



Bakteriyel Hemoglobin Ekspres Eden İmmobilize *Escherichia coli* Suşunun Malt Özütünden Biyoetanol Elde Etmede Kullanımının Araştırılması

Gamze ŞEKER , Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ* 

¹Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli

*Sorumlu Yazar: akbasm@gtu.edu.tr

Geliş Tarihi: 23.03.2022 Düzeltme Geliş Tarihi: 27.04.2023 Kabul Tarihi: 02.05.2023

ÖZ

Biyoetanol üretiminde mevcut hammaddelere, mikroorganizmalara ve yöntemlere alternatiflerin araştırılması önem gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışma ile etanol üreticisi *Escherichia coli* FBR5 ve bu suşun *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) ekspres eden türevi olan TS4 suşlarının fermentasyon ortamı olarak malt özütü (MEM) ve maltoz-glukoz (MGM) besiyerlerinin kullanılması ile biyoetanol eldesinde etkinliği araştırılmıştır. Ayrıca çeşitli mikrobiyal metabolitlerin üretiminde verimi arttırdığı bilinen aljinat aracılı hücre immobilizasyonunun bu bakterilerin biyoetanol üretkenliklerine etkisi değerlendirilmiştir. VHb ekspresyonu ve immobilizasyonun birlikte kullanımının MEM besiyerinde 72 saat sonunda *E. coli* TS4 suşunun etanol üretimini (23.67 g L^{-1}) FBR5 suşu ile elde edilenden %58'e varan oranlarda arttırdığı belirlenmiştir. Böylece VHb ekspresyonunun ve hücre immobilizasyonunun malt özütü gibi bir kaynaktan biyoetanol üretimini arttırmada etkin bir strateji olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, arpa malt özütünün biyoetanol üretiminde potansiyel alternatif bir karbon kaynağı olabileceği görülmüştür. Sonuç olarak bakteriyel hemoglobin ekspres eden *E. coli* suşunun immobilize formdaki hücrelerinin arpa malt özütünden etanol üretimini arttırmada ümit verici bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel hemoglobin, VHb, malt özütü, bakteriyel fermentasyon.

Investigation of the Use of Bacterial Hemoglobin Expressing Immobilized *Escherichia coli* Strain for Bioethanol Production from Malt Extract

ABSTRACT

It is important to investigate alternatives to existing raw materials, microorganisms and methods in bioethanol production. For this purpose, in the present study, the efficiency of ethanol producer *Escherichia coli* FBR5 and its *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) expressing version TS4 strains were investigated in bioethanol production by using malt extract (MEM) and maltose-glucose (MGM) media as fermentation media. In addition, the effect of alginate-mediated cell immobilization, known to have enhancement effect on the production of various microbial metabolites was evaluated for the bioethanol production of these bacteria. In the study, it was determined that in combination with VHb expression and immobilization enhanced ethanol production by *E. coli* TS4 strain (23.67 g L^{-1}) by up to 58% in MEM medium compared to that of FBR5 strain in 72 hours. Thus, it was determined that VHb expression and cell immobilization is an effective strategies to increase bioethanol production from a source such as malt extract. In addition, it was seen that barley malt extract could be a potential alternative carbon source in bioethanol production. As a result, it was determined that immobilized cells of *E. coli* strain expressing bacterial hemoglobin could be a promising approach to increase ethanol production from barley malt extract.

Key words: Bacterial hemoglobin, VHb, malt extract, bacterial fermentation.

GİRİŞ

ABD, Brezilya, Çin ve Kanada gibi bazı endüstriyel ülkeler fosil yakıt kullanımında kısıtlamaya ve biyoetanol kullanımını yaygınlaştırmaya yönelmektedirler (Zabed ve ark., 2017). Biyoetanol, fermentatif mikroorganizmalar tarafından çeşitli karbon kaynaklarını kullanması sonucu üretilen bir biyoyakıttır. Yüksek nişasta içerikli bitkilerin ham madde olarak kullanılması biyoetanol üretiminde oldukça yaygındır. Mısır, buğday, kasava, patates ve tatlı patates biyoetanol üretiminde kullanılan nişastalı enerji bitkilerinin en bilinenlerindedir (Balat, 2011). Nişasta içeren ham maddeler fermentasyon öncesi mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilir şekerlerin eldesi için enzimatik hidrolize maruz bırakılmaktadır (Salimi ve ark., 2019). Bu uygulama tüm fermentasyon işleminin maliyetinin artmasına neden olmaktadır (Woiciechowski ve ark., 2002). Arpa tohumları (*Hordeum vulgare*) bolca nişasta içermektedir. İçerdiği bu nişasta, arpanın çimlenmesi ile etkinleşen enzimleri sayesinde parçalanmaktadır. Diğer tahıllarda kendi nişastalarını hidroliz edecek etkinlikte ve miktarda enzim bulunmadığından arpa bu özelliği ile diğer tahıllardan ayrılmaktadır (Durgun ve Kılıç, 1978). Elde edilen malt özütü fermente edilebilir maltoz, glukoz, dekstrinler, azotlu bileşikler, mineraller, pentozlar, maltotriozlar ve tetraozlarca zengin hale gelmiş olur (Schormüller, 1974).

