kirlenmesine hem de önemli miktarlarda besin kaybına neden olmaktadır [Kurt ve Gülümser, 1988].

Laktoz, laktaz enzimi preparatlarıyla ya da kuvvetli mineral asitlerin etkisiyle glukoz ve galaktoza parçalanabilmektedir. Laktozun istenmediği durumlarda; laktoz hidrolizinin gerçekleştirilmesi, laktoz içermeyen gıda ürünlerinin elde edilmesi ve peynir altı suyunun değerlendirilmesi amacıyla gıda sektörü açısından önem taşımaktadır. β -galaktosidaz laktozun enzimatik olarak glukoz ve galaktoza kadar parçalamakta ve mikroorganizma, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır.

Laktoz, süt ve süt ürünlerinde bazı mikroorganizmalar tarafından fermentasyona uğratarak çeşitli değişiklikler meydana getirir ve laktik asit oluşumuna neden olur. Laktoz, β -galaktosidaz enzimi ile hidrolize uğrayarak glukoz ve galaktoza parçalandıktan sonra dört molekül laktik asit molekülü oluşur.



Peynir oluşumu sırasında sütteki laktozun büyük bir kısmı peynir altı suyuna geçer ve peynir altı suyu laktozun değerlendirilmesi için iyi bir kaynak olarak görülür. Peynir pıhtısında kalan laktoz ise, olgunlaşma sırasında laktik asite dönüşür. Laktik asit, peynirin olgunlaşmasında önemli bir role sahiptir [Demirci, 1997]. Laktoz, laktik asit fermentasyonu dışında tereyağ, propiyonik asit ve etil alkole dönüşerek süt ve süt ürünlerinden değişik ürünlerin oluşmasını sağlarlar.

Laktoz, başta gıda sanayide olmak üzere tıpta, ilaç sanayinde sıkça kullanılmaktadır. Gıda sanayide özellikle bebek mamaları, fırıncılık, et ürünleri, şekerlemeler, hazır gıda, toz çorbalar ve bir takım diyet ürünlerinde kullanılmaktadır. Laktoz ve laktoz türevleri, bağırsakta asidik ortam oluşturarak patojen mikroorganizmaların gelişimini önler, bununla birlikte probiyotik ortam sağladığı için bebek mamalarını anne sütüne benzetmek için gıda katkı maddesi olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir [Barth and Behnke, 1997]. Laktozun absorpsiyon

yeteneği fazla olduğundan tat ve aroma maddelerinin tutulmasını sağlar. Aynı zamanda indirgen şeker olması ve bu nedenle proteinlerle tepkimeye girmesi sonucu ürüne karamel rengini verir ve bazı fırın ürünlerinde görünümü zenginleştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Mayalar laktozdan kolaylıkla yararlanamadığı için, kullanıldıkları gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla da kullanılmaktadırlar [Metin, 2005].

Peynir altı suyu içeriğinde vitaminler de bulunmaktadır. A vitamininin peynir oluşumu sırasında büyük bir kısmı peynire geçmekte çok az bir kısmı peynir altı suyunda kalmaktadır. Vitamin B₁, B₂ ve C suda çözündüklerinden dolayı peynir altı suyunda kalmaktadır. Peynir altı suyu, kuru maddesinin mineral içeriği ise değişkenlik göstermekle birlikte, peynir üretim teknolojisine bağlı olmaktadır. Peynir altı suyu sütte bulunan hemen hemen tüm çözünür tuzları ve mikro elementleri içerebilmektedir. Bunun yanında, bileşiminde bulunan fosfor ve kalsiyum mineralleri de peynir altı suyunun besin değerini arttırmaktadır.

2.2.2. Peynir Altı Suyunun Kullanım Alanları

Peynir altı suyu endüstriyel olarak peynir altı suyunun tüm bileşenleriyle birlikte konsantre edilmesi ve kurutulması ya da ayrı ayrı içerdıği bileşenlerin elde edilmesi şeklinde iki ayrı proste değerendirilebilmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda kullanılacak olan peynir altı suyunun bileşiminin, değerlendirilme sonucu kazanılacak ürünün kalitesine büyük etkisi olmaktadır. Peynir altı suyu yüksek miktarda su içeriğine sahiptir, çabuk bozulur ve asidikleşir. Peynir altı suyu laktoz içermesinden dolayı bazı mikroorganizmalar laktik asit üreterek asidikleşmeye sebep olmaktadır. Peynir altı suyunun işlenme prosesinde kullanılan bazı yöntemler; ultrafiltrasyon, ters osmoz, elektrodializ, fermentasyon, koagölasyon, iyon değeristirme, kurutma ve nanofiltrasyondur.

Peynir mayası kullanılarak peynir yapımı sırasında kazein ve yağın pıhtı olarak ayrılmasından sonra, geri kalan ve bileşimi peynir çeşidine ve yapım tekniğine göre değerşen sıvının toz haline getirilmesiyle tatlı peynir altı tozu üretilmektedir. Ayrıca sütün asit ile çöktürölmesi sonucu oluşın çöktütüden teknolojisine göre süzölerek elde edilen sıvının toz haline getirilmesiyle de ekşi peynir altı tozu üretilmektedir [TSE, 1995].

Peynir tozlarının üretiminde öncelikle bir peynir suyu emülsiyonu hazırlanmaktadır. Bu emülsiyonun oluşmasında, temelde ufalanmış peynirler, su ve emülsifiye edici tuzlar kullanılmaktadır. Üretilen peynir tozunun lezzeti, özellikle kullanılan peynirin çeşidine ve eğer ilave edilmişse diğer bileşenlerin ve tatlandırıcıların çeşidine ve miktarına bağlıdır. Asidik veya tatlı peynir altı tozu, demineralize peynir altı suyu tozu, laktozu alınmış peynir altı suyu tozu ve yağca zenginleştirilmiş peynir altı suyu tozu gibi çeşitleri üretilmektedir. Peynir tozları en fazla gıdalara lezzet verme amacıyla kullanılmaktadır. Farklı alanlarda kullanılmakla birlikte genel olarak; çerez kaplamalarında, soslarda, bebek mamalarında, hazır çorbalarda, cipslerde, keklerde, tuzlu çeşnilerde ve tuzlu bisküvilerde yararlanılmaktadır. Peynir tozu ilave edilmiş gıdalar, peynir içeren gıdalar ile aynı tat ve görünüşe sahip olabilmektedir.

Peynir altı suyu tozu kullanılmasının, peynir özelliklerine sahip düşük nem içerikli ve kuru ürün elde etme, katıldığı gıdalarda besin değerini yükseltmesi, raf ömrü uzun olan ürünlerin karışımlarında kullanılması ve farklı gıda üretimlerine kolaylıkla uyum sağlaması gibi faydaları bulunmaktadır.

Peynir altı suyunun uzun zaman değeri anlaşılamamış ve değerlendirilememiştir. Önceleri; sadece hayvan yemi olarak kullanılan peynir altı suyu olduğu gibi ya da bazı proseslerle işlendikten sonra, günümüzde artık birçok alanda kullanılmaktadır.

Peynir altı suyu; yüksek miktarda laktoz ve protein içeriğine sahip olmasının yanı sıra, mineral ve suda çözünen vitaminleri içermesi sebebiyle herhangi bir işlem uygulanmadan hayvanların içme suyuna karıştırılarak, hayvan besini veya toprağa gübre olarak doğrudan sıvı şekilde tüketimi gerçekleştirilmektedir. Genellikle tahıllara karıştırılarak karışık yem şeklinde hayvanlara verilmektedir. Ancak yüksek laktoz, mineral madde ve tuz içeriği sebebiyle sıvı formda kullanımı oldukça sınırlıdır. Çünkü toprağa verilen peynir altı suyu dikkatli ve kontrollü bir şekilde toprağa verilmediğinde iklim, coğrafik yapı ve toprak özelliklerine bağlı olarak peynir altı suyundan gelen mineral tuzlarla toprak doymakta ve tahıl ya da çayır otlarının cılız kalmasına yol açmaktadır. Bundan dolayı, peynir altı suyunun çayırlara ve ilkbahar mevsimi gibi yağışların olduğu dönemlerde toprağa verilmesinin doğru olacağı belirtilmiştir [Konar, 1981].

Ülkemizde pek bilinmemesine rağmen, peynir altı suyundan alkollü ya da alkolsüz çeşitli içecekler elde edilmektedir. Peynir suyuna mango, şeftali,

turunçgiller, elma, üzüm ve muz gibi çeşitli meyve aromalarının katılmasıyla değişik alkolsüz içecekler elde edilmektedir. Peynir altı suyu bazlı içecekleri geniş bir kitleye hitap etmektedir. Peynir altı suyu diyare, safra hastalıkları, cilt problemleri ve bazı intoksikasyonların tedavileri için başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu içeceklerin yüksek protein içeriği nedeniyle sporcular için zengin besin ve enerji kaynağıdır. Peynir altı suyu proteinleri lösin, izolösin ve valin gibi dallanmış zincir yapıdaki aminoasitlerin zengin bir kaynağıdır. Bu aminoasitler diğer esansiyel aminoasitlere benzemezler, çünkü metabolize olurlar ve direkt olarak kas dokusunda ve egzersiz ve direnç antrenmanları sürecince ilk kullanılan aminoasitlerdir. Bu içecekler kalsiyum emilimini de arttırdığı için özellikle osteoporozis hastalığı çeken yaşlı insanların beslenmesinde önemlidir. Peynir suyu sahip olduğu bazı özellikleri sebebiyle bira benzeri içeceklerin yapımı için elverişlidir. Ayrıca deproteinize asit peynir suyuna sakaroz ve karamelize şekeri, bira mayası, meyve aroması ve su katıldıktan sonra şişelenip, 18 °C’de 8-12 saat fermentasyona bırakılarak peynir suyu şampanyası üretilmektedir.

Peynir suyu proteinlerinin yağ oranı yüksek kremalarda, mayonezde, sürülebilir krem peynirlerde, et sosları ve salata sosları gibi ürünlerin yapımında, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon kapasitesinin yüksek olması nedeniyle kullanılabilmesi belirtilmiştir. Ayrıca kremalı çorbalar, et sosları ve benzeri gıdalarda yüksek jelleşme özelliğine sahip olan peynir suyu proteinleri kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır [Gökalp ve Işık, 1999]. Peynir altı suyu, yapısındaki laktozdan dolayı sosis salam gibi et ürünlerinde belirli miktarlarda kullanılmaktadır. Çünkü laktoz bu ürünlerde kısa sürede laktik aside dönüşmekte ve ürüne ekşimsi bir tat vermektedir. Isıtma ile elde edilen Quark, Cottage ve eritme peynirlerinde yapıyı geliştirmek, Cheddar peynirinde randımanı arttırmak, yoğurt yapımında su bağlama özelliği sayesinde daha kıvamlı ürün elde etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Ayrıca içerdiği yüksek miktardaki laktoz sebebiyle, kek, bisküvi, pasta ve çöreklerde yağsız süt tozunun yerine değişik miktarlarda peynir altı tozu kullanılmaktadır.

Kozmetikler için uygun olan peynir suyu minerallerinin düşük molekül ağırlıklı fraksiyonu peynir suyundan, peynir suyu konsantratı ya da izolatu üretim sırasında bir yan ürün olarak elde edilmektedir. Bu maddelerin suda çözünbilme, su bağlama ve hücrelerde hızlı yayılma yetenekleri kozmetik endüstrisinde kullanılan hyaluronik aside benzerlik göstermektedir. Bu nedenle peynir suyundan elde edilen

bu maddeler, kadınlar için üretilen ana kozmetik ürünleri ile bebekler için üretilen sabun ve losyonlarda kullanılmaktadır.

Günümüzde serum proteinlerinin anti-bakteriyel ve bağışıklığı artırıcı özellikleri nedeniyle bazı hastalıklara karşı kullanılabileceği ifade edilmektedir [Demirci ve Arıcı, 1989]. Peynir altı suyu proteinleri, inek sütünün anne sütüne benzetilmesi ve içme sütlerinin proteince zenginleştirilmesi için süt şekeri ile birlikte diyetetik amaçla kullanılmaktadır.

Peynir altı suyunun anaerobik fermentasyonu ile biyogaz ve metan üretimi uzun zamandır kullanılmakta ve bu amaçla birçok anaerobik reaktör geliştirilmiştir. Bu reaktörler sayesinde biyogaz ve metan üretiminin yanında BOİ ve KOİ değerleri önemli ölçüde azaltılmaktadır. Biyogaz, çok yönlü bir enerji kaynağı olarak doğrudan ısıtma ve aydınlatma amacıyla kullanılabildiği gibi, elektrik enerjisine ve mekanik enerjiye çevrilerek de kullanımı mümkündür.

Peynir altı suyundan, gıda sektöründe sıkça kullanılan propiyonik asit, asetik asit, laktik asit, laktobiyonik asit, sitrik asit ve glukonik asit gibi organik asitlerin üretiminde yararlanılmaktadır. Ayrıca peynir altı suyunun bazı mayalar tarafından fermentasyonu sonucunda gliserol üretilmektedir.

2.3. Bakteriyel Hemoglobin

Vitreoscilla hemoglobini ise son yıllarda keşfedilen ilk prokaryotik hemoglobin olup, bu proteinin çeşitli endüstriyel proseslerdeki kullanım potansiyeli son yıllarda birçok araştırmanın konusunu oluşturmuştur. VHb 15,775 Da molekül ağırlığına sahip, sitoplazmik ve periplazmik bölgede yoğunlaşan, homodimer (iki özdeş alt ünite) yapısı gösteren bir proteindir ve her bir alt ünite 146 aminoasitten oluşmuştur [Wakabayashi et al., 1986]. Her alt ünite bir adet hem grubu (Fe^{2+}) içermektedir. Hem grubundaki demir ökaryotik hemoglobinlerde olduğu gibi ferrus (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) olmak üzere iki farklı formda bulunabilmektedir. Bu iki formdan sadece ferrus (Fe^{2+}) oksijen bağlayabilir [Kroneck et al., 1991].

Gram negatif bakteri mor fotosentetik olan *Vitreoscilla* atmosferik oksijen konsantrasyonundan % 90 daha düşük ortamda *E. coli* ile kıyaslandığında VHb ekspresyonunun 50 kat daha fazla üretildiği belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Rekombinant protein üretiminden, çeşitli antibiyotiklerin üretimine ve zararlı

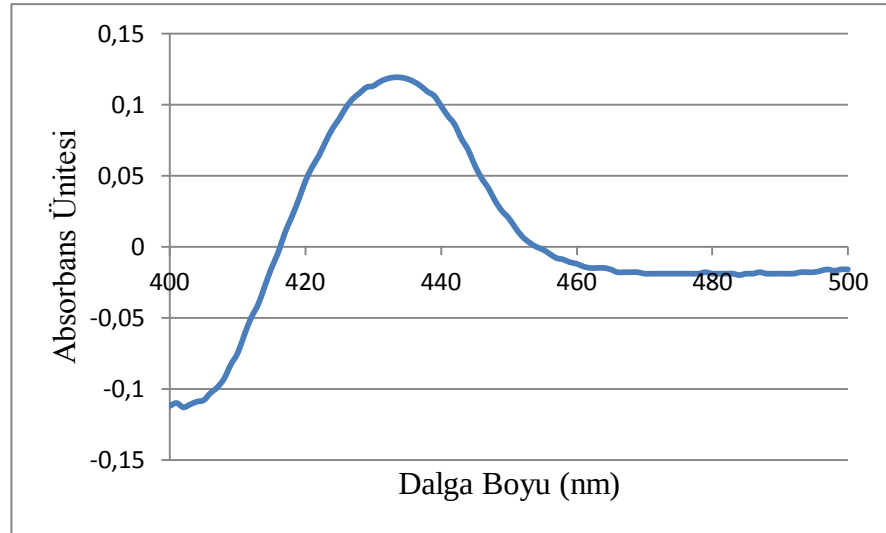
aromatiklerin parçalanmasına benzer birçok proste bu proteinin klonlanmış hücrelere önemli avantaj kazandırdığı saptanmıştır. Dolayısı ile son yıllarda literatüre girmiş olan “metabolik mühendislik” terimi kullanıldığında bu protein ilk sırada bahsedilen potansiyel alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.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

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

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

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

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

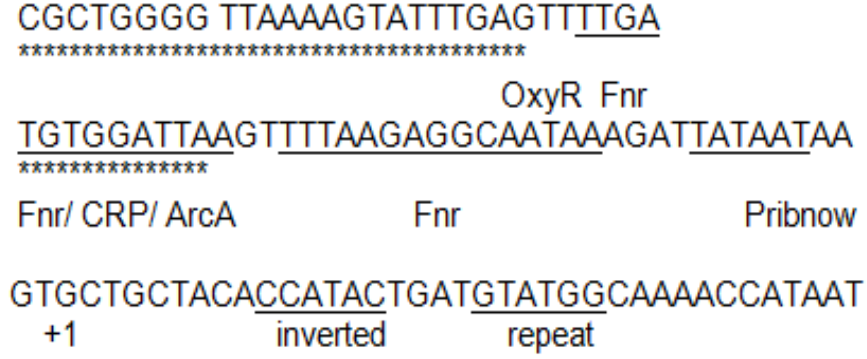


Şekil 2.2: *Vgb* içeren *E. coli* TS4 suşuna ait hücre homojenatında VHb'nin ditiyonit ile indirgenmesi sonucu oluşan absorpsiyon spektrumu.

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

Vgb promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru (P_{vgb}) oksijene duyarlı bir promotordur. Promotorun oksijene duyarlılığı üzerinde taşıdığı ve global düzenleyici proteinlere, yani Fnr ve ArcA ve OxyR proteinlerine özgü dizilerden kaynaklanır [Yang et al., 2005] (Şekil 2.8). *E. coli*'de *vgb* promotoru mikroaerobik koşullar altında (% 2 den daha az çözünmüş oksijen seviyelerinde) maksimum düzeyde indüklenirken [Kroneck et al., 1991]. *E. aerogenes*'de aynı şartlar altında böyle bir indüklenme olmadığı belirlenmiştir [Hart et al., 1994]. Bu da *E. coli* ve *E. aerogenes* gibi iki birbirine yakın enterik bakteride bu genin farklı düzenlendiğini ve farklı düzenleyici mekanizmaların kullanıldığını ifade etmektedir. Ayrıca Fnr bakımından mutant *E. coli* hücrelerinin

mikroaerobik koşullar altında *vgb* promotorunu aktive edemedikleri belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Diğer çalışmalarda da *vgb*'nin oksijene duyarlı promotor aktivitesinin olduğunu ve genin proteininin, yani VHb'nin, ifadesinin Fnr tarafından sağlandığı gösterilmiştir [Kiley and Reznikoff, 1991].



Şekil 2.3: *vgb* promotor bölgesi. Yıldızla işaretlenmiş bölgeler OxyR, altı çizili bölgeler Fnr bağlanma bölgeleri.

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

Yapılan başka bir çalışmada ise *vgb* klonlanmış *Burkholderia sp.*'de dinitrotoluen yıkımında artış sağladığı bildirilmiştir [Patel et al., 2000]. *Vgb* klonlanmış bakterilerde rekombinant protein sentezi artmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda *vgb*'nin mayalarda antibiyotik ve etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise *vgb*'nin bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin bütandiol ve asetoin üretimini arttırdığını gösterilmiştir [Brünker et al., 1998].

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerinden disodyum EDTA, çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kalsiyum klorür (CaCl_2), manganez klorür (MnCl_2), demir sülfat (FeSO_4), bakır klorür (CuCl_2), kobalt klorür (CoCl_2), tiamin (vitamin B_1), sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), NaCl , HCl , laktoz, D(+)-ksiloz, agar, pepton, maya özütü, asetonitril, alfa naftol, etanol, streptomisin sülfat, ampicilin sodyum ve gentamisin sülfat antibiyotikleri Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edildi. Etanol ölçümü için kullanılan EnzyChrom Etanol Assay Kit, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya'dan, laktoz ölçümünde kullanılan ince tabaka kromatografisi plakaları ise, Whatman, TLC Plates Partisil[®] K5, Maidstone, İngiltere'den temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında hücrelerin büyüme süreci için, Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya ve Edmund Bühler GmbH (çalkalamalı), TH15, Hechingen, Almanya inkübatörleri kullanıldı. Hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (Optik Density; OD) Bio-Rad, SmartSpec[™] 3000, Philadelphia, A.B.D. spektrofotometresi ile ölçüldü. Peynir altı suyu proteinlerini çöktürmek amacıyla Beckman Coulter, Allegra[™] 25R Centrifuge, Almanya ve hücreleri çöktürmede ise Labogene, Scanspeed 1580R, Lynge, Danimarka santrifüjleri kullanıldı. pH değerleri, Hanna Instruments, pH 211 Micropr^o Cessor, Michigan, A.B.D. ile belirlendi. Hemoglobin ekstraksiyonu amacıyla hücrelerin parçalanması için Branson Ultrasonic Corporation, Branson Digital Sonifier 250, Danbury, A.B.D. kullanıldı. Hemoglobin ölçümü ise Shimadzu, UV-3600 UV-VIS NIR, Kyoto, Japonya UV spektroskopisi ile ölçüldü. Besiyerinde kalan laktoz miktarları TLC görüntüleme densitometresi Bio-Rad, GS 670, Philadelphia, A.B.D. kullanılarak ölçüldü. Sarf malzemeleri ve peynir

altı suyu ise deneylerden önce Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya otoklavı kullanılarak steril edildi.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

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

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

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

Bu tez çalışmasında, *vgb*⁻ *E. coli* FBR5 suşu ve *vgb*⁺ rekombinant *E. coli* suşları (TS3 ve TS4) VHb'nin etanol üretimindeki etkilerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılan bu rekombinant suşlar farklı oksijen koşullarında (aerobik ve mikroaerobik), saf şeker olarak laktozu (% 4 w/v) içeren kontrol besiyerinde ve peynir altı suyunda (laktoz % 4 w/v) üretilerek, hücrelerin üreme özellikleri, etanol üretimleri ve VHb ekspresyon seviyeleri incelendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Peynir Altı Suyunun Hazırlanması

Çalışma boyunca büyüme ve üretim ortamı olarak İzpey Süt Ürünleri'nden (Kütahya) temin edilen ekşi peynir altı suyu kullanıldı.