Biyoteknolojik olarak değiştirilmiş mikroorganizmaların endüstriyel biyoetanol üretiminde kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır (Scully ve Orlygsson, 2015). Keşfedilen ve karakterizasyonu yapılan ilk prokaryotik hemoglobin olan *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb)'nin özellikle oksijenin sınırlı olduğu koşullarda solunum metabolizmasını desteklediği ve hücre içinde farklı metabolik yolları etkinleştirdiği bilinen *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) birçok mikroorganizmaya aktarılmıştır. Bu sayede hidroksialkonat (Liu ve ark., 2011), metiyonin- γ -liyaz (Kahraman ve ark., 2011), L-arjinin (Xu ve ark., 2011), ramnolipid (Kahraman ve Erenler, 2012) ve Poli- γ -glutamik asit (Zhang ve ark., 2013) gibi mikrobiyal metabolitlerin üretimlerinin arttığı belirlenmiştir. Bu kapsamda son yıllarda etanol üreticisi *E. coli* FBR5 ve VHb ekspresyonu yapan TS3 ve TS4 suşları kullanılarak patates işleme atık suyu hidrolizatı, peyniraltı suyu ve tozu, şeker pancarı melası, lignoselülozik mısır atığı ve patates nişastasının kullanıldığı çalışmalarla, VHb ekspresyonu ile etanol üretiminin artabildiği belirlenmiştir (Abanoz ve ark., 2012; Şar ve ark., 2017; Şar ve Akbaş, 2016; Sümer ve ark., 2015).

Aljinat ile hücre immobilizasyonu metabolit üretimini arttırmak veya inkübasyon esnasında ortaya çıkan bazı sorunları çözmek amacıyla kullanılan bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu sayede, immobilize mikrobiyal hücreler canlılıklarını olumsuz ortam koşullarına karşın sürdürebilmektedir (Park ve Chang, 2000). Ayrıca fermentasyon sonrası hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak da immobilizasyon sayesinde kolaylaşmaktadır (Kosseva, 2011). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda VHb ekspresyonu ve hücre immobilizasyonu ile ayrı ayrı veya birlikte uygulamasının malt özütü içeren ortamda biyoetanol üretimindeki etkileri incelenmemiştir. Bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobininin ekspresyonun ve/veya hücre immobilizasyonunun malt özütü içeren besiyeri (MEM) kullanılarak *Escherichia coli* FBR5 (*vgb*-) ve TS4 (*vgb*+) suşlarının biyoetanol üretim etkinlikleri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada, USDA laboratuvarlarından temin edilmiş *pdc* ve *adhb* genlerini içeren pLOI297 plazmid ile transforme edilen *Escherichia coli* FBR5 suşu (Dien ve ark., 2000) ve FBR5 suşunun *vgb* geni içeren pTS4 plazmid ile transforme edilmesi ile elde edilen TS4 suşu (Sanny ve ark., 2010) fermentatif mikroorganizmalar olarak kullanılmıştır. Önkültür ve fermentasyon besiyerlerine FBR5 suşu için 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampisilin, TS4 suşu için ise 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampisilin ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamisin ilave edilmiştir (Sanny ve ark., 2010).

Besiyerleri ve hazırlanışları

Malt özütü yerel bir üretim tesisinden temin edilmiştir. HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) analizleri sonucunda malt özütünü %9 maltoz ve %2 glukoz (w/v) içerdiği saptanmıştır. Ön çalışmalar sonucu test mikroorganizmaları ile yapılacak fermentasyonlar için uygun malt özütü şeker konsantrasyonunun %4.5 maltoz ve %1 glukoz (w/v) olduğu belirlenmiştir.

Malt özütü besiyerinin (MEM) hazırlanması

Besiyeri oluşturmak üzere malt özütü 121 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Ardından soğutulup, steril koşullarda 4100 rpm dönme hızına 16 dakika boyunca 4 °C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Üst sıvıya final şeker konsantrasyonu %4.5 maltoz (w/v), %1 glukoz (w/v) olacak şekilde (55 g L⁻¹ toplam şeker); % 0.5 maya özütü (w/v), 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, 0.1 g L⁻¹ CaCl₂ ve 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ilave edilmiştir.

Maltoz-glukoz besiyerinin (MGM) hazırlanması

MEM besiyerine ek olarak MEM'in içerdiği şeker miktarı ile aynı olacak şekilde maltoz (%4.5 w/v), glukoz (%1 w/v) (55 g L⁻¹ toplam şeker) mineral karışımı (0.5 g L⁻¹ MgSO₄, 0.1 g L⁻¹ CaCl₂ ve 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄) ve maya özütü (%0.5 w/v) içeren bir besiyeri (MGM) hazırlanmıştır. Bu besiyeri ile, MEM'in içerdiği fermente edilebilir şekerler harici toplam besin ve/veya mineral içeriklerinin fermentasyonu arttırmada etkisi değerlendirilecektir.

Kalsiyum aljinatta hücre immobilizasyonu

16 saatlik kültürlerden ayrılan örnekler 1600 rpm dönme hızında 4 °C sıcaklıkta 16 dakika boyunca santirfuj edilerek çöktürülmüştür. Elde edilen pellet %0.9 NaCl çözeltisi ile seyreltilmiştir. Aljinat süspansiyonu (%6 w/v), hücre süspansiyonu ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak finalde %3 aljinat içeren bir hücre karışımı elde edilmiştir. Hücre-aljinat karışımı 1000 µL'lik bir mikropipet kullanılarak 3-4 mm çaplı boncuklar elde edilecek şekilde yaklaşık 400 rpm dönme hızında manyetik karıştırıcı ile karıştırılan %3 CaCl₂ solüsyonuna damlatılmıştır. Boncukların polimerizasyonu oda sıcaklığında 1 saat boyunca sürdürülmüştür. 3-4 mm çapında oluşmuş boncuklar steril saf su ile yıkanmış ve aynı gün kullanılmıştır (Ivanova ve ark., 2011).