Peynir altı suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri, GYTE Çevre Mühendisliği laboratuvarında analiz edilerek belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Peynir altı suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Ölçüm Kriterleri	Sonuçlar
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	69.168 mg/L
Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ)	16 mg/L
Askıda katı madde	4023 mg/L
pH	4.46
Sülfat	6.04 mS/cm

Peynir altı suyu minimal besiyerinin hazırlanması;

- Peynir altı suyu, süt proteinlerinin çöktürülmesi amacıyla 121 °C sıcaklıkta 20 dakika otoklavlandı. Kaba filtre yardımıyla denatüre proteinlerin ayrılması sağlandı.
- 1L peynir altı suyuna 5g/L maya özütü ilave edildi. Peynir altı suyunun pH değeri NaOH yardımıyla pH 7.0 ye ayarlanarak, peynir altı suyu 121 °C sıcaklıkta 20 dakika tekrar otoklavlandı.
- Otoklavdan çıkan peynir altı suyu soğutuldu ve steril bir şekilde + 4 °C'de 10000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar alınarak peynir altı suyu besiyeri olarak bakteri soylarının kullanımına hazır hale getirildi.

3.2.2. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Peynir altı suyu (PAS) içeren kültür besiyeri; Laktoz içeriği % 4 (w/v) llen, bakteri soylarının kullanabilmesi için bir takım işlemlerden geçmiş olan peynir altı suyunun bir litresine 5ml/L iz element solüsyonu (Tablo 3.3), 1 ug/L tiamin ve uygun antibiyotikler belirtilen oranlarda (Tablo 3.4) farklı rekombinant suşlar için olmak üzere ayrı ayrı hazırlanan besiyerine ilave edildi [Guaimaraes et al., 1992].

Laktoz içeren kontrol besiyeri (LK) (laktoz; % 4, w/v); 1L distile suya 40 g laktoz, 5g/L maya özütü ilave edildi. pH NaOH yardımıyla 7.0'ye ayarlandı. Hazırlanan laktoz besiyeri 121°C sıcaklıkta 20 dakika otoklavda steril edildi. Hazırlanan laktoz besiyerine 5ml/L iz element solüsyonu (Tablo 3.3), 1 ug/L tiamin ve uygun antibiyotikler belirtilen oranlarda (Tablo 3.4) farklı rekombinant suşlar için ayrı ayrı hazırlanan besiyerine ilave edildi.

Tablo 3.3: İz element solüsyonu içeriği (100X).

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

Tablo 3.4 : Kültür ortamlarına eklenen antibiyotik miktarları.

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

3.2.3. Stok Kùltürlerin Hazırlanması ve Muhafazası

Litrede 12.5 g pepton, 6.25 g maya özütü, 6.25 g NaCl, 18.75 g agar içeren LB agar ortamı (pH 7.0) hazırlandı. % 40'lık (w/v) ksiloz çözeltisi ise distile su ile hazırlanarak otoklavda ayrı olarak steril edildi. Steril edildikten sonra ılınması beklenen ksiloz çözeltisi son konsantrasyon % 8 (w/w) olacak şekilde, Luria Bertani besiyerine eklendi. Hazırlanan besi ortamı 50 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra uygun oranlarda ilgili rekombinant soylar için farklı antibiyotikler ilave edilerek petrilere döküldü (Tablo 3.4).

Petri kaplarındaki ksiloz içeren LB (LBK) agar besiyerlerine öze yardımıyla hücreler inoküle edilerek, bir gece 37 °C sıcaklıkta büyümeleri için bir inkübatörde inkübe edildi. Katı besi ortamına ekilen bakteri soyları, her hafta pasajlanarak bakteri soylarının aktif kalmaları sağlandı.

3.2.4. Önkùltürlerin Hazırlanması

FBR5, TS3 ve TS4 suşları, % 4 (w/v) laktoz içeren kontrol besiyeri veya peynir altı suyu içeren Tablo 3.4'te belirtilen uygun antibiyotikleri, Tablo 3.3'te belirtilen iz element solüsyonu ve 1 ug/L tiamin içerecek şekilde hazırlanan kùltür besiyerlerinin 5 ml'sine (50 ml'lik erlenlerde) 2 veya 3 koloni inoküle edilerek, bir gece boyunca, 37 °C sıcaklıkta, 180 rpm hızında çalkalamalı bir inkübatörde büyütölerek hazırlandı.

3.2.5. Aerobik Koşullar

Hazırlanan bir gecelik ön kùltürlerden 100 ml besiyerine 300 µl ilave edilecek şekilde ($OD_{600} \sim 0.04$) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml (küçük hacim) ya da 1 litrelik erlenler içerisinde 200 ml (büyük hacim), PAS veya LK besiyerlerine inoküle edildi. Kùltür ortamlarının 180 rpm hızda, 37 °C sıcaklıkta, 48 saat süre ile çalkalanarak inkübasyonu sağlandı.

3.2.6. Mikroaerobik Koşullar

Hazırlanan bir gecelik ön kültürlerden yaklaşık 100 ml besiyerine 300 µl ilave edilecek şekilde ($OD_{600} \sim 0.04$) 100 ml besiyerine 80 ml (küçük hacim) ya da 1 litrelik erlen içerisinde 800 ml (büyük hacim), PAS ve LK besiyerlerine inoküle edildi. Erlenlerin ucu kauçuk tıplar ile kapatıldı ve 22-kalibre iğne ile delinerek gaz çıkışı sağlandı. Kültür ortamlarının 180 rpm hızda, 37 °C sıcaklıkta 48 saat süre ile çalkalanarak inkübasyonu sağlandı.

İnkübasyon sonrası 48 saatlik kültürlerin pH değerleri, OD_{600} değerleri, etanol-g/100 ml (% w/v), etanol-ml/100 ml (% v/v) ölçümleri, VHb miktarları (nmol/g) ve kültür ortamında kalan laktoz miktarları (% w/v) belirlendi.

3.2.7. Kültürlerin pH Değerlerinin Belirlenmesi

Peynir altı suyu veya laktoz ile farklı havalandırma koşullarında 48 saat süre ile inkübe edilen kültürlerin pH değerleri, bir pH metre kullanılarak belirlendi.

3.2.8. Toplam Hücre Sayısının (Biyokütle) Belirlenmesi

Laktoz veya peynir altı suyu ile gerçekleştirilen farklı havalandırma koşullarındaki 48 saat süren inkübasyon sonundaki hücre sayımları kültürlerin A_{600} nm'deki optik yoğunlukları steril özgül besiyeri ile seyreltilerek spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Ölçümler sırasında spektrofotometre cihazına kör olarak özgül besiyeri okutuldu.

3.2.9. Fermentasyon Ortamındaki Biyoetanol Miktarının Ölçümü

Farklı havalandırma koşullarında laktoz veya peynir altı suyu ile 48 saat süren inkübasyon sonundaki fermentasyon ortamında oluşan etanol miktarının belirlenmesi için hücre kültürleri bir santrifüjlenerek ile 4000 rpm de 4 °C sıcaklıkta 15 dakika çöktürüldü, üst sıvıları alındı ve mikrofüj tüplerine aktarıldı.

Farklı koşullarda üretilen kültürlerin içerdikleri biyoetanol miktarı (% w/v; % v/v) EnzyChrom Etanol Assay Kit ile ölçülerek belirlendi. Kitin prensibi; etanolun NAD ile alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla asetaldehite oksitlenmesine, bu

oluşan asetaldehitin de aldehit dehidrogenazla asetik aside oksitlenmesine ve böylece oluşan NADH'nin 340 nm'de oluşturduğu absorbans farkının ölçülmesine dayanmaktadır.

3.2.10. Besiyerinde Kalan Laktoz Miktarının Ölçümü

Laktoz ve peynir altı suyu kaynağı olarak şeker kaynağı olarak kullanıldığı ve farklı havalandırma koşullarında 48 saat süre boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonunda kültür ortamında kalan laktoz miktarının ölçülmesi için ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) kullanıldı. Bunun için laktoz içeriği 0.5, 1, 2, 3 ve 4 mg/ml (w/v) olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Örnekler standartların dışına çıkmaması için uygun oranlarda seyreltildi.

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

Besiyerinde kalan laktoz miktarları, TLC görüntüleme densitometresinde taratılarak hacim hesaplamaları yapıldı. R² değeri 0.920 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edildi.

3.2.11. Rekombinant Soylardaki Hemoglobin Ekspresyonunun Ölçümü

Yapılan denemelerde kullanılan *vgb* içeren rekombinant organizmaların (TS3 ve TS4) ürettikleri VHb miktarı, UV-3600 Shimadzu UV-VIS NIR spektrometre vasıtasıyla, ditiyonit (sodyum hidrosülfid) eklenerek indirgenmiş-indirgenmemiş fark spektrumunu ölçülerek belirlendi [Webster ve Liu, 1974]. Bunun için PAS veya LK besiyerlerinde farklı havalandırma koşullarında 48 saat süren inkübasyon sonunda üretilen hücre kültürleri 4000 rpm hızda 4 °C sıcaklıkta 20 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Daha sonra pelletlerin yaş ağırlıkları

belirlendi ve -20 °C sıcaklıkta en az bir gece boyunca muhafaza edildi. Daha sonra 30 ng/ml olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5) ile sulandırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonları bir sonikatör yardımı ile buz içerisinde 20 saniyelik vurma ve 10 saniyelik bekleme süreleri ile toplamda 3 dakika boyunca 6 kez sonike edildi.