Serbest ve immobilize hücrelerle fermentasyon

İnkübasyon, %20 havalandırmalı mikroaerofilik koşullarda 100 mL hacimlik Erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Final hücre yoğunluğu 0.05 OD₆₀₀ olacak şekilde ayarlanmış serbest hücreler, 80 mL MEM veya MGM besiyerleri içerisinde inkübe edilmiştir. Immobilize hücreler ise 100 mL hacimlik erlenlere 64 mL MEM veya MGM besiyeri eklenmiş, kültür içerisinde final hücre yoğunluğu 0.05 OD₆₀₀ olacak şekilde önceden ayarlanmış 16 mL immobilize hücre içeren 320 adet boncuk ilave edilmiştir. Serbest ve immobilize hücre kültürleri bir orbital karıştırıcılı inkübatörde MEM veya MGM besiyerlerinde 180 rpm çalkalama hızında 37 °C sıcaklıkta 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Analitik yöntemler

Serbest ve immobilize hücreler için, optik yoğunluklar (OD₆₀₀), besiyerlerindeki şeker miktarları ve fermentasyon sonunda tüketilen şeker miktarları (g L⁻¹) ile üretilen etanol miktarları (g L⁻¹) 48 ve 72 saatlik fermentasyonlar sonunda ölçülmüştür.

Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

Fermentasyon ortamındaki hücre yoğunlukları (OD₆₀₀) bir spektrofotometre (Shimadzu UV Spectrophotometer, UV 1800) aracılığı ile ölçülmüştür.

Şeker ve etanol miktarlarının HPLC analizi ile belirlenmesi

Besiyerinde üretilen etanol, fermentasyon başlangıcında bulunan ve sonunda kalan maltoz ve glukoz miktarları HPLC ile (Shimadzu 10A, Shimadzu, Columbia, MD), NH₂ kolonu (Interstil NH₂ column, 5 mm, 4.6×250 mm, GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japan) ve refraktif indeks dedektörü (RID-10A) kullanılarak ölçülmüştür. Farklı oranlarda (%0.5-5) maltoz, glukoz ve etanol standartları cihaza tanımlanmıştır. Örnekler analiz öncesi 10000 rpm dönme hızında 10 dakika boyunca santrifuj edilmiştir. Ardından üst sıvı 22 µm por çaplı filtre ile süzülerek cam HPLC tüplerine aktarılmıştır. Mobil faz olarak ultra saf su ile hazırlanan %60 (v/v) asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. İnjesiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 25 °C ve akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır (Şar ve ark., 2017).

Fermentasyon parametrelerinin hesaplanması

Etanol miktarı (g L⁻¹), substrat tüketimi (%) ve etanol verimi (%) aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\text{Etanol Miktarı (g/L)} = \text{Ethanol Miktarı (\%v/v)} \times 7.9 \quad (1)$$

$$\text{Substrat Tüketimi (\%)} = \frac{\text{Tüketilen Şeker (g/L)}}{\text{Toplam Şeker (g/L)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Etanol Verimi (\%)} = \frac{\text{Etanol Miktarı (g/L)}}{\text{Tüketilen Şeker Miktarı (g/L)}} \times 100 \quad (3)$$

Bakteriyel hemoglobin (VHb) miktarının belirlenmesi

TS4 suşu tarafından sentezlenen VHb miktarı indirgenmiş/indirgenmemiş (Webster ve Liu, 1974) fark spektrasına dayanarak (Khosla ve Bailey, 1988) bir spektrofotometre cihazı ile fermentasyon sonlarında (72 saat) ölçülmüştür. Sonuçlar nmol g⁻¹ yaş ağırlık cinsinden hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA**MEM ve MGM besiyerlerinde inkübasyon sonu hücre biyokütlesi (OD₆₀₀)**

Fermentasyonda biyokütle artışının kontrolünü sağlamak oldukça önemlidir. Ortamda bulunan karbon kaynağının biyokütle artışına istenilen seviyenin dışında harcanması metabolitlerin üretimini etkileyebilir. Bu çalışmada inkübasyon, ortamda kalan şeker miktarı ve hücre yoğunluğundaki artış takip edilerek fermentasyon 72 saat sürdürülmüştür. MEM besiyerinde en yüksek biyokütle artışının serbest ve immobilize hücrelerle TS4 suşu tarafından 72 saat sonunda sırasıyla 6.79 ve 7.94 (OD₆₀₀) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Biyokütle miktarının MGM besiyerinde MEM besiyerinden daha düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 1). MGM besiyerinde serbest hücrelerde 72 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek hücre yoğunluğunun FBR5 suşu 4.49 (OD₆₀₀) ile elde edildiği belirlenmiştir. Immobilize edilmiş hücrelerle ise en yüksek hücre yoğunluğunun MGM besiyerinde 72 saat sonunda 4.69 (OD₆₀₀) olarak FBR5 suşu ile elde edildiği gözlemlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Serbest (SH) ve immobilize formdaki (İH) *E. coli* FBR5 ve TS4 suşları ile malt özütü (MEM) ve maltoz-glukoz (MGM) besiyerlerinde 48 ve 72 saatlik fermentasyonlar sonunda biyokütle (OD₆₀₀), etanol (%v/v; g L⁻¹), birim hücre başına etanol üretimi (EtOH/biyokütle, g 100 mL⁻¹/OD₆₀₀) ve tüketilen şeker (g L⁻¹) miktarları. Her değer üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içinde ilgili değerın standart sapması belirtilmiştir.