Elde edilen hücre homojenatları 4 °C sıcaklıkta 4000 rpm hızda 20 dakika süre ile santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R, Lynge, Danimarka) edildi. Üst sıvılar VHb miktarı tayini için ayrıldı. Kör olarak sodyum ditiyonit ile muamele edilmeyen üst sıvılar kullanıldı. Ölçümler 400-500 nm aralığında yapıldı. VHb'nin sodyum ditiyonitle indirgendiğinde karakteristik olarak verdiği 416 ve 430 nm dalga boyları arasındaki fark spektrumundan ($\Delta\epsilon = 34 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) VHb miktarı nmol/g olarak hesaplandı.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2007 6.0 programı ile yapıldı. *P* değerleri tek kuyruklu *t*-testi ile VHb'nin etanol üretimini arttırabileceği hipotezine dayanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Peynir Altı Suyu ile Hazırlanan Besiyerlerindeki Etanol Üretimleri

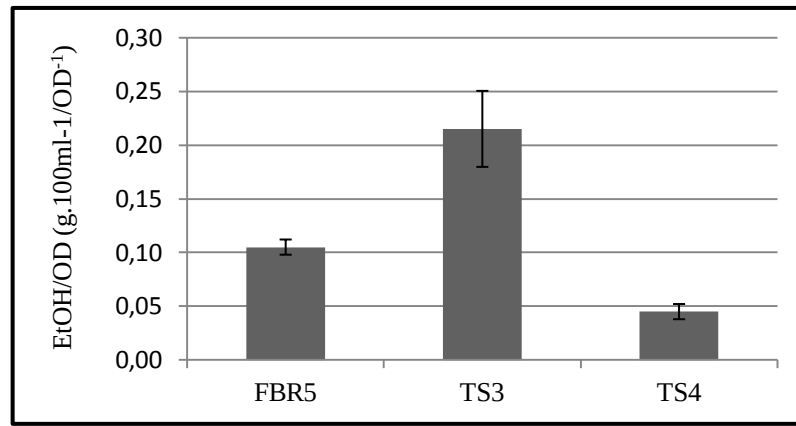
4.1.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değeri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren peynir altı suyu (PAS) besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAS besiyerinde, aerobik koşulda büyütölen kùltürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değeri, en fazla FBR5 suşu ile olacak şekilde, önemli azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v), TS3 suşu, FBR5 suşuna göre % 233 daha fazla ($p = 0.03$) etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu % 100 ($p = 0.06$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 271 nmol/g ($p = 0.05$) olduğu göröldü (Şekil 4.3). Kùltür ortamında bulunan laktozun, üremenin 48. saati sonunda, TS3 suşu ile tamamının, TS4 suşu ile yaklaşık % 57'sinin ve FBR5 suşu ile yaklaşık % 52'sinin tüketildiği saptandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonundaki pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Laktoz (% w/v)
FBR5	4.97 (0.04)	4.23 (0.32)	0.45 (0.01)	0.57 (0.01)	1.91 (0.23)
TS3	7.71 (0.88)	6.76 (0.51)	1.50 (0.11)	1.90 (0.14)	0.00 (0.00)
TS4	5.99 (1.33)	3.05 (1.48)	0.14 (0.04)	0.19 (0.06)	1.73 (0.12)



Şekil 4.1: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata ubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.1.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

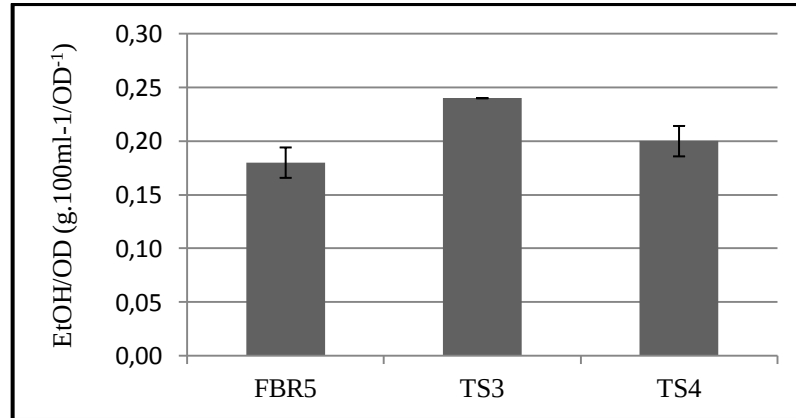
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyeri (pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAS besiyerinde, mikroaerobik koşulda bytlen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla FBR5 suşu olacak şekilde, azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu

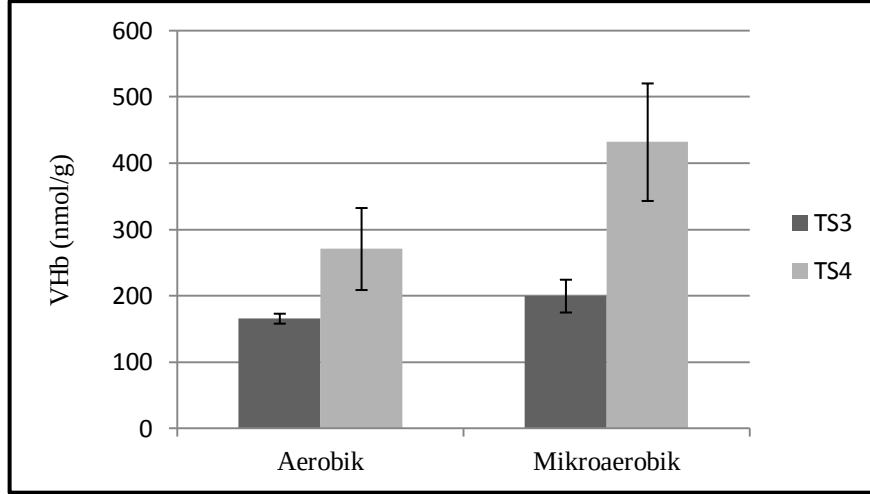
görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v), TS3 suşu, FBR5 suşuna göre % 188 (p = 0.04), TS4 suşu, FBR5 suşuna göre % 20 (p = 0.05), daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 33 (p = 0.05), TS4 suşu ile ise % 11 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.2). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 433 nmol/g (p = 0.05) olarak saptandı (Şekil 4.3). Kültür ortamında bulunan laktozun, üremenin 48. saati sonunda TS3 suşu ile tamamının, FBR5 suşu ile yaklaşık % 48'inin ve TS4 suşu ile yaklaşık % 87'sinin tüketildiği belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Laktoz (% w/v)
FBR5	5.22 (0.29)	2.03 (0.04)	0.38 (0.03)	0.49 (0.04)	2.09 (0.16)
TS3	6.13 (0.04)	4.53 (0.46)	1.11 (0.11)	1.41 (0.13)	0.00 (0.00)
TS4	5.51 (0.12)	2.26 (0.06)	0.46 (0.02)	0.59 (0.02)	0.54 (0.11)



Şekil 4.2: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.3: PAS besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

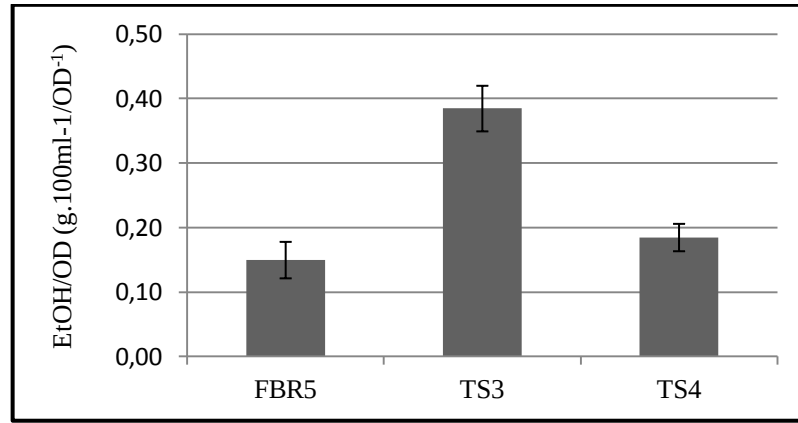
4.1.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAS besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla PTS4 suşu olacak şekilde, önemli azalmalar ($p > 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile, % 413 ($p = 0.01$), TS4 suşu ile ise, % 48 ($p = 0.08$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 160 ($p = 0.06$), TS4 suşu ile ise % 26 ($p = 0.05$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.4). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 622 nmol/g ($p = 0.004$) olduğu görüldü (Şekil 4.6). Kültür ortamında bulunan laktozun, üremenin 48. saati sonunda, TS3 suşu ile tamamının, FBR5 suşu ile yaklaşık % 63'ünün, TS4 suşu ile ise yaklaşık % 68'inin tükendiği belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH		OD (600 nm)		EtOH (g/100 ml)		EtOH (% v/v)		Laktoz (% w/v)	
FBR5	5.22	(0.12)	2.77	(0.52)	0.50	(0.09)	0.54	(0.01)	1.49	(0.15)
TS3	6.43	(0.43)	5.30	(0.71)	2.18	(0.06)	2.77	(0.08)	0.00	(0.00)
TS4	5.46	(0.38)	3.29	(0.76)	0.62	(0.08)	0.80	(0.08)	1.30	(0.04)



Şekil 4.4: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata ubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.1.4 Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

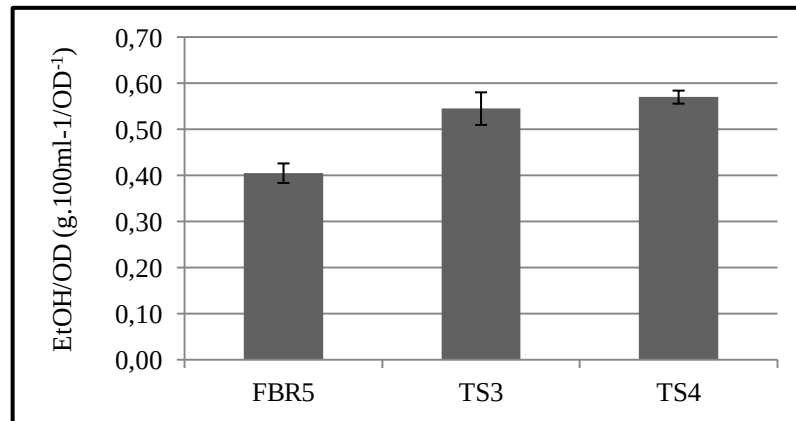
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyeri (pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren PAS besiyerinde, mikroaerobik koşulda bytlen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, yine benzer olarak en