Süre (Saat)	Hücre Tipi	Suşlar	Biyokütle (OD ₆₀₀)	EtOH (%v/v)	EtOH (g L ⁻¹)	EtOH/Biyokütle (g 100 mL ⁻¹ /OD ₆₀₀)	Tüketilen Şeker (g L ⁻¹)	
MEM	48	SH	FBR5	5.15 (0.16)	2.14 (0.01)	17.08 (0.11)	0.33 (0.01)	38.15 (0.35)
			TS4	5.33 (0.29)	1.86 (0.18)	14.85 (1.47)	0.28 (0.04)	37.15 (3.18)
		İH	FBR5	4.68 (0.84)	1.79 (0.17)	14.28 (1.35)	0.28 (0.08)	34.10 (5.94)
			TS4	4.70 (0.14)	1.80 (0.01)	14.37 (0.11)	0.28 (0.02)	27.90 (3.11)
	72	SH	FBR5	6.22 (0.16)	1.89 (0.21)	15.09 (2.15)	0.33 (0.02)	47.60 (0.14)
			TS4	6.79 (0.91)	2.65 (0.17)	21.11 (1.75)	0.31 (0.03)	46.80 (4.10)
		İH	FBR5	7.50 (0.97)	1.88 (0.06)	15.05 (0.62)	0.20 (0.02)	34.30 (0.57)
			TS4	7.94 (0.91)	2.97 (0.05)	23.67 (0.51)	0.30 (0.03)	48.20 (0.00)
MGM	48	SH	FBR5	4.15 (0.14)	1.73 (0.07)	13.81 (0.56)	0.33 (0.02)	19.90 (0.42)
			TS4	1.26 (0.48)	1.01 (0.05)	8.02 (0.40)	0.69 (0.30)	3.70 (0.14)
		İH	FBR5	4.31 (0.06)	1.19 (0.03)	9.50 (0.23)	0.22 (0.00)	38.15 (0.35)
			TS4	0.58 (0.07)	0.77 (0.11)	6.11 (0.85)	1.07 (0.28)	37.15 (3.18)
	72	SH	FBR5	4.49 (0.09)	1.69 (0.04)	13.45 (0.28)	0.30 (0.01)	30.6 (1.13)
			TS4	1.88 (0.08)	0.98 (0.01)	7.78 (0.06)	0.22 (0.02)	27.75 (1.91)
		İH	FBR5	4.69 (0.33)	1.88 (0.00)	15.01 (0.00)	0.32 (0.02)	11.00 (0.71)
			TS4	0.55 (0.11)	0.90 (0.11)	7.14 (0.85)	1.31 (0.12)	19.95 (1.06)

Besiyeri zenginliğinin serbest ve immobilize hücrelerle etanol üretimine etkisi

Bu çalışmada, fermentasyon etkinliği incelenmek üzere 55 g L⁻¹ fermente edilebilir şeker ve takviyeler içeren malt özütü besiyeri (MEM) oluşturulmuştur. Fermentasyon maliyetini düşük tutmak amacıyla her iki besiyerine de sadece 5 g L⁻¹ maya özütü ilave ederek azot kaynağı takviyesi yapılmıştır. Fermentasyon ortamının maya özütü ve peptonla desteklendiğinde şeker tüketiminin ve etanol üretiminin arttığı bilinmektedir (Ortiz-Muñiz ve ark., 2010; Pérez-Carrillo ve ark., 2011; Harde ve ark., 2014). Arpadan malt özütü elde edilirken,

çimlenme ile enzimatik aktivitenin artması sonucunda, şeker ve azotlu madde miktarı yükselir (Durgun, 2008; Durgun ve Kılıç, 1978). Bu nedenle tek tip azot kaynağı ile destek sağlanmasının etanol üretimine etkisini belirlemek önemlidir. Bu çalışmada, malt özütünün içerdiği şeker harici besinlerden ve/veya minerallerden kaynaklı fermentasyonu artırma etkisini değerlendirebilmek için, MEM besiyeri ile aynı oranda ve türde şeker ve takviyeler içeren kontrol besiyeri olarak maltoz-glukoz besiyeri (MGM) hazırlanmış ve aynı koşullarda etanol üretiminde etkinliği değerlendirilmiştir. MEM besiyerinin arpa maltından kaynaklı azot kaynaklarınınca zengin olması, fermentasyon için etkin bir aday besiyeri olabileceğini işaret etmiştir. Hücre biyokütlesi verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, MEM besiyerinin fermentasyonu desteklemede etkili bir besiyeri olduğu görülmektedir. İmmobilize FBR5 (*vgb-*) hücreleri ile gerçekleştirilen uygulamanın 72 saatlik etanol üretimleri hariç tüm uygulamalarda (serbest ve immobilize hücrelerle) MGM ile karşılaştırıldığında, MEM besiyerinin kullanımı, FBR5 ve TS4 suşlarının etanol üretimine sırasıyla %0-50 ve %84-230 oranlarında artışa neden olmuştur. En yüksek etanol miktarı artışı %230 oranı ile immobilize TS4 suşu tarafından 72 saat sonunda elde edilmiştir (23.67 g L⁻¹ etanol). Zayıf içerikli kontrol besiyeri MGM'nin etanol üretimine katkısı görülmemiştir. Aksine serbest ve immobilize FBR5 suşunun serbest ve immobilize TS4 suşundan sırasıyla %72 ve %11 oranında daha fazla etanol ürettiği görülmüştür. Etanol üretiminin belirgin şekilde yüksek olduğu MEM besiyerinin fermentasyon etkinliğinin, malt özütünün mineraller ve azotlu bileşiklerce zengin olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Disakkarit bir şeker olan laktozca zengin peyniraltı suyu tozu ile gerçekleştirilen bir çalışmada da ortamda azot kaynağının yetersiz olmasının biyokütle ve etanol miktarını olumsuz etkilediği rapor edilmiştir (Sar ve ark. 2017). Malt özütü kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon çalışmalarında, genellikle *Saccharomyces* cinsine ait ticari maya suşları kullanılmaktadır. Odibo ve ark. (2002) çalışmalarında, sorgum özsuyundan malt özütü elde edilmiş ve %60 (w/v) fermente edilebilir şeker içeren malt özütü kullanılmıştır. *Saccharomyces uvarum* ile gerçekleştirilen bu çalışmada ortamda 3 g L⁻¹ malt özütü olacak şekilde 6 gün boyunca fermentasyon sürdürülmüş ve sonuçta 34.3 g L⁻¹ etanol üretildiği belirlenmiştir (Odibo et al., 2002). Capece ve ark.'nın (2021) çalışmasında, farklı malt özütleri *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces* olmayan 4 maya suşunun farklı kombinasyonlarını içeren karışık kültürlerinin, etanol üretim kapasiteleri değerlendirilmiştir. Kullanılan malt özütü türüne bağlı olarak saf kültürle 24.6-25.5 g L⁻¹; karışık kültürle ise 20.9-25.9 g L⁻¹ etanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Capece ve ark., 2021). Fermentasyon etkinlikleri yüksek olduğunu bilinen maya suşları ile karşılaştırıldığında benzer oranlarda etanol elde edilmesi nedeniyle bu çalışmada kullanılan *vgb* eksprese eden *E. coli* TS4 suşunun biyoetanol eldesinde etkili bir mikroorganizma olduğu söylenebilir.

Bakteriyel hemoglobinin etanol üretimine etkisi

Oksijen taşınmasını hızlandırdığı bilinen VHB, enerji üretiminde önemli ATP ve NADH gibi elementlerin üretimini arttırarak enerji kazanımını arttırır ve dolayısı ile hücre üremesine ve hücrelerin metabolit üretimine destek sağlar (Stark et al., 2012; Sar ve ark., 2017). Bu çalışmada zengin içerikli MEM besiyerinde, serbest TS4 suşunun (21.11 g L⁻¹) serbest FBR5 suşundan (15.09 g L⁻¹) %40 daha fazla etanol ürettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde immobilize TS4 suşunun (23.67 g L⁻¹) da immobilize FBR5 suşundan (15.05 g L⁻¹) %58 daha fazla etanol ürettiği saptanmıştır. Çeşitli bitkisel veya hayvansal kaynaklı atıklardan oluşturulan besiyerleri ile *vgb*'nin etanol üretimini arttırıcı etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Patates işleme atığı (%18) (Abanoz ve ark., 2012), peyniraltı suyu tozu ile şeker pancarı melası (%17-362 ve %21-419) (Akbaş ve ark., 2014) ve mısır atığı hidrolizatı ile ilave şekerler varlığında (glukoz ilavesi ile %15, ksiloz ilavesi ile %10) (Sanny ve ark., 2010) gerçekleştirilen çalışmalarla da hemoglobin ekspresyonunun etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir.

İmmobilizasyonun etanol üretimine etkisi

İmmobilizasyon mikroorganizma için yüksek üretkenlik, inhibitör ve toksik bileşiklere karşı dayanım ve enzimlerin spesifik aktivitelerinde artışa neden olarak fermentasyonun daha etkin gerçekleşmesine neden olmaktadır (Zhu, 2006). Aljinat, temin edilmesi ve polimerizasyon koşullarının kolay olması nedeniyle hücre immobilizasyonunda en yaygın kullanılan matrikslerin başında gelmektedir. Biyoetanol üretiminde etkinliği bilinen aljinatın, şeker kamışı melası (Ghorbani ve ark., 2011), mahula bitkisinin çiçekleri (Swain ve ark., 2007) veya peyniraltı suyu tozundan (Şar ve ark., 2017; Şar ve Akbaş, 2019) etanol üretimini arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada, MEM besiyerinde serbest ve immobilize hücreler ile en yüksek etanol üretimi, 72 saat sonunda TS4 suşu ile sırasıyla 21.11 g L⁻¹ ve 23.67 g L⁻¹ miktarlarında gerçekleşmiştir (Çizelge 1). 72 saatte immobilizasyonun etanol üretimine TS4 suşunda etkisinin %12 oranında olduğu belirlenmiştir. FBR5 suşunun serbest ve immobilize hücreleri ile eşit miktarda (yaklaşık 15 g L⁻¹) etanol üretilmiştir. Zayıf içerikli MGM besiyerinde ise en fazla immobilize FBR5 hücreleri (15.01 g L⁻¹) ile serbest FBR5 hücrelerinden (13.45 g L⁻¹) %11; TS4 suşu ile ise serbest hücrelerden daha fazla etanol üretilmediği belirlenmiştir. Sonuç olarak immobilizasyonun etanol üretimini arttırıcı etkisi zengin içerikli MEM besiyerinde belirgin bir şekilde görülmüştür. Bir başka çalışmada ise fermentasyon ortamı elde etmede yağlık palmye ağacının gövdesinden elde edilen hidrolizat kullanılmış ve

biyoetanol üretimi serbest ve immobilize *S. cerevisiae* SC90 hücreleri aracılı gerçekleştirilmiştir. Immobilize hücreler ile serbest hücrelerden %22 oranında daha fazla etanol üretimi sağlandığı görülmüştür (Wilaitup ve ark., 2022). Immobilizasyonun metabolit üretimindeki arttırıcı etkisi hücreyi ortamda oluşan çeşitli metabolitlerden izole etmesi, besinlerin boncuk içerisine kontrollü alımı, ürünlerin ortama kontrollü salınımı, değişen ortam koşullarından hücreleri koruması ile hücre stabilitesini arttırması sayesinde gerçekleşmektedir (Kourkoutas ve ark., 2004; Duarte ve ark., 2013). Değişen koşullardan daha az etkilenen immobilize hücrelerin daha yüksek substrat konversiyonu sağlaması ile etanol üretimi olumlu etkilenmektedir (Kourkoutas ve ark., 2004; Duarte ve ark., 2013).