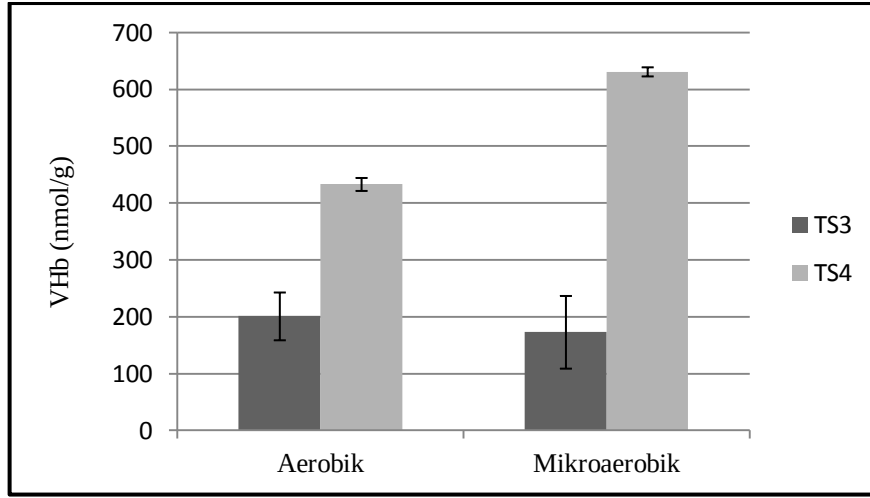
fazla TS4 suşu olacak şekilde, önemli azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşu ile en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 171 ($p = 0.02$) ve TS4 suşu ile % 38 ($p = 0.02$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 34 ($p = 0.05$), TS4 suşu ile % 39 ($p = 0.01$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.5). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 508 nmol/g ($p = 0.004$) olduğu görüldü (Şekil 4.6). Kültür ortamında bulunan laktozun, üremenin 48. saati sonunda, TS3 suşu ile tamamen tükenirken, FBR5 suşu ile yaklaşık % 72’sinin, TS4 suşu ile yaklaşık % 84’ünün tüketildiği tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren PAS besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Laktoz (% w/v)
FBR5	5.42 (0.06)	2.00 (0.14)	0.81 (0.01)	1.04 (0.02)	1.14 (0.14)
TS3	5.64 (0.03)	4.04 (0.06)	2.22 (0.10)	2.82 (0.12)	0.00 (0.00)
TS4	5.33 (0.18)	1.98 (0.04)	1.13 (0.06)	1.44 (0.07)	0.65 (0.18)



Şekil 4.5: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, PAS besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}^{-1}$). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.6: PAS besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.2. Laktoz İçeren Kontrol Besiyerindeki Etanol Üretimleri

4.2.1. Küçük Hacimli-Aerobik Kültürler

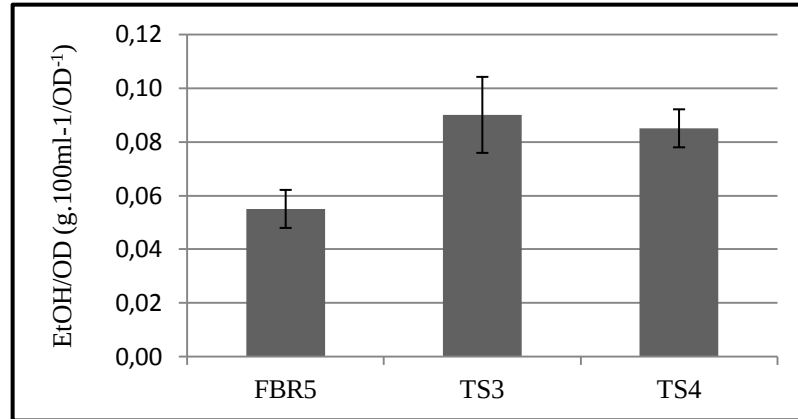
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 20 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz kontrol (LK) besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LK besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla TS4 suşu ile olacak şekilde, önemli azalmalar ($p > 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS4 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 112 ($p = 0.04$), TS4 suşu ile ise % 162 ($p = 0.02$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.5). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu (p

= 0.05) ve TS4 suşu ($p = 0.10$) ile % 50 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.7). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 80 nmol/g ($p = 0.03$) olduğu görüldü (Şekil 4.9). Peynir altı suyu ortamından farklı olarak, LK besiyerinde laktoz kullanımının düşük miktarlarda ve farklı koşullarda benzer şekilde gerçekleştiği görüldü. Kültür ortamında üremenin 48. saati sonunda ortamdaki laktozun, FBR5 suşu ile % 15'inin, TS3 suşu ile % 23'ünün, TS4 suşu ile % 28'sinin tüketildiği görüldü (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Laktoz (% w/v)
FBR5	6.14 (0.11)	1.02 (0.03)	0.06 (0.01)	0.08 (0.01)	3.41 (0.01)
TS3	6.19 (0.54)	1.33 (0.17)	0.13 (0.01)	0.17 (0.01)	3.08 (0.04)
TS4	5.94 (0.08)	1.74 (0.06)	0.16 (0.01)	0.21 (0.01)	2.88 (0.04)



Şekil 4.7: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

4.2.2. Küçük Hacimli-Mikroaerobik Kültürler

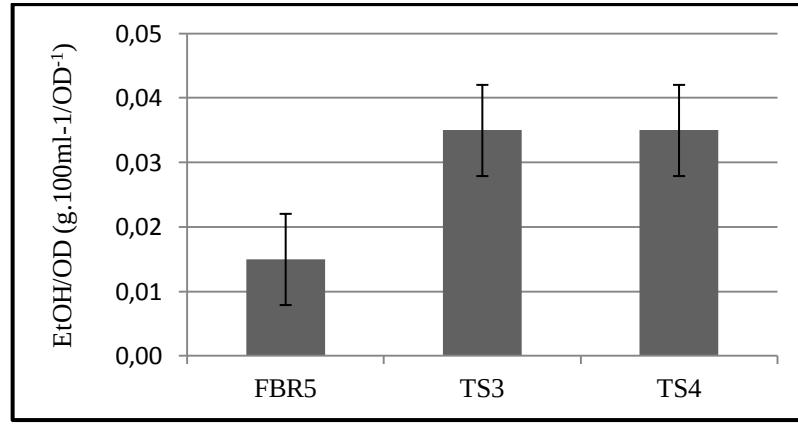
FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde

kalan laktoz miktarları (% w/v) 100 ml'lik erlenler içerisinde 80 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyeri (pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

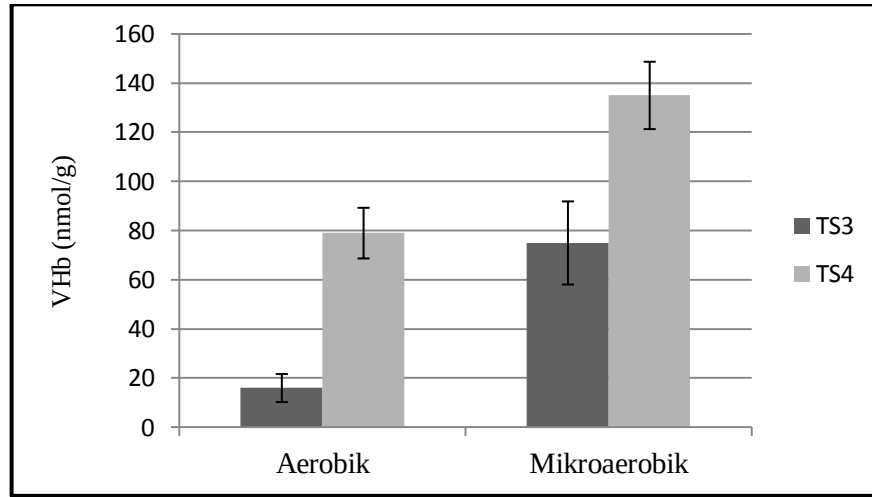
Uygun antibiyotikleri içeren LK besiyerinde, mikroaerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla PTS4 suşu ile olacak şekilde, önemli azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, FBR5 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v), TS3 suşu, FBR5 suşuna göre % 75 ($p = 0.03$), TS4 suşu ile ise FBR5 suşuna göre % 25 ($p = 0.03$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.6). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ($p = 0.00$) ve TS4 suşu ($p = 0.00$) ile % 100 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.8). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 137 nmol/g ($p = 0.02$) olduğu görüldü (Şekil 4.9). Kültür ortamında üremenin 48. saati sonunda ortamdaki laktozun, FBR5 suşu ile yaklaşık % 11'inin, TS3 suşu ile % 18'inin, TS4 suşu ile yaklaşık % 8'inin tükendiği görüldü (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde, 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH		OD (600 nm)		EtOH (g/100 ml)		EtOH (% v/v)		Laktoz (% w/v)	
FBR5	5.31	(0.81)	1.30	(0.28)	0.03	(0.01)	0.04	(0.00)	3.57	(0.04)
TS3	5.19	(0.83)	1.26	(0.11)	0.05	(0.00)	0.07	(0.01)	3.27	(0.04)
TS4	5.14	(0.80)	1.01	(0.01)	0.04	(0.01)	0.05	(0.01)	3.66	(0.06)



Şekil 4.8: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.9: LK besiyerinde, küçük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

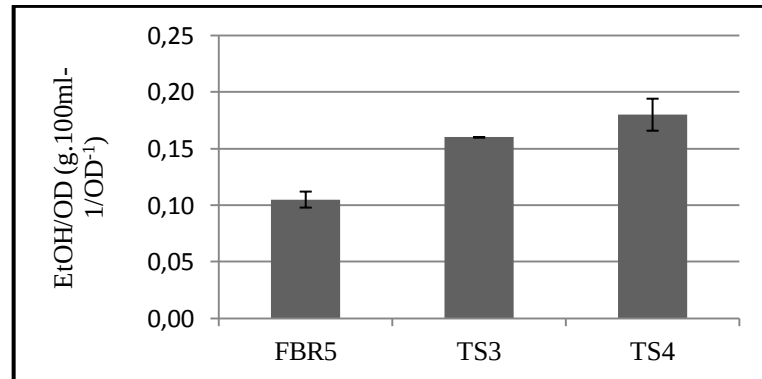
4.2.3. Büyük Hacimli-Aerobik Kültürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değerleri, hücre yoğunlukları (OD₆₀₀), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 200 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) LK besiyeri (pH 7.0) ile aerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