Bakteriyel hemoglobinin ve immobilizasyonun etanol üretimine birlikte etkisi

Immobilizasyonun hemoglobin ekspresyonu ile birlikte etanol üretimine etkisini değerlendirmek amacıyla serbest FBR5 (*vgb-*) ve immobilize TS4 (*vgb+*) suşlarının etanol üretimleri karşılaştırılmıştır. MEM besiyerinde immobilizasyon ve *vgb* ekspresyonunun birlikte kullanımı sonucu, TS4 suşu ile 72. saat sonunda etanol üretimini %58 arttırdığı belirlenmiştir. (Çizelge 1). MGM besiyerinde etanol üretiminin immobilize hücrelerle FBR5 suşu ile, TS4 suşu ile elde edilenden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Böylelikle immobilizasyon ve VHB ekspresyonunun birlikte zayıf içerikli MGM besiyerinde etkin etanol üretimini sağlamada önemli bir artışa neden olmadığı fakat zengin içerikli MEM besiyerinde etanol üretimini arttırmada kullanılabilecek etkili biyoteknolojik yöntemler oldukları saptanmıştır. Bir başka çalışmada, peyniraltı suyu tozu ve maya özütü kullanılarak oluşturulan besiyerleri içerisinde serbest ve immobilize *E. coli* FBR5 ve *vgb* eksprese eden *E. coli* TS3 suşlarının fermentasyon kapasiteleri değerlendirilmiştir. En yüksek etanol üretiminin gerçekleştiği WPM6 besiyerinde, 72 saatlik fermentasyon sonucu immobilize *E. coli* TS3 suşu ile yaklaşık 23 g L⁻¹ etanol elde edilmiştir (Şar ve ark. 2017). Mevcut çalışma ile karşılaştırıldığında, WPM6 besiyerinin içerdiği şeker miktarının daha yüksek olmasına rağmen (80 g L⁻¹) *vgb* eksprese eden TS3 suşu 72 saat sonunda, daha az miktarda şeker içeren MEM besiyerinde (55 g L⁻¹) hemoglobin eksprese eden TS4 suşu ile benzer miktarlarda (23.67 g L⁻¹) etanol ürettiği görülmüştür.

MGM ve MEM besiyerlerinde substrat tüketimi ve etanol verimi

Çalışmada kullanılan suşların, MEM besiyerinde substratı yüksek oranda tükettikleri belirlenmiştir. Substrat tüketiminin serbest hücrelerle en yüksek %87 oranında FBR5 suşu ile, immobilize hücreler ile ise %88 oranında TS4 suşu tarafından gerçekleştirildiği saptanmıştır. En yüksek etanol veriminin ise immobilize TS4 suşu ile %49 olduğu ve 72. saatin sonunda sağlandığı görülmüştür (Çizelge 2).

Çizelge 2. Serbest (SH) ve immobilize formdaki (İH) *E. coli* FBR5 ve TS4 suşları ile malt özütü (MEM) ve maltöz-glukoz (MGM) besiyerlerinde 72 saatlik fermentasyonlar sonunda etanol verimi (%) ve substrat tüketim (%) değerleri. Her değer üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içinde ilgili değerlerin standart sapması belirtilmiştir.

	Hücre Tipi	Suşlar	Etanol Verimi (%)	Substrat Tüketimi (%)
MEM	SH	FBR5	28 (4.40)	87 (0.26)
		TS4	45 (0.22)	85 (7.46)
	İH	FBR5	44 (1.09)	62 (1.03)
		TS4	49 (1.05)	88 (0.00)
MGM	SH	FBR5	44 (0.70)	56 (2.06)
		TS4	28 (1.73)	50 (3.47)
	İH	FBR5	137 (8.79)	20 (1.29)
		TS4	36 (2.43)	36 (1.93)

MGM besiyerinde en yüksek substrat tüketimi %56 oranı ile serbest FBR5 tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu uygulama sonucu %44 etanol verimi elde edilmiştir (13.45 g L⁻¹). MGM besiyerinde gözlenen en yüksek etanol verimi ise %137 oranı ile immobilize FBR5 suşu tarafından elde edilmiştir. % 20 substrat tüketimi (11 g L⁻¹ şeker) gerçekleşmiştir ve tüketilen substrattan yüksek oranda etanol gerçekleştirilmesi nedeniyle etkin bir üretim miktarı sağlansa da (15.01 g L⁻¹ etanol) böyle yüksek bir etanol verimi elde edilmiştir. Bunun sebebi besiyerinde