Uygun antibiyotikleri içeren LK besiyerinde, aerobik koşulda büyütülen kültürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değerlerinde, en fazla TS3 suşu ile olacak şekilde, bütün suşlarda önemli azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD 600 nm’de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 43 ($p = 0.10$), TS4 suşu ile ise, % 24 ($p = 0.06$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.7). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}^{-1}$) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 45 ($p = 0.03$), TS4 suşu ile % 64 ($p = 0.06$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.10). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 30 nmol/g ($p = 0.03$) olduğu görüldü (Şekil 4.12). Kültür ortamında üremenin 48. saati sonunda ortamdaki laktozun, FBR5 suşu ile yaklaşık % 25’inin, TS3 suşu ile % 36’sının, TS4 suşu ile yaklaşık % 30’unun tükendiği görüldü (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Aerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD (600 nm), etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH	OD (600 nm)	EtOH (g/100 ml)	EtOH (% v/v)	Laktoz (% w/v)
FBR5	6.16 (0.37)	1.45 (0.07)	0.16 (0.01)	0.21 (0.02)	3.00 (0.13)
TS3	5.24 (0.62)	1.50 (0.01)	0.25 (0.01)	0.30 (0.02)	2.53 (0.06)
TS4	5.29 (0.60)	1.11 (0.01)	0.20 (0.01)	0.26 (0.01)	2.79 (0.01)



Şekil 4.10: Aerobik, antibiyotikli koşullarda, LK besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($\text{g etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / \text{OD}^{-1}$). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

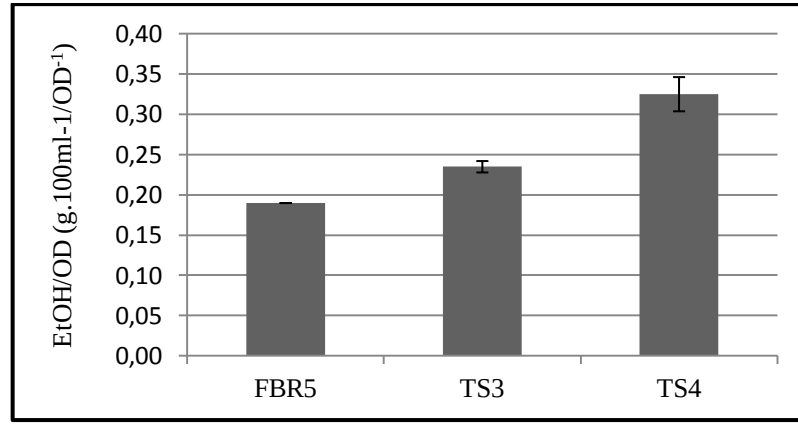
4.2.4. Büyük Hacimli-Mikroaerobik Kùltürler

FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının pH değeri, hücre yoğunlukları (OD_{600}), etanol üretimleri (% w/v; % v/v), VHb ekspresyonları (nmol/g yaş ağırlık) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v) 1000 ml'lik erlenler içerisinde 800 ml olacak şekilde hazırlanan, % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyeri (pH 7.0) ile mikroaerobik olarak, uygun antibiyotikleri içeren koşullarda, 180 rpm çalkalama hızında, 37 °C sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendi.

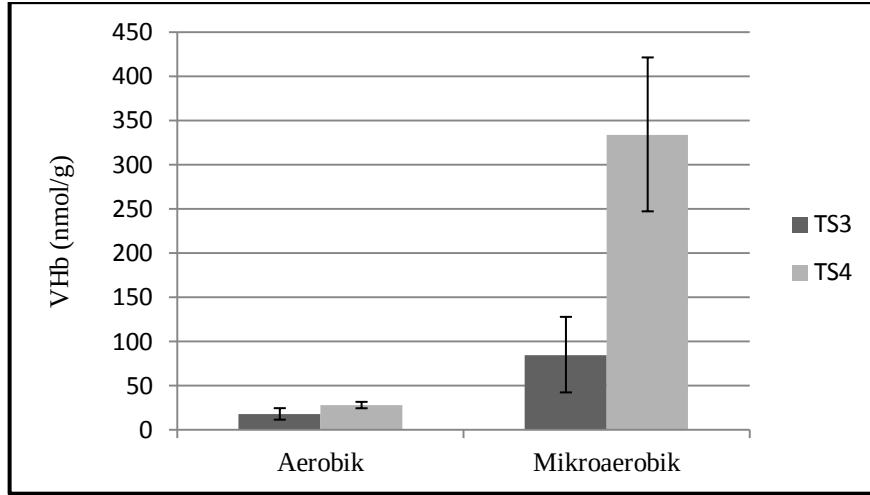
Uygun antibiyotikleri içeren LK besiyerinde, mikroaerobik koşulda büyütölen kùltürlerde, üremenin 48. saati sonundaki pH değeri, en fazla PTS4 suşu olacak şekilde, önemli azalmalar ($p < 0.05$) belirlendi. Toplam hücre sayımları için, OD_{600} nm'de yapılan ölçüm sonuçlarında, TS3 suşunun en yüksek değere sahip olduğu göröldü. Etanol üretimi açısından (% w/v; % v/v) FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 43 ($p = 0.01$), TS4 suşu ile ise, % 80 ($p = 0.01$) daha fazla etanol üretiminin olduğu gözlemlendi (Tablo 4.8). Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin ($g \text{ etanol} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ besiyeri} / OD^{-1}$) yine FBR5 suşuna göre, TS3 suşu ile % 74 ($p = 0.04$) ve TS4 suşu ile % 58 ($p = 0.04$) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.11). VHb ekspresyonunun (nmol/g yaş ağırlık) ise en fazla TS4 suşu ile 334 nmol/g ($p = 0.06$) olduğu göröldü (Şekil 4.12). Kùltür ortamında üremenin 48. saati sonunda ortamdaki laktozun, FBR5 suşu ile ve TS4 suşu ile yaklaşık % 32'sinin, TS4 suşu ile yaklaşık % 37'sinin tükendiği olduğu göröldü (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda FBR5, TS3 ve TS4 suşlarının % 4 (w/v) laktoz içeren LK besiyerinde 48. saat sonunda pH, OD_{600} nm, etanol (% w/v; % v/v) ve besiyerinde kalan laktoz miktarları (% w/v). Her değeri iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değeri standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

Suşlar	pH		OD (600 nm)		EtOH (g/100 ml)		EtOH (% v/v)		Laktoz (% w/v)	
FBR5	4.85	(0.08)	1.17	(0.11)	0.23	(0.02)	0.30	(0.02)	2.71	(0.04)
TS3	5.51	(0.01)	1.41	(0.05)	0.34	(0.01)	0.43	(0.02)	2.71	(0.30)
TS4	5.38	(0.11)	1.26	(0.06)	0.42	(0.01)	0.54	(0.01)	2.52	(0.06)



Şekil 4.11: Mikroaerobik, antibiyotikli koşullarda, Laktoz besiyerinde, her ünite hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 ml⁻¹ besiyeri / OD⁻¹). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.



Şekil 4.12: LK Besiyerinde, büyük hacimde farklı koşullarda büyütülen kültürlerin VHb ekspresyon değerleri (nmol/g yaş ağırlık). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (δ_{n-1}) göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE YORUMLAR

Bu tez kapsamında, *E. coli* suşları (NZN111 ve FBR5) ve bu suşlardan *pdc*, *adhb* ve *vgb* içerecek şekilde geliştirilen TS3 ve TS4 suşlarının farklı havalandırma koşullarında, peynir altı suyu (PAS) ve laktoz kontrol (LK) besiyerleri ile hazırlanan, uygun antibiyotikleri içeren besiyerlerindeki biyoetanol ve hemogloblin üretim özellikleri incelendi.

Bu çalışmada, VHb ekspresyonunun, aerobik ve mikroaerobik koşullarda, PAS içeren (laktoz; % 4 w/v) veya LK (laktoz; % 4, w/v) besiyerlerinde, hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin artmasına neden olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre, en fazla etanol üretimi, büyük ölçekli PAS içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren mikroaerobik inkübasyon sonunda, FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 171 (2.22 g/100ml) ve TS4 suşu ile % 38 (1.13 g/100ml) daha fazla olacak şekilde sağlanmıştır. Benzer şekilde büyük ölçekli PAS içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren aerobik inkübasyon sonunda, FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 413 (2.18 g/100ml) daha fazla olacak şekilde sağlanmıştır. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi için ise en yüksek değerler, büyük ölçekli PAS içeren antibiyotikli ortamlarda, 48 saat süren aerobik inkübasyonun sonunda, yine FBR5 suşu ile elde edilenden, TS3 suşu ile % 160 ve TS4 suşu ile % 27 daha fazla olarak belirlenmiştir.

LK besiyerinde, mikroaerobik koşullarda, uygun antibiyotikleri içeren büyük ölçekli ortamlarda, 48 saatlik inkübasyon sonunda, en fazla etanol üretiminin, FBR5 suşuna göre, TS4 suşu ile % 43 (0.43 g/100ml), TS3 suşu ile % 80 (0.54 g/100ml) daha fazla olacak şekilde belirlenmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimi için ise en yüksek değerler, mikroaerobik koşullarda, antibiyotik içeren, küçük ölçekli LK besiyerinde, TS3 ve TS4 suşlarının her ikisi ile % 100 daha fazla olarak elde edilmiştir.

Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada *E. coli* FBR5, TS3 ve TS4 suşları kullanılmış ve mikroaerobik koşullarda, % 8 (w/v) glukoz veya ksiloz ya da % 20 mısır hidrolizatı içeren LB besiyerinde üretilen kültürlerde, düşük seviyelerde VHb ekspresyonu yapan TS3 suşunun, FBR5 suşundan daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, VHb ekspresyonunun ksilozdan etanol

üretimini arttırdığı, glukozdan ise az miktarda arttırabildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, VHB ekspresyonunun glukoz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde, küçük ölçekli ortamda % 30, ksiloz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde % 119 ve mısır hidrolizatı (% 20, w/v) içeren LB besiyerinde % 59 oranında etanol üretimini arttırdığını belirlemişlerdir. Çalışmanın devamında, 2 litrelik fermentörlerde, glukoz (% 8, w/v) içeren LB besiyerinde denemelerde, TS3 suşunun % 10 daha fazla etanol ürettiğini tespit etmişlerdir.

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

Bu tez çalışmasında yukarıdaki çalışmalarda kullanılan şekerlerden farklı olarak, uygun antibiyotikleri ve laktoz içeren PAS ve LK besiyeri kullanılmış, FBR5, TS3 ve TS4 suşları ile etanol ve hemoglobin üretim özellikleri incelenmiştir. Etanol üretimi, PAS besiyerinde hem aerobik ve mikroaerobik koşullarda hem de büyük ve küçük ölçeklerde en fazla TS3 suşu ile elde edilmiştir. PAS besiyerinde en yüksek oranda alkol üretimi (%v/v), mikroaerobik büyük ölçekli koşullarda TS3 suşu ile gerçekleşmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına düşen etanol üretiminin ise en fazla, büyük ölçekli aerobik ortamda, TS3 suşu ile % 160 oranında olduğu saptanmıştır. % 4 (w/v) laktoz içeren, laktoz kontrol besiyerinde ise etanol üretimi en fazla TS4 suşu ile büyük ölçekli mikroaerobik ortamda elde edilmiştir. Her ünite hücre biyokütlesi başına düşen etanol üretiminin ise en fazla, küçük ölçekli mikroaerobik ortamda, TS3 ve TS4 suşları ile % 100 oranında olduğu saptanmıştır.