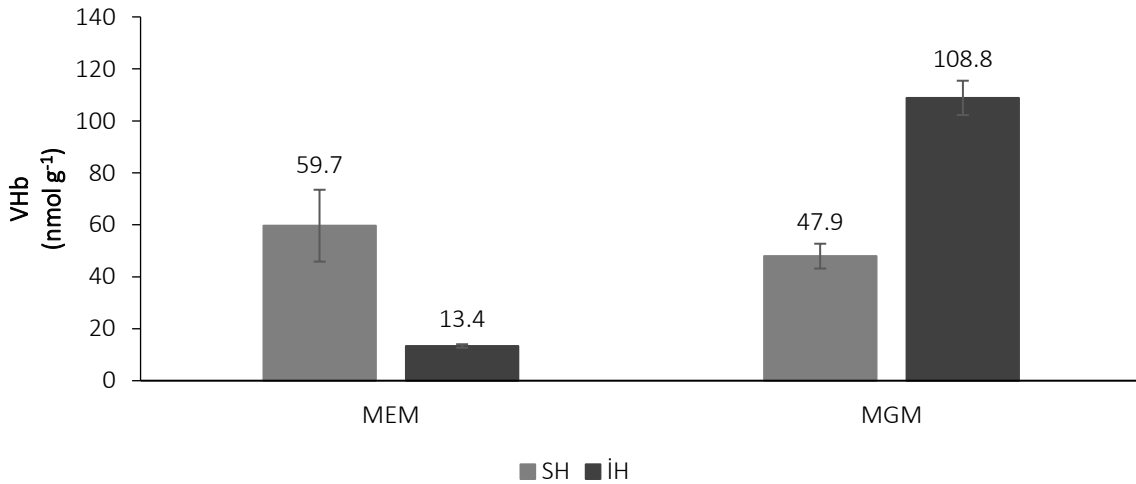
bulunan maya özütündeki karbonun da etanol üretiminde az da olsa kullanımı olabilir (Ortiz-Muñiz ve ark., 2010; Pérez-Carrillo ve ark., 2011; Harde ve ark., 2014).

MGM ve MEM besiyerlerinde birim hücre biyokütlesi başına etanol eldesi

Fermentasyonda kullanılan iki besiyeri içerisinde MEM besiyerinde 72. saatin sonunda immobilize TS4 suşu ile ve MGM besiyerinde ise 48 ve 72 saatin sonunda hem immobilize hem de serbest TS4 suşu ile birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin daha fazla olduğu olduğu saptanmıştır. En yüksek birim hücre biyokütlesi başına etanol üretiminin MGM besiyerinde immobilize formdaki TS4 suşu ile ($1.31 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}/\text{OD}$) elde edildiği görüldü de üretilen etanol miktarının düşük (7.14 g L^{-1}) ve kalan şeker miktarının yüksek (35 g L^{-1}) olması nedeniyle bu etkin bir üretimi ifade etmemektedir (Çizelge 1).

MGM ve MEM besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucu TS4 suşunun eksprese ettiği bakteriyel hemoglobin (VHb) miktarları

MEM besiyerinde 72 saat sonunda serbest formdaki TS4 suşu 59.7 nmol g^{-1} yaş ağırlık VHb üretirken, immobilize TS4 suşu 13 nmol g^{-1} yaş ağırlık VHb üretmiştir (Şekil 1). MGM besiyeri içerisinde ise TS4 suşu serbest formda iken 47.9 nmol g^{-1} yaş ağırlık VHb üretirken immobilize formda ise $108.8 \text{ nmol g}^{-1}$ yaş ağırlık VHb üretmiştir. VHb ekspresyonu ve etanol üretimi ilişkili önceki çalışmalarla da hemoglobin ekspresyonunun belirli miktarlardan fazla olmasının etanol üretiminin ters yönde etkileyebileceğini de rapor edilmiştir (Sanny ve ark., 2010). Söz konusu durumun nedeni, zengin olmayan MGM besiyerinde hücre metabolizmasının etanol üretimi yerine daha çok hemoglobin sentezine yönelmesi olabilir.



Şekil 1. MEM ve MGM besiyerleri içerisinde serbest (SH) ve immobilize (İH) TS4 suşunun VHb (nmol g^{-1}) ekspresyon değerleri.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Alternatif yeni karbon kaynaklarının potansiyellerinin belirlenmesi ticari amaçla biyoetanol üretimini ileri bir boyuta taşıyacaktır. Hammadde çeşitliliğinin olması mevcut kaynakların fiyatlarında düşüğe neden olacaktır. Ekonomik anlamda maliyetin düşürülerek zengin fermentasyon ortamlarının oluşturulabileceği yeni hammaddelerin keşfi ile ülkemizde biyoetanol üretimine yeni yatırımların yapılması konusunda teşvik sağlayacaktır.

Bu çalışma ile ilk kez biyoetanol üretimi bir içecek/gıda sanayi ürünü olan malt özütü içeren fermentasyon besiyerinden immobilizasyon ve VHb ekspresyonunun birlikte kullanılmasıyla etkin bir şekilde artırılması çalışılmıştır. İleriki çalışmalarla biyoetanol üretiminin büyük ölçekli fermentasyon koşullarında denenmesi ile kitlesel üretimin kontrollü koşullar altında sağlanma potansiyeli belirlenmesi önemlidir. Sonuç olarak, arpa malt özütü besiyerinden VHb eksprese eden fermentatif *E. coli* suşları ile etanol üretiminin arttığı ve bakteriyel hemoglobin ekspresyonu ile immobilizasyonun etanol üretiminde avantajlı ve pratik bir araç olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Abanoz, K., Stark, B. C., ve Akbas, M. Y. 2012. Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6), 436–443.
- Akbas, M. Y., Sar, T., ve Ozcelik, B. 2014. Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla* hemoglobin expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(4), 687–694.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875.
- Capece, A., De Fusco, D., Pietrafesa, R., Siesto, G., ve Romano, P. 2021. Performance of wild non-conventional yeasts in fermentation of wort based on different malt extracts to select novel starters for low-alcohol beers. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(2), 1–17.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., O’Byrne, P. J., ve Bothast, R. J. 2000. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 84–86, 181–196.
- Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J. S., Valença, G. P., ve Nunhez, J. R. 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3, 1–8.
- Durgun, T. 2008. Malt Ekstraktı Üretimi ve Değerlendirilmesi. *Gıda*, 33(1), 43–51.
- Durgun, T., ve Kılıç, O. 1978. Malt, Maltözü ve Bira Üretiminde Teknoloji ve Bileşim İlişkileri. *Gıda*, 3(4), 139–148.
- Ghorbani, F., Younesi, H., Esmaeili Sari, A., ve Najafpour, G. 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36(2), 503–509.
- Harde, S. M., Bankar, S. B., Ojamo, H., Granström, T., Singhal, R. S., ve Survase, S. A. 2014. Continuous lignocellulosic ethanol production using *Coleus forskohlii* root hydrolysate. *Fuel*, 126, 77–84.
- Ivanova, V., Petrova, P., ve Hristov, J. 2011. Application in the Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast Cells in Matrix of Alginate/Magnetic Nanoparticles, on Chitosan-Magnetite Microparticles and Cellulose-coated Magnetic Nanoparticles. *International Reviews of Chemical Engineering*, 3(March), 289–299.
- Kahraman, H., ve Erenler, S. O. 2012. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* engineered with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 188–193.
- Kahraman, Hüseyin, Aytan, E., ve Kurt, A. G. 2011. Production of methionine γ -lyase in recombinant *Citrobacter freundii* bearing the hemoglobin gene. *BMB Reports*, 44(9), 590–594.
- Khosla, C., ve Bailey, J. E. 1988. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Letters to Nature*, 331, 633–635.
- Kosseva, M. R. 2011. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1089–1118.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., ve Koutinas, A. A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, 21(4), 377–397.
- Liu, F., Jian, J., Shen, X., Chung, A., Chen, J., ve Chen, G. Q. 2011. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* 4AK4 for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate. *Bioresource Technology*, 102(17), 8123–8129.
- Odibo, F. J. C., Nwankwo, L. N., ve Agu, R. C. 2002. Production of malt extract and beer from Nigerian sorghum varieties. *Process Biochemistry*, 37(8), 851–855.
- Ortiz-Muñoz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sanchez, B., ve Aguilar-Uscanga, M. G. 2010. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(10), 1361–1367.
- Park, J. K., ve Chang, H. N. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18(4), 303–319.
- Pérez-Carrillo, E., Cortés-Callejas, M. L., Sabillón-Galeas, L. E., Montalvo-Villarreal, J. L., Canizo, J. R., Moreno-Zepeda, M. G., ve Serna-Saldivar, S. O. 2011. Detrimental effect of increasing sugar concentrations on

- ethanol production from maize or decorticated sorghum mashes fermented with *Saccharomyces cerevisiae* or *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 33(2), 301–307.
- Salimi, E., Saragas, K., Taheri, M. E., Novakovic, J., Barampouti, E. M., Mai, S., Moustakas, K., Malamis, D., ve Loizidou, M. 2019. The Role of Enzyme Loading on Starch and Cellulose Hydrolysis of Food Waste. *Waste and Biomass Valorization*, 10(12), 3753–3762.
- Sanny, T., Arnaldos, M., Kunkel, S. A., Pagilla, K. R., ve Stark, B. C. 2010. Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1103–1112.
- Sar, T., Stark, B. C., ve Yesilcimen Akbas, M. 2017. Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. *Bioengineered*, 8(2), 171–181.
- Sar, T. ve Yesilcimen Akbas, M. 2019. Investigation of Effective Immobilization Method for Ethanol Producing *E. coli* Strain. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 15(2), 217–220.
- Şar, T., ve Akbaş, M. Y. 2016. Biyoetanol Üretimi İçin Gıda İşleme Atıklarının Asit Hidrolizi Acid Hydrolysis of Food Processing Wastes for Bioethanol Production. *Akademik Gıda*, 14(1), 15–20.
- Schormüller, J. 1974. Pflanzliche Lebensmittel. In *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (pp.456-721). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Scully, S. M., ve Orlygsson, J. 2015. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8(1), 1–30.
- Stark, B. C., Dikshit, K. L., ve Pagilla, K. R. 2012. The biochemistry of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210002.
- Sumer, F., Stark, B. C., ve Yesilcimen Akbas, M. 2015. Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using *E. coli* engineered to express *Vitreoscilla* haemoglobin. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(18), 2319–2327.
- Swain, M. R., Kar, S., Sahoo, A. K., ve Ray, R. C. 2007. Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 162(2), 93–98.
- Webster, D. A., ve Liu, C. Y. 1974. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cytochrome o Reductase Associated with Cytochrome o Purified from *Vitreoscilla*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4257–4260.
- Wilaithup, A., Sultan, I. N., Tareen, A. K., Laemsak, N., Sirisansaneeyakul, S., Vanichsriratana, W., ve Parakulsuksatid, P. 2022. Bioethanol production from oil palm trunk fibers using activated immobilized *Saccharomyces cerevisiae* SC90 under simultaneous saccharification and fermentation. *Bioenergy Research*, 1972–1981.
- Woiciechowski, A. L., Nitsche, S., Pandey, A., ve Soccol, C. R. 2002. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: An economic study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(3), 393–400.
- Xu, M., Rao, Z., Xu, H., Lan, C., Dou, W., Zhang, X., Xu, H., Jin, J., ve Xu, Z. 2011. Enhanced production of L-arginine by expression of *Vitreoscilla* hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(6), 707–719.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., ve Faruq, G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(October 2015), 475–501.
- Zhang, W., Xie, H., He, Y., Feng, J., Gao, W., Gu, Y., Wang, S., ve Song, C. 2013. Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances γ -PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 343(2), 127–134.
- Zhu, Y. 2006. Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*, 373–396.