Bir başka çalışmada ise *Z. mobilis*'e ait etanol üretimi için gerekli olan, *pdc* (piruvat dekarboksilaz) ve *adhB* (alkol dehidrogenaz II) genlerinin, bu genleri taşıyan bir plazmit ile *E. coli*'ye aktarımı sağlanmıştır [Ingram et al., 1988]. Bu genlerin *E. coli*'ye transfer edilmesiyle geliştirilen, etanolojenik bir mikroorganizma olan

Escherichia coli K011 suşu ile glukoz, laktoz ve ksiloz şekerlerinden etanol üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir [Alterthum et al., 1989]. Leite ve arkadaşları (2000) rekombinant *Escherichia coli* K011 suşu ile peynir altı suyu ortamına, etanol üretiminin arttırılması için iki farklı nitrojen kaynağı, maya özütü ve bazı iz elementleri ilave ederek etanol üretimini incelemişlerdir. Peynir altı suyu besiyerine, litreye % 0.05'den % 0.5'e kadar dört farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ve en verimli sonuç % 0.5 oranında maya özütü ilave edilmesiyle, 36 saatlik fermentasyon sonucunda alınmıştır. Guaimaraes ve arkadaşları (1992) ise, K011 suşu ile peynir altı suyu içeren LB besiyerinde, iz elementlerin ve tiaminin etanol üretimine arttııcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, litreye % 0.5 maya özütü eklenmiş peynir altı suyu besiyerine, farklı iz element karışımları ve tiamin ekleyerek etanol üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. % 0.5 maya özütü içeren peynir altı suyu besiyerine, iz elementler ve tiamin (1 ug/L) eklenmesiyle etanol üretiminin, sadece maya özütü içeren peynir altı suyu besiyerinde üretilen etanol miktardan daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek alkol üretimini ise besiyerine, iz elementlerden Zn^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} ve tiamin ilavesiyle elde etmişlerdir. Bu verilere dayanarak, bu tez çalışmasında hem PAS besiyerine hem de LK besiyerine litreye % 0.5 maya özütü, karışık iz element solüsyonu (5 ml/L) (Çizelge 3.3.) ve tiamin (1ug/L) eklenmiştir.

Hem aerobik hem mikroaerobik koşullarda, genel olarak TS3 suşlarındaki VHB ekspresyonu seviyeleri TS4 suşundakinden daha düşük bulunmuştur. TS3 suşunda bulunan pTS3 plazmidi, TS4 suşunda bulunan pTS4 plazmidinden daha düşük kopya sayısına sahip olduğundan, VHB ekspresyonları arasındaki bu farkın nedeninin gen doz etkisi olabileceği düşünülmüştür. Önceki çalışmalarda *E.coli*'de VHB ekspresyonunun mikroaerobik koşullarda etanol üretimini azalttığı belirlenmiştir [Tsai et al., 1996]. Sanny ve arkadaşlarının (2010) yaptığı başka bir çalışmada ise, % 20 (v/v) mısır hidrolizatı içeren LB besiyerinde yüksek seviyede eksprese olan VHB ile etanol üretimi arasında ters bir orantı belirlenmiştir. Bu verilerle uyumlu bir şekilde, bu tez çalışmasında da, PAS besiyerinde TS3 suşu ile VHB'nin düşük seviyelerdeki ekspresyonu hem etanol miktarını hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini arttırmıştır. Buna karşın, PAS besiyerinde, TS4 suşunda görülen yüksek seviyelerdeki VHB'nin ekspresyonu, genellikle her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda, VHb'nin oksijeni terminal oksidazlara transfer eden bir araç olarak iş gördüğü belirlenmiştir. VHb sitokrom *bo* ubikinol oksidazın 1 nolu alt ünitesine bağlanır, oksijeni transfer eder ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretimini özellikle düşük oksijenli koşullarda sağlar. [Park et al., 2002]. *E. coli*'de VHb eksprese eden suşlar VHb eksprese etmeyen yabancı suşlara göre daha yüksek büyüme oranı ve daha az glukoz tüketim oranı göstermişlerdir ki bu da glikolizisten daha etkin ATP ve NADH oluşumu ile ilişkilidir [Tsai et al., 1995]. VHb'nin, NADH/NAD⁺ ve ATP/ADP oranlarındaki değişiklikleri indükleyici bir rol oynadığı sanılmaktadır. VHb'nin hücre içeriğini daha oksidize bir hale getirdiği ve böylece metabolik yollarda karbon akış şemasını değiştirdiği düşünülmektedir [Dikshit et al., 1992]. VHb ekspresyonunun, *E. coli*'de, mikroaerobik koşulda NADH miktarının azalmasına ve de ATP miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir [Dikshit et al., 1992]. Arnaldos ve arkadaşlarının (2012) TS3 ve FBR5 suşları ile yapmış olduğu bir çalışmada, NAD⁺, NADH ve ATP seviyeleri, VHb'nin etanol üretimi üzerindeki biyokimyasal etkilerinin anlaşılması açısından incelenmiştir. Fermentasyonun erken evrelerinde NADH/NAD⁺ oranı TS3 suşu için FBR5 suşuna göre daha az iken, büyümenin geç evrelerinde bu oranın arttığı görülmüştür [Arnaldos et al., 2012]. Başka bir deyişle, mikroaerobik koşulda, hücreler anaerobikten çok aerobik metabolizmalarını kullanarak daha az karbon kaynağından daha çok enerji üretebilmektedirler [Tsai et al., 1996]. Böylece, *vgb* taşıyan rekombinant hücrelerin geliştirilmesi ile enerjiyi verimli kullanmaları sayesinde, çeşitli karbon kaynaklarından üretilcek metabolitlerin daha yüksek miktarlarda elde edilebilmesi sağlanabilir. Bu tez çalışmasında da, PAS besiyerinde, VHb ekspresyonu ile birlikte, TS3 suşunda, hem etanol miktarının hem de her ünite hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin arttığı ve ortamdaki laktozun 48 saat fermentasyon sonunda tamamen tükendiği belirlenmiştir. LK besiyerinde ise üretilen etanol miktarları VHb ekspresyonu seviyelerinin PAS besiyerine göre çok daha düşük olduğu ve bütün suşların laktozu iyi bir şekilde metabolize edemediği saptanmıştır.

Wu ve arkadaşları (2011), VHb ile β -galaktosidazın *Pichia pastoris*'in sitoplazmasında birlikte ekspresyonun hücrelerin üremesini, canlılığını, solunumunu β -galaktosidaz üretimini arttırdığını göstermişlerdir.

Peynir altı suyu besiyeri içerdiği laktoz oranı ile laktoz kontrol besiyerindeki laktoz miktarları eşit olmasına rağmen, peynir altı suyunun, içerdiği bir takım besleyici bileşenlerden, mineral ve vitaminlerden dolayı, üremeyi, VHb

ekspresyonunun ve böylece etanol üretim etkinliğini arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

Etanol oluşumu her ne kadar fermentatif bir olay ise de, optimum sentezi belli kritik seviyede oksijene gereksinim duymaktadır. Bununla birlikte, VHb ile arttırılmış etanol üretim etkinliği *E.coli* hücrelerinin arttırılmış biyosentetik kapasitesi ile ilgili olabilir. Daha fazla enerji, etkin hücre büyümesi ve diğer metabolik işlemlerin (örneğin metabolik enzimlerin biyosentezi) çoğalmasına neden olarak hücrelerin biyosentetik kapasitelerinin artmasına yol açar. Bu tez çalışmasında da, VHb ekspresyonunun etanol sentez yol izindeki enzimlerin aktivitesini arttırmış olabilir. Ayrıca *E.coli*'de VHb ekspresyonunun ribozom ve tRNA seviyelerini yükselttiği ve böylece hücrelerin biyosentetik kapasitelerini arttırdığı tahmin edilmektedir. *E.coli*'de VHb'nin 308 genin transkripsiyonunu etkilediği belirlenmiştir [Roos et al., 2004]. Böylece VHb hücrenin düşük oksijenli ortamlara uymasını bu koşullarda biyokütle artışı ve artmış VHb düzeyi ile sağladığı tespit edilmiştir [Tsai et al., 1996].

Laktoz, laktaz enzim preparatlarıyla ya da kuvvetli mineral asitlerin etkisiyle glukoz ve galaktoza parçalanabilmektedir. β - galaktosidaz enzimi laktozun enzimatik olarak glukoz ve galaktoza kadar parçalamakta ve mikroorganizma, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Bu tez kapsamında kullanılan *E. coli* suşları, PAS besiyeri ve LK besiyeri içerisindeki laktozu metabolize eden β -galaktosidaz enzimine sahip olduğundan, dışarıdan ilave edilecek laktaz enzimine ihtiyaç duyulmadan fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, peynir altı suyu içerisine fermentasyon öncesi dışarıdan katılacak laktaz enzimi ilavesi ile laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması ve bu elde edilen besiyerinin kullanılması ile biyoetanol üretiminin veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir. Ancak, böyle bir uygulamanın maddi yükü ayrıca değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada, en yüksek etanol üretimi yaklaşık % 2.8 olarak, büyük hacimli PAS içeren ortamlarda, üremenin 48. saati sonunda hem mikroaerobik hem aerobik koşulda belirlenmiştir. VHb ekspresyonunun mikroaerobik ortamlarda indüklendiği bilinmesine rağmen, aerobik ortamlarda da eşit miktarda yüksek etanol değeri elde edilebilmesinin sebebinin fermentasyon ortamının üremenin 48. saatinde aerobikten mikroaerobiğe değişmesi ve VHb ekspresyonunu indüklemesi, böylece etanol üretimini arttırması olabileceği düşünülmektedir.

Teknolojik gelişmeler ve tüketicilerin artan ilgisi ile birlikte atık ürün olmaktan çıkan peynir altı suyunun, bileşiminden kaynaklanan besleyici özellikleriyle birlikte maya özütü, iz element solüsyonu ve tiamin miktarları değiştirilerek biyoetanol üretiminin verimi arttırılabilir.

Bu tez çalışmasında, *E. coli* suşları NZN111 ve FBR5 ve bu suşlardan geliştirilen TS3 ve TS4 suşları kullanılarak, VHb'nin gıda peynir altı suyundan biyoetanol üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Peynir altı suyu içeren ortamda ve farklı havalandırma koşullarında, *vgb*, *pdc* ve *adhb* dizilerine sahip bu rekombinant suşlar ve ürettikleri etanol miktarının belirlenmesi, üreme özelliklerinin incelenmesi ve ürettikleri hemoglobin miktarının ölçülmesi, VHb teknolojisi ile yapılan çalışmalar kapsamında bir ilktir.

Bu çalışmada, aerobik ve mikroaerobik koşullarda, PAS veya LK besiyerlerinin her ikisinde de, küçük hacimli ortamlardan büyük hacimli ortamlara geçişlerin tümünde, hem etanol üretiminin hem de VHb ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Laboratuvar ortamında erlenmayer içinde gerçekleştirilen kültür ortamları, endüstriyel anlamda daha büyük reaktörlerde ve kontrollü ortamlarda gerçekleştiğinde, etanol üretiminin daha yüksek değerlere çıkması beklenmektedir. Böylece yapılan çalışmada elde edilen veriler, fazla maddi yükü olmayan peynir altı suyu ile *vgb*/VHb sisteminin sanayide biyoetanol üretiminde potansiyel olarak kullanılabileceğini ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma ile süt endüstrisi içinde yer alan ve peynir üretiminde ortaya çıkan, kimyasal oksijen ihtiyacı, içerdiği yüksek miktardaki şeker (laktoz) ve protein nedeniyle önemli ölçüde kirliliğe neden olan peynir altı suyu VHb teknolojisi ile değerlendirilebildiği ve çevreye verdiği kirliliğin önemli ölçüde azaltılabildiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abanoz K., (2012), “*Vitreoscilla* Hemoglobini ile Patates İşleme Atık Suyundan Biyoetanol Üretiminin Arttırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Abanoz K., Stark B. C., Akbas M. Y., (2012), “Enhancement of ethanol production from potato processing waste water by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* hemoglobin,” Lett. Appl. Microbiol. 55, 436-443.
- Acaroglu M., Oguz H., Unaldı M., (2004), “Türkiye için Alternatif Bir Yakıt: Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri”, Biyoenerji 2004 Sempozyumu, Ekim, İzmir.
- Alterthum F., Ingram L. O., (1989), “Efficient Ethanol Production from Glucose, Lactose, and Xylose by Recombinant *Escherichia coli*”, Appl. Environ. Microbiol., 55: 1943-1948.
- Aktaş N., (2003), “Akışkan yatak biyofilmreaktörde (AYBR) peynir altı atık suyunun arıtılması ve sistem performansının modellenmesi”, Hacettepe Üniversitesi.
- Arnaldos M., Kunkel S. A., Wang J., Pagilla K. R., Stark B. C., (2012), “*Vitreoscilla* hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth media,” Biomass & Bioenergy 37, 1-8.
- Avcı A., (2004), “Bazı Thermoanaerobacter Suşlarının Etanol Üretim Oranlarının Karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Barth C. A. and Behnke U., (1997), “Nutritional Significance of Whey and Whey Compenents”, Nahrug 41 (1), 2–12.
- Brett C., Waldron K., (1996), “Physiology and biochemistry of plant cells walls”, 2nd ed., Champmn&Hall pres, New York.
- Brünker P., Minas W., Kallio P.T. and Bailey J.E., (1998), “Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vhb) ”, Microbiology., 144, 2441–2448.
- Boerman S.J., Webster D.A., (1982), “Control of heme content in *Vitreoscilla* by oxygen”, J.Gen. Appl. Microbiol., 28, 35-43.
- Bulut B., (2006), “Tarıma Dayalı Alternatif Yakıt Kaynaklarından Biyoetanol ve Türkiye İçin En Uygun Biyoetanol Maddesi Seçimi”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.
- Chen W., Hughes, DE., Bailey JE., (1994), “Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*”, Biotechnol Prog;10:308–13.

De Wit J.N. (1998), "Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products", *Journal of Dairy Science*, Vol.81 (3): 597-608.

Demirci M., Arıcı, M., (1989), "Peyniraltı Suyunun Önemi", *Hasad Dergisi* 5 (4): 26-29.

Demirci M., Şimşek O., (1997), "Süt İşleme Teknolojisi", Hasad Yayıncılık Ltd. Şti. (Ed) İstanbul, Türkiye.

Dien BS., Nichols NN., OBryan PS., Bothast RJ., (2000), "Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocelulosic biomass", *Applied Biochemical Biotechnology* 84:181-196.

Dikshit K.L., Spaulding D., Braun A., Webster D.A., (1989), "Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*", *J. Gen. Microbiol.*, 135, 2601-2610.

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

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

Frey A.D., Farres J., Bollinger C.J., Kallio P.T., (2002), "Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology* 68:4835–4840.

Gardner D., (1989), "New technologies in the conversion of whey to high protein Products, *Modern Dairy*", 68, 15-17.

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

Grassi G., (2000), "Bioethanol-Industrial World Perspectives", *Renewable Energy World*.

Gokalp H.Y., Isık F., (1999), "Peyniraltı Suyu ve Peyniraltı Suyu Tozunun Emülsiyon Özellikleri ve Gıda Sanayiinde Bu Amaçla Kullanımları", *II. Standart Dergisi* 38(455), 61-72.

Guimarães W. V.; Dudgey G. L.; Ingram L. O., (1992), "Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*", *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 41-42.

Hardison R., (1998), "Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different of patterns of gene expression", *J.Exp. Biol.*, 201, 1099-1117.

Hart R. A., Bailey J. E., (1991), "Purification and aqueous two-phase partitioning properties of recombinant *Vitreoscilla* hemoglobin", Enzyme Microb. Technol. 13, 788-795.

Ingram L.O.; Conway T. (1988), "Expression of diferents levels pf ethanologen enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinants strains of *Escherichia coli*", Appl. Environ. Microbiol., 54: 397-404.

IEA, (2004), "Biofuels for Transport: An International Perspective", International Energy Agency.

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

Karaosmanoglu F., (2002), "Türkiye için Çevre Dostu Yenilenebilir Bir Yakıt Adayı: Biyomotorin", Enerji ve Kojenerasyon Dünyası Dergisi, 10, 50-56, İstanbul.

Karaosmanoglu F., (2005), "Biyokökenli Endüstriyel Ürünler-I: Yakıt Alkolü", 3e Dergisi, Sayı 134.

Karaosmanoglu F., (2006), "Biyoyakıt Teknolojisi ve İTÜ araştırmaları", ENKÜS 2006- İTÜ Enerji Çalıştayı ve Sergisi, İstanbul.

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

Kiley P., Reznikoff W. S., (1991), "fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen", J. Bacteriol. 173, 16-22.

Khosla C., Bailey JE., (1988), "The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*", Mol Gen Genet 214:158-61.

Konar A., (1981), "Sütçülük Artıklarının Degerlendirilmesi", Türkiye 4.Sütçülük Kongresi,1-23 s, 9-10 Aralık, Ankara.

Kroneck P. M. H., Jakob W., Webster D. A., DeMaio R., (1991), "Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*", BioMetals, 4(2), 119-125.

Kumar S., Singh N., Prasad R., (2010), "Anhydrous ethanol: A renewable source of energy", Renew. Sust. Energ. Rev., 14, 1830-1844.

Kurt A., (1990), "Süt Teknolojisi", Atatürk Üniversitesi Yayınları No 573, 398.

Kurt A., Gülümser S., (1988), "Peynir suyu ve kullanım imkanları" Gıda dergisi, 2(3), 133-141.

Leite A.R., Guimarães W.V., de Araujo E.F., and Silva D.O. (2000), “Fermentation of Sweet Whey by Recombinant *Escherichia coli* KO11”, Brazilian Journal of Microbiology 31: 212-215.

Liu S. C., Webster D. A., Wei M. L., Stark B. C., (1995), “Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhanced degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*”, *Biotechnology and bioengineering*, 49(1), 101-105.

Liu SC., Liu YX., Webster DA., Wei ML., Stark BC., (1996), “Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas mathophilii*”, *Biotechnol Bioeng* 49:101–5.

Magnolo S.K., Leenutaphong D.L., Demodena J.A., Curtis J.E., Bailey J.E., Galazzo J.L., Hughes D.E., (1991), “Actionrhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin”, *Bio/Technology*, vol. 9, no. 5, p. 473-476.

Metin M., (2005), “Süt Teknolojisi - Sütün Bileşimi ve İşlenmesi”, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33, E.Ü. Basımevi, Bornova, İzmir, 802.

Mohanty S.M., Behera S., Swain M.R., Ray R.C., (2009), “Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation”, *Appl. Energy.*, 86, 640–644.

Oruç N., (2008), “Şeker Pancarından Alternatif Yakıt Kaynağı Olarak Biyoetanol Üretimi: Eskişehir Şeker-Alkol Fabrikası”, VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, 17-19 Aralık, İstanbul.

O'Dwyer J.P., (2005), “Developing a Fundamental understanding of biomass structural features responsible for enzymatic digestibility”, University of Louisiana-Lafayette.

Ozcan T., Delikanli B., (2011), “Gıdaların Tekstürel Özelliklerinin Geliştirilmesinde Peynir Altı Suyu Protein Katkılarının Fonksiyonel Etkileri”, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 25, Sayı 2, 77-88.

Park KW., Kim KJ., Howard AJ., Stark BC., Webster DA., (2002) “*Vitreoscilla* hemoglobin binds to subunit I of cytochrome *bo* ubiquinol oxidases”, *J Biol Chem* 277:33334–33337.

Pihlanto A. and Korhonen H., (2003), “Bioactive peptides and proteins. *Advances Food and Nutrition Research*”, Vol.47: 175-276.

Rech R., Cassini C.F. and Ayub M. A. Z., (1999)., “Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*”, *J. Ind. Microbiol.*, 23, 91-96.

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

Patel S.M., Stark B.C., Hwang K.W., Dikshit K.L., Webster D.A., (2000), "Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia* sp. Strain DNT for enhancement of 2,4 –dinitrotoluene degradation", *Biotechnol Prog.*, 16, 26–30.

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

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

Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S. J., (1995), "Principles of Fermentation Technology", 2nd ed., Pergamon, U. K., 357.

Tsai PS., Rao G., Bailey JE., (1995), "Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential", *Biotechnol Bioeng.* 47(3):347e54.

Wakabayashi S., Matsubara H., Webster DA., (1986,) "Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*", *Nature*, 322:481–3.

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

Wyman C., (1994), "Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation", *Appl. Biochem Biotechnol* 45/46:897-915.

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

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

Yenigün O., Mutlutürk G., (1991), "Peyniraltı suyu atık giderimi ve peyniraltı suyundan biyogaz eldesi", *Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu*, İstanbul, 536-549.

Yigit N., (2007), "Peyniraltı Suyundan Sürekli Sistemde Biyogaz Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi", *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra ÖZÇELİK, 24 Haziran 1988 tarihinde doğdu. 2006 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve aynı zamanda pedagojik formasyon sertifikasını alarak 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine kabul edildi.